



"El saber de mis hijos  
hará mi grandeza"

# UNIVERSIDAD DE SONORA

FACULTAD INTERDISCIPLINARIA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE SALUD  
DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS Y  
TECNOLÓGICAS

## POSGRADO EN BIOCENCIAS

---

### CULTIVO DE CALLOS DE *Acalypha californica* Bentham Y EVALUACIÓN DE SU ACTIVIDAD ANTIPROLIFERATIVA, ANTIOXIDANTE Y ANTIINFLAMATORIA.

#### TESIS

que para obtener el grado de:

#### DOCTORA EN BIOCENCIAS

presenta:

**LESYANNY HECHAVARRÍA PÉREZ**

Hermosillo, Sonora, México

21 de marzo de 2024

# Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



**"El saber de mis hijos  
hará mi grandeza"**



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

Hermosillo, Sonora a 21 de marzo de 2024.

Asunto: Licencia de uso no exclusiva

**UNIVERSIDAD DE SONORA**  
**P R E S E N T E.**

Por este conducto hago constar que soy autor y titular de la obra denominada "**Cultivo de callos de *Acalypha californica* Bentham y evaluación de su actividad antiproliferativa, antioxidante y antiinflamatoria.**" (LA OBRA), que realicé como trabajo terminal siendo estudiante de Doctorado, como requisito para obtener el Grado de **Doctorado en Biociencias** en la Universidad de Sonora (UNISON), y en justa retribución autorizo a la UNISON, para que divulgue total o parcialmente LA OBRA mediante repositorios, bibliotecas, distribución electrónica y reproducción, así como la digitalización de la misma, con fines educativos, de investigación, de extensión y de difusión de la cultura, las veces que se requieren y en cualquiera otra forma en que a juicio de la UNISON sea necesario utilizarla, sin fines de lucro, en el entendido de que habrá de respetar en todo momento mi autoría y a otorgarme el crédito correspondiente en todas las actividades mencionadas anteriormente.

De la misma manera, manifiesto que el contenido académico, literario, la edición y en general cualquier parte de LA OBRA son de mi entera responsabilidad, por lo que deslindo a la UNISON por cualquier violación a los derechos de autor y/o propiedad intelectual y/o cualquier responsabilidad relacionada con la OBRA del que suscribe, frente a terceros.

Esta autorización es gratuita y la otorgo por un tiempo de cinco años, renovable automáticamente por el mismo periodo, reservándome el derecho de manifestar, en un plazo de cuando menos treinta días naturales previos a su vencimiento, su revocación por escrito dirigido a la Rectoría de la Universidad de Sonora.

Así mismo, esta autorización no es exclusiva y no implica la cesión de mis derechos patrimoniales.

**A T E N T A M E N T E**



Nombre completo y firma: **Lesyanny Hechavarría Pérez**

Departamento Académico: Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas  
Dirección: Luis Donald Colosio s/n, entre Sahuaripa y Reforma. Col Centro, C.P. 83000.  
Hermosillo, Sonora, México.

Correo electrónico y teléfono: [posgrado.biociencias@unison.mx](mailto:posgrado.biociencias@unison.mx) Tel. (662) 2592169.

CULTIVO DE CALLOS DE *Acalypha californica* Bentham  
Y EVALUACIÓN DE SU ACTIVIDAD ANTIPROLIFERATIVA, ANTIOXIDANTE Y  
ANTIINFLAMATORIA.

T E S I S

que para obtener el grado de:  
DOCTORA EN BIOCENCIAS

presenta:

LESYANNY HECHAVARRÍA PÉREZ

Hermosillo, Sonora, México.

21 de marzo del 2024

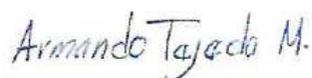
## APROBACIÓN

Los miembros del Comité designado para revisar la tesis intitulada “Cultivo de callos de *Acalypha californica* Bentham y evaluación de su actividad antiproliferativa, antioxidante y antiinflamatoria” presentada por Lesyanny Hechavarría Pérez, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Doctora en Biociencias.



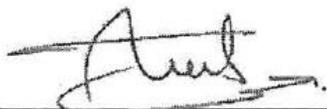
---

Dra. Luisa Alondra Rascón Valenzuela  
Directora y Presidenta



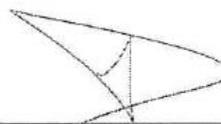
---

Dr. Armando Tejeda Mansir  
Co-Director



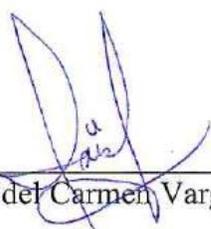
---

Dra. María Guadalupe Burboa Zazueta  
Secretaria



---

Dr. Andrés Ochoa Meza  
Sinodal interno



---

Dra. Irasema del Carmen Vargas Arispuro  
Sinodal externo

## **DEDICATORIA**

A Dios.

A mí, por no rendirme y empezar a creérmela un poquito más.

A mis padres, sin su apoyo y educación no hubiese podido lograr esta meta.

A mi directora de tesis Luisa Alondra Rascón Valenzuela por confiar en mí y arriesgarse, gracias por ser un excelente ser humano y rescatar esta investigación.

A mi co-director y uno de los mejores maestros que he tenido Armando Tejeda Mansir por todo el apoyo, la confianza y preocupación en el proyecto.

A mis amigos, Gildardo Martín Montaña Piña y Thelma Alicia Ortíz Rendón, gracias por empujarme siempre.

A mi hermano Víctor Dayron, tus ocurrencias me alegran la vida.

A mi pareja Julio César Torres Carrillo, gracias por contribuir con mi crecimiento personal.

A todo el que ha confiado en mí y en mis capacidades en este recorrido. Gracias por las buenas vibras.

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Universidad de Sonora y al Posgrado en Biociencias del Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas por todas las facilidades brindadas durante el desarrollo y término de esta tesis de doctorado.

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia Humanidades y Tecnología (CONAHCYT) por haberme otorgado una beca para realizar mis estudios de Doctorado. Gracias por brindarme el apoyo económico, registrado con el número de beca 726102.

Gracias en especial a José Alberto Pérez Burgos y a todos los chicos del laboratorio de Investigación en Productos Naturales por su cooperación y asesoría.

Gracias al Dr. Luis Ángel Medina por la prestación del equipo HPLC para la caracterización de las muestras obtenidas.

## RESUMEN

*Acalypha californica* Bentham es una planta utilizada por grupos étnicos de Sonora para tratar el cáncer, sin embargo, no ha sido cultivada y las actividades antioxidante y antiinflamatoria relacionadas al cáncer no han sido evaluadas. El objetivo del presente trabajo fue cultivar callos de *A. californica* y caracterizar química y biológicamente los extractos etanólicos de callos y planta silvestre generados. Se cultivaron hojas, pecíolos, yemas y segmentos nodales con ácido indol butírico (AIB), bencil amino purina (BAP) y cinetina (CIN) en un intervalo de 0.5-2.0 mg/L. La actividad antiproliferativa se midió mediante el ensayo MTT en las líneas celulares cancerosas humanas A549, HeLa y MCF-7. La actividad antioxidante se evaluó empleando los ensayos DPPH, FRAP y midiendo el contenido de fenoles (TPC) y flavonoides totales (TFC). La actividad antiinflamatoria fue estimada mediante la capacidad inhibitoria del óxido nítrico en macrófagos RAW264.7 estimulados con lipopolisacáridos. Se generaron perfiles químicos utilizando espectrometría de masas (ESI-IT-MS-MS). Los resultados revelaron que a 1.5 mg/L de AIB las yemas fueron el explante más callogénico, con un 55.60 % de inducción. El extracto de callos no mostró actividad antiproliferativa significativa; sin embargo, la planta silvestre presentó valores de  $IC_{50}$  de  $43.4 \pm 2.46$  y  $50.29 \pm 5.36$  en células HeLa y MCF-7 respectivamente. La actividad antioxidante fue significativamente alta mediante DPPH\* y FRAP; aunque el TFC en callos fue bajo  $1.56 \pm 0.25$  mmol QE/g con respecto a plantas silvestres  $11.83 \pm 1.21$  mmol QE/g. El extracto de callos inhibió en un 24% la producción de óxido nítrico; la planta silvestre inhibió significativamente esta producción a 100 y 200  $\mu\text{g/mL}$  mostrando un comportamiento dosis-respuesta. Finalmente, el perfil químico de los callos mostró principalmente ácidos fenólicos y flavonoides simples mientras en la planta silvestre predominaban flavonoides complejos y proantocianidinas; concluyendo que los flavonoides complejos probablemente originan la alta actividad antioxidante y antiinflamatoria de *A. californica*.

**Palabras clave:** *Acalypha californica*, cáncer, compuestos fenólicos, micropropagación.

## ABSTRACT

*Acalypha californica* Bentham is a plant used by ethnic groups in Sonora to treat cancer, however, it has not been cultivated and the antioxidant and anti-inflammatory activities related to cancer have not been evaluated. The objective of the present work was to cultivate *A. californica* calluses and chemically and biologically characterize the ethanolic extracts of calluses and wild plants generated. Leaves, petioles, buds and nodal segments were cultured with indole butyric acid (IBA), benzyl amino purine (BAP) and kinetin (CIN) in a range of 0.5-2.0 mg/L. Antiproliferative activity was measured by MTT assay in human cancer cell lines A549, HeLa and MCF-7. The antioxidant activity was evaluated using the DPPH, FRAP assays and measuring the content of phenols (TPC) and total flavonoids (TFC). The anti-inflammatory activity was estimated by the inhibitory capacity of nitric oxide in RAW264.7 macrophages stimulated with lipopolysaccharides. Chemical profiles were generated using mass spectrometry (ESI-IT-MS-MS). The results revealed that at 1.5 mg/L of IBA the buds were the most callogenic explant, with 55.60% induction. The callus extract did not show significant antiproliferative activity; However, the wild plant presented IC<sub>50</sub> values of 43.4±2.46 and 50.29±5.36 in HeLa and MCF-7 cells respectively. Antioxidant activity was significantly high by DPPH and FRAP; although the TFC in callus was low 1.56±0.25 mmol QE/g compared to wild plants 11.83±1.21 mmol QE/g. The callus extract inhibited nitric oxide production by 24%; The wild plant significantly inhibited this production at 100 and 200 µg/mL, showing a dose-response behavior. Finally, the chemical profile of the callus showed mainly phenolic acids and simple flavonoids while complex flavonoids and proanthocyanidins predominated in the wild plant; concluding that complex flavonoids probably give rise to the high antioxidant and anti-inflammatory activity of *A. californica*.

**Keywords:** *Acalypha californica*, cancer, phenolic compounds, micropropagation.

## INDICE GENERAL

<b>APROBACIÓN</b> .....	i
<b>DEDICATORIA</b> .....	ii
<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	iii
<b>RESUMEN</b> .....	iv
<b>ABSTRACT</b> .....	v
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	viii
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b> .....	x
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>I. ANTECEDENTES</b> .....	3
I.1 Cáncer.....	3
I.1.1 Epidemiología.....	4
I.1.2 Características moleculares del cáncer.....	6
I.1.3 Tratamiento.....	9
I.2 Inflamación.....	10
I.2.1 Relación entre cáncer e inflamación.....	12
I.3 El estrés oxidativo.....	14
I.4 La medicina tradicional como fuente de compuestos activos .....	18
I.4.1 Metabolitos secundarios.....	19
I.4.2 Rutas metabólicas de metabolitos secundarios.....	23
I.4.3 Mecanismo de acción de compuestos fenólicos.....	25
I.5 Cultivos vegetales.....	28
I.5.1 Cultivo de callos .....	31
I.5.2 Producción de metabolitos secundarios <i>in vitro</i> .....	33
I.6 Género <i>Acalypha</i> .....	35
I.6.1 Género <i>Acalypha</i> como fuente de metabolitos bioactivos .....	36
I.6.2 Actividad antiproliferativa y anticancerígena en el género <i>Acalypha</i> .....	37
I.6.3 <i>Acalypha californica</i> .....	39

<b>II. HIPÓTESIS</b> .....	41
<b>III. OBJETIVOS</b> .....	42
III.1 Objetivo general. ....	42
III.2 Objetivos específicos.....	42
<b>IV. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	43
IV.1 Material vegetal.....	43
IV.2 Inducción de callos.....	43
IV.2.1 Porcentaje de inducción de callos y morfología.....	44
IV.3 Preparación del extracto etanólico de callos y planta silvestre de <i>A. californica</i> .....	44
IV.4 Cultivo celular. ....	44
IV.4.1 Actividad antiproliferativa de callos y planta silvestre (ensayos de viabilidad celular). ....	45
IV.5 Contenido de fenoles totales (TPC). ....	46
IV.6 Contenido de flavonoides totales (TFC). ....	46
IV.7 Estabilización del radical DPPH. ....	47
IV.8 Poder Antioxidante Reductor Férrico (FRAP).....	47
IV.9 Actividad antiinflamatoria.....	48
IV.10 Identificación de Compuestos Fenólicos por ESI-IT-MS-MS.....	48
IV.11 Análisis estadístico.....	49
<b>V. RESULTADOS</b> .....	50
V.1 Inducción de callos. ....	50
V.2 Evaluación de la proliferación celular. ....	53
V.3 Actividad antioxidante.....	55
V.4 Actividad antiinflamatoria.....	58
V.5 Identificación de Compuestos Fenólicos por ESI-IT-MS-MS .....	59
<b>VI. DISCUSIÓN</b> .....	63
<b>VII. CONCLUSIONES</b> .....	73
<b>VIII. RECOMENDACIONES</b> .....	74
<b>IX. LITERATURA CITADA</b> .....	75

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Ranking nacional de cáncer como causa de muerte en menores de 70 años en 2019. ....	4
<b>Figura 2.</b> Características del cáncer. Modificado de (Hanahan, 2022). ....	7
<b>Figura 3.</b> Modelo de carcinogénesis de piel de ratón multietapa. Modificado de (Rundhaug y Fischer, 2010) .....	8
<b>Figura 4.</b> Las células del microambiente tumoral. Modificado de (Hanahan y Weinberg, 2011). ....	12
<b>Figura 5.</b> Principales sistemas oxidantes y antioxidantes. NOX, NADPH oxidasa; XO, xantina oxidasa; SOD, superóxido dismutasa; CAT, catalasa; GPX, peróxido de glutatión; GSH, glutatión; GSSG, glutatión reducido; GST, glutatión S-transferasa; H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , peróxido de hidrógeno; ONOO <sup>-</sup> , peroxinitrito; HO·, radical hidroxilo; O <sup>-2</sup> , superóxido; <sup>1</sup> O <sub>2</sub> , oxígeno singlete; Fe <sup>2+</sup> , Hierro (II); Fe <sup>3+</sup> , Hierro (III); ROS, especies reactivas de oxígeno; RNS, especies reactivas de nitrógeno. Modificado de (Liu et al., 2023). ....	17
<b>Figura 6.</b> Diversos estreses bióticos y abióticos afectan el crecimiento y desarrollo de las plantas; por lo que desarrollan mecanismos de defensa para mitigar estas tensiones. Se ejemplifican cuatro tipos de metabolitos secundarios involucrados en varios modos de resistencia. ....	20
<b>Figura 7.</b> Etapas de las reacciones de las plantas a los estreses bióticos y abióticos. Los procesos particulares pueden ser específicos para cada estímulo ambiental, sin embargo, cada uno de ellos conduce a una mejora de la adaptación de la planta al estrés y a una respuesta más eficaz en el futuro. ....	23
<b>Figura 8.</b> Rutas del metabolismo secundario. ....	24
<b>Figura 9.</b> Mecanismo para la regulación de la expresión de genes antioxidantes mediado por Nrf2 en presencia de fitoquímicos. Nrf2 permanece asociado con la proteína Keap1 en la forma del complejo Keap1-Nrf2 en condiciones homeostáticas, por lo tanto, retenido dentro del citoplasma por la proteína Keap1. La interacción de los FQ con la proteína Keap1 desencadena la liberación de Nrf2 del complejo Keap1-Nrf2. Los radicales libres (RL) generados por FQ pueden activar las diversas vías de señalización, lo que puede desencadenar la liberación y translocación de Nrf2 del citosol al núcleo, que es responsable de la expresión de los genes antioxidantes. (FQ- Fitoquímico; AQ-Agente quimiopreventivo; RL-Radicales libres; PQC- Proteína quinasa C; FI3Q-fosfoinositido 3-quinasa; PQAM- proteína quinasa activada por mitógeno; Keap1- proteína 1 asociada a ECH similar a Kelch; Nrf2-factor nuclear-	

factor 2 relacionado con eritroide 2; ERA- elemento de respuesta antioxidante; AO- Antioxidante; ARNm- Ácido ribonucleico mensajero; GUT glucuronosiltransferasa; HO-1-hemoxygenasa-1; GST- glutati6nS-transferasa; NQO1-NAD(P)H-quinona oxidorreductasa 1; MC- Membrana celular; MN- membrana Nuclear). .....27

- Figura 10.** Vías de regeneraci6n de plantas por cultivo de tejidos. Esquema modificado a partir de (Boeri, 2016). .....32
- Figura 11.** Fotografía de las partes aéreas de *A. californica*. A) Inflorescencias de *A. californica* y venaci6n del haz y envés del limbo foliar. B) Rama de *A. californica* con hojas e inflorescencias. C) Arbusto de *A. californica* en suelos rocosos.....39
- Figura 12.** Desarrollo de callo de *A. californica* a partir de un explante de hoja después de cuatro semanas de incubaci6n en medio WPM+1 mg/L de BAP.....52
- Figura 13.** Organogénesis indirecta tras subcultivo en medio WPM suplementado con 1.5 mg/L de AIB: P: peci6lo, Y: yemas, H: hojas, SN: segmentos nodales. a-c Medias de grupos con letras iguales no difieren significativamente entre sí de acuerdo con la prueba de Tukey ( $p < 0.05$ ). .....53
- Figura 14.** Efecto en la producci6n de NO: Efectos del extracto etan6lico de callos de *A. californica* sobre la producci6n de 6xido nítrico en células RAW 264.7 estimuladas con LPS 1  $\mu\text{g/ml}$ , en un intervalo de concentraciones de 25 a 200  $\mu\text{g/mL}$ , \*Significancia estadística (Prueba de Tuke,  $p < 0.05$ ) en comparaci6n con las células control (DMSO).....58
- Figura 15.** Efecto en la producci6n de NO: Efectos del extracto etan6lico de *A. californica* sobre la producci6n de 6xido nítrico en células RAW 264.7 estimuladas con LPS 1  $\mu\text{g/ml}$ , en un intervalo de concentraciones de 25 a 200  $\mu\text{g/mL}$ , \*Significancia estadística en comparaci6n con las células control (DMSO),  $p < 0.05$  (Prueba de Tukey).....59

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Principales hormonas y sus tipos. ....	34
<b>Tabla 2.</b> Efecto de diferentes concentraciones (mg/L) de AIB, BAP o CIN en el porcentaje de inducción de callo y el crecimiento promedio (cm) en hojas, pecíolos, yemas y segmentos nodales que produjeron callos, durante seis semanas de incubación*....	51
<b>Tabla 3.</b> Actividad antiproliferativa del extracto etanólico de los callos y planta silvestre de <i>A. californica</i> en líneas celulares humanas.....	54
<b>Tabla 4.</b> Porcentaje de proliferación celular posterior a la aplicación del extracto etanólico de los callos <i>A. californica</i> en un rango de concentración de (25-200) µg/mL. ....	55
<b>Tabla 5.</b> Contenido de fenoles totales y flavonoides en los extractos etanólicos de callos de <i>A. californica</i> y partes aéreas de <i>A. californica</i> silvestre. ....	57
<b>Tabla 6.</b> Identificación de compuestos presentes en el extracto etanólico de callos de <i>A. californica</i> mediante FIA-ESI-IT-MS. ....	60
<b>Tabla 7.</b> Identificación de compuestos presentes en el extracto etanólico de las partes áreas de <i>A. californica</i> silvestre mediante FIA-ESI-IT-MS.....	61

## INTRODUCCIÓN

El cáncer comprende un amplio grupo de enfermedades que presentan un crecimiento celular descontrolado, así como la diseminación de células anormales hacia diversos órganos del cuerpo en un proceso denominado metástasis y se clasifica según el tipo de tejido o célula (Thummadi *et al.*, 2022). Actualmente, es un importante problema de salud pública, ya que se ha convertido en la segunda causa de muerte en el mundo con millones de nuevos pacientes diagnosticados cada año (Kargozar *et al.*, 2022; Siegel *et al.*, 2022).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que el 80% de la población mundial utiliza la medicina tradicional para la atención primaria de salud y la mayor parte de esta terapia implica el uso de extractos de plantas o sus componentes activos (Chandran *et al.*, 2020). Con el creciente interés en los productos naturales, los científicos continúan considerando plantas ricas en antioxidantes, como posibles fuentes de tratamientos efectivos para diferentes tipos de cáncer (Asuzu *et al.*, 2022). Estas plantas poseen abundantes compuestos bioactivos candidatos a fármacos terapéuticos debido a que presentan una eficacia prometedora comparable a los agentes de drogas sintéticas de alto costo (Babich *et al.*, 2021). Sin embargo, muchas plantas no pueden propagarse de forma natural por la baja producción y viabilidad de sus semillas, las infecciones bacterianas y fúngicas, la introducción de especies exóticas, la deforestación y la pérdida de hábitat; por lo que la creciente demanda de estos productos ha provocado la necesidad de encontrar estrategias para satisfacer las demandas de las industrias farmacéuticas sin perturbar las poblaciones naturales.

Entre las técnicas biotecnológicas más empleadas con estos fines se encuentra el cultivo de tejidos vegetales. El cultivo de tejidos vegetales utiliza medios de cultivo nutritivos y condiciones asépticas controladas para el crecimiento de plantas, células, tejidos y órganos. En condiciones *in vitro*, las células vegetales sometidas a ciertos estímulos forman una masa de células conocida como callo, que pueden proporcionar material vegetal capaz de producir metabolitos secundarios (Ochatt *et al.*, 2022). Esta técnica es indispensable para la producción de plantas libres de enfermedades, multiplicación rápida de plantas raras, genotipos, transformación del genoma vegetal y producción de metabolitos derivados de plantas de importante valor comercial (Krishna, 2016).

La familia Euphorbiaceae está conformada por alrededor de 300 géneros y 7800 especies, por lo que es considerada una de las más diversas (Din *et al.*, 2013; Vega *et al.*, 2021). Entre los géneros que la componen se encuentra *Acalypha* con aproximadamente 500 especies, de las que se han reportado varios integrantes con actividad antioxidante, antimicrobiana y citotóxica: *A. siamensis*, *A. guatemalensis*, *A. wilkesiana*, *A. fruticosa* y *A. platyphilla* (Madlener, 2009). *Acalypha californica* se distribuye en los estados de Baja California y Sonora, es un arbusto semileñoso y perenne, utilizado por los grupos étnicos para tratar el cáncer, por lo que se conoce comúnmente como "hierba del cáncer". Su actividad antiproliferativa radica en un alto contenido de compuestos fenólicos, principalmente flavonoides y proantocianidinas; a los que se les confiere la capacidad de suprimir, retrasar y revertir el proceso de carcinogénesis (Cortés, 2013; Rascón *et al.*, 2015).

Debido a la recolección aleatoria por parte del herbolario local y a la destrucción de su hábitat por la actividad antropogénica, es necesario tomar medidas encaminadas a la permanencia de *A. californica* en estos ecosistemas, entre las que se propone la búsqueda de métodos de propagación y técnicas de cultivo comercial para esta planta medicinal. El principal objetivo de esta investigación consistió en obtener callos a partir de hojas, pecíolos, yemas y segmentos nodales de *A. californica*, y la evaluación de las actividades antiproliferativa, antioxidante y antiinflamatoria del extracto etanólico de los callos obtenidos.

## I. ANTECEDENTES

### I.1 Cáncer.

Cáncer es un término genérico utilizado para designar un amplio grupo de enfermedades que pueden afectar a cualquier parte del organismo. Una característica definitoria del cáncer es la multiplicación rápida de células anormales que se extienden más allá de sus límites habituales y pueden invadir partes adyacentes del cuerpo o propagarse a otros órganos, en un proceso que se denomina metástasis; siendo esta la principal causa de muerte por la enfermedad. Por otra parte, la OMS (2021) lo define como: “Un proceso de crecimiento y diseminación incontrolados de células que puede aparecer prácticamente en cualquier lugar del cuerpo”. Anualmente, se invierten miles de millones de dólares en la investigación del cáncer, pero las tasas de éxito no son satisfactorias (Sung *et al.*, 2021).

Muchos factores intrínsecos y extrínsecos influyen en el desarrollo del cáncer, por lo que se conoce como un padecimiento multifactorial. Botelho *et al.*, 2014 los define como factores intrínsecos y extrínsecos. Los primeros se refieren al huésped incluyen edad, sexo, constitución genética, función del sistema inmunitario, metabolismo, niveles hormonales y estado nutricional. Los factores extrínsecos incluyen sustancias que se ingieren, beben o fuman (hábitos); lugar de trabajo y exposiciones ambientales (aire, agua y suelo); así como, el comportamiento sexual; y elementos de estilo de vida tales como entorno social y cultural; o lo que es lo mismo la exposición a carcinógenos físicos, químicos y biológicos (Ferlay *et al.*, 2019).

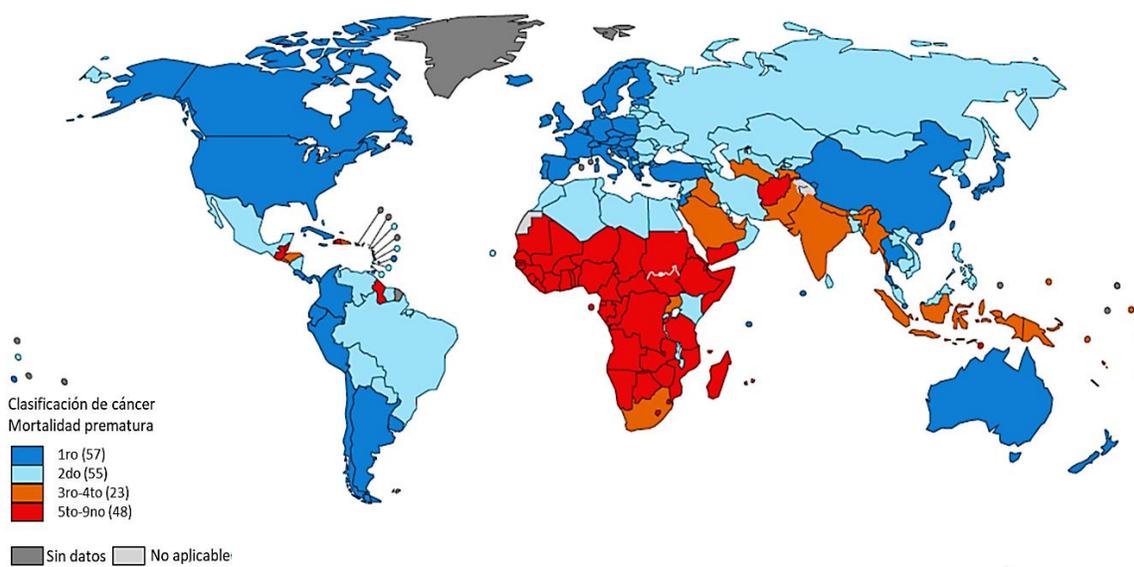
Estos carcinógenos tienen la capacidad de dañar regiones del ADN afectando la expresión de proteínas necesarias para el funcionamiento normal de la célula. Otro tipo de mutación es aquella que sufren las regiones del ADN que codifican a una proteína en particular afectando la función de esta. El conjunto de estas alteraciones al material genético tiene la capacidad de convertir el genoma de la célula de normal a canceroso (Gupta *et al.*, 2017).

El rol de las alteraciones genéticas en la carcinogénesis fue puesto de manifiesto al descubrir en el genoma humano, genes homólogos a genes retrovirales relacionados previamente con el desarrollo de tumores. En células humanas normales estos genes se

denominaron protooncogenes y se relacionan con el crecimiento y proliferación de células normales. Sin embargo, cuando se encuentran mutados se denominan oncogenes y su mutación es de tipo dominante, es decir, sólo es necesario que uno de los alelos sufra una mutación para que la proteína que codifica gane funcionalidad. Esto generalmente se traduce en un aumento de la proliferación (Weitzel *et al.*, 2011).

### I.1.1 Epidemiología.

El cáncer es una de las principales causas de muerte en todo el mundo; es la primera o segunda causa principal de muerte antes de los 70 años en 112 de 183 países, y la tercera o cuarta en más de 23 países, según estimaciones de la Organización Mundial de la Salud (OMS) en 2019 (Asuzu *et al.*, 2022) (Figura 1). El cáncer es una de las enfermedades crónico-degenerativas de gran prevalencia en la actualidad, solo en 2020 se registraron 19.2 millones de casos nuevos y 9.9 millones de muertes (GLOBOCAN, 2021). El Instituto Nacional del Cáncer pronostica que para el año 2040 el número de casos nuevos por año incrementará a 29.5 millones y el de fallecimientos a 16.4 millones (Instituto Nacional del Cáncer, 2020).



**Figura 1.** Ranking nacional de cáncer como causa de muerte en menores de 70 años en 2019.

El número de países representados en cada grupo de ranking es incluido en la leyenda.  
Fuente: Organización Mundial de la Salud (Sung *et al.*, 2021).

En el 2020, se presentaron 19,292,789 de casos de cáncer en el mundo de los cuales, 9,958, 133 representaron muertes por esta patología. Entre los tipos de cáncer más comunes a nivel mundial, se encuentran el cáncer de mama, el cáncer de pulmón, el cáncer colorrectal y el cáncer de próstata con una incidencia de 11.7%, 11.4%, 10%, 7.3% y una mortalidad de 18%, 6.9%, 9.4% y 3.8% respectivamente (GLOBOCAN, 2020). El cáncer de pulmón, de mama y cervicouterino presentan una tasa significativa de incidencia y de mortalidad estandarizadas por edad, lo cual los localiza dentro de los principales seis tipos de cáncer de importancia. El cáncer de pulmón con una incidencia de 22.4 y mortalidad de 18 casos por 100,000 habitantes, el cáncer de mama con 47.8 y 13.6 casos y el cáncer cervicouterino con 13.3 y 7.3, respectivamente (GLOBOCAN, 2021).

En México, se presentaron 195,499 nuevos casos y 90, 222 muertes hasta el año 2020, de los cuales el más común es el cáncer de mama que representa el 15.3% de los casos, seguido del cáncer de próstata, cáncer colorrectal, cáncer de tiroides y cáncer cervicouterino con un 13.7%, 7.6%, 5.7% y 4.8% de incidencia, respectivamente (GLOBOCAN, 2020). El cáncer en México ha permanecido como la tercera causa de muerte en los últimos años, tanto en hombres como en mujeres, solo bajando a la cuarta posición en el año 2020 debido al aumento de defunciones por COVID-19 (INEGI, 2021b). Los tipos de cáncer de mayor prevalencia en el país son el de mama, próstata, tiroides, colon, cervicouterino, estómago, pulmones e hígado. Sin embargo, dentro de los principales cinco que presentan una mayor tasa de mortalidad se encuentran el cáncer de mama, próstata, cervicouterino, pulmones y estómago, siendo el de mama (10.6 casos por cada 100,000 habitantes) y el cervicouterino (5.7 casos por cada 100,000 habitantes) los principales dos tipos de cáncer que ocasionan la muerte de la población femenina en México (GLOBOCAN, 2021). Debido a esto, en la distribución porcentual por sexos se observa que los fallecimientos en mujeres son mayores (51%) que el de los hombres (49%) (INEGI, 2021c).

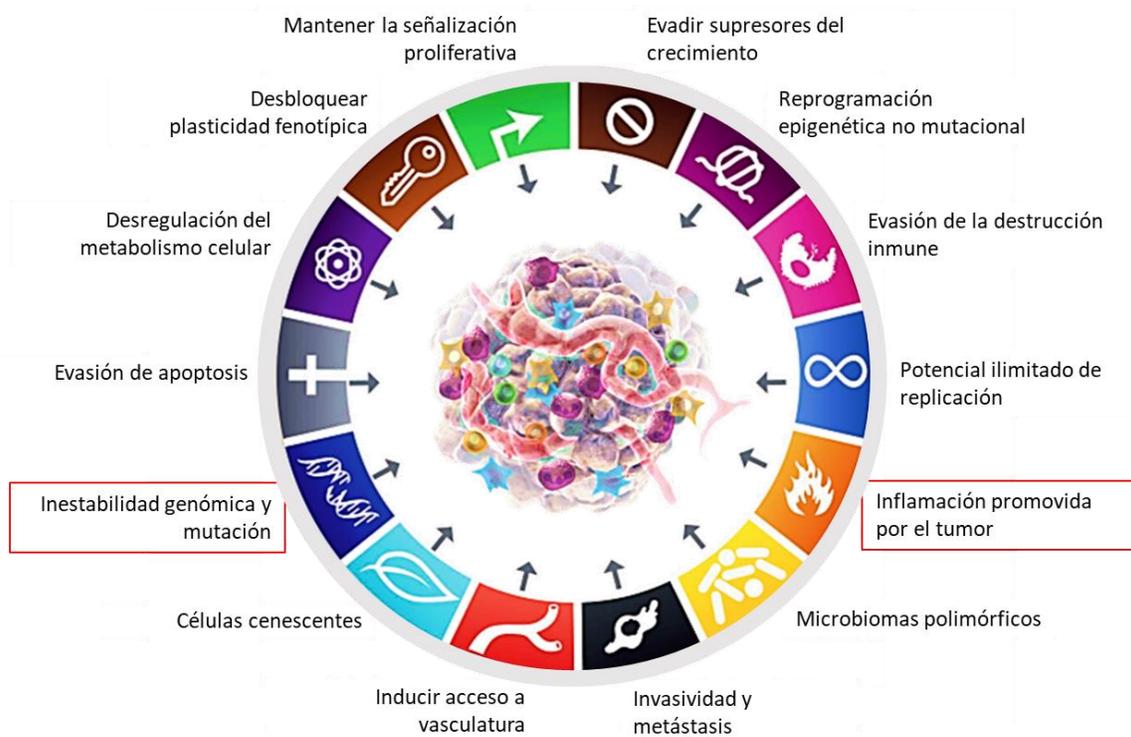
En América Latina y el Caribe la incidencia de cáncer en ambos sexos en el año 2020 fue de 1,470, 274 casos y una mortalidad de 713,414 siendo los tipos de cáncer más comunes, el cáncer de próstata, de mama, colorrectal y pulmón, con una incidencia de 14.6%, 14.3%, 9.2% y 6.6% respectivamente (GLOBOCAN,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

En el estado de Sonora se reportaron 8.7 defunciones por tumores malignos por cada 10,000 habitantes en el 2020 (INEGI, 2021a). Según la Secretaría de Salud del Estado de Sonora, el Centro Estatal de Oncología atiende entre 800 y 900 casos nuevos anualmente, entre los cuales el cáncer de mama, cervicouterino, colón y pulmón son los tipos más frecuentes (Secretaría de Salud Pública del Estado de Sonora, 2021).

### I.1.2 Características moleculares del cáncer.

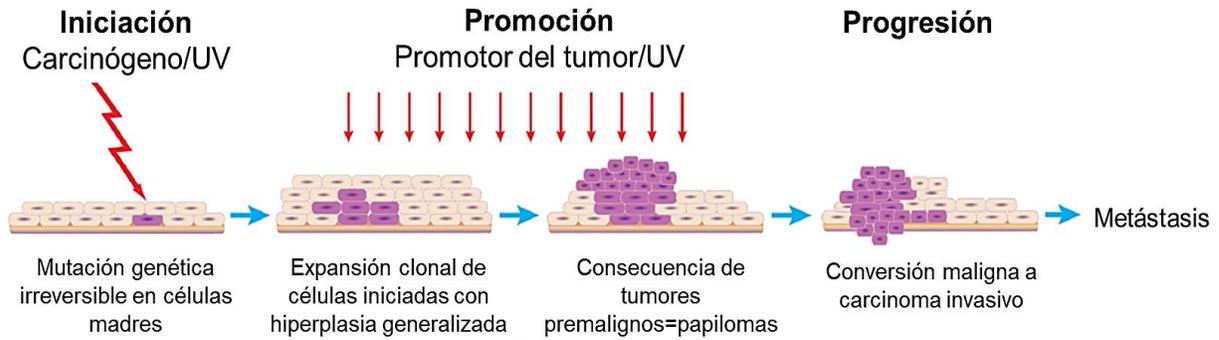
El cáncer es un estado de desregulación del proceso de señalización celular normal que culmina en una proliferación celular excesiva. El proceso por el cual las células normales se transforman en células malignas se denomina carcinogénesis (Weitzel *et al.*, 2011).

A pesar de las diversas entidades clínicas agrupadas como cáncer, es posible identificar ciertas características comunes de las células tumorales que permiten entender esta enfermedad y el desarrollo de nuevas estrategias clínicas para su manejo. En el año 2000 tras un exhaustivo análisis de la literatura publicada, Hanahan y Weinberg describieron 6 características que son compartidas por las células tumorales: capacidad de crecimiento autónomo, la evasión de señales inhibitorias del crecimiento, evasión de muerte por apoptosis, potencial replicativo ilimitado, angiogénesis e invasión y metástasis. Además de dos características en particular que favorecen el desarrollo tumoral: la inestabilidad genómica y/o mutaciones, así como la inflamación promovida por el tumor. En el 2022 después de más de dos décadas de investigación Hanahan amplió esta información describiendo cuatro características emergentes: células senescentes, desbloqueo de plasticidad fenotípica, reprogramación epigenética no mutacional y microbiomas polimórficos, para un total de 14 características intrínsecas de las células tumorales (Figura 2). Los cuatro últimos procesos son considerados como características emergentes porque su relación con las seis características restantes requiere más investigación, aunque hay evidencia de su importancia en la carcinogénesis (Hanahan y Weinberg, 2000; Hanahan y Weinberg, 2011; Hanahan, 2022;).



**Figura 2.** Características del cáncer. Modificado de (Hanahan, 2022).

Durante la carcinogénesis se genera una célula mutada a partir de la modificación genética de su ADN y posteriormente se da la proliferación selectiva de la célula mutada para dar origen al tumor. Las etapas en las cuales se divide comúnmente la carcinogénesis son tres: iniciación, promoción y progresión (Figura 3).



**Figura 3.** Modelo de carcinogénesis de piel de ratón multietapa. Modificado de (Rundhaug y Fischer, 2010)

La iniciación implica la formación de una mutación genética debido a la alteración irreversible del ADN de la célula, dando lugar a una célula iniciada (Klaunig y Wang, 2018). La célula puede mantenerse en esta etapa por un tiempo indefinido sin llegar a pasar a la etapa de promoción. Se sostiene de forma latente y sin causar algún efecto en el individuo. A los agentes capaces de realizar estas modificaciones se les denomina inductores (Botelho *et al.*, 2014). En la etapa de promoción los promotores (inflamación crónica y agentes químicos) actúan principalmente incrementando la proliferación celular y/o disminuyendo su capacidad de llevar a cabo la apoptosis, no se consideran mutagénicos ya que actúan a nivel epigenético y no directamente sobre el ADN, a diferencia de los inductores, por lo que solo actúan si la célula ha sido previamente iniciada (Klaunig y Wang, 2018). En la progresión continúan los cambios genéticos, se presentan reordenamientos y modificaciones del genoma, así como una pérdida de la integridad del cromosoma. Esta etapa se caracteriza por evidenciar la naturaleza maligna del tumor, como lo es su capacidad de proliferación descontrolada, su potencial invasivo, cambios morfológicos de las células lo que provoca la etapa de metástasis. Se ha evidenciado que la iniciación y promoción del cáncer se encuentran fuertemente asociadas con el estrés oxidativo y un proceso inflamatorio crónico (Rundhaug y Fischer, 2010).

### I.1.3 Tratamiento.

Los tratamientos contra el cáncer son terapias complejas y se encuentran en constante evolución. Tienen como finalidad la remisión del cáncer hasta llegar a la erradicación completa de la enfermedad y de no ser posible, los tratamientos se enfocan en extender y preservar la calidad de vida del paciente mediante la paliación de los síntomas (Merriel y Hamilton, 2020).

El tratamiento depende específicamente de la etapa y el tipo de cáncer. Existen diferentes tipos de tratamientos contra el cáncer, entre ellos se encuentran la radiación, quimioterapia, inmunoterapia, terapia hormonal y terapia dirigida (Hosseinzadeh *et al.*, 2017). Estas se dividen en local o sistémica según la vía de administración, en la primera el tratamiento contra el tumor es de forma directa, como en la cirugía o radioterapia y en la segunda es comúnmente por vía intravenosa o medicación oral con efecto en todo el cuerpo, como en la quimioterapia (Sausville y Longo, 2015). Actualmente, la quimioterapia es la mayormente utilizada y es comúnmente combinada con otro tipo de terapia para una mejor respuesta al tratamiento. Su nombre radica en el uso de químicos como agentes terapéuticos, con el fin de inhibir la proliferación celular y multiplicación tumoral. Esto lo hacen interfiriendo con el ADN, ARN o la síntesis proteica, afectando el funcionamiento adecuado de las moléculas en el ciclo celular. Sin embargo, debido a la complejidad de la red de señalización es difícil desarrollar un medicamento anticancerígeno confiable con efectos reproducibles. Además, la heterogeneidad de las células tumorales también conduce a variaciones en la sensibilidad a los fármacos (Anand *et al.*, 2023).

Las terapias actuales para tratar el cáncer conllevan un gran número de efectos secundarios que disminuyen la calidad de vida del paciente, además de generar un gran impacto económico por lo costosas que resultan, los pacientes pueden llegar a desmotivarse y discontinuar el tratamiento. Además, la actividad anticancerígena de muchos tratamientos es limitada debido a la resistencia generada por las células cancerosas. Por todo lo anterior, existe la necesidad de descubrir compuestos activos para la elaboración de nuevos fármacos anticancerígenos menos tóxicos, así como más potentes y selectivos (Alonso *et al.*, 2011).

## **I.2 Inflamación.**

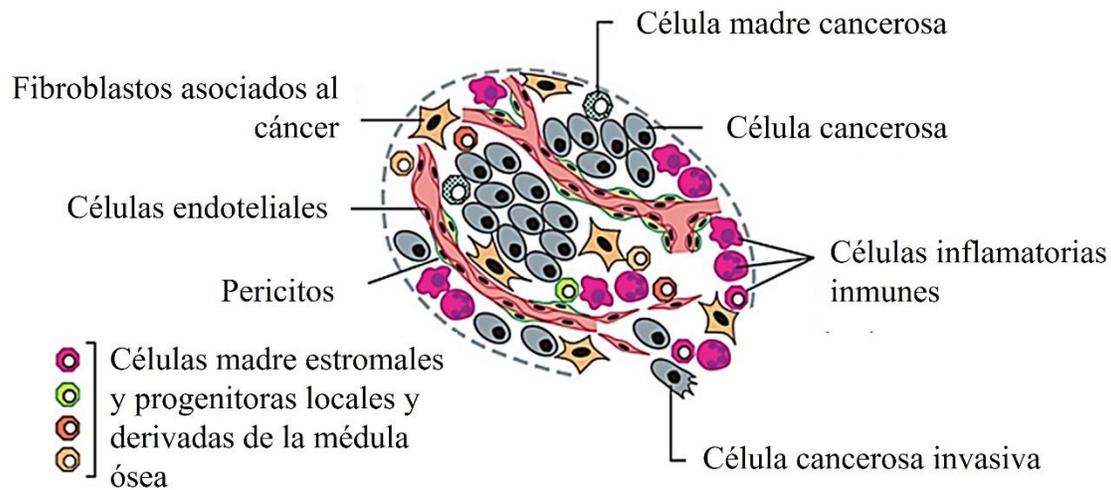
La inflamación es un mecanismo de defensa vital para la salud utilizado por el sistema inmune como respuesta hacia estímulos dañinos, como pueden ser infecciones microbianas, la exposición a radiación y compuestos tóxicos, enfermedades crónicas y autoinmunes e incluso algunos hábitos cotidianos, como el consumo de alcohol, tabaco y una dieta alta en calorías (Chen *et al.*, 2018). Mediante este mecanismo, el organismo elimina estos agentes nocivos y da inicio al proceso de curación, en el cual se da la reparación de tejido y el restablecimiento de la homeostasis (Zhao *et al.*, 2021).

La inflamación se puede dividir en dos categorías según la duración del proceso inflamatorio: aguda y crónica. La inflamación aguda se refiere a la respuesta inicial del organismo, seguida de la exposición al agente dañino y la activación del sistema inmune. Se encuentra involucrada principalmente la inmunidad innata y dura un corto periodo de tiempo. Si el proceso inflamatorio no se resuelve y continua por un largo periodo de tiempo, da lugar a la inflamación crónica. Esta se caracteriza por la formación de infiltrados leucocitarios en el tejido dañado y se encuentra asociada a diferentes enfermedades crónicas, entre ellas el cáncer (Gonda *et al.*, 2009; Reuter *et al.*, 2010). La inflamación aguda contribuye a la muerte de las células cancerosas al inducir una reacción antitumoral o respuesta inmunitaria, mientras que la inflamación crónica está involucrada en la inmunosupresión provocada por la terapia ya que actúa sinérgicamente con la exposición a carcinógenos, daño y reparación tisular; proporcionando así un microambiente preferido para la tumorigénesis y metástasis, aunado a la resistencia terapéutica y la progresión del cáncer (Zhao *et al.*, 2021).

Cuando la inflamación se vuelve crónica, el proceso inflamatorio normal del cuerpo crea un ambiente favorable para el desarrollo de células cancerosas. Existen numerosas vías de señalización que contribuyen de manera clave a generar cambios epigenéticos fuera y dentro de la célula. En este proceso inflamatorio se describen dos vías, la vía intrínseca y la vía extrínseca (Sohrab *et al.*, 2023). La vía intrínseca favorece al desarrollo del cáncer por medio de cambios genéticos, debido a la mutación de genes críticos. Estas mutaciones originan células iniciadas y promueven la progresión del tumor reclutando y activando células inflamatorias. Por otro lado, la vía extrínseca se asocia a un estado inflamatorio prolongado provocado por factores externos (enfermedades virales, bacterianas, autoinmunes, obesidad, tabaco, entre otros) que condiciona

un ambiente favorable para la formación del tumor (Zhao *et al.*, 2021). Durante el proceso de inflamación se da una infiltración de células inflamatorias en el tejido dañado, las cuales producen una gran cantidad de mediadores. Se han observado tanto a las células como a los mediadores inflamatorios en los tumores, por lo que se adjudica que el vínculo entre la inflamación y el cáncer se da por vía intrínseca y extrínseca ya que estas vías convergen para activar factores de transcripción que forman mediadores inflamatorios (Korniluk *et al.*, 2017).

Un conjunto de distintos tipos celulares constituye la mayoría de los tumores sólidos que, en conjunto, permiten el crecimiento y la progresión del tumor, dando el soporte funcional y nutricional; estableciendo lo que se ha denominado el microambiente tumoral (Figura 4 Sohrab *et al.*, 2023). Dentro de estos tipos celulares se encuentran los fibroblastos anormales, células endoteliales y del sistema inmune innato y adaptativo. Todas estas células pueden suministrar moléculas bioactivas al microambiente tumoral, incluidos los factores de crecimiento que sustentan la señalización proliferativa, los factores de supervivencia que limitan la muerte, factores proangiogénicos, modificadores de la matriz extracelular, enzimas que facilitan la angiogénesis, la invasión y la metástasis; así como señales inductivas que facilitan el desarrollo tumoral. Además, las células inflamatorias pueden liberar especies reactivas de oxígeno que son activamente mutagénicas para células cancerosas cercanas, acelerando su evolución genética hacia estados de mayor malignidad (Hanahan y Weinberg, 2011; Ireland y Mielgo, 2018; Korniluk *et al.*, 2017).



**Figura 4.** Las células del microambiente tumoral. Modificado de (Hanahan y Weinberg, 2011).

### I.2.1 Relación entre cáncer e inflamación.

Se ha demostrado que la inflamación está estrechamente relacionada con todas las etapas de desarrollo y progresión maligna de la mayoría de los tipos de cáncer, así como con la eficacia de las terapias anticancerígenas (Zhao *et al.*, 2021).

La inflamación promueve la iniciación tumoral al generar un estrés genotóxico, que favorecen nuevas mutaciones; participa en la promoción al inducir la proliferación tumoral y a la progresión tumoral al incrementar la producción de nuevos vasos sanguíneos (angiogénesis) alrededor del tumor y la invasión tisular al favorecer la extravasación celular, lo que facilita el desarrollo de metástasis. Los factores generados por las células inmunes como factores proangiogénicos y de crecimiento, enzimas modificadoras de la matriz extracelular y otras señales son capaces de inducir las capacidades de las células tumorales y se han descrito como eventuales blancos terapéuticos (Salim *et al.*, 2023).

El sistema inmunitario detecta y se dirige específicamente a los agentes infecciosos con la respuesta inmunitaria adaptativa, que se apoya por las células del sistema inmune innato. A su vez, el sistema inmunológico innato está involucrado en la curación y limpieza de heridas, células muertas y restos celulares. Estas tareas especializadas son logradas por distintas

subclases de células inflamatorias, es decir, una clase de macrófagos y neutrófilos convencionales (involucrados en el apoyo a la inmunidad adaptativa), y subclases de macrófagos y progenitores mieloides "activados alternativamente" que participan en la cicatrización de heridas y limpieza doméstica de tejidos (Egeblad *et al.*, 2010; Mantovani y Allavena 2015; Qian y Pollard, 2010). Este último subtipo de células inmunitarias son una de las principales fuentes de factores de crecimiento angiogénico, epitelial y del estroma y enzimas de remodelación de la matriz que se necesitan para la cicatrización de heridas, y son estas células las que son reclutadas para apoyar la progresión neoplásica. De manera similar, las subclases de linfocitos B y T pueden facilitar el reclutamiento, activación y persistencia de tales curaciones de heridas y promoción de tumores (Egeblad *et al.*, 2010; Biswas y Mantovani, 2010).

La inmunosupresión celular también se ha visto asociada con la aparición y el desarrollo del cáncer. Se han reportado diferentes grados de reducción de subconjuntos de linfocitos T en pacientes con cáncer de pulmón avanzado (Vivarelli y Risaliti, 2011). Análogamente, un estudio sobre el cáncer de hígado encontró que la función inmune celular de los pacientes era generalmente inferior a la de las personas sanas con una reducción de células T CD3+, células T CD4+ y células T CD4+/CD8+ (Granito *et al.*, 2021).

Se estima que alrededor del 20% de los cánceres se encuentran asociados a inflamación crónica tanto de origen patogénico como no patogénico (Nitin Singh *et al.*, 2019). La gastritis persistente que causa la infección por *Helicobacter pylori* aumenta en un 75% el riesgo de padecer cáncer de estómago, así como las infecciones por el virus de la hepatitis B y C promueven la formación de un carcinoma hepatocelular (Liu *et al.*, 2023). De igual forma, múltiples enfermedades de origen no patogénico se encuentran asociadas con un aumento en el riesgo de cáncer, algunas de estas son la pancreatitis crónica, enfermedad inflamatoria pélvica, enfermedad inflamatoria intestinal, la colitis ulcerosa crónica y la enfermedad de Crohn. Éstas últimas dos son de gran importancia como evidencia de la relación existente entre la inflamación y el desarrollo del cáncer, ya que aumentan 10 veces el riesgo de padecer cáncer colorrectal (Acevedo *et al.*, 2022).

### I.3 El estrés oxidativo.

Las especies reactivas de oxígeno (EROs), son productos normales del metabolismo celular, estas son altamente oxidantes ya que contienen oxígeno con propiedades reactivas, representados como radicales de oxígeno, incluidos los aniones superóxido ( $O_2^-$ ), hidroxilo ( $HO\cdot$ ), alcoxilo ( $RO\cdot$ ), peroxilo ( $RO_2\cdot$ ) y ciertas moléculas que no son radicales, ya sean agentes oxidantes y/o que se conviertan fácilmente en radicales, incluidos peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), ácido hipocloroso ( $HOCl$ ), singlete oxígeno ( $^1O_2$ ) y ozono ( $O_3$ ). También existen especies reactivas de nitrógeno (ERN), estas especies químicas contienen nitrógeno, tales como el óxido nítrico ( $\cdot NO$ ), compuestos no radicales, peroxinitrito ( $ONOO^-$ ), dióxido de nitrógeno ( $\cdot NO_2$ ) y trióxido de dinitrógeno ( $N_2O_3$ ). La mayoría de estas moléculas se producen a partir del oxígeno en numerosos procesos metabólicos que tienen lugar en todo el cuerpo, principalmente en las mitocondrias, el retículo endoplasmático (RE) y los peroxisomas; sin embargo, pueden producirse también por fuentes exógenas (Liu *et al.*, 2023).

Los principales factores externos involucrados en la generación exógena de especies reactivas son los agentes ambientales, como la radiación y xenobióticos. La radiación es un carcinógeno que daña directamente el ADN de las células, cuyos efectos tóxicos son mediados por EROs, producidos principalmente por radiólisis de moléculas de agua. En el caso de los xenobióticos, se incluyen los compuestos clorados, iones metálicos, barbitúricos, ésteres de forbol, entre otros. Estos tipos de compuestos producen EROs metabolizándose directamente a intermediarios de radicales primarios o activando vías endógenas de generación de especies reactivas (Khan *et al.*, 2021; Klaunig y Wang, 2018).

Dentro de las fuentes endógenas de EROs se encuentran la cadena transportadora de electrones mitocondrial, organelos celulares como peroxisomas y células inflamatorias activadas, por medio de la NOX2 (isoforma de la NADPH oxidasa (NOX) y la iNOS (óxido nítrico sintetasa inducible) (Sharifi *et al.*, 2020). La fuente mayor de especies reactivas es la mitocondria, aproximadamente el 2% del oxígeno consumido por la esta se convierte en superóxido donde se originan como subproductos de la fosforilación oxidativa (Klaunig y Wang, 2018). Los sitios de mayor producción son el complejo I (NADH deshidrogenasa) y III (citocromo bc1), los cuales generan una gran cantidad del radical superóxido, el cual es dismutado rápidamente por la superóxido dismutasa 1 y 2 (SOD1 y SOD2, respectivamente)

para dar origen a  $H_2O_2$ , un segundo mensajero altamente difusible con la capacidad de atravesar la membrana celular y de causar daño potencialmente carcinogénico (Liou y Storz, 2010). Los peroxisomas median la producción de EROs a través de la reacción de  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos, flavina oxidasa y la degradación de EROs a través de la descomposición de  $H_2O_2$  mediada por catalasa. Por otro lado, el RE proporciona un ambiente oxidante, que promueve el plegamiento de proteínas y actúa como fuente de EROs (Liu *et al.*, 2023; Salim *et al.*, 2023).

Tanto las EROs como las ERNs sirven como un mensajeros intracelulares e intercelulares que regulan muchas vías de señalización celular que en su mayoría están mediadas por los factores de transcripción NF- $\kappa$ B y STAT3, inducible por hipoxia factor-1 $\alpha$ , cinasas, citocinas y otras proteínas (Boengler *et al.*, 2017). Dichas vías pueden promover la supervivencia y la proliferación de las células. Así, estos radicales y moléculas altamente reactivas están presentes en niveles más altos en las células cancerosas debido al aumento de la actividad metabólica, la disfunción mitocondrial, la actividad de los peroxisomas, el aumento de la señalización del receptor celular, la actividad del oncogén, el aumento de la actividad de oxidasas, ciclooxigenasas, lipoxigenasas y timidina fosforilasa, o mediante diafonía con células inmunitarias infiltrantes (Singh y Manna, 2022). A este desequilibrio entre la producción de radicales libres con respecto a los antioxidantes encargados de eliminarlos se le conoce como estrés oxidativo (Veltman *et al.*, 2023). Este desbalance origina un daño a células y biomoléculas importantes del organismo. Al ser especies altamente reactivas y sumamente inestables, reaccionan con lípidos, proteínas e incluso el ADN de las células, ocasionando inestabilidad cromosómica, mutación genética y/o modulación del crecimiento, proliferación, supervivencia y muerte celular, lo cual puede dar inicio al proceso carcinogénico (Acevedo *et al.*, 2022).

Es crucial que las células regulen los niveles de EROs y ERN para evitar el estrés oxidativo, por lo que han desarrollado mecanismos de defensa antioxidantes para mantener la homeostasis. El organismo posee moléculas y enzimas encargadas de regular la concentración de especies reactivas en el cuerpo, estas moléculas actúan mediante reacciones enzimáticas y no enzimáticas (Cheung y Vousden, 2022). Las principales enzimas involucradas en las reacciones enzimáticas son la óxido nítrico sintasa endotelial desacoplada (eNOS), la NADPH oxidasa (NOX), la xantina oxidasa (XO), el ácido araquidónico (ARA), la peroxidasa y enzimas metabólicas como el sistema del citocromo P450, la ciclooxigenasa y la lipoxigenasa (Liu *et al.*,

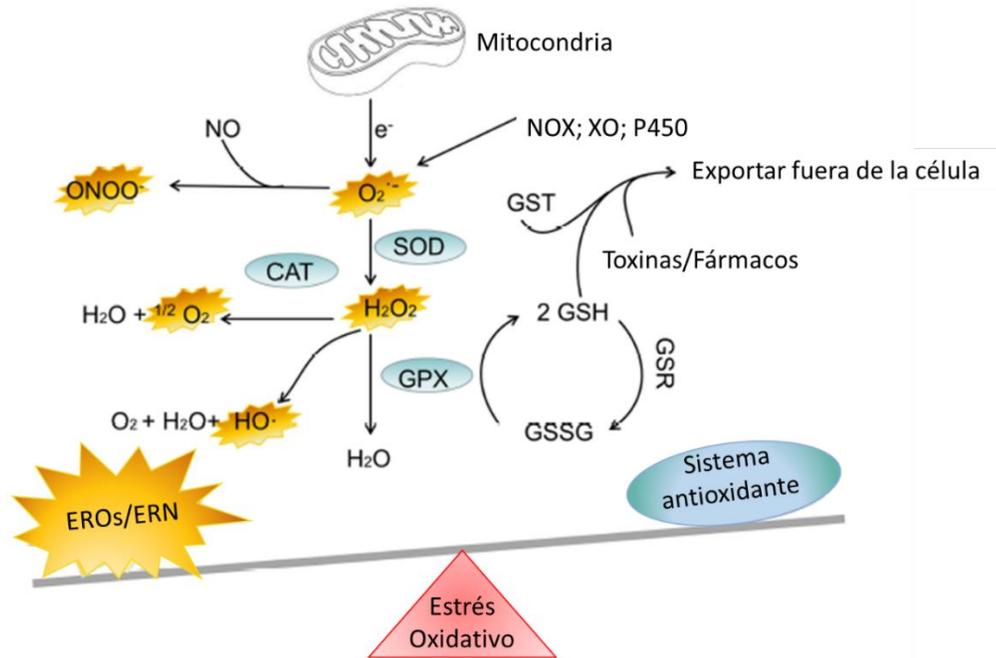
2023). El sistema de defensa no enzimático incluye glutatión (GSH), flavonoides, antioxidantes dietéticos como las vitaminas A, C y E, selenio y b-caroteno (Cheung y Vousden, 2022; Liu *et al.*, 2023; Teng *et al.*, 2023).

El estrés oxidativo también es causado por la inflamación sostenida. Tras alguna lesión el reclutamiento de células inicia en la inflamación aguda, posterior a la activación del sistema inmune (Gonda *et al.*, 2009). Inicialmente los leucocitos son movilizados al sitio dañado y se produce un “estallido respiratorio”, en donde se da la liberación de distintos compuestos destinados a eliminar a los agentes nocivos fagocitados. Se liberan principalmente especies reactivas de oxígeno (EROs), esto es debido a que los fagocitos activados modifican la manera en la que manejan el oxígeno y la tasa de consumo aumenta considerablemente, por lo tanto, se da una acumulación de EROs en el sitio de daño (Reuter *et al.*, 2010; Thomas, 2017).

Las concentraciones altas se vuelven perjudiciales para las células, ya que el sistema de defensa antioxidante del cuerpo se ve abrumado por la producción de especies reactivas, dañando biomoléculas de importancia (Figura 5 Chelombitko, 2018). Las EROs pueden interactuar y dañar macromoléculas como lípidos, proteínas y ADN. A través de la interacción con estas macromoléculas, las EROs pueden afectar múltiples procesos celulares como la proliferación, la inflamación y la muerte celular. En particular, los diferentes tipos de EROs pueden tener distintos efectos en las macromoléculas (Veltman *et al.*, 2023).

La peroxidación lipídica es el proceso en el que las ERO descomponen los ácidos grasos poliinsaturados, dañando los componentes celulares que contienen lípidos, como la membrana celular, mitocondrias y el RE. Esta reacción afecta la permeabilidad y fluidez de la membrana, así como la actividad de las proteínas unidas a esta (Kaweme *et al.*, 2020). El daño oxidativo también afecta a las proteínas reduciendo, aumentando, modificando o anulando completamente su actividad. Durante el estrés oxidativo, las proteínas pueden oxidarse temporalmente, lo que conduce a una alteración de la función y la señalización de las proteínas. La modificación oxidativa del ADN inducida por EROs puede resultar en la alteración del estado de metilación del ADN o la inestabilidad genómica. Estas alteraciones en la metilación del ADN, resultan en la modificación oxidativa de las proteínas MBP, DNMT y HDAC, las que pueden activar oncogenes (Caballero *et al.*, 2022; Stein y Eckert, 2021).

De esta manera, se crea un círculo vicioso, en donde la inflamación inducida por el estrés oxidativo genera una producción continua de especies reactivas y, de no ser resuelto, las células vecinas sanas se ven comprometidas, manteniendo así un ambiente inflamatorio-oxidativo sostenido, el que, de continuar por un largo periodo de tiempo, puede provocar la carcinogénesis (Mittal *et al.*, 2014).



**Figura 5.** Principales sistemas oxidantes y antioxidantes. NOX, NADPH oxidasa; XO, xantina oxidasa; SOD, superóxido dismutasa; CAT, catalasa; GPX, peróxido de glutatión; GSH, glutatión; GSSG, glutatión reducido; GST, glutatión S-transferasa;  $H_2O_2$ , peróxido de hidrógeno;  $ONOO^-$ , peroxinitrito;  $HO^\cdot$ , radical hidroxilo;  $O_2^{\cdot-}$ , superóxido;  $^1O_2$ , oxígeno singlete;  $Fe^{2+}$ , Hierro (II);  $Fe^{3+}$ , Hierro (III); ROS, especies reactivas de oxígeno; RNS, especies reactivas de nitrógeno. Modificado de (Liu *et al.*, 2023).

#### **I.4 La medicina tradicional como fuente de compuestos activos**

El uso de metabolitos de plantas comenzó en el año 2600 a.C. y desde entonces los metabolitos secundarios provenientes de las plantas se han utilizado principalmente para fines medicinales y de veneno. La morfina fue el primer producto natural aislado de la adormidera (*Papaver somniferum*) en 1806 y abrió una nueva era en la investigación de metabolitos secundarios (Twaij y Hasan, 2022).

Desde hace siglos, el humano ha dependido de los recursos vegetales que brinda la naturaleza para sus necesidades básicas como la producción de alimentos, fabricación de ropa, fragancias, ornamentos y entre las tantas aplicaciones que se les dan, el uso medicinal. Estos conocimientos se han transmitido de generación en generación y han evolucionado con base en observaciones, experiencia y experimentos de prueba y error. Una de las ventajas que posee el uso de plantas medicinales es la disponibilidad, además de que son culturalmente aceptables, por lo cual son utilizadas comúnmente por las poblaciones indígenas (Karunamoorthi *et al.*, 2012). La OMS define la medicina tradicional como “*Todo el conjunto de conocimientos, aptitudes y prácticas basados en teorías, creencias y experiencias indígenas de las diferentes culturas, sean o no explicables, usados para el mantenimiento de la salud, así como para la prevención, el diagnóstico, la mejora o el tratamiento de enfermedades físicas o mentales*”, la cual utiliza distintas partes de las plantas o la planta completa con el fin de tratar enfermedades (Asuzu *et al.*, 2022).

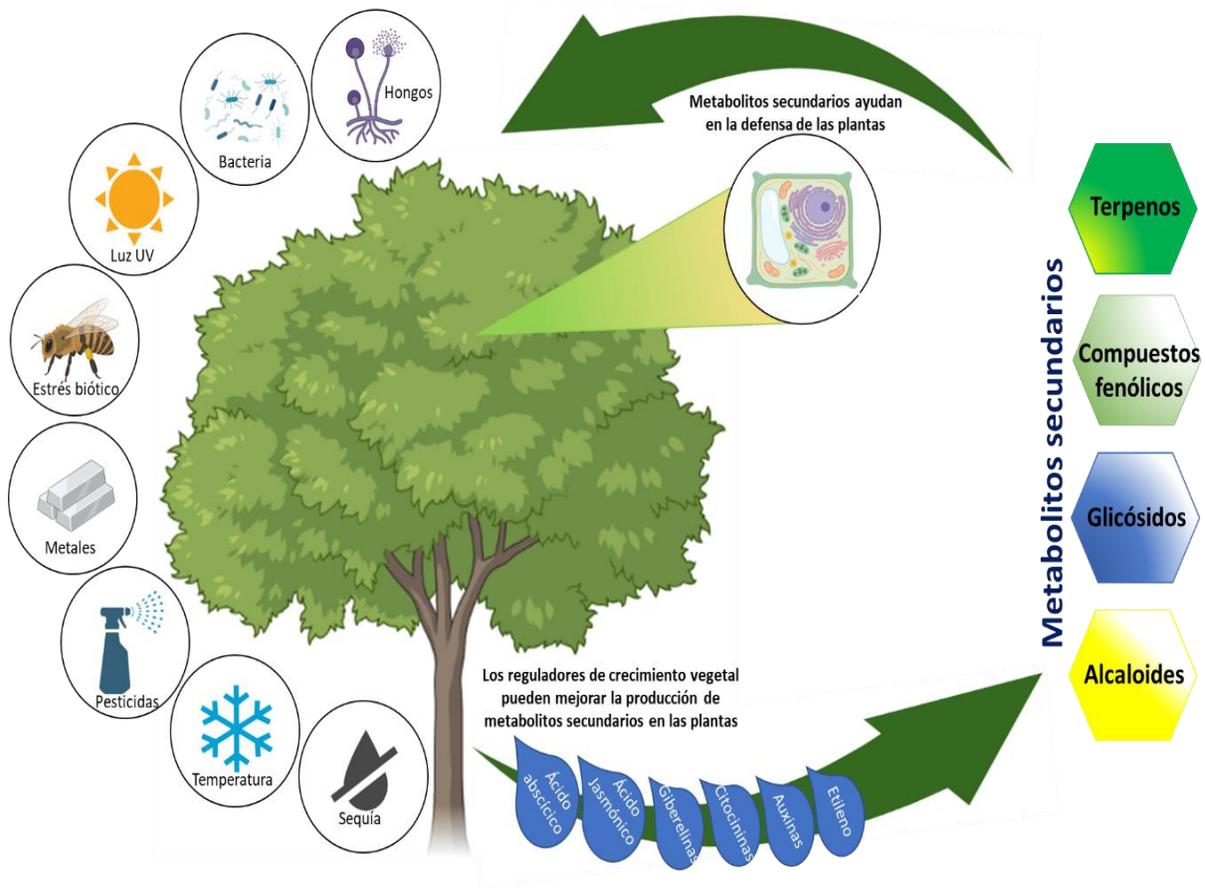
De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), se estima que alrededor del 80% de la población en países en vías de desarrollo utiliza la medicina tradicional como primer nivel de atención en salud (Ávila, 2017). En México, el uso de plantas a través de la medicina tradicional es ancestral; por lo que el número de pacientes que recurre a la medicina alternativa es de entre el 15 y 20% del total de la población (Horacio *et al.*, 2017).

Por lo anteriormente expuesto, la salud humana ha estado indisolublemente ligada al uso de hierbas medicinales durante milenios (Theodoridis *et al.*, 2023), adicionalmente las plantas representan la principal fuente de moléculas para el desarrollo de nuevos fármacos, lo que intensifica el interés de las industrias transnacionales en la búsqueda de sustancias obtenidas de

fuentes vegetales (Nunes *et al.*, 2020); especialmente porque solo el 5.2% cuenta con estudios etnofarmacológicos (Atriano y Benito, 2021; Dorado, 2020; Nasrat *et al.*, 2022).

#### I.4.1 Metabolitos secundarios.

Los compuestos producidos por las plantas se clasifican en metabolitos primarios y secundarios. Los metabolitos primarios, como carbohidratos, lípidos y proteínas, son directamente involucrados en el desarrollo y crecimiento de las plantas (Kisiel *et al.*, 2023; Twaij y Hasan, 2022). En contraste, los metabolitos secundarios son compuestos derivados de metabolitos primarios y se producen a partir de modificaciones biosintéticas, tales como la metilación, glicosilación e hidroxilación (Setyorini y Antarlina, 2022). Estos compuestos tienen un papel importante en la interacción de la planta con su entorno ya que les permiten responder a diversos tipos de estrés (Jan *et al.*, 2021). La síntesis de los metabolitos secundarios depende tanto de factores bióticos como de factores abióticos como el crecimiento, la fisiología, la temperatura, sequía, salinidad la humedad relativa, intensidad de la luz, entre otros (Zhou *et al.*, 2022). Su producción es a menudo baja (menos del 1% en peso seco), por tanto, para mejorar el crecimiento y la productividad de los metabolitos, estos factores deben optimizarse. Los principales tipos de metabolitos secundarios son los terpenos, alcaloides, glicósidos y compuestos fenólicos (Figura 6 Twilley y Lall, 2018).



**Figura 6.** Diversos estreses bióticos y abióticos afectan el crecimiento y desarrollo de las plantas; por lo que desarrollan mecanismos de defensa para mitigar estas tensiones. Se ejemplifican cuatro tipos de metabolitos secundarios involucrados en varios modos de resistencia.

Los terpenoides son la familia más grande de compuestos vegetales que exhiben enormes estructuras y diversidad funcional, son un grupo único de productos naturales a base de hidrocarburos cuyas estructuras derivan del isopreno (Roba, 2021). Los alcaloides son metabolitos especializados con nitrógeno como elemento característico presente en sus estructuras químicas, se clasifican en compuestos heterocíclicos y no heterocíclicos, según la posición del átomo de nitrógeno en su estructura química (Bhambhani *et al.*, 2021). Los glucósidos se definen como compuestos en los que uno o más azúcares (glicona) se combinan con moléculas no azúcares (aglicona) mediante un enlace glicosídico (Banik *et al.*, 2022). Estos

metabolitos tienen la capacidad de interactuar con la bicapa lipídica de las membranas biológicas debido a la lipofilia exhibida por la aglicona del glucósido (Bejarano *et al.*, 2021).

El fenol en sí es un anillo de benceno que está sustituido con un grupo hidroxilo (OH) (Al Mamari, 2021). El término polifenol se utiliza para referirse a flavonoides, taninos, ácidos fenólicos y sus derivados modificados químicamente o polimerizados. Los polifenoles pueden actuar como antioxidantes, principalmente debido a los grupos fenólicos donadores de electrones en sus estructuras (Bié *et al.*, 2023). Los polifenoles eliminan radicales libres principalmente mediante la transferencia de átomos de hidrógeno (H) desde los grupos OH al radical libre (Raho y Mohamed, 2021). Varios informes bibliográficos sugieren que el potencial redox de los polifenoles se correlaciona con su actividad antioxidante, de modo que una disminución en los valores del potencial redox conduce a un aumento en la capacidad de eliminación de radicales, sin embargo; estos valores se ven fuertemente afectados por la naturaleza, número y posición de los sustituyentes en los anillos aromáticos de los polifenoles, alterando fuertemente su eficiencia antioxidante (Costa *et al.*, 2021; Zhang *et al.*, 2022).

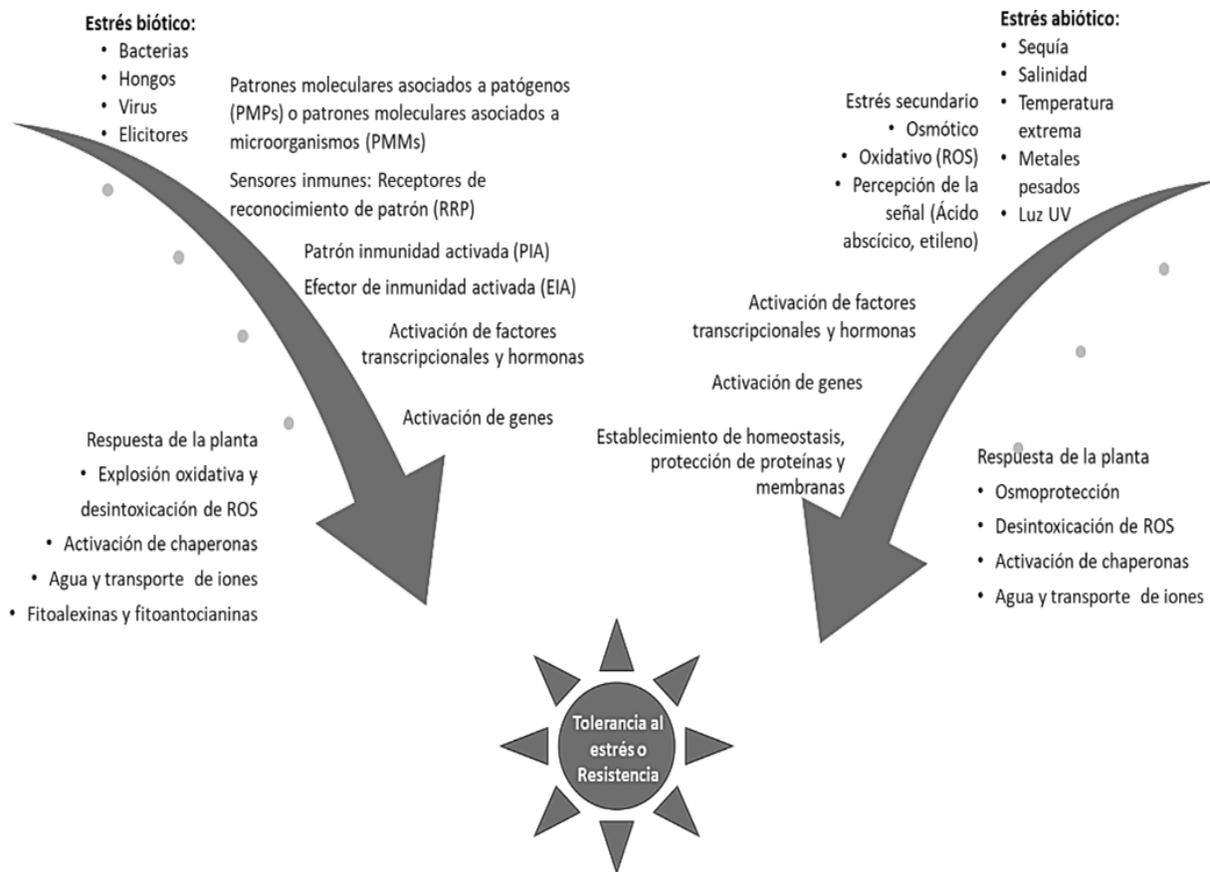
Entre las funciones ecológicas de los metabolitos secundarios se encuentra el actuar como antimicrobianos o insecticidas que disuaden a los depredadores; así como sustancias alelopáticas que pueden desalentar a las malas hierbas competidoras, específicamente los compuestos fenólicos y flavonoides, juegan un papel central en el sistema de defensa de las plantas; mientras que, por el contrario, algunos metabolitos secundarios pueden atraer polinizadores o simbiontes a través de sus propiedades cromáticas, olfativas o quimiotácticas (Kisiel *et al.*, 2023; Mamdouh y Smetanska, 2022; Ochatt *et al.*, 2022; Ozyigit *et al.*, 2023). Aparte de su impacto directo para la planta, los metabolitos secundarios tienen un interés primordial para las actividades humanas como fragancias, tintes, pesticidas, antioxidantes o productos farmacéuticos (Jamwal *et al.*, 2018; Lynch, 2022; Salim *et al.*, 2023).

Ante ciertos estreses bióticos y abióticos, las plantas pueden reducir rasgos morfológicos como el número de hojas o ramas, área foliar, altura y volumen de la raíz. De hecho, las plantas tienen una diversa gama de mecanismos de defensa que les permiten hacer frente a condiciones de estrés y mejorar la acumulación de metabolitos secundarios durante este período (Jamwal *et al.*, 2018). Las señales de amenaza son reconocidas por los receptores y sensores de las plantas, que permiten respuestas defensivas para protegerlos de estas tensiones (Figura 7). Los factores

de transcripción juegan un papel en el control de defensa de la planta al detectar señales de estrés y dirigir la expresión de genes de defensa corriente abajo (Jan *et al.*, 2021).

Las fitohormonas juegan un papel importante en la primera etapa del reconocimiento del estrés abiótico. Así tenemos que la señalización del estrés oxidativo que se inicia en los tejidos vegetales debido a la mayor abundancia de compuestos de señalización, entre los que se encuentran el ácido abscísico y el etileno. La respuesta de la planta comprende el inicio de la síntesis intensiva de solutos compatibles como prolina, glicina, betaínas o azúcares que poseen propiedades osmolíticas y compuestos con fuertes propiedades antioxidantes, seguido de la disminución de la conductancia estomática (Jan *et al.*, 2021; Piasecka *et al.*, 2019).

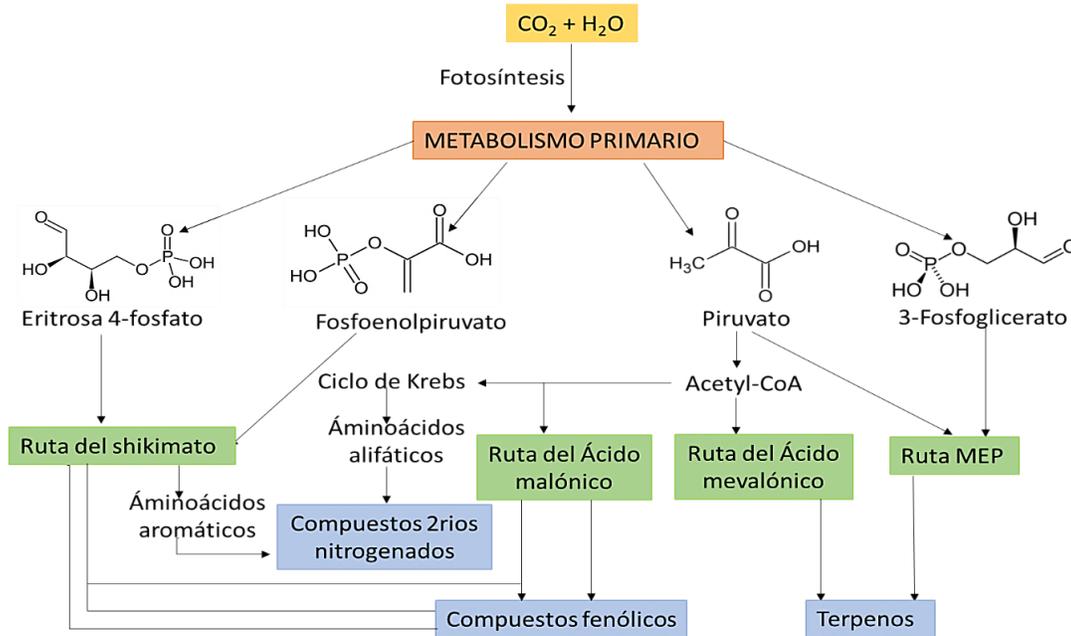
La complejidad de los metabolitos secundarios radica en que, al ser producidos por organismos vivos, poseen propiedades específicas para el cumplimiento de diferentes funciones. Esto lo logran mediante su estructura química, la cual busca la mayor afinidad a proteínas, enzimas y biomoléculas específicas para la realización de ciertas funciones biológicas y les brinda selectividad en la manera de actuar (Atanasov *et al.*, 2015). Aunado a esto, los agentes terapéuticos generados a partir de metabolitos secundarios pueden evitar los efectos secundarios adversos, a diferencia de los sintéticos, los cuales presentan menor efecto terapéutico y mayores efectos secundarios (Mathur y Hoskins, 2017). Actualmente, más del 60% de los medicamentos sintéticos son basados o derivados de productos naturales y el compuesto activo del 75% de los fármacos utilizados en la terapia contra el cáncer son basados en plantas (Sharifi *et al.*, 2019).



**Figura 7.** Etapas de las reacciones de las plantas a los estreses bióticos y abióticos. Los procesos particulares pueden ser específicos para cada estímulo ambiental, sin embargo, cada uno de ellos conduce a una mejora de la adaptación de la planta al estrés y a una respuesta más eficaz en el futuro.

#### I.4.2 Rutas metabólicas de metabolitos secundarios.

En las plantas silvestres las rutas metabólicas secundarias pueden ser modificadas por factores externos, como los niveles de nutrientes, factores de estrés, luz y reguladores del crecimiento (Babich *et al.*, 2021; Kisiel *et al.*, 2023). Sobre la base de las vías biosintéticas, los metabolitos secundarios se dividen en tres grupos principales (Figura 8): compuestos fenólicos sintetizados en la ruta del shikimato, terpenos sintetizados en la vía mevalónica y compuestos que contienen nitrógeno sintetizado en la vía del ciclo de Krebs (Twaij y Hasan, 2022)



**Figura 8.** Rutas del metabolismo secundario.

La ruta de los policétidos desempeña un papel vital en la biosíntesis de ácidos grasos. Se derivan de acetil CoA o malonil CoA. Los metabolitos secundarios establecidos a partir de la vía de los policétidos incluyen acetogeninas, jasmonatos, ácido metilsalicílico, plumbagina, coniina y antraquinonas (Jan *et al.*, 2021).

La biosíntesis de terpenoides en plantas utiliza dos vías autónomas, es decir, la ruta del ácido mevalónico y la del metil-D-eritritol. La primera vía sirve a los precursores para la síntesis de brasinoesteroides, sesquiterpenoides, fitoesteroles, triterpenoides, y poliprenoles. La segunda vía se utiliza para la biosíntesis de monoterpenoides, diterpenoides, hemiterpenoides, tocoferoles, plastoquinonas, reguladores del crecimiento vegetal como citoquininas, giberelinas, entre otras (Setyorini y Antarlina, 2022).

La vía del shikimato está altamente conservada y se conoce que es la principal fuente de fenilpropanoides y compuestos aromáticos (Twajj y Hasan, 2022). Se considera que es una vía metabólica esencial en las plantas en relación con el flujo de carbono, ya que se estima que más del 30% del carbono fijado se aprovecha a través de esta vía (Lynch, 2022). El metabolismo

general de los fenilpropanoides implica la participación de la enzima fenilalanina amonio liasa (PAL) (Schott *et al.*, 2022); esta enzima cataliza el proceso de síntesis mediante la desaminación de la fenilalanina a ácido cinámico, que además es catalizada por la tirosina amoníaco liasa para producir ácido p-cumárico (Sagharyan *et al.*, 2020; Vázquez *et al.*, 2016). Ambos cinámicos y el ácido p-cumárico son catalizados por 4-cumaroil-CoA ligasa para cinamoil-CoA y p-cumaroil-CoA (Zhou *et al.*, 2022). Estos fenoles son precursores de los compuestos polifenólicos, que son estilbenos (esqueleto de carbono C6-C2-C6), flavonoides (C6-C3-C6) y lignanos ((C6-C3)<sub>2</sub>) (Setyorini y Antarlina, 2022). Especialmente, p-cumaroil-CoA es un intermediario clave en la biosíntesis de varios fenilpropanoides tales como las cumarinas, flavonoides, lignanos, estilbenoides, catequinas, vainillina, ácido gálico, betalaínas, entre otros (Twaij y Hasan, 2022).

La diversidad de los fenilpropanoides es causada por la hidroxilación, metilación, acilación, isomerización, oligomerización y/o glicosilación que modifican los metabolitos secundarios a productos con mayor estabilidad y solubilidad en agua; aunque también pueden ser inactivados y detoxificados (Metsämuuronen y Sirén, 2019). En general, los fenilpropanoides se almacenan como glicosilados, se forman en la vacuola, desde donde pueden ser liberados y escindidos adicionalmente por b-glucosidasas dando paso a la forma activa o aglicona (Schott *et al.*, 2022; Zhou *et al.*, 2022).

#### I.4.3 Mecanismo de acción de compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos son la categoría más grande de fitoquímicos y los más ampliamente distribuidos en el reino vegetal. La ruta del shikimato se activa en condiciones de estrés para producir triptófano, tirosina y fenilalanina, que mejoran aún más la biosíntesis de estos compuestos (Kisiel *et al.*, 2023).

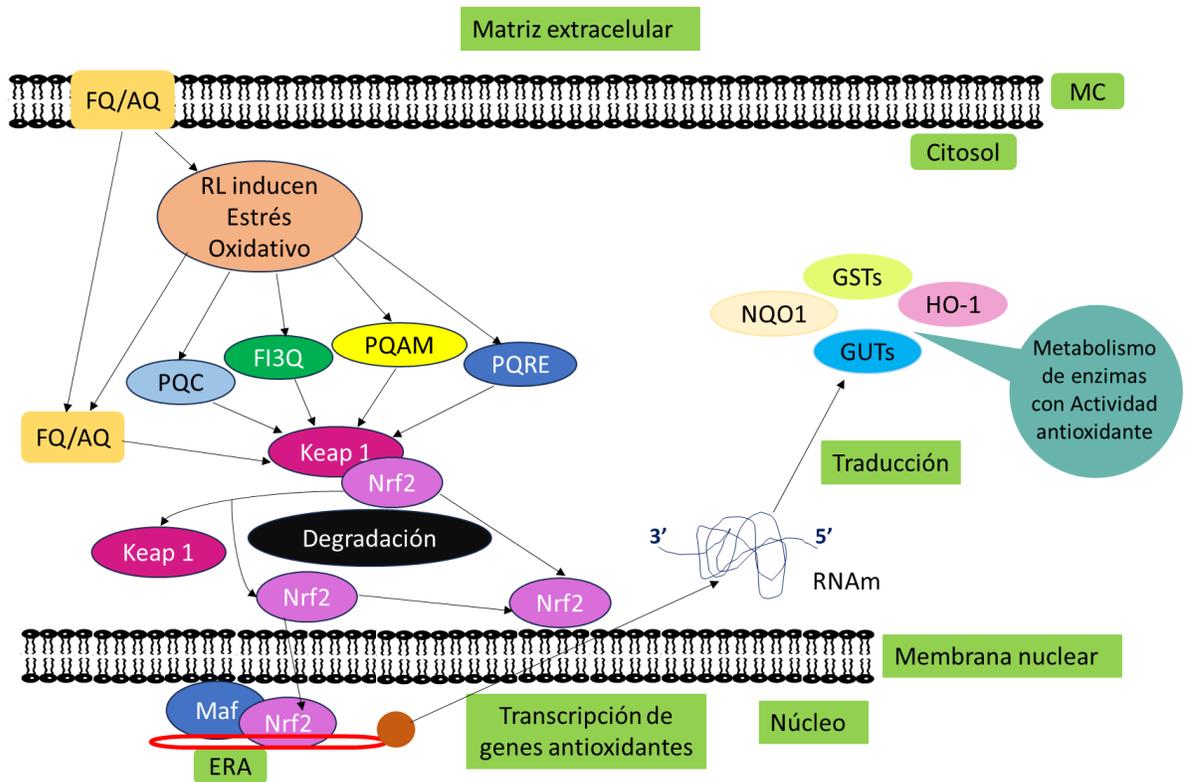
Las plantas tienen un sistema sofisticado de reconocimiento y señalización que permite detectar rápidamente el ataque de patógenos y puede iniciar una respuesta defensiva dinámica. Los compuestos fenólicos se acumulan en varias partes de la planta dependiendo de la condición de estrés; los solubles se sintetizan comúnmente en el retículo endoplásmico y se conservan en vacuolas, mientras que los poco solubles se producen por la transformación de compuestos

fenólicos solubles en la pared celular, donde se conjugan con moléculas de la pared celular a través de enlaces glucosídicos y de tipo éster. Su acumulación está regulada a nivel molecular por varios genes que codifican factores de transcripción (Jan *et al.*, 2021; Setyorini y Antarlina, 2022) .

Los polifenoles son buenos antioxidantes, capaces de neutralizar la reactividad destructiva de especies reactivas de oxígeno/nitrógeno producidas como subproductos del metabolismo (Costa *et al.*, 2021). Los compuestos fenólicos pueden eliminar directamente los radicales libres después de ingresar a las células y activar varias vías de señalización celular, que incluyen al factor nuclear eritroide-2 (NFE2) relacionado con factor 2 (Nrf2) asociado con Kelch complejo de proteína 1 (Keap1 Figura 9). Cuando se activa, el complejo Nrf2-Keap1 se inducen mecanismos de defensa celular, incluidas las enzimas desintoxicantes de fase II, los transportadores de fase III, proteínas de estrés antioxidante y otras moléculas de defensa contra el estrés que protegen a las células normales de EROs y metabolitos reactivos de especies cancerígenas.

Otro mecanismo que puede ser activado por fenoles es la cascada de proteínas quinasas activadas por mitógenos (PQAM), que ayuda a regular la proliferación, la diferenciación, la reducción del estrés y la apoptosis en las células (Gupta *et al.*, 2017).

El elemento de respuesta antioxidante (ERA) en la región promotora de genes seleccionados permite la regulación ascendente coordinada de enzimas antioxidantes y desintoxicantes en respuesta a fitoquímicos. Esta regulación positiva está mediada por el factor nuclear (derivado de eritroides 2) similar a (Nrf2) que puede activarse por moléculas endógenas y exógenas o condiciones estresantes. Estos agentes interrumpen la asociación entre Nrf2 y Keap1 con la posterior translocación nuclear de Nrf2. En el núcleo celular, Nrf2 interactúa con la pequeña proteína Maf, formando un heterodímero que se une a la secuencia ERA en la región promotora y regula al alza la transcripción de muchos genes que codifican enzimas desintoxicantes (Davinelli *et al.*, 2012; Gupta *et al.*, 2017).



**Figura 9.** Mecanismo para la regulación de la expresión de genes antioxidantes mediado por Nrf2 en presencia de fitoquímicos. Nrf2 permanece asociado con la proteína Keap1 en la forma del complejo Keap1-Nrf2 en condiciones homeostáticas, por lo tanto, retenido dentro del citoplasma por la proteína Keap1. La interacción de los FQ con la proteína Keap1 desencadena la liberación de Nrf2 del complejo Keap1-Nrf2. Los radicales libres (RL) generados por FQ pueden activar las diversas vías de señalización, lo que puede desencadenar la liberación y translocación de Nrf2 del citosol al núcleo, que es responsable de la expresión de los genes antioxidantes. (FQ- Fitoquímico; AQ-Agente quimiopreventivo; RL-Radicales libres; PQC-Proteína quinasa C; FI3Q-fosfoinositido 3-quinasa; PQAM- proteína quinasa activada por mitógeno; Keap1- proteína 1 asociada a ECH similar a Kelch; Nrf2-factor nuclear-factor 2 relacionado con eritroide 2; ERA- elemento de respuesta antioxidante; AO- Antioxidante; ARNm- Ácido ribonucleico mensajero; GUT glucuronosiltransferasa; HO-1-hemoxygenasa-1; GST- glutatiónS-transferasa; NQO1-NAD(P)H-quinona oxidorreductasa 1; MC- Membrana celular; MN- membrana Nuclear).

La activación de la vía Nrf2 podría inhibir la producción o expresión de mediadores proinflamatorios, incluidos citocinas, quimiocinas, moléculas de adhesión, metaloproteinasas de matriz, ciclooxigenasa-2 y óxido nítrico sintasa inducible (Davinelli *et al.*, 2012). En el contexto de la tumorigénesis, ha habido un interés renovado en Nrf2 como impulsor de la

progresión y resistencia a la terapia del cáncer, en los últimos años, debido a que muchas células cancerosas secuestran la señalización de estrés del retículo endoplasmático para promover la progresión del tumor (Sarcinelli *et al.*, 2020).

Además de que los compuestos fenólicos son conocidos como antioxidantes y posibles quelantes de metales se le han atribuido varias propiedades terapéuticas y de inhibición de enfermedades como antioxidantes, antiinflamatorios anticancerígenos, antivirales y antibacterianos, lo cual los coloca entre los grupos naturales de compuestos activos para la nutrición humana y el cuidado de la salud (Mamdouh y Smetanska, 2022; Metsämuuronen y Sirén, 2019; Bié *et al.*, 2023; Ozyigit *et al.*, 2023).

### **I.5 Cultivos vegetales.**

El cultivo de tejidos vegetales se refiere al conjunto de técnicas que permiten la multiplicación de plantas a partir de diversos tejidos de una planta madre, obteniendo así muchos ejemplares a partir de poco material vegetativo (Castañeda *et al.*, 2014). Desde que se creó este cultivo a inicios del siglo XX por Haberlandt, se convirtió en una herramienta esencial para la investigación de plantas (Calva y Pérez, 2005).

El principio básico del cultivo vegetal consiste en la propagación asexual, el balance hormonal y la totipotencialidad de las células vegetales, esta última es única en plantas, no puede encontrarse en animales superiores e indica que cualquier célula vegetal contiene una copia íntegra del material genético de la planta a la que pertenece sin importar su función o posición en ella y por lo tanto tiene el potencial para regenerar una nueva planta completa por medio de la división y diferenciación celular (Ozyigit *et al.*, 2023).

La propagación asexual de tipo clonal, también conocida como micropropagación es la técnica universal de clonación masiva de plantas; se fundamenta en la plasticidad celular, las que permiten a las células vivas convertirse en una nueva célula genéticamente idéntica a la que le dio origen mediante procesos de diferenciación celular, llegando a formar células, tejidos, órganos e individuos completos. Esta técnica es muy utilizada en cultivos de importancia económica, puesto que permite cultivar células de diversos tipos celulares (tejidos, órganos, semillas, embriones) produciendo plantas de calidad uniforme a escala comercial, a partir de un

genotipo selecto y con una tasa de multiplicación ilimitada. Los cultivos son realizados en medios enriquecidos específicos que permiten las condiciones necesarias para la embriogénesis u organogénesis, siendo necesario un estricto control de las condiciones ambientales. Además, una vez ajustados los protocolos para la especie o cultivo de interés, es posible automatizar el proceso y multiplicar la producción.

Los medios de cultivo deben optimizarse para cumplir con las necesidades nutricionales requeridas para el tejido *in vitro*. Por regla general, se hace a partir de variaciones en la concentración de nutrientes minerales, sustancias orgánicas y reguladores del crecimiento de las plantas. Los reguladores de crecimiento vegetal más empleados pertenecen al grupo de las auxinas y las citoquininas. Las auxinas en el medio de cultivo se relacionan con la formación de raíces adventicias y tejidos callogénicos, mientras que las citoquininas provocan la división celular y crecimiento de brotes. La interacción de las auxinas y las citoquininas también se utilizan ampliamente para la inducción y mantenimiento de los callos. Las auxinas inician la división celular y controlan los procesos de crecimiento y elongación celular porque inducen la transcripción de ARN mensajero, moléculas capaces de codificar proteínas importantes para el crecimiento (De Queiroz *et al.*, 2015). La citoquinina es la hormona vegetal más importante para potenciar el crecimiento y desarrollo de las plantas, ya que promueve la división celular y la diferenciación.

Actualmente se han elaborado diferentes medios de cultivo, entre los más empleados se encuentra el medio MS desarrollado por Murashige y Skoog (1962) y el medio, Woody Plant Medium (WPM) fabricado por Lloyd y Mc Cown (1980). El medio MS proporciona un crecimiento exitoso de células y tejidos debido a la alta concentración de amonio, nitrato y potasio. Sin embargo, este medio tiene una baja cantidad de fosfato, lo que, según muchos investigadores, es insuficiente para sostener el crecimiento de varias especies. Por otro lado, el medio WPM, desarrollado para el cultivo de brotes de plantas leñosas, tiene una concentración del 25% de amonio, nitrato, sulfato y iones de potasio y el doble de la concentración de iones de fosfato, en comparación con el medio MS. De hecho, una mayor concentración de potasio y un alto nivel de iones de sulfato son ampliamente utilizados en la micropropagación de plantas leñosas como arbustos y árboles (De Queiroz *et al.*, 2015).

Por lo que, dicho de una forma más amplia en un ambiente con condiciones controladas, usando medios de cultivo definidos, una planta entera puede regenerarse a partir de pequeños explantes provenientes de la planta madre; la tasa de crecimiento dependerá de varios factores, entre ellos la edad, la especie, el tipo de tejido, la composición de los medios de cultivo y las condiciones ambientales (Mamdouh y Smetanska, 2022).

Todos los métodos de cultivo de tejidos vegetales siguen una serie de pasos. Primero, la planta de interés necesita ser seleccionada; las plantas deben estar libres de enfermedades e insectos; si la planta lo requiere, algunos pretratamientos (fungicidas y pesticidas) pueden ser aplicados. Las concentraciones de reguladores del crecimiento vegetal podrían diferir según el tipo de planta. La temperatura, la luz y otras variables culturales tienen un papel en la creación de callos y crecimiento. El siguiente paso es la iniciación del cultivo *in vitro* mediante la escisión de pequeños trozos de plantas (explantes) o el uso de semillas y su esterilización superficial con productos químicos. Seguidamente se procede a la inoculación de estos explantes en el medio de cultivo y por último se incuban en condiciones de luz, temperatura y humedad definidas. Estos pasos permiten la producción masiva de plantas, el crecimiento de determinados órganos y la obtención de callos.

Dentro del mencionado algoritmo la selección de la planta utilizar es un factor decisivo para el cultivo, dicha elección dependerá de una serie de factores, siendo las principales el propósito del estudio y la disponibilidad de la planta. La mayoría de las plantas empleadas para la producción de metabolitos secundarios son de tipo silvestre, no cultivadas, ya que contienen las herramientas metabólicas necesarias para la producción de muchos metabolitos de interés.

Por otra parte, la elección de los medios de cultivo adecuados juega un papel vital en la fabricación de metabolitos secundarios. Los componentes del medio de cultivo como macro y micronutrientes, vitaminas, carbohidratos (azúcares) y aminoácidos, y reguladores del desarrollo vegetal, por ejemplo, citoquininas, auxinas, las giberelinas, jasmonatos y salicilatos influyen en la producción de metabolitos.

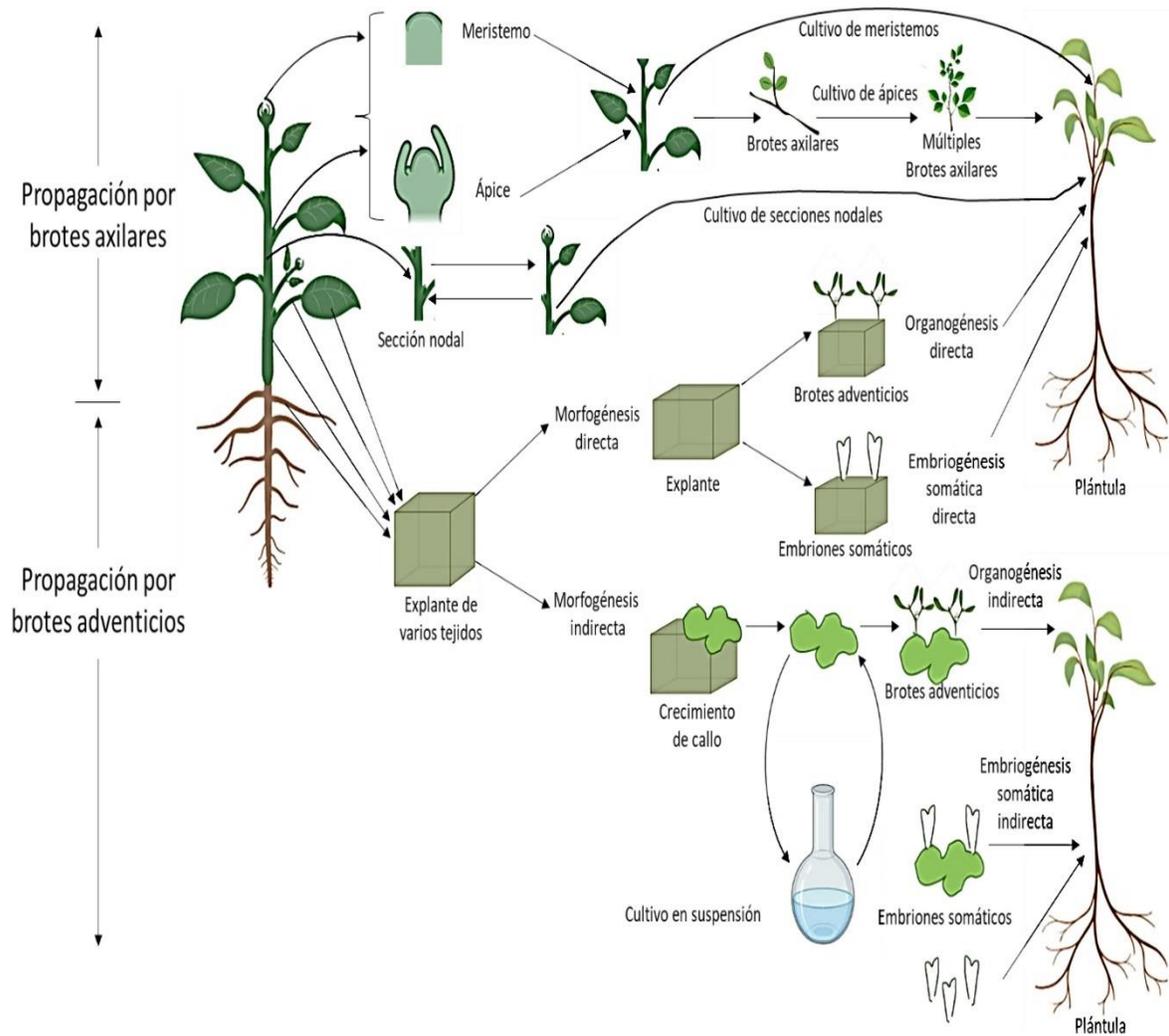
### I.5.1 Cultivo de callos

Los metabolitos de las plantas se pueden aislar de plantas cultivadas naturalmente, pero su producción comercial es limitada debido a problemas ambientales y limitaciones regionales. Muchas plantas no pueden propagarse de forma natural por la baja producción y viabilidad de sus semillas, las infecciones bacterianas y fúngicas, la introducción de especies exóticas, la deforestación y la pérdida de hábitat; por lo que se necesita de técnicas biotecnológicas modernas para satisfacer las demandas de las industrias farmacéuticas, tales como el cultivo de tejidos vegetales (Islam y Alam, 2018; Lozano., 2015; Rodríguez *et al.*, 2014). Esta técnica es indispensable para la producción de plantas libres de enfermedades, multiplicación rápida de plantas raras, genotipos, transformación del genoma vegetal y producción de metabolitos derivados de plantas de importante valor comercial. Existen diferentes sistemas *in vitro* para la producción de metabolitos secundarios, entre ellos se encuentran las suspensiones celulares, cultivo de raíces peludas y el cultivo de callos (Mamdouh y Smetanska, 2022; Ozyigit *et al.*, 2023).

Los callos se desarrollan naturalmente en una planta a causa de una herida, son una masa de células irregulares indiferenciadas, que pueden diferenciarse o multiplicarse indefinidamente en respuesta a agentes químicos o lesiones físicas y tienen la capacidad de diferenciarse en tejidos y órganos (De Queiroz *et al.*, 2015). Los cultivos de callos suelen tomar un breve tiempo para multiplicarse, necesitan espacios pequeños, no son caros, no requieren equipamiento especial, y pueden ser aplicados en diferentes escalas (Mamdouh y Smetanska, 2022). Por este motivo entre las técnicas de cultivo *in vitro*, el cultivo de callos se destaca como una alternativa económicamente viable que puede ser utilizada para la preservación de especies y para la obtención de metabolitos bioactivos de las plantas; debido a que los callos son heterótrofos, por lo que carecen de estructuras lignificadas, lo que facilita la extracción e identificación de metabolitos secundarios (Avinash y Umesha, 2018; De Queiroz Braga *et al.*, 2015).

Se denomina organogénesis al proceso que implica la formación *in vitro* de estructuras vegetales, incluidas raíces, brotes y hojas, a través de su derivación directa del meristemo o indirectamente, del callo (Figura 10). El proceso de regeneración vegetal vía organogénesis es posible a través de reguladores del crecimiento vegetal que se modifican alterando sus concentraciones en el medio nutritivo para actuar sobre la formación de callos y la

diferenciación de meristemas adventicios en órganos (Ozyigit *et al.*, 2023). El callo puede entonces utilizarse para regenerar plantas enteras, o puede ampliarse para la producción de metabolitos importantes en suspensión celular (Babich *et al.*, 2021).



**Figura 10.** Vías de regeneración de plantas por cultivo de tejidos. Esquema modificado a partir de (Boeri, 2016).

### I.5.2 Producción de metabolitos secundarios *in vitro*

Se ha documentado ampliamente que las fuentes vegetales ricas en una variedad de metabolitos secundarios se pueden usar con fines medicinales y terapéuticos y se han realizado esfuerzos para comercializar la producción para el beneficio humano. En este sentido la biotecnología *in vitro* puede mejorar significativamente la producción y uso de metabolitos secundarios (Ochatt *et al.*, 2022), debido a que en ocasiones no es posible utilizar la vía de síntesis bioquímica de metabolitos secundarios a nivel industrial debido a la complejidad de las vías metabólicas; sus estructuras complicadas de sintetizar en un laboratorio y la quiralidad que exhiben estos compuestos (Cui *et al.*, 2022).

Los métodos convencionales para la obtención de metabolitos secundarios por lo general consumen mucho tiempo ya que la planta tarda varios años en crecer y alcanzar el punto para la producción deseada de metabolitos. Por otro lado, la mayoría de estos compuestos bioactivos se aíslan de la naturaleza, lo que lleva a una sobreexplotación de especímenes silvestres o de plantas cultivadas que pueden tener bajas tasas de acumulación del producto de interés, a menudo debido a un conocimiento incompleto de las condiciones más favorables para su biosíntesis. Por este motivo los cultivos *in vitro* (células, callos, yemas y brotes) brindan la mejor alternativa para el suministro suave y constante de ingredientes activos vegetales permitiendo superar las limitaciones ambientales (Babich *et al.*, 2021; Khan *et al.*, 2021)

El cultivo de plantas medicinales y la producción *in vitro* de metabolitos secundarios son las únicas formas sostenibles para satisfacer la demanda del mercado (Babich *et al.*, 2021). La acumulación de metabolitos secundarios ocurre normalmente en plantas a las que se les han introducido varias moléculas señalizadoras o elicitores (Ochatt *et al.*, 2022). En este sentido, los reguladores del crecimiento vegetal se han utilizado como elicitores competentes para estimular la producción de metabolitos secundarios de las plantas, estos compuestos abarcan sustancias hormonales de ocurrencia natural (fitohormonas) así como sus análogos sintéticos Tabla 1 (Jamwal *et al.*, 2018).

**Tabla 1.** Principales hormonas y sus tipos.

<b>Principales hormonas</b>	<b>Hormonas naturales</b>	<b>Hormonas sintéticas</b>
Auxinas	Auxina Indol-3-ácido acético (AIA) Indol-3-acetonitrilo (IAN) Indol-3-acetaldehído (IAc) Etilindolacetato Ácido indol-3-pirúvico (AIP)	Ácido indol 3 butírico (AIB) Ácido indol 3 propiónico (AIP) Indazol 3 ácido acético Ácidos clorofenoxipropiónicos Ácido naftaleno acético (ANA)  Ácido fenoxiacético (APA) Ácido 2, 4-diclorofenoxiacético (2, 4-D) Ácido 2,4,5-triclorofenoxiacético (2,4,5-T) Naftaleno acetamida (NAAM) Ácido 2-naftoxiacético (ANO) Ácido 2, 3,5-triodobenzoico (ATB) Ácido tianaften-3-propiónico (ATP)
Citoquininas	Ribosilzeatina Zeatina Isopentiniladenina Dihidrozeatina	6-Bencil amino purina 6-fenil aminopurina Kinetina [(N-Bencil-9-(2-etrahidropirano) adenina] (BEA) Difenilurea Tidiazurón Bencimidazol Adenina 6-(2-tenilamino) purina
Giberelinas	GA GA4 GA7	GA GA <sub>3</sub>
Etileno	Etileno	Ethephon Ethrel
Brasinoesteroides	Dolicolida 28-homodolicolida Castasterona Dolicosterona 28-homodolicosterona Tifasterol	Cinco 5-hidroxi-6-cetona
Jasmonatos	Ácido jasmónico	Dihidrojasmonato de metilo Ácido dihidrojasmonico Jasmonato de metilo
Estrigolactonas	Estrigol Orobanchol	GR24

Se conoce que los reguladores de crecimiento funcionan a bajas concentraciones e intervienen en procesos fundamentales del crecimiento y desarrollo y en la regulación de la producción de metabolitos secundarios en plantas en cultivos de tejidos vegetales (Jamwal *et al.*, 2018). Los elicitores en cultivos de callos funcionan en bajas concentraciones e intervienen en procesos fundamentales para el crecimiento y desarrollo y producción (Jan *et al.*, 2021). Los elicitores más utilizados y probados son el ácido jasmónico y su éster metílico llamado jasmonato de metilo, triptófano, fenilalanina y moléculas mensajeras específicas de plantas que se originan a partir del ácido araquidónico (Twaij y Hasan, 2022). Aunque se sabe qué elicitores particulares deben usarse para metabolitos peculiares, aún no se conoce cómo las células vegetales reconocen un elicitador y cómo se transforman las señales en las células que expresan y controlar la biosíntesis de genes relacionados para producir metabolitos secundarios (Cui *et al.*, 2022). Por otro lado, la productividad de los metabolitos secundarios en los cultivos *in vitro* no solo depende de los elicitores, sino también de la composición del medio de cultivo, el pH, la densidad del inóculo, la temperatura, la luz, humedad, aireación, etc (Mamdouh y Smetanska, 2022).

La producción biotecnológica de metabolitos en cultivos de células y órganos vegetales es una atractiva alternativa a la extracción de material vegetal entero, sin embargo, el uso de cultivos de células y órganos vegetales sólo ha tenido éxito comercial limitado. Debido a que el proceso de selección de cultivos estables de alto rendimiento es de naturaleza empírica y finalmente por la falta de comprensión de la síntesis y regulación de los metabolitos secundarios (Namdeo, 2007).

## **I.6 Género *Acalypha***

La familia Euphorbiaceae es una de las más diversificadas de las angiospermas y del orden Malpighiales, con 300 géneros y, aproximadamente, unas 6500 especies (Davis *et al.*, 2005; Wurdack y Davis, 2009). Se caracteriza por tener hábito arbustivo, estípulas laterales, hojas simples y alternas, venación generalmente acródroma, inflorescencias en espiga, racimos o panículas uni o bisexuales, anteras vermiformes, estilos multífidos y brácteas generalmente acrescentes en fruto (Gómez *et al.*, 2015).

*Acalypha* Linnaeus (1753: 1003) (Euphorbiaceae: Acalyphoideae) comprende alrededor de 500 especies de árboles pequeños, arbustos y hierbas que ocupan una amplia gama de hábitats en todo el mundo, desde selvas tropicales hasta semidesiertos y desde el nivel del mar hasta 4000 m de altitud. La mayoría de las especies crecen en áreas tropicales y subtropicales (Cardiel y Montero, 2018). América es el hogar de casi dos tercios de las especies, que van desde el sureste de Canadá y los Estados Unidos hasta Uruguay y el norte de Argentina. México y Centroamérica se destacan como el centro de diversidad del género, África oriental tropical es un centro secundario de diversidad. *Acalypha* está incluida en la subfamilia *Acalyphoideae*, la más diversa y compleja de la familia Euphorbiaceae. Resultados moleculares preliminares de la filogenia de *Acalypha* sugieren que el género apareció por primera vez en África (Muñoz *et al.*, 2014; Muñoz *et al.*, 2018).

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

Recientemente están proliferando los estudios sobre las propiedades medicinales (antitumorales, antimicrobianas, entre otras) en distintas especies del género, ya que comúnmente, se utiliza la planta completa incluyendo las hojas, tallos y raíces en remedios tradicionales (Seebaluck *et al.*, 2015).

#### I.6.1 Género *Acalypha* como fuente de metabolitos bioactivos

Un gran porcentaje de las especies de *Acalypha* estudiadas han sido evaluadas para determinar sus actividades biológicas: *A. indica*, *A. hispida*, *A. fruticosa* y *A. wilkesiana* son las especies más citadas. Comúnmente se utilizan las especies del género en remedios tradicionales, para hacer mezclas y decocciones con la planta completa incluyendo las hojas, tallos y raíces para tratar diversos padecimientos (Seebaluck *et al.*, 2015); algunas de estas especies son *A. monostachya*, *A. pleoides* y *A. lindheimeri* (Estrada *et al.*, 2018; Estrada *et al.*, 2023). Varios fitoquímicos reportados del género *Acalypha* incluyen taninos, flavonoides, fenólicos,

saponinas, alcaloides, terpenoides, cumarinas, antocianinas y antraquinonas y otros compuestos bioactivos. Se han identificado más de 167 compuestos de alrededor de 19 especies, de los cuales aproximadamente el 10 % resultaron bioactivos (Seebaluck *et al.*, 2015b).

Un estudio realizado en *A. hispida* reveló el alto contenido de ácido elágico junto con otros constituyentes fenólicos, los que pudieron haber jugado un papel importante en la actividad antiinflamatoria y antioxidante observada (Siraj *et al.*, 2016). Los extractos de *Acalypha wilkesiana* contienen altos niveles de triterpenos, alcaloides, taninos y flavonoides, además de niveles moderados de saponinas (Lim *et al.*, 2011). Los resultados de análisis fitoquímicos de *Acalypha godseffiana* revelaron la presencia de alcaloides, flavonoides, taninos, saponinas y terpenoides (Olubodun *et al.*, 2021). Varios constituyentes químicos han sido aislados de *A. indica* incluyendo: taninos, L-quebrachitol, glucósidos de kaempferol y el glucósido cianogénico acalyphin (Sanseera *et al.*, 2012). Refilda *et al.*, 2021 evaluaron la actividad antioxidante de los extractos metanólicos y etanólicos de *A. indica* y encontraron que esta se debía a la presencia de compuestos pertenecientes al grupo de los fenoles, tales como los flavonoides, así como a esteroides, terpenoides y alcaloides. Kambara *et al.*, 2006 purificaron el tetraterpeno acalyphaser A, aislado de *A. siamensis*, empleando técnicas de RMN y espectrometría de masas. El examen fitoquímico preliminar realizado en *A. ciliata* reveló la presencia de alcaloides, saponinas, flavonoides, taninos, azúcares reductores, fenoles, glucósidos y resinas en algunos de los extractos evaluados (hexano, acetato de etilo, metanol) (Odeja *et al.*, 2016).

#### I.6.2 Actividad antiproliferativa y anticancerígena en el género *Acalypha*

Se les han conferido propiedades anticancerígenas a numerosas especies del género. Una investigación realizada en *A. wilkesiana* arrojó que los extractos de acetato de etilo y hexano poseen valiosos efectos citotóxicos que desencadenan la apoptosis en células cancerosas U87MG (glioblastoma astrocytoma) y A549 (carcinoma de pulmón) a través de la inducción de rupturas de simple y doble cadena en la molécula de ADN (Lim *et al.*, 2011). *A. siamensis* exhibió una fuerte inhibición mediante ensayos de citotoxicidad utilizando células de leucemia murina P388 (Kambara *et al.*, 2006). Otros estudios realizados en *A. wilkesiana* indican la

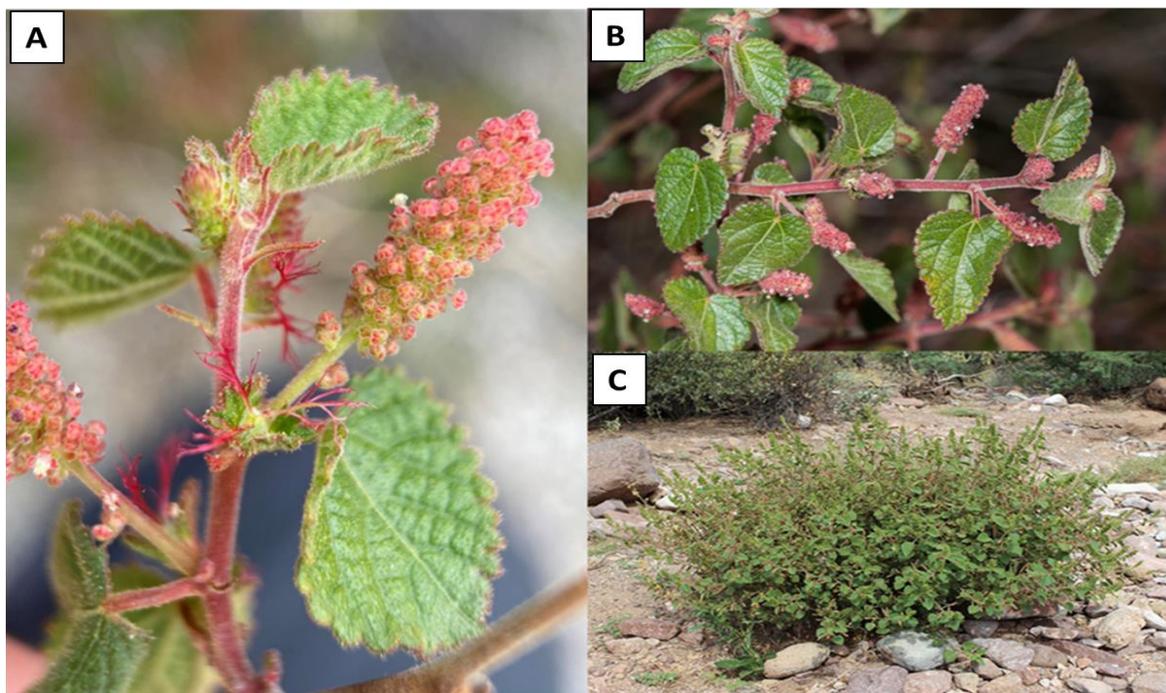
presencia de actividad citotóxica en HepG2 (carcinoma hepatocelular) y MCF7 (carcinoma de mama) empleando fracciones de extracto etanólico que muestran una inhibición del 75.8% y del 87.1%, respectivamente; así como una potente actividad antioxidante al realizar una prueba de DPPH (Abubakar *et al.*, 2018). Guillén *et al.*, 2021 demostraron un efecto citotóxico *in vitro* a partir de extractos de *A. monostachya* en las líneas celulares tumorales humanas HeLa (carcinoma de cuello uterino) y MDA-MB-231 (cáncer de mama triple negativo), siendo más sensibles en células HeLa; especialmente los extractos metanólicos y hexánicos mostraron el mayor efecto citotóxico a concentraciones mínimas en comparación con el extracto acuoso que mostró este efecto en las concentraciones más altas. Sin embargo, todos los extractos indujeron cambios morfológicos significativos en células tumorales. Otros estudios han demostrado la actividad anticancerígena de los extractos metanólicos, hexánicos y de cloroformo de *A. indica* mediante el ensayo de resazurina; estos extractos no fueron citotóxicos para células Vero (riñón no tumoral) pero si mostraron actividad anticancerígena frente a células NCIH187 (carcinoma de pulmón) (Sanseera *et al.*, 2012). Rajkumar *et al.*, 2010 demostraron un efecto citotóxico moderado de *A. fruticosa*, ya que su extracto etanólico inhibió la proliferación de células MDA-MB-435S (línea celular de melanoma) y Hep3B (carcinoma hepatocelular); además de que se evidenció la protección del ADN contra el daño oxidativo inducido con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

En un estudio previo Rascón *et al.*, 2015 demostraron que el extracto metanólico de *A. californica* y sus fracciones de solventes poseían actividad antiproliferativa media en las líneas celulares murinas M12.A<sup>k</sup>.C3.F6, RAW 264.7 y L929, así como en la línea celular cancerosa humana HeLa y que dicho efecto era debido a la activación de la apoptosis; adicionalmente se realizó un perfil químico de las sustancias contenidas en las fracciones con mayor actividad encontrando principalmente proantocianidinas y algunos ácidos fenólicos. Aunque dicho estudio fue el primero en brindar información sobre las actividades biológicas y la composición química de la planta, con excepción de la línea HeLa, no fue evaluada la actividad en otras líneas celulares cancerosas humanas.

### I.6.3 *Acalypha californica*

*Acalypha californica* Bentham se clasifica taxonómicamente de la siguiente forma: reino Plantae, división Tracheotophyta, clase Magnoliopsida, orden Malpighiales, familia Euphorbiaceae (Bentham, 1844).

En México se distribuye en los estados de Sonora y Baja California y en Estados Unidos se puede encontrar en el estado de California (Rascón *et al.*, 2015). Es un arbusto perenne de 1 m de altura con tallos jóvenes densamente hirsutos y tallos más viejos glabros y rojizos. Las hojas son de ovadas a cordadas, hirsutas y glandulares con el margen crenado. Las flores son estaminadas y pistiladas, con inflorescencias rojizas en las axilas inferiores (Figura 11). Los frutos son cápsulas esféricas o lobuladas, hispídeos y glandulares. Habita en laderas rocosas y su floración ocurre durante todo el año, especialmente de marzo-abril y de septiembre-noviembre (Gómez *et al.*, 2015; Muñoz *et al.*, 2014).



**Figura 11.** Fotografía de las partes aéreas de *A. californica*. A) Inflorescencias de *A. californica*. y venación del haz y envés del limbo foliar. B) Rama de *A. californica* con hojas e inflorescencias. C) Arbusto de *A. californica* en suelos rocosos.

Actualmente esta planta es utilizada por los grupos étnicos de Sonora para tratar el cáncer por lo que es conocida como la “hierba del cáncer” (Rascón *et al.*, 2015). De igual forma la comunidad indígena de Baja California conocida como Santa Catarina consume las hojas de *Acalypha californica* en cocimiento para el tratamiento del cáncer, la inflamación y los riñones (Cortés, 2013). Sin embargo, la afirmación de la eficacia de estos extractos contra varios padecimientos debe estar respaldada por pruebas científicas con el objetivo de garantizar la seguridad de su uso (Martínez, 2015). Por otro lado, *A. californica* no es cultivada, de manera tal que la especie crece en hábitats expuestos a las actividades antropogénicas y la colecta indiscriminada, resultando en la disminución significativa de sus poblaciones silvestres.

## **II. HIPÓTESIS**

El potencial antioxidante de *Acalypha californica* se conserva en callos. Sin embargo, las actividades antiproliferativa y antiinflamatoria de la planta variarán, de acuerdo, a los inductores empleados en el cultivo de tejidos vegetales.

### **III. OBJETIVOS**

#### **III.1 Objetivo general.**

Desarrollar el cultivo de callos de *Acalypha californica* y determinar la actividad antioxidante *in vitro*, antiproliferativa y antiinflamatoria de su extracto etanólico y el de plantas silvestres en diferentes líneas tumorales; así como comparar el perfil químico de ambos extractos.

#### **III.2 Objetivos específicos.**

- Definir el protocolo para obtener callos de *A. californica*
- Evaluar la actividad antiproliferativa de extractos etanólicos de plantas silvestres y de callos de *A. californica*, en tres líneas celulares de cáncer humano.
- Evaluar la actividad antioxidante de extractos etanólicos de plantas silvestres y de callos de *A. californica* mediante los métodos de DPPH y FRAP.
- Evaluar el potencial para disminuir la liberación de óxido nítrico de los extractos etanólicos de plantas silvestres y de callos y de *A. californica*.
- Generar los perfiles de compuestos fenólicos de los extractos etanólicos de plantas silvestres y de callos y de *A. californica*.

## **IV. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **IV.1 Material vegetal.**

Las partes aéreas de *A. californica* fueron recolectadas en septiembre del 2018 en el Cerro del Bachoco, en la ciudad de Hermosillo, Sonora, México (29°8'51.3'' N, 110°57'0''O, matorral semidesértico, temperatura promedio 32°C, humedad relativa media 56%). La planta fue identificada en el Herbario de la Universidad de Sonora (USON) y se le asignó el número de registro 026567.

### **IV.2 Inducción de callos.**

Para la inducción de los callos fueron elegidos tallos juveniles de *A. californica* obtenidos en la colecta, los cuales fueron lavados con agua corriente durante veinte minutos, luego con detergente mediante agitación manual por tres minutos. Para la asepsia las muestras fueron colocadas en alcohol al 70% (v/v) durante 60 segundos, seguido de un lavado en solución de hipoclorito de sodio al 2% con una gota de Tween 20 durante 15 minutos. Finalmente, los tallos fueron enjuagados con agua destilada estéril en tres ocasiones. Los explantes seleccionados para el estudio fueron hojas, pecíolos, yemas y segmentos nodales, mismos que fueron cortados en trozos de 0.5 – 1.0 cm con un bisturí estéril.

Para realizar el cultivo *in vitro* fue utilizado el medio para plantas leñosas Woody Plant Medium (WPM) suplementado con cuatro concentraciones (0.5,1.0,1.5,2.0 mg/L) de ácido indolbutírico (AIB), 6-bencilaminopurina (BAP) o cinetina (CIN) siguiendo la metodología empleada por (Majumder y Rahman, 2016), además se realizó la comparación con el grupo control, dando un total de 13 tratamientos. El pH del medio de cultivo se ajustó a 5.7 antes de adicionar el agar y la sacarosa, después se vertieron 25 mL de medio en frascos de vidrio, todo en condiciones de esterilidad.

Posteriormente, el medio que se encontraba en los frascos fue inoculado con los diversos explantes y se mantuvieron con un fotoperíodo de 16 horas luz a 27±1 °C de temperatura. El

subcultivo se realizó en un medio de igual composición al que permitió la callogénesis. El medio sin reguladores de crecimiento vegetal fue utilizado como control.

#### IV.2.1 Porcentaje de inducción de callos y morfología.

Los datos sobre la inducción de callos (%) se registraron con la ayuda de la siguiente fórmula: Porcentaje de inducción de callos = (N° de explantes que produjeron callos/N° de explantes) ×100. En la inducción completa del callo para cada tratamiento se examinaron visualmente la textura y el color.

### **IV.3 Preparación del extracto etanólico de callos y planta silvestre de *A. californica***

El extracto etanólico fue obtenido mediante maceración de los callos liofilizados (6 semanas de crecimiento) con etanol al 70% en proporción 1:10 durante diez días con agitación intermitente a temperatura ambiente. El solvente fue removido mediante evaporación bajo presión reducida a 40 °C en un evaporador rotatorio (IKA, RV 10 digital, Wilmington, NC, USA). El extracto concentrado fue guardado a 4 °C, protegido de la luz, para su uso en ensayos posteriores.

El extracto etanólico de la planta silvestre se obtuvo por maceración de las partes aéreas (tallos, hojas, flores y frutos) de *A. californica* secadas previamente a temperatura ambiente (50 g) en etanol (500 mL) al 70 % (v/v) durante 10 días mediante agitación constante. El disolvente se eliminó por evaporación durante tres días en campana de extracción.

### **IV.4 Cultivo celular.**

Para los ensayos de actividad antiproliferativa se utilizaron como modelos las líneas celulares cancerígenas humanas A549 (carcinoma pulmonar) (ATCC CRM-CCL-185), HeLa (adenocarcinoma cervicouterino) (ATCC: CCL-2), MCF-7 (adenocarcinoma mamario) (ATCC: HTB-22) y ARPE-19 (no cancerosa, epitelio pigmentado de la retina) (ATCC: CRL2302). En tanto que para el ensayo de actividad antiinflamatoria mediante la medición de óxido nítrico se utilizó como modelo la línea murina RAW 264.7 (macrófagos transformados por el virus de la

leucemia de Abelson) (ATCC: TIB-71). Todas las líneas celulares fueron adquiridas de la American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, EUA). Cada línea se mantuvo en el medio de cultivo DMEM alto en glucosa suplementado con 1% (v/v) de solución de penicilina-estreptomicina (10000 unidades de penicilina y 10 mg de estreptomicina/mL), 0.75% (v/v) de solución de L-glutamina 200 mM, 1% (v/v) de solución de piruvato de sodio 100 mM y 5% de suero fetal bovino. Las células fueron cultivadas en frascos de cultivo celular de 25 cm<sup>3</sup> y mantenidas a 37 °C en una incubadora con atmósfera humidificada y 5% de CO<sub>2</sub>. Las células se utilizaron para los ensayos una vez que se obtuvo el 80% de confluencia. Para despegar las células del fondo del frasco se utilizó una solución de tripsina-EDTA (Rascón *et al.*, 2015).

#### IV.4.1 Actividad antiproliferativa de callos y planta silvestre (ensayos de viabilidad celular).

La actividad antiproliferativa se evaluó mediante el ensayo de reducción de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio] (MTT; Mossman, 1983), con algunas modificaciones. Las células ( $1 \times 10^4$  por pozo, 50  $\mu$ L) fueron colocadas en cada pozo de una placa de 96 pozos y se incubaron durante 24 h a 37 °C en una atmósfera del 5% de CO<sub>2</sub>. Después se añadieron alícuotas de 50  $\mu$ L de medio (DMEM 5% FBS) con un intervalo 6.25 a 200  $\mu$ g/mL del extracto disuelto previamente en DMSO (concentración máxima de DMSO 0.5%) y las células estimuladas fueron incubadas durante 48 h. En las últimas 4 horas del período de incubación, el medio de cada pozo fue retirado y se realizó un enjuague con PBS 1X, posteriormente 100  $\mu$ L de medio fresco fueron añadidos a cada pocillo, así como 10  $\mu$ L de solución de MTT (5 mg/mL). El fármaco de amplio espectro doxorrubicina fue utilizado como control y con fines de comparación. La viabilidad celular se evaluó por la capacidad de las células metabólicamente activas para reducir la sal de tetrazolio a cristales de formazán, mismos que fueron disueltos con 100  $\mu$ L de alcohol isopropílico ácido. La absorbancia de las muestras se midió con un lector de microplacas (Thermo Fisher Scientific Inc. Multiskan GO, Waltham, MA, USA), utilizando una longitud de onda de prueba de 570 nm y una longitud de onda de referencia de 630 nm. La absorbancia de las células tratadas únicamente con DMSO fue considerada como el 100% de proliferación. La actividad antiproliferativa de los extractos fue reportada como valores de IC<sub>50</sub> o en porcentaje de proliferación cuando no se pudo inhibir el crecimiento del 50% de las células.

#### **IV.5 Contenido de fenoles totales (TPC).**

El contenido fenólico total de los extractos etanólicos de los callos y planta silvestre de *A. californica* se determinó utilizando el método de Folin-Ciocalteu adaptado a microplaca de 96 pozos (Sánchez *et al.*, 2013). Brevemente, se pesaron 10 mg del extracto seco y se disolvieron en 1 mL de metanol. Posteriormente 30  $\mu$ L de la solución de extracto se mezclaron con 30  $\mu$ L del reactivo de Folin-Ciocalteu al 10%. Las mezclas fueron incubadas por dos minutos a 40 °C. Seguidamente fueron adicionados a cada pozo 240  $\mu$ L de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 7% (p/v) y las mezclas fueron incubadas por 20 minutos a 40 °C. La absorbancia de cada pozo fue medida a una longitud de onda de 760 nm utilizando un espectrofotómetro de microplacas (Thermo Fisher Scientific Inc. Multiskan GO, Waltham, MA, USA). El contenido fenólico total de las muestras se calculó a partir de la curva de calibración de ácido gálico (0-58 mM). Los resultados fueron expresados como mmol de equivalentes de ácido gálico (GAE) por gramo de extracto.

#### **IV.6 Contenido de flavonoides totales (TFC).**

Para determinar el contenido total de flavonoides de los extractos etanólicos de los callos y planta silvestre de *A. californica* se evaluó la formación de complejos con aluminio (Shraim *et al.*, 2021). En una microplaca de 96 pozos se colocaron 100  $\mu$ L de agua desionizada, 10  $\mu$ L de NaNO<sub>2</sub> 5 % (p/v) y 25  $\mu$ L de extracto etanólico de *A. californica* previamente disuelto en metanol (10  $\mu$ g/mL). La microplaca con las soluciones se incubó a temperatura ambiente, en oscuridad durante cinco minutos. Posteriormente, fueron añadidos 15  $\mu$ L de solución de AlCl<sub>3</sub> al 10% (p/v) a cada uno de los pozos y seguidamente se incubaron a temperatura ambiente durante seis minutos; finalmente fueron adicionados 50  $\mu$ L de solución de NaOH 1 M y 50  $\mu$ L de agua desionizada. La absorbancia de las muestras fue medida a 510 nm en un espectrofotómetro UV-visible para microplacas (Thermo Fisher Scientific Inc. Multiskan GO, Waltham, MA, USA). El contenido total de flavonoides de las muestras se calculó a partir de la curva de calibración de quercetina (0-3.3 mM). Los resultados se expresan como mmol de equivalentes de quercetina (QE) por gramo de extracto.

#### IV.7 Estabilización del radical DPPH.

La actividad antioxidante por estabilización del radical DPPH (1,1- difenil- 2- picrilhidrazilo, 2,2- difenil- 1- (2,4,6- trinitrofenil) hidrazilo) en los extractos etanólicos de los callos y planta silvestre de *A. californica* se determinó según Molyneux 2004 con algunas modificaciones. Primero fueron disueltos 2.5 mg del radical en 100 mL de metanol, ajustándose la absorbancia a  $0.700 \pm 0.01$ . En una microplaca de 96 pocillos se añadieron 200  $\mu\text{L}$  del radical, y alícuotas de 20  $\mu\text{L}$  de diferentes concentraciones del extracto (concentración final de 50-1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Finalmente, las mezclas fueron incubadas por 30 minutos protegidas de la luz. La absorbancia fue medida en un espectrofotómetro UV-visible para microplacas (Thermo Fisher Scientific Inc. Multiskan GO, Waltham, MA, USA) empleando una longitud de onda de 515 nm. Se empleó un blanco reactivo y el flavonol quercetina como control positivo. Los porcentajes de inhibición fueron determinados mediante la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de inhibición} = \left( \frac{\text{Abs del blanco} - \text{Abs de la muestra}}{\text{Abs del blanco}} \right) * 100$$

#### IV.8 Poder Antioxidante Reductor Férrico (FRAP).

Para evaluar la actividad antioxidante mediante el ensayo FRAP en los extractos etanólicos de los callos y planta silvestre de *A. californica*, inicialmente se prepararon varias soluciones: buffer de acetatos 300 mM (pH 3.6), ácido clorhídrico 40 mM, solución TPTZ (2,4,6-Tris (2-piridil)-S-triazina) 10 mM (en HCl 40 mM) y una solución de cloruro férrico 20 mM. La solución FRAP se obtuvo mediante la adición de buffer de acetatos, solución TPTZ y solución de cloruro férrico con una relación 10:1:1, respectivamente. Posteriormente se colocaron 270  $\mu\text{L}$  del reactivo FRAP en una microplaca de 96 pocillos y se le añadieron alícuotas de 20  $\mu\text{L}$  con diferentes concentraciones del extracto (100, 500 y 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). A continuación, se incubó la microplaca protegida de la luz durante 30 minutos. La absorbancia fue medida a una longitud de onda de 593 nm en un espectrofotómetro UV-Vis para microplacas (Thermo Fisher Scientific Inc. Multiskan GO, Waltham, MA, USA). Los resultados se expresaron como mmol de  $\text{Fe}^{2+}/\text{g}$  de muestra mismos que fueron obtenidos mediante una curva de calibración de  $\text{Fe}_2\text{SO}_4$  con un intervalo de concentraciones de 7.82 a 250  $\mu\text{mol}$  de  $\text{Fe}^{2+}$ .

#### **IV.9 Actividad antiinflamatoria.**

La medición de la actividad antiinflamatoria se llevó a cabo según (Schmölz *et al.*, 2017). Los macrófagos RAW 264.7 se cultivaron a una densidad de  $500 \times 10^3$  células/mL de medio en una placa de 24 pozos, en una atmósfera con 5% CO<sub>2</sub> y 37 °C. Pasadas 24 horas, los cultivos fueron estimulados con concentraciones de 25-200 µg/mL del extracto por dos horas (valores cercanos a la IC<sub>10</sub>), luego se agregó 1µg/mL de lipopolisacáridos (LPS) a cada pozo, y las células estimuladas fueron incubadas por 24 horas. Posteriormente 50 µL de cada sobrenadante de los pozos fueron colocados en otra placa de 96 pozos y a cada uno se le adicionaron 50 µL de reactivo de Griess, la mezcla se dejó reaccionar por 10 minutos y la absorbancia fue medida a 540 nm, utilizando un espectrómetro UV-visible para microplacas (Thermo Fisher Scientific Inc. Multiskan GO, Waltham, MA, USA). Como control de activación se tomó la absorbancia de las células estimuladas con LPS (100% de producción de óxido nítrico) y como control de no activación la absorbancia de aquellas que no se estimularon con LPS (línea base de producción de óxido nítrico). El fármaco de amplio espectro dexametasona fue utilizado como control negativo y con fines de comparación.

#### **IV.10 Identificación de Compuestos Fenólicos por ESI-IT-MS-MS.**

La identificación de compuestos fenólicos presentes en los extractos etanólicos de callos y planta silvestre de *A. californica* se realizó introduciendo los extractos (10 µg/mL p/v) mediante inyección directa a un espectrómetro de masas Varian 500-MS (Walnut Creek, CA, EE. UU.) equipado con una fuente de ionización por electrospray y un analizador de masas de trampa de iones, que fueron controlados por MS WorkStation software v.16 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EE. UU.). El espectrómetro de masas fue operado en modo negativo. Se utilizó nitrógeno como gas nebulizador y helio como gas de colisión para medición de masa precisa a un flujo de 1 mL/min. El equipo se operó a un voltaje -17 KV, y temperatura capilar de 350 °C. Los espectros de masas se adquirieron en modo de escaneo completo en el rango de 100–2000 *m/z*. La manipulación de los extractos se llevó a cabo con protección de la luz. La identificación de los metabolitos se realizó por fragmentación de segundo orden (MS/MS). La confirmación se realizó comparando los iones fragmentados con los reportados en la literatura utilizando y

bases de datos como el Mass Spectrometry Data Center (<https://chemdata.nist.gov/>) y el MassBank (<https://massbank.eu/MassBank/>).

#### **IV.11 Análisis estadístico.**

Para el cálculo de los valores de concentración inhibitoria media (IC<sub>50</sub>) o concentración Eficaz media (EC<sub>50</sub>) se analizaron los porcentajes de proliferación o de inhibición de al menos tres experimentos, por triplicado, y fueron sometidos a un análisis de regresión lineal o no lineal dependiendo del comportamiento de los datos. Para el cálculo de la regresión no lineal los datos fueron log transformados, normalizados y analizados para generar una curva dosis-respuesta y calcular los valores correspondientes (IC<sub>50</sub> o EC<sub>50</sub>).

En todos los ensayos biológicos los resultados se presentan como la media de triplicados de tres experimentos paralelos  $\pm$  desviación estándar. Las diferencias significativas entre medias se evaluaron por análisis de varianza de una vía (ANOVA), después de comprobar que los datos eran normales (prueba de Shapiro-Wilk) y homocedásticos, seguido por una prueba de Tukey.

Las diferencias se consideraron significativas cuando  $p < 0.05$ . Los resultados se analizaron por medio del programa estadístico JMP, en las versiones para Windows 11.0.0 y Graphad prism versión 8.0.

## V. RESULTADOS

### V.1 Inducción de callos.

Para establecer el cultivo *in vitro* de una planta la inducción de callos es un paso vital, esto se puede realizar a partir de un explante con un grado de diferenciación variable de sus tejidos, debido a un proceso de desdiferenciación y división celular, modulado por el tipo de explante, medio de cultivo, tipo y concentración de regulador de crecimiento entre otros factores (Avinash y Umesha, 2018).

Con la finalidad de encontrar las mejores condiciones y el mejor explante para el cultivo de los callos de *A. californica*, pecíolos, yemas, hojas y segmentos nodales fueron inoculados en el medio Woody Plant Medium (WPM) especial para plantas leñosas, así como diferentes concentraciones de los reguladores de crecimiento vegetal 6-bencilaminopurina (BAP), cinetina (CIN) o ácido indol butírico (AIB) (Tabla 2).

Como se muestra en la Tabla 2 los mayores porcentajes de inducción de callos se obtuvieron empleando 1.0 mg/L de BAP y 1.5 mg/L de AIB. Adicionalmente se puede observar que el explante más callogénico fue la yema a la concentración de 1.5 mg/L de AIB con un 55.60 % de inducción. Por otro lado, el mayor crecimiento promedio de callos se observó en hojas con un valor promedio de 3.20 cm en la concentración de 1.0 mg/L de BAP (Figura 12).

El tratamiento control que consistía solo en medio WPM sin suplementación de los reguladores de crecimiento no presentó desarrollo de callo, lo que indica que es necesaria la aplicación de fitoreguladores en el cultivo de tejidos de *A. californica*, resultados similares reportaron (Sagharyan *et al.*, 2020). Sin embargo, resalta el hecho de que CIN no mostró un buen desempeño en la callogénesis, ya que a la concentración más alta (2 mg/L), tan solo se obtuvo un 14% en la inducción de callos a partir de hojas.

**Tabla 2.** Efecto de diferentes concentraciones (mg/L) de AIB, BAP o CIN en el porcentaje de inducción de callo y el crecimiento promedio (cm) en hojas, pecíolos, yemas y segmentos nodales que produjeron callos, durante seis semanas de incubación\*.

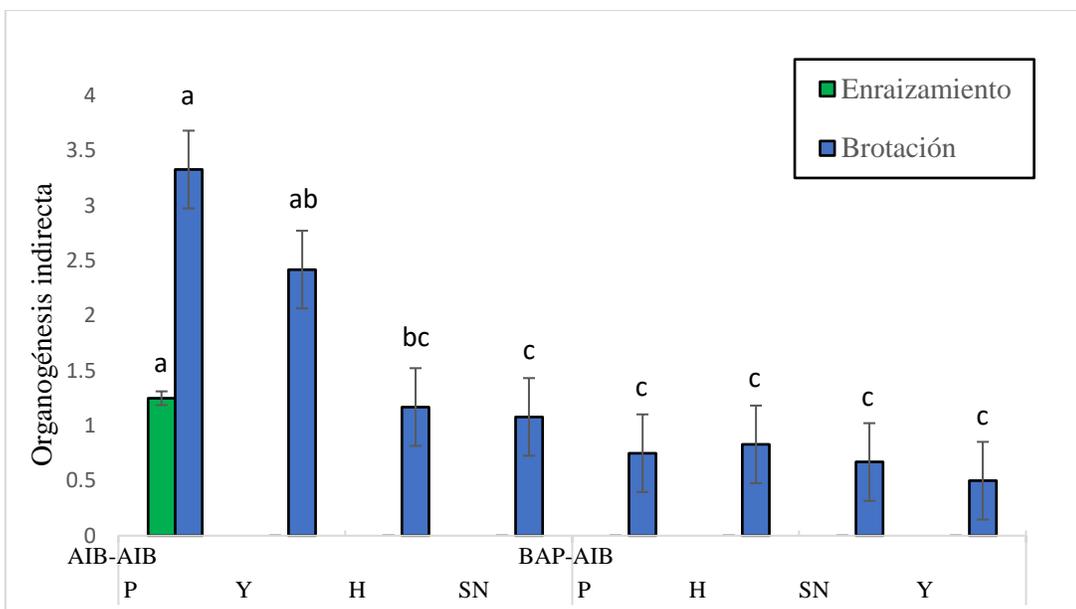
Tratamientos	Hojas		Pecíolos		Yemas		Segmentos nodales	
	% I	CP (cm)	% I	CP (cm)	% I	CP (cm)	% I	CP (cm)
<b>Control</b>	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>AIB</b>								
0.5	22.20 bc	0.55 ± 0.10 b	33.30 ab	0.56±0.30 b	16.30 c	0.50±0.01 b	15.60 c	0.56±0.10 b
1.0	9.00 c	0.58 ±0.20 b	34.10 ab	0.50±0.30 b	29.10 bc	0.53±0.10 b	14.90 c	0.55±0.10 b
1.5	33.30 a	1.90 ± 0.15 a	51.90 a	2.96±0.20 a	55.60 a	0.56±0.10 b	39.00 a	1.85±0.40 a
2.0	12.30 c	0.58 ± 0.20 b	18.50 bc	0.60±0.10 a	37.00 b	0.90±0.45 b	14.90 c	0.58±0.20 b
<b>BAP</b>								
0.5	10.30 c	0.50 ± 0.23 b	8.30 c	0.50±0.16 b	33.30 b	0.51±0.10 b	23.30 b	0.65±0.10 b
1.0	29.60 a	3.20 ± 0.41 a	44.60 a	0.86±0.20 b	49.90 a	2.00±0.20 a	44.30 a	0.80±0.30 b
1.5	13.30 c	0.60 ± 0.27 b	15.30 bc	0.64±0.10 b	20.70 c	0.80±0.10 b	12.90 c	0.57±0.10 b
2.0	14.90 c	0.56 ± 0.10 b	16.90 bc	0.59±0.20 b	18.50 c	0.50±0.01 b	10.00 c	0.50±0.16 b
<b>CIN</b>								
0.5	11.10 c	0.55± 0.30 b	7.00 c	0.50±0.13 b	5.00c	0.57±0.10 b	6.00 c	0.80±0.13 b
1.0	8.60 c	0.60±0.13 b	9.00 c	0.56±0.20 b	7.30 c	0.50±0.05 b	11.30 c	0.50±0.12 b
1.5	10.30 c	0.53±0.20 b	5.60 c	0.51±0.10 b	10.00 a	0.56±0.10 b	8.00 c	0.73±0.20 b
2.0	14.90 c	0.48±0.10 b	7.30 c	0.54±0.30 b	6.00 c	0.52±0.20 b	10.30 c	0.51±0.04 b

\*Los valores corresponden a la media de tres réplicas con tres explantes por réplica. %I=Porcentaje de inducción, CP=Crecimiento promedio. a-c Medias de grupos con letras iguales no difieren significativamente entre sí de acuerdo con la prueba de Tukey (p<0.05).



**Figura 12.** Desarrollo de callo de *A. californica* a partir de un explante de hoja después de cuatro semanas de incubación en medio WPM+1 mg/L de BAP.

Con la finalidad de evaluar si los callos obtenidos podían generar organogénesis indirecta una parte de los callos provenientes de los diferentes explantes y suplementados en un inicio con AIB (1.5 mg/L) o BAP (1 mg/L) fueron subcultivados utilizando WPM+1.5 mg/L de AIB y su diferenciación fue monitorizada durante seis semanas. En la Figura 13 se puede observar que los callos de todos los explantes fueron capaces de generar brotes; sin embargo, aquellos provenientes del medio inicial suplementado con AIB a 1.5 mg/L tuvieron un mayor crecimiento, destacando por su tamaño los obtenidos de pecíolos; adicionalmente pudo evidenciarse que únicamente los callos obtenidos de los pecíolos mostraron rizogénesis.



**Figura 13.** Organogénesis indirecta tras subcultivo en medio WPM suplementado con 1.5 mg/L de AIB: P: pecíolo, Y: yemas, H: hojas, SN: segmentos nodales. a-c Medias de grupos con letras iguales no difieren significativamente entre sí de acuerdo con la prueba de Tukey ( $p < 0.05$ ).

## V.2 Evaluación de la proliferación celular.

Una vez que se determinó que la mejor condición de callogénesis era el cultivo de los explantes en WPM+1.5 mg/L de AIB, los callos con seis semanas de crecimiento fueron liofilizados. Con la finalidad de caracterizar las actividades biológicas relacionadas con el efecto anticancerígeno que le atribuyen las etnias a *A. californica*, se generó un extracto hidroalcohólico por medio de maceración, tomando en cuenta que en un estudio previo las sustancias polares del extracto fueron las responsables de sus propiedades bioactivas (Rascón *et al.*, 2015). El extracto fue generado tanto para los callos liofilizados como para plantas silvestres con fines de comparación.

La primera de las actividades biológicas evaluadas fue la antiproliferativa, la cual se midió mediante el ensayo de reducción del MTT utilizando un intervalo de concentraciones de 6.25 – 200  $\mu\text{g/mL}$  del extracto etanólico de los callos y de las partes aéreas de planta silvestre de *A. californica* como tratamiento en las líneas celulares cancerosas humanas A549, HeLa y MCF-7 (Tabla 3).

**Tabla 3.** Actividad antiproliferativa del extracto etanólico de los callos y planta silvestre de *A. californica* en líneas celulares humanas.

Tratamiento	Líneas celulares (IC <sub>50</sub> *)		
	A549	HeLa	MCF-7
Extracto etanólico de callos de <i>A. californica</i>	ND	ND	ND
Extracto etanólico de <i>A. californica</i>	75.01±5.82	43.40±2.46	50.29±5.36
Doxorrubicina	0.98±0.01 <sup>a</sup>	0.79±0.01 <sup>b</sup>	0.87±0.01 <sup>a</sup>

Valores de IC<sub>50</sub> (µg/mL; media ± desviación estándar, n>3). Los valores en las filas con superíndice distinto (a-c) son significativamente diferentes ( $p < 0.05$ )\* Concentración inhibitoria del 50%. ND: No determinado, IC<sub>50</sub> > 200 µg/mL

Como se observa en la Tabla 3 los valores de IC<sub>50</sub> del extracto etanólico de los callos de *A. californica* no pudieron ser determinados para ninguna de las líneas celulares, debido a que a la concentración más alta empleada en el presente estudio el extracto no posee la capacidad de inhibir el 50% del crecimiento de las células con respecto a aquellas tratadas únicamente con DMSO (100% de proliferación).

La línea celular A549 resultó ser la más susceptible al efecto del extracto etanólico de callos con una proliferación del 66.05% a la concentración de 200 µg/mL, en tanto que la línea MCF-7 mostró ser la más resistente; caso contrario se encontró en los tratamientos con el extracto de la planta silvestre ya que los valores de IC<sub>50</sub> fueron de 75.01, 43.4 y 50.29 µg/mL para las líneas celulares A549, HeLa y MCF-7, respectivamente; lo cual nos evidencia un efecto antiproliferativo moderado sobre todas las líneas celulares probadas, ya que de acuerdo al NCI para que un extracto sea considerado con buena actividad antiproliferativa precisa exhibir valores de IC<sub>50</sub> menores o iguales a 30 µg/mL.

Los efectos del extracto etanólico de los callos de *A. californica* exhibieron un efecto dosis dependiente en las concentraciones de 50-200 µg/mL, en tanto que en las concentraciones de 6.25-25 µg/mL el crecimiento de las células tratadas fue similar a la del control por lo que estas últimas no se mostraron en la Tabla 4.

**Tabla 4.** Porcentaje de proliferación celular posterior a la aplicación del extracto etanólico de los callos *A. californica* en un rango de concentración de (25-200) µg/mL.

Concentración (µg/mL) *	A549	HeLa	MCF-7
200	66.05± 10.34 <sup>a</sup>	89.21 ± 5.57 <sup>c</sup>	94.26 ± 2.04 <sup>c</sup>
100	78.42±5.48 <sup>b</sup>	99.46±3.81 <sup>c</sup>	102.24±2.75 <sup>c</sup>
50	91.10±6.15 <sup>c</sup>	101.65±1.17 <sup>c</sup>	99.56±7.4 <sup>c</sup>
25	99.45±4.38 <sup>c</sup>	100.49±3.74 <sup>c</sup>	101.16±2.39 <sup>c</sup>

\*Las concentraciones incluidas en los ensayos comprendieron el intervalo de 6.25 a 200 µg/mL; sin embargo, por debajo de 25 µg/mL no se encontraron diferencias con las células sin tratamiento. Los valores en las filas con superíndice distinto (a-c) son significativamente diferentes ( $p<0.05$ ).

### V.3 Actividad antioxidante.

Con la finalidad de determinar la actividad antioxidante de los extractos etanólico de callos y planta silvestre de *A. californica* se emplearon cuatro metodologías complementarias, la medición del contenido de fenoles totales (TPC), la concentración de flavonoides totales (TFC), la estabilización del radical DPPH (DPPH) y el poder de reducción del hierro férrico a ferroso (FRAP).

El contenido total de flavonoides y contenido de fenoles totales se ve relacionado con la actividad antioxidante de los extractos debido a que los grupos hidróxilos y los anillos aromáticos que forman parte de la estructura de los mencionados compuestos facilitan la estabilización de los radicales libres y reducción de especies oxidantes. Los compuestos fenólicos y flavonoides presentan estructuras complejas y variadas de manera tal que se debe establecer una metodología que permita comparar los efectos de los diversos compuestos con uno de referencia, así que para el TPC se utilizó el estándar de ácido gálico y para TFC se empleó el estándar de quercetina. Un valor más alto obtenido en estos ensayos representa una mayor abundancia de compuestos con capacidad antioxidante.

En la Tabla 5 se observa como el extracto etanólico de los callos de *A. californica* posee un alto contenido de fenoles totales con un valor de 2.60±0.25 mmol de GAE/g de extracto seco,

esto de acuerdo con la clasificación propuesta por (Subedi *et al.*, 2014) quienes establecen que un valor igual o superior a 0.6 mmol GAE/g de extracto representa una alta concentración de compuestos fenólicos. Por otra parte, el contenido de flavonoides totales determinado para el extracto también puede ser considerado muy alto ya que presentó  $1.56 \pm 0.25$  mmol QE/g de extracto, cuando el valor de corte para extractos con alto contenido se encuentra en 0.33 mmol QE/g de extracto (Subedi *et al.*, 2014).

El contenido de fenoles totales fue mayor en el extracto etanólico de las partes aéreas de *A. californica* respecto al extracto de los callos, ya que el primero mostró un valor de  $3.30 \pm 0.36$  mmol de GAE/g; en tanto que el contenido de flavonoides totales fue más de siete veces mayor que el extracto de callos ( $11.83 \pm 1.21$  mmol QE/g). Lo anterior era de esperarse ya que como se sabe los compuestos fenólicos son metabolitos secundarios que las plantas utilizan para defenderse de diversos desafíos ecológicos, mismos a los cuales los callos desarrollados en el laboratorio no estuvieron expuestos.

Para evaluar el potencial antirradicalario del extracto se empleó el ensayo de estabilización de radical DPPH. Una mayor cantidad de antioxidantes en un extracto es responsable de la disminución de la absorbancia de la solución de DPPH, para comparar la actividad de eliminación de radicales por los extractos etanólicos se utilizaron los valores de  $EC_{50}$ , y cuanto menor sea su valor, mayor es la capacidad de estabilizar los radicales libres. Un estándar del flavonol, quercetina, se utilizó como control positivo con un valor de  $EC_{50}$  de  $1.71 \pm 0.40$   $\mu\text{g/mL}$ . Para determinar si los valores de  $EC_{50}$  obtenidos son significativos, se tomó como base la clasificación propuesta por (Bi *et al.*, 2016), quien propone los siguientes valores de corte: Actividad antioxidante fuerte con  $EC_{50} < 100$   $\mu\text{g/mL}$ , intermedia  $EC_{50}$  100-500  $\mu\text{g/mL}$ , débil  $EC_{50} > 500$   $\mu\text{g/mL}$ . De manera tal que el extracto etanólico de los callos de *A. californica* exhibió una actividad antirradicalaria muy fuerte con un valor de  $EC_{50}$  de  $44.85 \pm 1.22$   $\mu\text{g/mL}$  (Tabla 5). En tanto el extracto etanólico de las partes aéreas de *A. californica* resultó ser 4 veces más potente para estabilizar el DPPH ya que mostró un  $EC_{50}$  significativamente bajo ( $10.79 \pm 0.39$   $\mu\text{g/mL}$ ).

Debido a que existen diversos mecanismos oxidativos, el ensayo FRAP fue incluido con la finalidad de evaluar la capacidad del extracto de callos de *A. californica* para reducir el ion férrico a ferroso. Mediante un cribado de más de 20 extractos de plantas con actividad

antioxidante Gohari *et al.* (2011) determinaron que valores de 0.16 mmol de Fe<sup>2+</sup>/g de extracto representan una fuerte actividad reductora en el ensayo FRAP por lo que el poder reductor del hierro férrico para el extracto etanólico de los callos de *A. californica* puede ser considerado fuerte ya en los experimentos realizados en el presente estudio se obtuvo un valor de 1.58±0.15 mmol de Fe<sup>2+</sup>/g de extracto (Tabla 5). En lo referente a la planta silvestre esta mostró un potencial de reducción muy fuerte, obteniendo valores de 4.9±0.38 mmol de Fe<sup>2+</sup>/g los cuales son 30 veces mayor que el punto de corte establecido en la citada literatura.

En todos los ensayos empleados para evaluar la actividad antioxidante se obtuvo una mayor actividad en la planta silvestre; sin embargo, en el contenido de flavonoides totales se aprecia que este valor fue más de siete veces mayor en la planta silvestre (11.83±1.21), con respecto al extracto etanólico de los callos (1.56 ± 0.25), lo que presume que en el cultivo de tejidos vegetales se vio afectada la formación de estos metabolitos secundarios.

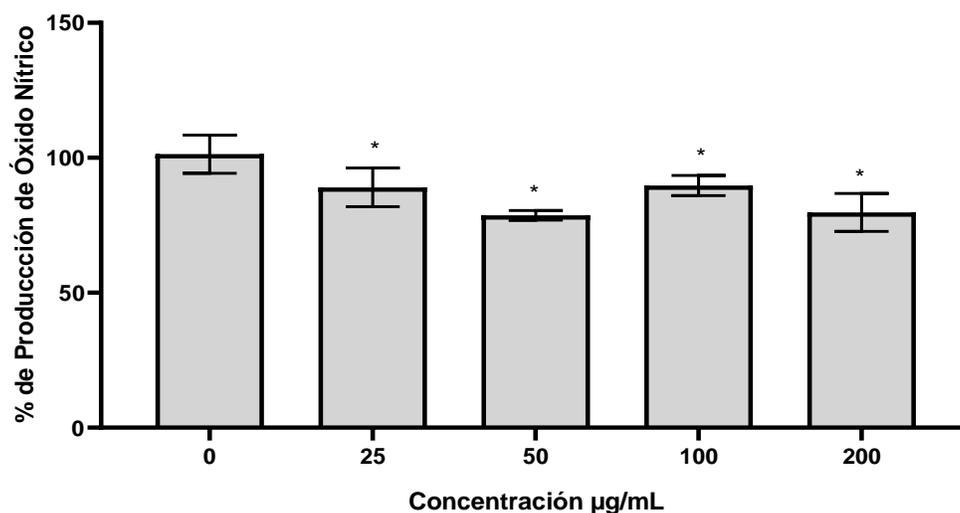
**Tabla 5.** Contenido de fenoles totales y flavonoides en los extractos etanólicos de callos de *A. californica* y partes aéreas de *A. californica* silvestre.

Muestra	TPC <sup>a</sup>	TFC <sup>b</sup>	DPPH <sup>c</sup>	FRAP <sup>d</sup>
Extracto etanólico de callos de <i>A. californica</i>	2.6 ± 0.25	1.56 ± 0.25	44.85 ± 1.22	1.58 ± 0.15
Extracto etanólico de <i>A. californica</i> silvestre	3.3±0.36	11.83±1.21	10.79±0.39	4.9±0.38
Quercetina			1.71±0.14	33.27±0.82

<sup>a</sup>mmol de equivalentes de ácido gálico, representado como la media ± EE; <sup>b</sup>mmol de equivalentes de quercetina, representado como la media ± SE; <sup>c</sup>EC<sub>50</sub>, representado como la media ± SE en µg/mL, <sup>d</sup>mmol de Fe<sup>2+</sup>, representado como la media ± SE.

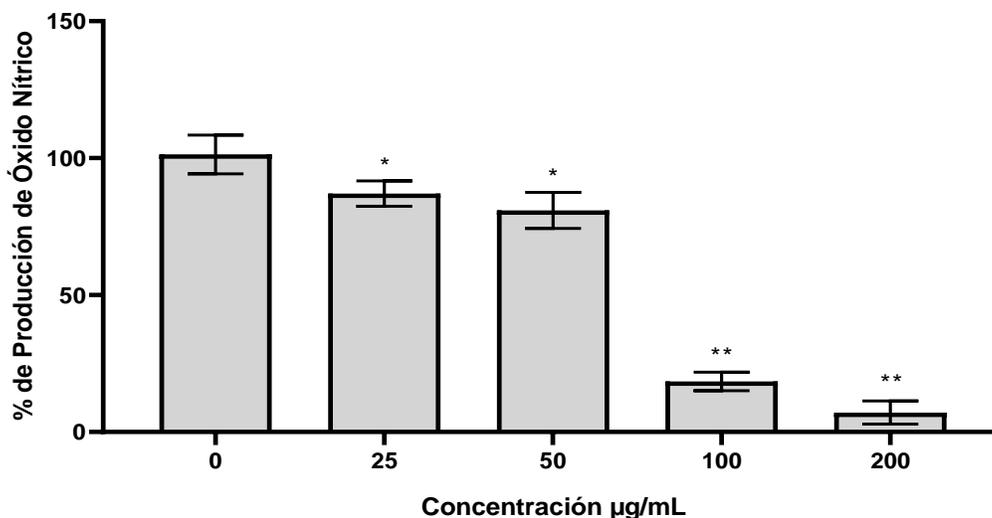
#### V.4 Actividad antiinflamatoria

En general, se reconoce que el efecto inhibitor de la producción de óxido nítrico (NO) es un índice importante para evaluar la eficacia de los agentes antiinflamatorios. Así que con la finalidad de determinar dicha actividad del extracto etanólico de los callos y de las partes áreas de la planta silvestre de *A. californica* se utilizó un sistema basado en células RAW 264.7 activadas con LPS para la producción del NO. Los macrófagos activados fueron tratados con un intervalo de concentraciones del extracto etanólico de los callos de *A. californica* de 25-200 µg/mL, el cual no disminuye la proliferación de las células RAW264.7. En la Figura 14 se muestra como todas las concentraciones probadas causaron disminuciones estadísticamente significativas en la producción de NO, siendo la concentración de 50 µg/mL la que mostró una mayor efectividad reduciendo aproximadamente un 23% del NO producido con respecto al control de células sin tratamiento.



**Figura 14.** Efecto en la producción de NO: Efectos del extracto etanólico de callos de *A. californica* sobre la producción de óxido nítrico en células RAW 264.7 estimuladas con LPS 1 µg/ml, en un intervalo de concentraciones de 25 a 200 µg/mL, \*Significancia estadística (Prueba de Tuke,  $p < 0.05$ ) en comparación con las células control (DMSO).

Como se puede apreciar en la Figura 15, la planta silvestre mostró un efecto inhibitorio dependiente de la concentración; sin embargo, en las concentraciones de 25 y 50  $\mu\text{g/mL}$  el comportamiento con respecto a la producción de NO fue similar al apreciado en el extracto etanólico de los callos.



**Figura 15.** Efecto en la producción de NO: Efectos del extracto etanólico de *A. californica* sobre la producción de óxido nítrico en células RAW 264.7 estimuladas con LPS 1  $\mu\text{g/ml}$ , en un intervalo de concentraciones de 25 a 200  $\mu\text{g/mL}$ , \*Significancia estadística en comparación con las células control (DMSO),  $p < 0.05$  (Prueba de Tukey).

### V.5 Identificación de Compuestos Fenólicos por ESI-IT-MS-MS

Con la finalidad de elucidar los compuestos presentes en el extracto etanólico de los callos y de la planta silvestre de *A. californica* se utilizó espectrometría de masas en modo de ionización negativo, el cual es el método más pertinente para la identificación de compuestos fenólicos. De esta manera el análisis de los espectros de masas del extracto etanólico de los callos de *A. californica* denotó la presencia de 15 compuestos fenólicos, de los cuales 10 son pertenecientes a los ácidos fenólicos y cinco son flavonoides (Tabla 6). Dentro del grupo de los flavonoides se identificó una isoflavona, la genisteína; un flavonol, el kaempferol; un flavano, la [epi]catequina; un flavanonol, la taxifolina; y una flavona, la miricetina-3-*O*-pentósido.

**Tabla 6.** Identificación de compuestos presentes en el extracto etanólico de callos de *A. californica* mediante FIA-ESI-IT-MS.

Sustancia	Ion precursor [M-H] ( <i>m/z</i> )	Iones productos ESI-MS <sup>n</sup> ( <i>m/z</i> )
Aldehído protocatéquico	137	109 (100)
Ácido protocatéquico	153	109 (100), 137 (29)
Ácido cumárico	163	109 (24), 135 (100)
Ácido gálico	169	125 (100)
Ácido cafeico	179	135 (73), 161 (62)
Ácido quínico	191	83 (18), 93 (63), 109 (33), 111 (26), 127 (100), 137 (14), 171 (67)
Genistéina	269	183 (72), 243 (32)
Kaempferol	285	113 (36), 159 (39), 227 (41), 266 (100)
[Epi]catequina	289	205 (13), 227 (91), 245 (81), 271 (100)
Ácido carboxílico de la brevifolina	291	203 (34), 247 (69)
Ácido elágico	301	185 (22), 229 (35), 257 (41)
Taxifolina	303	153 (12), 234 (92), 275 (58)
Ácido metil-elágico	315	185 (30), 273 (15), 300 (90)
Ácido elágico-pentosa	433	300 (100), 301 (86)
Miricetina 3- <i>O</i> -pentosa	449	279 (100), 317 (72)

Por otro lado, en el extracto etanólico de *A. californica* silvestre fue posible identificar 29 compuestos fenólicos, entre los cuales se encontraron ácidos fenólicos, como lo son los ácidos protocatéquico, cinámico, cumárico, gálico, cafeico, quínico, ferúlico, siríngico, cafeico-hexosa y HHDP-hexosa; flavonoides de diferentes tipos como las isoflavonas genistéina y daidzeína, los flavonoles kaempferol, quercetina y quercetina 3-*O*-hexosa, el flavano [epi]catequina; el flavanol taxifolina, la flavonas miricetina 3-*O*-pentosa y diosmetina, taninos hidrolizables como

el ácido elágico, el ácido metil-elágico, el ácido elágico-pentosa y el ácido metil-galoil-elágico, además de taninos condensados los cuales incluyen dímeros de [epi]catequina, [epi]galocatequina, y su combinación, así como trímeros de los mismos. El estilbeno resveratrol también fue identificado (Tabla 7).

**Tabla 7.** Identificación de compuestos presentes en el extracto etanólico de las partes áreas de *A. californica* silvestre mediante FIA-ESI-IT-MS.

Sustancia	Ion precursor [M-H] (m/z)	Iones productos ESI-MS <sup>n</sup> (m/z)
Ácido protocatéquico	153	109 (100), 137 (29)
Ácido cinámico	147	119 (60)
Ácido cumárico	163	119 (30), 135 (100)
Ácido gálico	169	125 (100)
Ácido cafeico	179	135 (100), 161 (71)
Ácido quínico	191	93 (71), 109 (33), 127 (100)
Ácido ferúlico	193	137 (100)
Ácido siríngico	197	153 (25), 163 (100), 181 (12)
Resveratrol	227	121 (21), 143 (21), 185 (20)
Daidzeína	253	135 (46), 183 (65), 198 (42), 211(33), 225 (100)
Genisteína	269	157 (13), 183 (100)
Kaempferol	285	65 (23), 119 (72), 159 (41)
[Epi]catequina	289	137 (11), 161 (34), 179 (20), 203 (40), 205 (61), 227 (22), 245 (100)
Quercetina	301	117 (86), 240 (100), 285 (50)
Ácido elágico	301	185 (28), 229 (100), 257 (90)
Ácido metil-elágico	315	185 (100), 301 (36)
Taxifolina	303	285 (100)
Ácido cafeico-hexosa	341	179 (54)

Ácido elágico-pentosa	433	259 (23), 301 (28)
Ácido metil-galoil-elágico	447	300 (13), 301 (3), 315 (100)
Miricetina 3- <i>O</i> -pentosa	449	279 (100)
Diosmetina 8- <i>C</i> -hexósido	461	281 (64), 341 (100), 371 (23), 446 (40)
Quercetina 3- <i>O</i> -hexosa	463	300 (42), 301 (100)
HHDP-hexosa	481	275 (15), 301 (100)
Dímero de [epi]catequina	577	245 (42), 289 (86), 407 (100), 425 (58)
[Epi]galocatequina- [epi]catequina	593	289 (64), 305 (75), 407 (64), 425 (31)
Dímero de [epi]galocatequina	609	305 (100), 423 (53), 441 (67)
Trímero de [epi]catequina	865	543 (100), 575 (59), 713 (81), 739 (53)
[Epi]catequina- [epi]galocatequina- [Epi]galocatequina	897	303 (24), 465 (26), 593 (38), 711 (100)

---

La abundancia relativa de los iones producto es presentada en paréntesis. HHDP: Ácido hexahidroxidifénico.

Existe una marcada diferencia entre los compuestos fenólicos encontrados en el extracto etanólico de los callos de *A. californica* y el extracto etanólico de las partes aéreas de la planta silvestre. Básicamente los callos contienen ácidos fenólicos y flavonoides no complejos, en tanto que la planta silvestre, la cual ha crecido en un entorno con desafíos ambientales y de estrés biótico, produce además de los ácidos fenólicos, flavonoides complejos y glucosilados; así como grandes y complejas estructuras como los taninos hidrolizables y condensados e inclusive se logró identificar un compuesto perteneciente a los estilbenos.

## VI. DISCUSIÓN

Las plantas han sido por miles de años una fuente valiosa de compuestos bioactivos, tanto es así que el 80% de la población utiliza algún tipo de planta medicinal para el cuidado de su salud (Ávila, 2017). Al respecto *A. californica* es una de las hierbas más utilizadas empíricamente para el tratamiento del cáncer en el Noroeste de México; sin embargo, es una planta que no es cultivada, de manera tal que la especie crece en hábitats expuestos a las actividades antropogénicas y la colecta indiscriminada, resultando en la disminución significativa de las poblaciones silvestres. Bajo esta premisa el presente estudio tuvo como primer objetivo encontrar las mejores condiciones de cultivo *in vitro* para generar callos de *A. californica* con la finalidad de disminuir la presión de las poblaciones silvestres y dar un primer paso en el desarrollo de fuentes de compuestos bioactivos para la obtención de materias primas utilizadas en la elaboración de fitofármacos.

Las principales variables estudiadas en la generación de los callos fueron los diferentes explantes, los cuales podían provenir de hojas, pecíolos, yemas y segmentos nodales; así como la concentración (0.5-2 mg/L) y tipos de reguladores de crecimiento (AIB, BAP y CIN). Resultando que el explante más callogénico fueron las yemas y las concentraciones más efectivas fueron 1.0 mg/L (49.9% de inducción) de BAP y 1.5 mg/L de AIB (55% de inducción); en cambio la suplementación con CIN produjo una callogénesis pobre (14% el valor más alto).

El hecho de que las yemas en combinación con los reguladores utilizados hayan sido el explante más callógeno se debe a las características genéticas propias de *A. californica* y el mecanismo de acción de los fitorreguladores. Algunos autores atribuyen las diferencias en la respuesta de distintos explantes a las características anatómicas y las variaciones en el contenido hormonal endógeno de los mismos pues es justo a nivel de factores de transcripción que actúan las auxinas y citocininas, de manera que en algunas plantas las hojas y los segmentos nodales pueden resultar más callogénicos (Espinosa *et al.*, 2012).

Como se muestra en la Tabla 1 la concentración de auxinas y citocininas no siempre tienen un efecto dosis dependiente, ya que podemos observar que los mejores porcentajes de inducción de callos de *A. californica* son obtenidos por concentraciones intermedias de AIB o BAP. Al

respecto, ha sido evidenciado que una concentración intermedia de auxina y citocininas promueven la inducción de callos, en tanto que una alta concentración de estos es propicia para el desarrollo de raíces; sin embargo, el mecanismo molecular del proceso aún no se encuentra claro. Algunos autores plantean que, dependiendo de la planta y sus características genéticas, las auxinas y citocininas pueden causar cambios a nivel de factores de transcripción (vía ARF para las auxinas y vía ARR para las citocininas) que juegan un papel central en la reentrada de las células al ciclo celular (Ikeuchi *et al.*, 2013; Patel *et al.*, 2022).

Contrario a lo presentado en esta investigación CIN sirve para propiciar la callogénesis en especies tales como *Medicago sativa* (alfalfa) y *Azadirachta indica* (Neem) (Farjaminezhad y Garoosi, 2019; Wan *et al.*, 1988). Aunque, a diferencia del presente estudio, en dichas investigaciones CIN siempre fue combinada con una auxina, lo que puede explicar el hecho de que por sí sola no logró una inducción y crecimiento de los callos de *A. californica*. Lo anterior puede deberse a que la auxina AIB regula el crecimiento y la dediferenciación en la planta, la citocinina BAP promueve tanto la división, como diferenciación de las células; en tanto la cinetina CIN solo promueve la división celular. Estos resultados concuerdan con los de Majumder y Rahman (2016), quienes encontraron que el mayor porcentaje de inducción de callo en *A. indica* se obtenía en presencia de una combinación de auxinas y citocininas, siendo AIB el más efectivo.

Una vez obtenidos los callos y con la finalidad de continuar con la búsqueda de las mejores condiciones para una producción eficiente de callos de *A. californica*, una parte de los callos previamente cultivados en medio suplementado con 1.5 mg/L de AIB o 1.0 mg/L de BAP (los más callogénicos) fueron subcultivados en WPM +1.5 mg/L de AIB y su crecimiento y diferenciación se registró durante seis semanas de incubación. Como se puede apreciar en la Figura 2 los callos obtenidos previamente en la concentración de 1.0 mg/L de BAP no desarrollaron raíces y sus brotes fueron de menor tamaño. Numerosas investigaciones en las cuales se estudió la diferenciación de plantas medicinales, como *Ugni molinae*, *Salvia officinalis*, *Mentha piperita* han comprobado que AIB es un regulador de crecimiento que estimula la formación de raíces en plantas leñosas, por lo que el hecho de que no hayan sido generadas raíces y que se obtuvieron brotes más pequeños a partir de los callos inicialmente obtenidos por la suplementación con BAP nos permitió concluir que las mejores condiciones

para el crecimiento de callos de *A. californica* es a partir de un explante de yemas inoculado en medio WPM suplementado con 1.5 mg/L de AIB (Islam y Alam, 2018; Jafari *et al.*, 2017; Rodríguez *et al.*, 2014).

*A. californica* es una planta a la cual los grupos étnicos de Sonora y Baja California le atribuyen actividad anticancerígena, dicha propiedad fue evidenciada en un estudio realizado por (Rascón *et al.*, 2015) en donde la fracción polar del extracto metanólico de *A. californica* mostró actividad antiproliferativa moderada en las líneas celulares cancerosas murinas M12.A<sup>k</sup>.C3.F6 (IC<sub>50</sub>=59.90±1.05 µg/mL) y RAW 264.7 (IC<sub>50</sub>=58.93±1.26 µg/mL), así como en la línea celular cancerosa humana HeLa (IC<sub>50</sub>=50.11±1.13 µg/mL); adicionalmente el extracto exhibió actividad diferencial al afectar en menor medida a las células no cancerosas murinas L929 (IC<sub>50</sub>=100.00±1.09 µg/mL), dicho efecto fue atribuido al contenido de proantocianidinas; sin embargo el estudio mostró ciertas limitaciones ya que solo se evaluó una línea celular humana y actividades relacionadas con el proceso de carcinogénesis no fueron evaluadas. Así que como un primer esfuerzo para caracterizar tanto química como biológicamente las etapas de desarrollo de *A. californica* en cultivo *in vitro*, se evaluaron las actividades antiproliferativas en líneas cancerosas humanas, la actividad antioxidante *in vitro* así como la actividad antiinflamatoria en células del extracto etanólico de los callos de *A. californica*; también se realizó un perfil químico del mencionado extracto utilizando espectrometría de masas. Con la finalidad de comparar los compuestos presentes y las actividades biológicas de las etapas tempranas del desarrollo de la planta y la planta ya desarrollada y expuesta a los desafíos bióticos y abióticos, el extracto etanólico de las partes aéreas de *A. californica* silvestre fue sometido a las determinaciones anteriormente expuestas.

Para evaluar la actividad antiproliferativa del extracto etanólico de los callos de *A. californica* fueron utilizadas las líneas celulares cancerosas humanas A549, HeLa y MCF-7 utilizando un intervalo de concentraciones de 6.25 a 200 µg/mL. Como se puede apreciar la mayor disminución para la proliferación celular (34%) fue obtenida para la línea A549 a una dosis de 200 µg/mL; sin embargo, dicho efecto no se considera activo ya que de acuerdo con el NCI para que un extracto sea considerado con propiedad antiproliferativa debe de tener un valor de IC<sub>50</sub> menor que 30µg/mL. Que el extracto etanólico de los callos no haya tenido un efecto significativo puede deberse a que los compuestos responsables de la actividad antiproliferativa

son metabolitos secundarios específicamente proantocianidinas, los cuales poseen una función ecológica en el organismo, en cambio los callos son una masa de células no diferenciadas las cuales aún no producen este tipo de compuestos. La biosíntesis de metabolitos secundarios en el cultivo de tejidos vegetales suele ser baja en los estadios tempranos de desarrollo de la planta, por lo que generalmente la adición de moléculas precursoras al medio de cultivo aumenta la formación del compuesto de interés. Por este motivo, se recomienda realizar dos medios de cultivo, uno que permita un buen crecimiento celular para permitir el desarrollo de la planta y otro que optimice la producción de metabolitos secundarios una vez formada (Efferth, 2019).

Por otro lado, el tratamiento con el extracto etanólico de *A. californica* silvestre logró inhibir la proliferación celular con valores de IC<sub>50</sub> entre 50 y 75 µg/mL siendo así que, la mayor inhibición de la proliferación celular se observó en la línea HeLa, con una reducción de aproximadamente el 56.6% de la viabilidad celular; por lo que se puede corroborar que el extracto etanólico de *A. californica* presenta notables efectos antiproliferativos. Estos resultados coinciden con los obtenidos por (Rascón *et al.*, 2015), sin embargo, en nuestro estudio el extracto etanólico no se fraccionó previamente por lo que pudimos obtener valores altos de inhibición de la proliferación celular; demostrando que los compuestos responsables de la actividad antiproliferativa son afines a la fracción etanólica, y que se encontraban probablemente en mayor concentración.

Se ha informado recientemente que algunas especies del género *Acalypha* han mostrado actividad antiproliferativa y citotóxica; los extractos hexánicos y metanólicos de *A. monostachya* presentaron notables efectos citotóxicos, principalmente en células HeLa; así como el extracto hexánico de hojas de *Acalypha indica* Linn. en la línea celular MCF-7 mediante el método de ensayo MTT (Chekuri *et al.*, 2017; Guillén *et al.*, 2021). De igual forma (Massarani *et al.*, 2019a) obtuvieron excelentes resultados con la fracción de acetato de etilo de *A. fruticosa*, la que exhibió una actividad citotóxica notable contra todas las líneas celulares cancerosas probadas (MCF-7, HCT-116 y HepG-2). (Halimah *et al.*, 2022) investigaron la actividad antiproliferativa de diversas fracciones obtenidas a partir de hojas de *A. wilkesiana* resultando que la fracción de acetato de etilo fue la que más inhibió la proliferación de células MCF-7. Recientemente (Halimah *et al.*, 2023) investigaron la actividad antiproliferativa y apoptótica del beta-sitosterol extraído de *A. wilkesiana* en la línea celular MCF-7, y encontraron que el beta-

sitosterol inhibía la proliferación celular y que su actividad apoptótica era proporcional a la dosis.

El cáncer es un proceso multifactorial el cual posee una asociación significativa con los procesos oxidantes e inflamatorios. Lo anterior debido a que las especies oxidantes generan mutaciones y daños a las células y tejidos, mismos que disparan un proceso de inflamación crónica que a su vez promueve la diferenciación de células iniciadas a células cancerosas (Moloney y Cotter, 2018). Por esta razón las terapias contra el cáncer deben de considerar múltiples aristas entre ellas la actividad antioxidante y antiinflamatoria de las mismas.

La actividad antioxidante del extracto etanólico de los callos de *A. californica* fue evaluada utilizando cuatro metodologías complementarias. Primeramente, el contenido de compuestos fenólicos totales y de flavonoides fue evaluado utilizando como sustancias de referencia el ácido gálico y el flavanol quercetina, respectivamente. El extracto etanólico de los callos de *A. californica* mostró un alto contenido de fenoles totales ( $2.6 \pm 0.25$  GAE/g de extracto) y también de flavonoides totales ( $1.56 \pm 0.25$  QE/g de extracto), de acuerdo con las escalas establecidas por (Subedi *et al.*, 2014) y (Bi *et al.*, 2016). Tomando en cuenta que los compuestos fenólicos y uno de sus grupos, los flavonoides, son considerados metabolitos secundarios, sorprenden los altos niveles obtenidos en los extractos de callos, incluso algunos autores sugieren que la formación de tejidos especializados es un requisito previo para la producción de metabolitos secundarios, especialmente compuestos fenólicos (De Queiroz *et al.*, 2015). Sin embargo, la producción de compuestos fenólicos y flavonoides ya ha sido reportado. En un estudio donde se generaron callos de *Ageratina pichichensis* se demostró que estos poseían TCP y TFC muy parecidos a los de las plantas silvestres, esto debido a que a partir de los 20 días los callos empiezan a experimentar estrés en el cultivo a causa del consumo de compuestos del sustrato, provocando la síntesis de metabolitos secundarios (Motolinia *et al.*, 2023).

El extracto de callos de *A. californica* presentó una actividad antioxidante especialmente fuerte mediante el ensayo DPPH<sup>•</sup>, según (Yuniarti *et al.*, 2020), logrando estabilizar la mitad de la concentración del radical DPPH<sup>•</sup> con una concentración de 44.85 µg/mL. Dicha actividad antirradicalaria puede ser explicada debido al alto contenido de compuestos fenólicos y flavonoides del extracto de los callos, ya que la estructura química de estos compuestos los

capacita para estabilizar y desactivar radicales libres antes de que ataquen a las biomoléculas de la célula. En sistemas vivos la actividad antirradicalaria se encuentra asociada a la prevención de múltiples desórdenes crónicos tales como la diabetes, arteroesclerosis, envejecimiento y cáncer (Santamaría *et al.*, 2018; Zhang *et al.*, 2022). De igual forma el extracto etanólico de *A. californica* silvestre presentó una actividad antioxidante especialmente fuerte mediante el ensayo DPPH<sup>•</sup>, logrando estabilizar aproximadamente el 90% de la concentración del radical DPPH<sup>•</sup> con una concentración de 10.79 µg/mL (Yuniarti *et al.*, 2020). Se puede apreciar el potencial como agente antioxidante del extracto etanólico de *A. californica* silvestre para producir compuestos fenólicos *in vitro*, ya que el contenido fenólico y de flavonoides totales se relaciona directamente con el potencial antioxidante detectado por DPPH<sup>•</sup>. Resultados similares describieron (Olubodun *et al.*, 2021) al analizar los extractos de hojas de *A. godseffiana*, ya que contenían metabolitos secundarios vinculados con propiedades antioxidantes. Ravi *et al.* (2017) evaluaron *in vitro* el extracto metanólico de hojas de *A. indica*, y de una fracción polifenólica *in vivo*, los resultados mostraron que el extracto metanólico contenía una gran cantidad de fenoles, flavonoides y saponinas los cuales mostraron una buena actividad antioxidante y que fue evidenciado en la fracción polifenólica, ya que indujo la expresión de enzimas antioxidantes en ratas diabéticas. Otros estudios realizados en especies del género que también han mostrado un potente efecto eliminador de radicales libres en el ensayo DPPH<sup>•</sup> son *A. fruticose* (Massarani *et al.*, 2019), *A. hispida* (Siraj *et al.*, 2016), *A. indica* (Refilda *et al.*, 2021) y *A. ciliata* (Odeja *et al.*, 2016),

Los procesos oxidativos no se encuentran asociados únicamente con la actividad de los radicales libres, sino que también se pueden ejercer efectos oxidantes por medio de la oxidación de moléculas por los metales de transición presentes en el cuerpo. Razón por la cual al evaluar la actividad antioxidante de los callos de *A. californica* resultó importante medirla por medio del método FRAP, el cual se fundamenta en la capacidad que tienen los extractos para reducir el hierro en estado férrico (Fe<sup>3+</sup>) a su estado ferroso (Fe<sup>2+</sup>); al respecto, de acuerdo con los valores establecidos en la literatura, el extracto de los callos mostró un fuerte poder reductor del hierro con 1.58 ± 0.15 mmol de Fe<sup>2+</sup>/g de extracto; en tanto que el extracto etanólico de la planta silvestre mostró un efecto tres veces mayor. Dicha actividad se ve relacionada estrechamente con el contenido de compuestos fenólicos del extracto (Vega *et al.*, 2021).

En este contexto, vale la pena reconocer que las enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo se tratan tradicionalmente con miembros del género *Acalypha* tales como *A. wilkesiana* var. *Macafeana*, *A. indica* Linn. y *A. fruticosa* (Din *et al.*, 2013; Mullick *et al.*, 2013; Rajkumar *et al.*, 2010).

Como se muestra en la Figura 15, la producción de NO disminuyó ligeramente en los macrófagos RAW 264.7 estimulados con LPS tratados con la concentración de 50 µg/mL de extracto etanólico de los callos (24%), en tanto que a concentraciones mayores el efecto inhibitorio fue menor. Este comportamiento puede deberse a la clase de compuestos fenólicos contenidos en los callos, ya que solo ciertos tipos de compuestos fenólicos tales como los flavonoides se ven asociados a la actividad antiinflamatoria; además ha sido documentado que, si bien los compuestos fenólicos pueden tener efectos antiinflamatorios en ciertas concentraciones, a concentraciones mayores pueden presentar un efecto pro-oxidante y pro-inflamatorio (Rahman *et al.*, 2022).

En la Figura 16 se puede apreciar la producción de NO en los tratamientos con el extracto etanólico de la planta silvestre apreciando así que esta fue inversamente proporcional a la concentración de extracto aplicado, disminuyendo ligeramente a 25 y 50 µg/mL, seguido de una disminución abrupta a 100 y 200 µg/mL. Esta fuerte inhibición en la producción de óxido nítrico posiblemente está asociada a la presencia de una mayor variedad y complejidad encontrada en el grupo de los flavonoides perteneciente al extracto etanólico de la planta silvestre. En este extracto destacó la presencia de flavonoides glucosilados, proantocianidinas tales como taninos hidrolizables y condensados, el estilbeno resveratrol y el flavonoide quercetina; este último compuesto ha sido muy referenciado con respecto a su prometedora capacidad para la modulación del proceso inflamatorio, ya que presenta un grupo catecol en el anillo B de su estructura, lo que le permite inhibir simultáneamente la producción de prostaglandina E2 inflamatoria y citocinas proinflamatorias, a diferencia de otros flavonoides que carecen del grupo catecol en su estructura, como la genisteína encontrada en el extracto etanólico de callos; ya que según (Leyva *et al.*, 2016) la falta de grupos hidroxilo en el anillo B aparentemente elimina la actividad antiinflamatoria.

Numerosos estudios avalan el rol de la quercetina en la regulación de la expresión de intermediarios inflamatorios en células murinas de macrófagos RAW 264.7 estimuladas con

LPS; Mueller *et al.* (2010) encontraron que el kaempferol y la quercetina a las concentraciones de 50 y 100 nM, reducen niveles de secreción de las citocinas IL-6 y TNF- $\alpha$ . De igual manera Hämäläinen *et al.* (2007) reportaron que la quercetina y la genisteína inhiben la secreción de TNF- $\alpha$  a las concentraciones de 25 y 50  $\mu$ M, además la quercetina estimuló la expresión de la citoquina antiinflamatoria IL-10 a concentraciones inferiores a 50  $\mu$ M. Por otro lado, (Ribeiro *et al.*, 2015) obtuvieron que la quercetina a la concentración de 25  $\mu$ M inhibe la producción de IL-1, IL-6, IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  en sangre entera humana incubada con LPS.

Se han documentado efectos antiinflamatorios en otras especies del género *Acalypha*, tales como *A. hispida*, la que presentó actividad depuradora de NO significativa a una concentración de 100  $\mu$ g/mL (Siraj *et al.*, 2016). El extracto metanólico de *A. indica* presentó actividad antiinflamatoria mediante la capacidad del extracto para inhibir la desnaturalización de proteínas (Soruba *et al.*, 2015), esta capacidad también fue evaluada por Olubodun *et al.* (2020) en *A. godseffiana* y se observó un porcentaje significativo de inhibición de la desnaturalización de proteica.

Los compuestos polifenólicos han llamado mucho la atención debido a sus efectos de modulación sobre los inflamomas, complejos multiproteicos asociados al inicio y la progresión de enfermedades crónicas como el cáncer (Nunes *et al.*, 2020). Las plantas medicinales asociadas con el conocimiento de las etnias podrían ser una fuente alternativa potencial de nuevas terapias antiinflamatorias (Yeshe *et al.*, 2022). Las plantas del género *Acalypha* se caracterizan por ser ricas principalmente en compuestos fenólicos, saponinas, taninos y triterpenos, que son los responsables de su acción antiinflamatoria (Nunes *et al.*, 2020). *A. wilkesiana* y *A. indica* son las plantas más estudiadas del género, sus extractos metanólicos tienen potentes acciones analgésicas y antiinflamatorias en ratas (Aniyeloye *et al.*, 2019; Chekuri *et al.*, 2016).

En el estudio biodirigido realizado por (Rascón *et al.*, 2015) sobre la actividad antiproliferativa del extracto metanólico de *A. californica* se estudió la composición de la fracción residual de dicho extracto por espectrometría de masas, encontrando que la mayoría de los compuestos eran pertenecientes a la familia de las proantocianidinas. Contrariamente al generar el perfil químico del extracto etanólico de los callos de *A. californica* mediante

espectrometría de masas fueron encontradas estructuras de ácidos fenólicos y flavonoides principalmente.

Lo anterior puede deberse a que si bien en los callos se genera estrés por los nutrientes y reguladores de crecimiento, propiciando las condiciones para la síntesis de compuestos fenólicos tales como los ácidos fenólicos y flavonoides, dicho estrés no provoca la síntesis de las proantocianidinas encontradas en los extractos de las plantas silvestres ya que estas se ven mayormente favorecidas por el enfrentamiento contra patógenos, la presencia de metales pesados y altas radiaciones UV, es decir, condiciones propias de un organismo en un ecosistema (Yu *et al.*, 2022).

Por este motivo los ácidos fenólicos y flavonoides encontrados en callos pueden obedecer mayormente a procesos de oxidación metabólica dentro de las células en crecimiento (Liu *et al.*, 2015). A su vez, la presencia de los ácidos fenólicos y los flavonoides en el extracto etanólico de los callos fundamenta la actividad antioxidante y antiinflamatoria encontrada en el presente estudio.

Las plantas desarrollan naturalmente callos u otros tumores después de la exposición a diversas condiciones de crecimiento adversas, tales como heridas o infecciones por patógenos y actualmente se conoce que todos estos tipos de callos difieren en sus propiedades moleculares y fisiológicas (Ikeuchi *et al.*, 2013). Los reguladores de crecimiento de las plantas no pueden regular la síntesis de ácidos nucleicos, proteínas y enzimas; sin embargo, algunos de ellos pueden mejorar el contenido de proteínas y azúcares y mejorar su resistencia al estrés biótico y abiótico, mediante la modulación de la señalización de hormonas vegetales, en particular, de auxinas y citoquininas (Farjaminezhad y Garoosi, 2019). Estos reguladores son factores importantes que además afectan el crecimiento celular, la diferenciación y la formación de metabolitos en células y tejidos vegetales (De Queiroz *et al.*, 2015).

Los metabolitos secundarios, como los compuestos fenólicos, se producen en bajas cantidades en cultivos de tejidos y órganos; sin embargo, el uso de inductores químicos y moléculas de señalización tales como el jasmonato de metilo, el ácido salicílico, el quitosano y los metales pesados pueden mejorar la producción de estos metabolitos secundarios (Sagharyan *et al.*, 2020). Las condiciones fisiológicas juegan un papel importante en las técnicas de

provocación, aunado a la presencia de reguladores del crecimiento, ya que propician mejores resultados durante la fase exponencial de crecimiento de la planta, cuando la concentración de compuestos bioactivos es mayor (Baenas *et al.*, 2014; Cevallos y Cisneros, 2010). Lee *et al.* (2013) realizaron cultivos en suspensión de raíces adventicias de *Aloe vera* y obtuvieron que el ácido salicílico mejoraba la actividad antiinflamatoria aumentando la concentración de antraquinonas, al igual que Attaran *et al.*, (2017) encontraron que los iones jasmonato de metilo (MeJA) y plata ( $\text{Ag}^+$ ) tenían una capacidad considerable para estimular la producción de ácidos fenólicos valiosos como el ácido rosmarínico en los cultivos de brotes regenerados de *Savia virgata*. No obstante, diversos estudios de la naturaleza de esta investigación han sido desarrollados y se han obtenido resultados satisfactorios, tal es el caso de la investigación realizada por Motolinia *et al.* (2023) quienes encontraron que cultivos *in vitro* de *A. pichichensis* en ausencia de elicitores produce una menor concentración de compuestos fenólicos en comparación con la planta silvestre.

Así con los resultados obtenidos mediante esta investigación podemos denotar que *A. californica* es una planta que posee fuertes actividades biológicas, las cuales son en gran medida debida a los compuestos fenólicos que poseen. De manera tal que las plantas que se han enfrentado a un desafío ecológico muestran un mayor efecto. La producción de los callos de *A. californica* como fuente alternativa de compuestos fenólicos bioactivos *in vitro* es una buena estrategia para obtener material vegetal; sin embargo diversos elicitores deberán de ser adicionados para que se potencie la producción de compuestos fenólicos, lo cual alienta estudios agronómicos y bioquímicos adicionales para el futuro desarrollo de nuevos protocolos para la obtención de cultivos celulares *in vitro*, con altas concentraciones de compuestos fenólicos desde un enfoque biotecnológico.

## VII. CONCLUSIONES

- Se obtuvieron callos a partir de hojas, pecíolos, yemas y segmentos nodales de *A. californica* en medio WPM suplementado con 1.5 mg/L de AIB y 1.0 mg/L de BAP.
- Los extractos etanólicos de callos y planta silvestre de *A. californica* mostraron una fuerte actividad antioxidante mediante las metodologías del DPPH\*, FRAP, TPC y TFC.
- El extracto etanólico de *A. californica silvestre* mostró una actividad antiproliferativa moderada según el NCI, con mayor actividad en las líneas celulares cancerosas de tipo ginecológicas HeLa y MCF-7; sin embargo, el extracto etanólico de callos no mostró IC<sub>50</sub> en ninguna de las líneas celulares evaluadas.
- El extracto etanólico de *A. californica silvestre* mostró una alta capacidad de inhibición del óxido nítrico; con respecto al extracto etanólico de callos con una actividad antiinflamatoria no significativa.
- El perfil químico del extracto etanólico de *A. californica silvestre* mostró la presencia de proantocianidinas, flavonoides y estilbenos; con respecto al perfil químico del extracto etanólico de callos de *A. californica* en el que se encontraron principalmente ácidos fenólicos y flavonoides sencillos.

## VIII. RECOMENDACIONES

Este estudio constituye la base para la producción de plantas de *A. californica* utilizando herramientas biotecnológicas, por lo cual se considera realizar las siguientes recomendaciones para estudios futuros.

- Utilizar como base para la generación de callos de la planta las condiciones y medios aquí descritos, una vez que estos callos sean generados utilizar elicitores para potenciar la producción de compuestos fenólicos.
- Desarrollar un método mediante HPLC para monitorizar la concentración de compuestos fenólicos en los diferentes estadios de desarrollo de las plantas
- Evaluar la actividad antioxidante en un sistema celular, por ejemplo, utilizando DCFH y midiendo la generación de hidroxilos mediante citometría de flujo.
- Evaluar otras moléculas relacionadas a procesos inflamatorios tales como el TNF- $\alpha$  y las interleucinas anti y proinflamatorias.

## IX. LITERATURA CITADA

- Abubakar, I. B., S. W. Lim, y H. S. Loh, 2018. Synergistic apoptotic effects of tocotrienol isomers and *Acalypha wilkesiana* on A549 and U87MG cancer cells. *Tropical Life Sciences Research*, 29(1): 229–238. doi: 10.21315/2018.29.1.15
- Acevedo, D., L. Monzó, L. Pérez, E. Naranjo, S. Á. Gómez, N. Estañ, C. Bañuls y G. Sáez. 2022. Oxidative stress and DNA damage markers in colorectal cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(19): 1-12. doi: 10.3390/231911664
- Al Mamari, H. H. 2021. Phenolic compounds: classification, chemistry, and updated techniques of analysis and synthesis. [www.intechopen.com](http://www.intechopen.com)
- Alonso, A. J., M. L. Villarreal, L. A. Salazar, M. Gómez, F. Dominguez y A. García. 2011. Mexican medicinal plants used for cancer treatment: Pharmacological, phytochemical and ethnobotanical studies. In *Journal of Ethnopharmacology* 133(3): 945–972. doi: 10.1016/.2010.11.055
- Anand, U., A. Dey, A. K. S. Chandel, R. Sanyal, A. Mishra, D. K. Pandey, V. De Falco, A. Upadhyay, R. Kandimalla, A. Chaudhary, J. K. Dhanjal, S. Dewanjee, J. Vallamkondu y J. M. Pérez. 2023. Cancer chemotherapy and beyond: Current status, drug candidates, associated risks and progress in targeted therapeutics. In *Genes and Diseases* 10(4): 1367–1401. doi: 10.1016/2022.02.007
- Aniyeloye, C. A. N., O. J. Olorunfemi y M. T. Bekinbo. 2019. Effect of hydro-methanolic extract of *Acalypha wilkesiana* leaves on pyretic, Inflammatory and pain-induced scenarios in WistarRats. *International Journal of Pharma Sciences and Research* 10(10): 350.
- Asuzu, P. C., N. S. Trompeter, C. R. Cooper, S. A. Besong y A. N. A. Aryee. 2022. Cell culture-based assessment of toxicity and therapeutics of phytochemical antioxidants. in *molecules* 27(3):1087. doi: 10.3390/27031087
- Atanasov, A. G., B. Waltenberger, E. M. Pferschy, T. Linder, C. Wawrosch, P. Uhrin, V. Temml, L. Wang, S. Schwaiger, E. H. Heiss, J. M. Rollinger, D. Schuster, J. M. Breuss, V. Bochkov, M. D. Mihovilovic, B. Kopp, R. Bauer, V. M. Dirsch y H. Stuppner. 2015. Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review. In *Biotechnology Advances* 33(8):1582–1614. doi: 10.1016/ 2015.08.001
- Atriano, R. A., y B. Benito. 2021. Medicina tradicional mexicana, cultura y tradición, un paso hacia la etnofarmacología. *Revista Intercyt. Interculturalidad, Ciencia y Tecnología*.
- Attaran, S., P. Abrishamchi, T. Radjabian, y S. A. Salami. 2017. Enhanced phenolic acids production in regenerated shoot cultures of *Salvia virgata* Jacq. after elicitation with Ag<sup>+</sup> ions, methyl jasmonate and yeast extract. *Industrial Crops and Products*, 103, 81–88. doi: 10.1016/ 2017.03.043
- Ávila, C. J. 2017. La medicina tradicional en la pobreza. *Revista de Comunicación y salud*. 7(1): 199-204. doi: 10.35669

- Avinash y Umesha. 2018. Effect of growth hormones in induction of callus, antioxidants, and antibacterial activity in *Nerium odorum*. *Journal of Applied Biology y Biotechnology*, 21–25. doi: 10.7324/ 2018.60404
- Babich, O., S. Sukhikh, A. Pungin, L. Astahova, E. Chupakhin, D. Belova, A. Prosekov y S. Ivanova. 2021. Evaluation of the conditions for the cultivation of callus cultures of *hyssopus officinalis* regarding the yield of polyphenolic compounds. *Plants*, 10(5). doi: 10.3390/10050915
- Baenas, N., C. García y D. A. Moreno. 2014. Elicitation: A tool for enriching the bioactive composition of foods. In *Molecules* 19(9): 13541–13563. doi: 10.3390/190913541
- Banik, B. K., B. M. Sahoo y A. Tiwari. 2022. Terpene glycosides. In *Terpenoids Chemistry, Biochemistry, Medicinal Effects, Ethno-pharmacology* (pp. 229–253). BocaRaton FLA. doi: 10.1201/9781003008682-7
- Bejarano, N., L. Lafuente, J. Esteche, C. C. Santiago, A. H. Rojas y A. Ponzinibbio. 2021. Synthesis and structure of novel potentially bioactive amphiphilic -O-(N)-glycosides. *Chemistry Proceedings* 3(1): doi: 10.3390/24-08286
- Bentham, G. 1844. *The botanical descriptions* (Richard Brinsley, Ed.). Elder Smith and Co.
- Bhambhani, S., K. R. Kondhare y A. P. Giri, 2021. Diversity in chemical structures and biological properties of plant alkaloids. In *Molecules* 26(11): doi: 10.3390/26113374
- Bi, W., C. He, Y. Ma, J. Shen, L. H. Zhang, Y. Peng y P. Xiao. 2016. Investigation of free amino acid, total phenolics, antioxidant activity and purine alkaloids to assess the health properties of non-Camellia tea. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 6(2): 170–181. doi: 10.1016/j.apsb.2015.11.003
- Bié, J., B. Sepodes, P. C. B. Fernández y M. H. L. Ribeiro. 2023. Polyphenols in Health and Disease: Gut Microbiota, Bioaccessibility, and Bioavailability. *Compounds*, 3(1): 40–72. doi: 10.3390/3010005
- Biswas, S. K., y A. Mantovani. 2010. Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. *Nature Immunology*. 11(10):889-96. doi: 10.1038/ni.1937.
- Boengler, K., M. Kosiol, M. Mayr, R. Schulz y S. Rohrbach. 2017. Mitochondria and ageing: role in heart, skeletal muscle and adipose tissue. *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle*, 8, 349 - 369. doi: 10.1002/12178
- Boeri, P. A. 2016. “Bioprospección química y propagación de plantas nativas del monte patagónico como estrategias de conservación y uso sustentable” TESIS DOCTORAL Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales-Universidad Nacional de La Plata.
- Botelho, M. C., J. P. Teixeira y P. A. Oliveira. 2014. Carcinogenesis. In *Encyclopedia of Toxicology: Third Edition* (pp. 713–729). Elsevier. doi: 10.1016/B978-0-12-386454-3.00371-7
- Caballero, M. D., P. A. Hernández, J. Hernández y B. Fernández. 2022. La+expresión+de+8-hidroxi+2'-desoxiguanosina+en+el+cáncer. *Tequío*, 5(15): doi: 10.53331/5i15.3751
- Calva, G. and Pérez, J. 2005. Cultivo de células y tejidos vegetales: Fuente de alimentos para el futuro. *Revista Digital Universitaria*. 6 (11): 1-16. doi: 1067-6079

- Cardiel, J. M. y I. Montero. 2018. Synopsis of *Acalypha* (Euphorbiaceae) of west tropical África, including cameroon, chad, equatorial Guinea, Gabon, and São Tomé and Príncipe. *Plant Systematics and Evolution*, 304(1): 93–110. doi: 10.1007/s00606-017-1453-4
- Castañeda, O., Gómez, F. C., Trejo, L. I., Morales, V., González, M. T., Martínez, Y. M., Gámez, R. and Pastelín, M. C. 2014. Aplicaciones del cultivo de tejidos vegetales en caña de azúcar (*Saccharum* spp.) *Agroproductividad*. 7(2): 16-21.
- Cevallos, B. A. y L. Cisneros. 2010. Impact of germination on phenolic content and antioxidant activity of 13 edible seed species. *Food Chemistry*, 119(4), 1485–1490. doi: 10.1016/2009.09.030
- Chandran, H., M. Meena, T. Barupal y K. Sharma. 2020. Plant tissue culture as a perpetual source for production of industrially important bioactive compounds. In *Biotechnology Reports* (26). Elsevier B.V. doi: 10.1016/2020.e00450
- Chekuri, S., N. Vankudothu, S. Panjala, N. B. Rao y R. R. Anupalli. 2016. Phytochemical analysis, anti-oxidant and anti-microbial activity of “*Acalypha indica*” leaf extracts in different organic solvents. *International Journal of Phytomedicine*, 8(3): 444–452. doi: 10.5138/09750185.1882
- Chekuri, S., S. Panjala y R. R. Anupalli. 2017. Cytotoxic activity of *Acalypha indica* L. hexane extract on breast cancer cell lines (MCF-7). *The Journal of Phytopharmacology*, 6(5): 264–268. doi: 10.31254/phyto.2017.6502
- Chelombitko, M. A. 2018. Role of Reactive Oxygen Species in Inflammation: A Minireview. *Moscow University Biological Sciences Bulletin*, 73(4): 199–202. doi: 10.3103/S009639251804003X
- Chen, L., H. Deng, H. Cui, J. Fang, Z. Zuo, J. Deng, Y. Li, X. Wang y L. Zhao. 2018. Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. In *Oncotarget* 9(6): doi: 10.18632/23208
- Cheung, E. C. y K. H. Vousden. 2022. The role of ROS in tumour development and progression. In *Nature Reviews Cancer* 22(5): 280–297. doi: 10.1038/s41568-021-00435-0
- Cortés, E. A. 2013. Conocimiento tradicional herbolario pa ipai y perspectiva de desarrollo local en Santa Catarina, B.C. Universidad Autónoma de Baja California.
- Costa, M., Z. Sezgin, S. Losada, F. Paiva, L. Saso y C. Bravo. 2021. Polyphenols as antioxidants for extending food shelf-life and in the prevention of health diseases: Encapsulation and interfacial phenomena. In *Biomedicines* 9(12): doi: 10.3390/9121909
- Cui, X., Y. Zhang, Y. Lu y M. Xiang. 2022. ROS and Endoplasmic Reticulum Stress in Pulmonary Disease. In *Frontiers in Pharmacology* 13: doi: 10.3389/2022.879204
- Davinelli, S., D. C. Willcox y G. Scapagnini. 2012. Extending healthy ageing: Nutrient sensitive pathway and centenarian population. In *Immunity and Ageing* 9(1): doi: 10.1186/1742-4933-9-9
- Davis, C. C., C. O. Webb, K. J. Wurdack, C. A. Jaramillo y M. J. Donoghue. 2005. Explosive radiation of Malpighiales supports a mid-cretaceous origin of modern tropical rain forests. *The American Naturalist*, 165(3): doi: 10.1086/428296

- De Queiroz, K., M. C. Coimbra, A. Hortência y F. Castro. 2015. *In vitro* germination, callus induction and phenolic compounds contents from *Pyrostegia venusta* (Ker Gawl.) Miers. *Acta Scientiarum. Biological Sciences Maringá*, 37(2): 151–158. doi: 10.4025/37i2
- Din, W. M., J. Chu, G. Clarke, K. T. Jin, T. D. Bradshaw, J. R. Fry y C. Wiart. 2013. Antioxidant and Cytoprotective Effects of an Ethanol Extract of *Acalypha wilkesiana* var. *macafeana* from Malaysia. doi: 10.1177/1934578X1300800325
- Dorado, C. 2020. Etnofarmacología, riqueza terapéutica de México para el desarrollo social sostenible. *Ecociencia Internacional Journal*. 2(3): 54-65. doi: 10.35766/je20236
- Efferth, T. 2019. Biotechnology applications of plant callus cultures. In *Engineering* 5(1): 50–59. doi: 10.1016/2018.11.006
- Egeblad, M., E. S. Nakasone y Z. Werb. 2010. Tumors as organs: complex tissues that interface with the entire organism. *Developmental Cell*. 18:884-901. doi: 10.1016/j.devcel.2010.05.012
- El-Raey, M. y W. Fayad. 2016. Phenolic constituents and biological activities of *Acalypha wilkesiana* forma *tricolor* Muell arg seeds repurposing of antibiotic drugs: Innovative revision of breast cancer treatment. View project Natural products and gastric ulcer. *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research*; 8(3); 386-392.
- Espinosa, A., J. Silva, S. Sariego, L. Cholo y H. Delgado. 2012. Effect of explant type and concentration of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid on callus formation in *Morus alba* L. *Pastos y Forrajes*, 35(4): 407–416.
- Estrada, E., J. Á. Villarreal, A. Mora, G. Cuéllar, J. Sánchez, T. V. Gutiérrez, R. V. Alameda, D. A. González, C. González y J. R. A. Sierra. 2023. Ethnobotany of the useful native species in Linares, Nuevo León, México. *Sustainability (Switzerland)*, 15(15): doi: 10.3390/151511565
- Farjaminezhad, R. y A. G. Garoosi. 2019. New biological trends on cell and callus growth and azadirachtin production in *Azadirachta indica*. *3 Biotech*, 9(8). doi: 10.1007/s13205-019-1836-z
- Ferlay, J., M. Colombet, I. Soerjomataram, C. Mathers, D. M. Parkin, M. Piñeros, A. Znaor y F. Bray. 2019. Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. *International Journal of Cancer*, 144(8): 1941–1953.
- GLOBOCAN. 2020. World. The global cancer observatory. <https://gco.iarc.fr/today/home>
- GLOBOCAN. 2021, March. CANCER TODAY. <https://gco.iarc.fr/today/home>
- Gohari, A. R., S. Saeidnia, Y. Ajani y A. Hadjiakhoondi. 2011. Antioxidant activity of some medicinal species using FRAP Assay. *Journal of Medicinal Plants*, 10(37): 54–60.
- Gómez, A., J. Murillo y Y. García. 2015. EL GÉNERO *Acalypha* (EUPHORBIACEAE) en Santander. doi: 10.13140/RG.2.2.34843.67362
- Gonda, T. A., S. Tu y T. C. Wang. 2009. Chronic inflammation, the tumor microenvironment and carcinogenesis. In *Cell Cycle* 8(13): 2005–2013. doi: 10.4161/cc.8.13.8985

- Granito, A., L. Muratori, M. Guidi, M. Lenzi y P. Murator. 2021. Hepatocellular carcinoma in viral and autoimmune liver diseases: Role of CD4+ CD25+ Foxp3+ regulatory T cells in the immune microenvironment. *World Journal of Gastroenterology*, 27(22): 2994–3009.
- Guillén, G. A., S. A. Villa, R. A. Pérez, U. Castillo, D. Salas, O. Saucedo, R. Montes, C. A. Gómez, A. J. Garza, D. E. Zamora, M. Loera y A. Soto. 2021. Cytotoxic effect *in vitro* of *acalypha monostachya* extracts over human tumor cell lines. *Plants*, 10(11): doi: 10.3390/10112326
- Gupta, V. K., R. Singh y B. Sharma. 2017. Phytochemicals mediated signalling pathways and their implications in cancer chemotherapy: Challenges and opportunities in phytochemicals based drug development: A review. *Biochemical Compounds*, 5(1): 2. doi: 10.7243/2052-9341-5-2
- Halimah, E., R. Hendriani y F. Ferdiansyah. 2023. Antiproliferative activity of *Acalypha wilkesiana* against human cervical cancer cell lines HeLa. *Journal of Advanced Pharmacy Education and Research*, 11(4): 7–10. doi: 10.51847/jsMgvvrBMs
- Halimah, E., R. Hendriani, B. Indradi y F. F. Sofian. 2022. Cytotoxicity of ethanol extract and its fractions from *Acalypha wilkesiana* against breast cancer cell MCF-7. *Journal of Advanced Pharmacy Education and Research*, 12(1): 17–20. doi: 10.51847/G2BMKVC6PO
- Hämäläinen, M., R. Nieminen, P. Vuorela, M. Heinonen y Moilanen, E. 2007. Anti-inflammatory effects of flavonoids: Genistein, kaempferol, quercetin, and daidzein inhibit STAT-1 and NF- $\kappa$ B activations, whereas flavone, isorhamnetin, naringenin, and pelargonidin inhibit only NF- $\kappa$ B activation along with their inhibitory effect on iNOS expression and NO production in activated macrophages. *Mediators of Inflammation*, 2007. doi: 10.1155/2007/45673
- Hanahan, D. 2022. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discovery*, 12(1), 31–46. doi:10.1158/2159-8290.CD-21-1059
- Hanahan, D. y R. A. Weinberg. 2000. The Hallmarks of Cancer Review evolve progressively from normalcy via a series of pre. *Cell*, 100: 57–70. doi: 10.1016/s0092-8674(00)81683-9.
- Hanahan, D. y R. A. Weinberg. 2011. Hallmarks of cancer: The next generation. In *Cell* 144(5): 646–674. doi: 10.1016/j.2011.02.013
- Horacio, S., G. Maldonado, R. S. Díaz y M. M. González. 2017. Plantas medicinales la realidad de una tradición ancestral.
- Hosseinzadeh, E., N. Banaee y H. A. Nedaie. 2017. Cancer and Treatment Modalities. *Current Cancer Therapy Reviews*, 13(1): doi: 10.2174/1573394713666170531081818
- Ikeuchi, M., K. Sugimoto y A. Iwase. 2013. Plant callus: Mechanisms of induction and repression. In *Plant Cell* 25(9): 3159–3173. doi: 10.1105/tpc.113.116053
- INEGI. 2021a. CARACTERÍSTICAS DE LAS DEFUNCIONES REGISTRADAS EN MÉXICO DURANTE 2020. <https://whttps://www.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/boletines/2021/EstSociodem>

o/DefuncionesRegistradas2020preliminar.pdfwww.paho.org/hq/dmdocuments/2016/2016-cha-epidemiological-calendar.pdf

- INEGI. 2021b. ESTADÍSTICA DE DEFUNCIONES REGISTRADAS DE ENERO A JUNIO DE 2021 (PRELIMINAR). <https://www.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/boletines/2022/dr/dr2021.pdf>
- INEGI. 2021c. ESTADÍSTICAS A PROPÓSITO DEL DÍA MUNDIAL CONTRA EL CÁNCER (4 DE FEBRERO). [https://www.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/aproposito/2021/cancer2021\\_Nal.pdf](https://www.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/aproposito/2021/cancer2021_Nal.pdf)
- Instituto Nacional del Cáncer. 2020, September 25. Estadísticas del cáncer. <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/naturaleza/estadisticas#:~:text=La>
- Ireland, L. V. y A. Mielgo. 2018. Macrophages and fibroblasts, key players in cancer chemoresistance. In *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 6: doi: 10.3389/fcell.2018.00131
- Islam, A. T. M. R. y M. F. Alam. 2018. *In vitro* callus induction and indirect organogenesis of *Mentha piperita* (L.) - an aromatic medicinal plant. *GSC Biological and Pharmaceutical Sciences*, 4(3), 49–60. doi: 10.30574/gscbps.2018.4.3.0078
- Jafari, S., M. H. Daneshvar, M. S. Salmi y A. L. Jalal. 2017. Indirect Organogenesis and Plant Regeneration in Common Sage (*Salvia officinalis* L.): An important medicinal plant of Iran. *Modern Applied Science*, 11(5): 22. doi: 10.5539/11n5p22
- Jamwal, K., S. Bhattacharya y S. Puri. 2018. Plant growth regulator mediated consequences of secondary metabolites in medicinal plants. In *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants* 9: 26–38. doi: 10.1016/2017.12.003
- Jan, R., S. Asaf, M. L. Numan y K. M. Kim. 2021. Plant secondary metabolite biosynthesis and transcriptional regulation in response to biotic and abiotic stress conditions. In *Agronomy* 11(5): doi: 10.3390/11050968
- Kambara, H., T. Yamada, M. Tsujioka, S. Matsunaga, R. Tanaka, H. I. Ali, C. Wiart, M. Yusof, H. Hassan, A. Hanifah, Z. M. Fauzi, H. Mazlan, M. Jay, M. Kunishima y E. Akaho. 2006. A study on medicinal plants from Malaysia focused on *Acalypha siamensis* Oliv. ex Gage. Isolation and structure of a new tetraterpene, Acalyphaser A chemistry y biodiversity 10(9): 1505–1507. doi: 10.1177/1934578X1501000904
- Kargozar, S., S. Mollazadeh, F. Kermani, T. J. Webster, S. Nazarnezhad, S. Hamzehlou y F. Bains. 2022. Hydroxyapatite nanoparticles for improved cancer theranostics. *Journal of Functional Biomaterials*, 13(3): doi: 10.3390/jfb13030100
- Karunamoorthi, K. 2012. Medicinal and aromatic plants: A major source of green pesticides/risk-reduced pesticides. *Medicinal & Aromat Plants* 1(8) doi:10.4172/2167-0412.1000e137
- Kaweme, N. M., S. Zhou, G. J. Changwe y F. Zhou. 2020. The significant role of redox system in myeloid leukemia: from pathogenesis to therapeutic applications. *Biomarker Research*, 8(1): doi: 10.1186/s40364-020-00242-z

- Khan, A., A. H. Shah y N. Ali. 2021. *In-vitro* propagation and phytochemical profiling of a highly medicinal and endemic plant species of the Himalayan region (*Saussurea costus*). *Scientific Reports*, 11(1): doi: 10.1038/s41598-021-03032-1
- Kisiel, A., A. Krzemińska, D. Cembrowska y T. Miller. 2023. Data Science and Plant Metabolomics. In *Metabolites* 13(3): doi: 10.3390/13030454
- Klaunig, J. E. y Z. Wang. 2018. Oxidative stress in carcinogenesis. In *Current Opinion in Toxicology* 7: 116–121. doi: 10.1016/2017.11.014
- Klaunig, J. E. y Z. Wang. 2018. Oxidative stress in carcinogenesis. *Current Opinion in Toxicology*, 7: 116–121. doi: 10.1016/2017.11.014
- Klaunig, J. E., Z. Wang, X. Pu y S. Zhou. 2011. Oxidative stress and oxidative damage in chemical carcinogenesis. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 254(2): 86–99. doi: 10.1016/2009.11.028
- Korniluk, A., O. Koper, H. Kemonia y V. Dymicka. 2017. From inflammation to cancer. In *Irish Journal of Medical Science* 186(1): 57–62. doi: 10.1007/s11845-016-1464-0
- Krishna, R. 2016. Micropropagation and Agrobacterium: mediated transformation of GUS gene in to *Gymnema sylvestre* antidiabetic plants. *Journal of Medicinal Plants Studies*, 18(4): 18–24.
- Lee, Y. S., H. K. Ju, Y. J. Kim, T. G. Lim, M. R. Uddin, Y. B. Kim, J. H. Baek, S. W. Kwon, K. W. Lee, H. S. Seo, S. U. Park y T. J. Yang. 2013. Enhancement of anti-inflammatory activity of *Aloe vera* adventitious root extracts through the alteration of primary and secondary metabolites via salicylic acid elicitation. *PLoS ONE* 8(12): doi: 10.1371/0082479
- Leyva, N., E. P. Gutierrez, D. L. Ambriz y J. Basilio. 2016. Flavonoids as cytokine modulators: A possible therapy for inflammation-related diseases. In *International Journal of Molecular Sciences* 17(6): doi: 10.3390/17060921
- Lim, S. W., K. N. Ting, T. D. Bradshaw, N. A. Zeenathul, C. Wiart, T. J. Khoo, K. H. Lim y H. S. Loh. 2011. *Acalypha wilkesiana* extracts induce apoptosis by causing single strand and double strand DNA breaks. *Journal of Ethnopharmacology* 138(2): 616–623. doi: 10.1016/2011.10.005
- Liou, G. Y. y P. Storz. 2010. Reactive oxygen species in cancer. *Free Radical Research* 44(5): 479–496. doi: 10.3109/10715761003667554
- Liu, J., A. Osbourn y P. Ma. 2015. MYB transcription factors as regulators of phenylpropanoid metabolism in plants. In *Molecular Plant* 8(5): 689–708. doi: 10.1016/2015.03.012
- Liu, W., Y. Gao, H. Li, X. Wang, M. Jin, Z. Shen, D. Yang, X. Zhang, Z. Wei, Z. Chen y J. Li. 2023. Association between oxidative stress, mitochondrial function of peripheral blood mononuclear cells and gastrointestinal cancers. *Journal of Translational Medicine* 21(107): 1–15. doi: 10.1186/s12967-023-03952-8
- Liu, Y., Y. Shi, R. Han, C. Liu, X. Qin, P. Li y R. Gu. 2023. Signaling pathways of oxidative stress response: the potential therapeutic targets in gastric cancer. *Frontiers in Immunology*, 14(1139589): 1–12. doi: 10.3389/2023.1139589

- Lozano, M. A., R. A. Menchaca, J. L. Alanís y J. M. Pech. 2015. Cultivo *in vitro* de yemas axilares de *Vanilla planifolia* Andrews con diferentes citocininas. *Revista Científica Biológico-Agropecuaria Tuxpan*, 4(6): 1153–1165.
- Lynch, J. H. 2022. Revisiting the dual pathway hypothesis of Chorismate production in plants. *Horticulture Research*, 9: doi: 10.1093/hr/uhac052
- Majumder, S. y M. M. Rahman. 2016. Development of a successful protocol for *in vitro* callus induction and indirect plant regeneration of *Acalypha indica* L. *American International Journal of Research in Formal, Applied y Natural Sciences* 15(1): 60–65.
- Mamdouh, D. y I. Smetanska. 2022. Optimization of callus and cell suspension cultures of *Lycium schweinfurthii* for improved production of phenolics, Flavonoids, and Antioxidant Activity. *Horticulturae*, 8(5): 1–17. doi: 10.3390/8050394
- Mantovani, A. y P. Allavena. 2015. The interaction of anticancer therapies with tumor-associated macrophages. *Journal of Experimental Medicine*. 212:435–445. doi: 25753580
- Martínez., A. L. 2015. Herbolaria mexicana para el tratamiento del dolor. *Ciencia*, 60–67.
- Massarani, S. y K. M. I. El-Sayed. 2019. Antioxidant and anti-proliferative activities of *Acalypha fruticosa*: Possible elucidated mechanism. Article in *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 32(5): 2041–2050. d
- Mathur, S. y C. Hoskins. 2017. Drug development: Lessons from nature. *Biomedical Reports*, 6(6): 612–614. doi: 10.3892/br.2017.909
- Merriel, S. W. D. y W. Hamilton. 2020. Improving early cancer diagnosis in primary care. *Prescriber*, 31(9): 10–14. doi: 10.1002/psb.1862
- Metsämuuronen, S. y H. Sirén. 2019. Bioactive phenolic compounds, metabolism and properties: a review on valuable chemical compounds in Scots pine and Norway spruce. *Phytochemistry Reviews* 18(3): 623–664. doi: 10.1007/s11101-019-09630-2
- Mittal, M., M. R. Siddiqui, K. Tran, S. P. Reddy y A. B. Malik. 2014. Reactive oxygen species in inflammation and tissue injury. En *Antioxidants and Redox Signaling* 20(7): 1126–1167. doi: 10.1089/ars.2012.5149
- Moloney, J. N. y T. G. Cotter. 2018. ROS signalling in the biology of cancer. *Seminars in Cell and Developmental Biology* 80: 50–64. doi: 10.1016/2017.05.023
- Motolinia, E. A., A. M. Franco, A. Nieto, R. Arreguín, M. Rodríguez, F. Cruz y A. Román. 2023. Phenolic compounds from wild plant and *In Vitro* cultures of *Ageratina pichichensis* and evaluation of their antioxidant activity. *Plants* 12(5): doi: 10.3390/plants12051107
- Mueller, M., S. Hobiger y A. Jungbauer. 2010. Anti-inflammatory activity of extracts from fruits, herbs and spices. *Food Chemistry* 122(4): 987–996. doi: 10.1016/2010.03.041
- Mullick, A., J. Martin y L. Sallnow. 2013. An introduction to advance care planning in practice. *BMJ (Online)* 347(7930): 1–6. doi: 10.1136/f6064
- Muñoz, I. M., J. M., Cardiel y G. A. Levin. 2018. Nomenclatural review of *Acalypha* (Euphorbiaceae) of the Western Indian Ocean Region (Madagascar, the Comoros

- Archipelago, the Mascarene Islands and the Seychelles Archipelago). *PhytoKeys*, 108: 85–116. doi: 10.3897/108.27284
- Muñoz, P., J. M. Cardiel y D. Atha, 2014. *Acalypha* subgenus *Linostachys* (Euphorbiaceae, Acalyphoideae): A global review. *Phytotaxa*, 166(3): 199–221. doi: 10.11646/166.3.2
- Namdeo, A. G. 2007. Plant cell elicitation for production of Secondary Metabolites: A Review. *Pharmacognosy Reviews*. 1(1): 69-79.
- Nasrat, M. N., S. Z. Sakimin, M. Hakim. 2022. Phytochemicals and antioxidant Activities of conventionally propagated nodal segment and *in vitro*-induced callus of *Bougainvillea glabra* choisy using different solvents. *Horticultura* 8: 712-731 doi: 251478249
- Nitin, S., B. Deepak, P. R. Jagadish, B. P. Pankaj, S. T. Savita y B. P. Veena. 2019. Inflammation and Cancer. *Ann Afr Med* 18(3): 121–126. doi: 10.4103/\_56\_18
- Nunes, C. R., M. B. Arantes, S. M. de Faria, L. L., da Cruz, M. de Souza, L. P. de Moraes, I. J. C. Vieira y D. B. de Oliveira. 2020. Plants as Sources of Anti-Inflammatory Agents. In *Molecules* 25(16): 1–22. doi: 10.3390/25163726
- Ochatt, S., A. R. Alan, A. Bhattacharya, C. Hano, K. V. Kiselev, P. L. Marconi, W. C. Otoni, S. Y. Park, K. X. Tang y P. J. Weathers. 2022. Secondary metabolites: a boon from plants, the best chemist in nature: preface from the editors. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 149: 1–6. doi: 10.1007/s11240-022-02289-2
- Odeja, O., C. E. Ogwuche, E. E. Elemike y G. Obi. 2016. Phytochemical screening, antioxidant and antimicrobial activities of *Acalypha ciliata* plant. *Clinical Phytoscience*, 2(1): 2–12. doi: 10.1186/s40816-016-0027-2
- Olubodun, S. O., G. E. Eriyamremu, M. E. Ayevbomwan y C. I. Nzoputa. 2021. *In vitro* antioxidant activity and phytochemical analyses of *Acalypha godseffiana* (Euphorbiaceae) leaf extracts. *Nigerian Journal of Natural Products and Medicine*, 25(1): 75–79. doi: 10.4314/25i1.8
- Olubodun, S. O., G. E. Eriyamremu, N. Ayevbomwan y A. D. Giwa. 2020. *In Vitro* Anti-inflammatory and antimicrobial activities of *Acalypha godseffiana* leaf extracts. *A Journal of Research and Development*, 7(2): 2020.
- Ozyigit, I. I., I. Dogan, A. Hocaoglu, B. Yalcin, A. Erdogan, I. E. Yalcin, E. Cabi y Y. Kaya. 2023. Production of secondary metabolites using tissue culture-based biotechnological applications. *Frontiers in Plant Science*, 14: doi: 10.3389/2023.1132555
- Patel, P., V. Patel, A. Modi, S. Kumar y Y. M. Shukla. 2022. Phyto-factories of anti-cancer compounds: a tissue culture perspective. *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences*, 11(43): 1–21. doi: 10.1186/s43088-022-00203-5
- Piasecka, A., P. Kachlicki y M. Stobiecki. 2019. Analytical methods for detection of plant metabolomes changes in response to biotic and abiotic stresses. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(379): 1–23. doi: 10.3390/20020379
- Qian, B. Z., y J. W. Pollard. 2010. Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. *Cell*. 141(1):39-51. doi: 10.1016/j.cell.2010.03.014.

- Rahman, M. M., M. S. Rahaman, M. R. Islam, F. Rahman, F. M. Mithi, T. Alqahtani, M. A. Almikhlaifi, S. Q. Alghamdi, A. S. Alruwaili, M. S. Hossain, M. Ahmed, R. Das, T. Emran y M. S. Uddin. 2022. Role of phenolic compounds in human disease: Current knowledge and future prospects. *Molecules*, 27(1): 1–36. doi: 10.3390/27010233
- Raho, B. y B. Mohamed. 2021. Phenolic compounds: structures and activities. *Journal of medical cornvus*, 2(5): 6–24.
- Rajkumar, V., G. Guha y R. Ashok. 2010. Therapeutic potential of *Acalypha fruticosa*. *Food and Chemical Toxicology*, 48(6): 1709–1713. doi: 10.1016/2010.03.050
- Rascón, L., M. Jiménez, C. Velázquez, A. Garibay, W. Vilegas, L. A. Campaner y R. E. Robles. 2015. Chemical composition and antiproliferative activity of *Acalypha californica*. *Industrial Crops and Products*, 69: 48–54. doi: 10.1016/2015.02.004
- Ravi, S., B. Shanmugam, G. V. Subbaiah, S. H. Prasad y K. S. Reddy. 2017. Identification of food preservative, stress relief compounds by GC–MS and HR-LC/Q-TOF/MS; evaluation of antioxidant activity of *Acalypha indica* leaves methanolic extract (*in vitro*) and polyphenolic fraction (*in vivo*). *Journal of Food Science and Technology*, 54(6): 1585–1596. doi: 10.1007/s13197-017-2590-z
- Refilda, I., F. Hanifa, D. Yefrida y I. Batubara. 2021. Evaluation and determination of total antioxidant in anting-anting (*Acalypha Indica* L.) leaf extract. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 757(1): 1–7. doi: 10.1088/1755-1315/757/1/012061
- Reuter, S., S. C. Gupta, M. M. Chaturvedi y B. B. Aggarwal. 2010. Oxidative stress, inflammation, and cancer: ¿How are they linked? *Free Radical Biology and Medicine*, 49(11): 1603–1616. doi: 10.1016/2010.09.006
- Ribeiro, D., M. Freitas, S. M. Tomé, A. M. S. Silva, S. Laufer, J. L. F. C. Lima y E. Fernández. 2015. Flavonoids inhibit COX-1 and COX-2 enzymes and cytokine/chemokine production in human whole blood. *Inflammation*, 38(2): 858–870. doi: 10.1007/s10753-014-9995-x
- Roba, K. 2021. The Role of Terpene (Secondary Metabolite). *Natural Products Chemistry y Research*, 9(8): 1–11.
- Rodríguez, M. M., M. I. Latsague, M. A. Chacón y P. K. Astorga. 2014. Inducción *in vitro* de callogénesis y organogénesis indirecta a partir de explantes de cotiledón, hipocótilo y hoja en *Ugni molinae*. *Bosque* 35(1): 111–118. doi: 10.4067/S0717-92002014000100011
- Rundhaug, J. E. y S. M. Fischer. 2010. Molecular mechanisms of mouse skin tumor promotion. In *Cancers* 2(2): 436–482. doi: 10.3390/cancers2020436
- Rundhaug, J. E. y S. M. Fischer. 2010. Molecular mechanisms of mouse skin tumor promotion. En *Cancers* 2(2): 436–482. doi: 10.3390/cancers2020436
- Sagharyan, M., A. Ganjeali, M. Cheniany y S. M. M. Kouhi. 2020. Optimization of callus induction with enhancing production of phenolic compounds production and antioxidants activity in callus cultures of *nepeta binaloudensis* jamzad (Lamiaceae). *Iranian Journal of Biotechnology* 18(4): 47–55. doi: 10.30498/IJB.2020.2621

- Salim, M., A. Saeed, M. Iqbal, B. A. Khan, N. Khan, I. Rabbani, F. Alsenani y A. Rasul. 2022. Phytochemical screening and evaluation of antioxidant, total phenolic and flavonoid contents in various weed plants associated with wheat crops. *Brazilian Journal of Biology*, 82: 1–8. doi: 10.1590/1519-6984.256486
- Sánchez, J. C., J. Benavides, J. B. Heredia, L. Cisneros y D. A. Jacobo. 2013. The Folin-Ciocalteu assay revisited: Improvement of its specificity for total phenolic content determination. *Analytical Methods*, 5(21): 5990–5999. doi: 10.1039/c3ay41125g
- Sanseera, D., W. Niwatananun, B. Liawruangrath, S. Liawruangrath, A. Baramée, K. Trisuwan y S. G. Pyne. 2012. Antioxidant and anticancer activities from aerial parts of *Acalypha indica* Linn. *CMU. Journal of Natural Science* 11(2): 157.
- Santamaría, J. M., J. Piloni, A. Quintero, A. Bernardino y N. Güemes. 2018. Compuestos fenólicos y actividad antioxidante antes y después del proceso de extrusión. resumen. *Investigación y Desarrollo En Ciencia y Tecnología de Alimentos* 3: 406–410.
- Sarcinelli, C., Dragic, H., Piecyk, M., Barbet, V., Duret, C., Barthelaix, A., Ferraro-Peyret, C., Fauvre, J., Renno, T., Chaveroux, C., y Manié, S. N. 2020. ATF4-dependent NRF2 transcriptional regulation promotes antioxidant protection during endoplasmic reticulum stress. *Cancers*, 12(3): 1–13. doi: 10.3390/12030569
- Sausville, E. A. y L. D. L. 2015. *Harrison Principios de Medicina Interna 19a Edición Vol 1. Principios del tratamiento del cáncer.*
- Schmölz, L., M. Wallert y S. Lorkowski. 2017. Optimized incubation regime for nitric oxide measurements in murine macrophages using the Griess assay. *Journal of Immunological Methods*, 449: 68–70. doi: 10.1016/j.jim.2017.06.012
- Schott, J., B. Fuchs, C. Böttcher y M. Hilker. 2022. Responses to larval herbivory in the phenylpropanoid pathway of *Ulmus minor* are boosted by prior insect egg deposition. *Planta* 255(16): 1–16. doi: 10.1007/s00425-021-03803-0
- Secretaría de Salud Pública del Estado de Sonora. 2021, February 3. Llama Salud Sonora a detectar a tiempo el cáncer. <https://salud.sonora.gob.mx/acciones/boletines-informativos/llama-salud-sonora-a-detectar-a-tiempo-el-cancer.html>
- Seebaluck, N. V., P. R. Munhurrun, P. Naidoo y P. Rughoonauth. 2015. An analysis of the push and pull motives for choosing Mauritius as “the” wedding destination. *Procedia - Social and Behavioral Sciences* 175: 201–209. doi: 10.1016/2015.01.1192
- Seebaluck, R., A. Gurib y F. Mahomoodally. 2015. Medicinal plants from the genus *Acalypha* (Euphorbiaceae)-A review of their ethnopharmacology and phytochemistry. *Journal of Ethnopharmacology* 159: 137–157. doi: 10.1016/j.jep.2014.10.040
- Setyorini, D. y S. S. Antarlina. 2022. Secondary metabolites in sorghum and its characteristics. In *Food Science and Technology (Brazil) (Vol. 42)*. Sociedade Brasileira de Ciencia e Tecnologia de Alimentos, SBCTA. doi: 10.1590/fst.49822
- Setyorini, D. y S. S. Antarlina. 2022. Secondary metabolites in sorghum and its characteristics. *Food Science and Technology*. 42:1-12. doi:10.1590/fst.49822

- Sharifi, J., A. Ozleyen, T. B. Tumer, C. O. Adetunji, N. Omari, A. Balahbib, Y. Taheri, A. Bouyahya, M. Martorell, N. Martins y W. C. Cho. 2019. Natural products and synthetic analogs as a source of antitumor drugs. En *Biomolecules* 9(11): doi: 10.3390/9110679
- Sharifi, M., N. V. Anil, P. Zucca, E. M. Varoni, L. Dini, E. Panzarini, J. Rajkovic, P. V. Tsouh, E. Azzini, I. Peluso, A. Prakash, M. Nigam, Y. el Rayess, M. Beyrouthy, L. Polito, M. Iriti, N. Martins, M. Martorell, A. O. Docea, J. Sharifi. 2020. Lifestyle, oxidative stress, and antioxidants: Back and forth in the pathophysiology of chronic diseases. En *Frontiers in Physiology* 11: doi: 10.3389/2020.00694
- Shraim, A. M., T. A. Ahmed, M. M. Rahman y Y. M. Hijji. 2021. Determination of total flavonoid content by aluminum chloride assay: A critical evaluation. *LWT*, 150. doi: 10.1016/j.lwt.2021.111932
- Sibylle, M., J. Svacinová, M. Kitner, J. Kopecky, R. Eytner, A. Lackner, T. Phuong N. Vo, R. Frisch, M. Grusch, R. Martin, K. Dolezal, M. Strnad y G. Krupitza. 2009. *In vitro* anti-inflammatory and anticancer activities of extracts of *Acalypha alopecuroidea* (Euphorbiaceae). *International Journal of Oncology*, 35(4): 881–891. doi: 10.3892/00000403
- Siegel, R. L., K. D. Miller, H. E. Fuchs y A. Jemal. 2022. Cancer statistics, 2022. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 72(1): 7–33. doi: 10.3322/21708
- Singh, R. y P. P. Manna. 2022. Reactive oxygen species in cancer progression and its role in therapeutics. *Exploration of Medicine*, 3(Reactive Oxygen Species (ROS) in pathophysiological conditions 43–57. doi: 10.37349/emed.2022.00073
- Siraj, M. A., J. A. Shilpi, M. G. Hossain, S. J. Uddin, M. K. Islam, I. A. Jahan y H. Hossain. 2016. Anti-inflammatory and antioxidant activity of *Acalypha hispida* leaf and analysis of its major bioactive polyphenols by HPLC. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 6(2): 275–283. doi: 10.15171/2016.039
- Sohrab, S. S., R. Raj, A. Nagar, S. Hawthorne, A. C. Paiva, M. A. Kamal, M. M. El-Daly, E. I. Azhar y A. Sharma. 2023. Chronic Inflammation's Transformation to Cancer: A Nanotherapeutic Paradigm. *Molecules* 28(11): 1–19. doi: 10.3390/28114413
- Soruba, E., S. Vickram, M. Ramesh, K. Karikalan y B. Sridharan. 2015. Antioxidant, Antibacterial and Anti-Inflammatory Activity of *Acalypha indica* and *Terminalia chebula*: An *In vitro* Analysis. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, 6(3): 180–188.
- Stein, M. E. y K. A. Eckert. 2021. Impact of g-quadruplexes and chronic inflammation on genome instability: Additive effects during carcinogenesis. *Genes*, 12(11): 1–18. doi: 10.3390/12111779
- Subedi, L., S. Timalsena, P. Duwadi, R. Thapa, A. Paudel y K. Parajuli. 2014. Antioxidant activity and phenol and flavonoid contents of eight medicinal plants from Western Nepal. *Journal of Traditional Chinese Medicine*, 34(5): 584–590.
- Sung, H., J. Ferlay, R. L. Siegel, M. Laversanne, I. Soerjomataram, A. Jemal y F. Bray. 2021. *Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality*

- Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. CA: A Cancer Journal for Clinicians, 71(3): 209–249. doi: 10.3322/21660
- Teng, Y., L. Xu, W. Li, P. Liu, L. Tian y M. Liu. 2023. Targeting reactive oxygen species and fat acid oxidation for the modulation of tumor-associated macrophages: a narrative review. *Frontiers in Immunology* 14: 1–11. doi: 10.3389/1224443
- Theodoridis, S., E. G. Drakou, T. Hickler, M. Thines y D. Nogues. 2023. Evaluating natural medicinal resources and their exposure to global change. *The Lancet Planetary Health*, 7(2): 155–163. doi: 10.1016/S2542-5196(22)00317-5
- Thomas, D. C. 2017. The phagocyte respiratory burst: Historical perspectives and recent advances. *Immunology Letters*, 192: 88–96. doi: 10.1016/j.ccell.2019.04.001
- Thummadi, N. B., T. Mallikarjuna, V. Vindal y P. Manimaran. 2022. Prioritizing the candidate genes related to cervical cancer using the moment of inertia tensor. *Proteins: Structure, Function and Bioinformatics*, 90(2): 363–371. doi: 10.1002/prot.26226
- Twaij, B. M. y M. N. Hasan. 2022. Bioactive secondary metabolites from plant sources: types, synthesis, and their therapeutic Uses. *International Journal of Plant Biology* 13(1): 4–14. doi: 10.3390/13010003
- Twilley, D. y N. Lall. 2018. The role of natural products from plants in the development of anticancer agents. In *natural products and drug discovery: an Integrated Approach* 139–178. doi: 10.1016/B978-0-08-102081-4.00007-1
- Vázquez, A., I. Ovando, L. Adriano, D. Betancur y M. Salvador. 2016. Alcaloides y polifenoles del cacao, mecanismos que regulan su biosíntesis y sus implicaciones en el sabor y aroma. *Archivos latinoamericanos de nutrición*, 66(3): 239–254.
- Vega, Y. C., C. Hayano, N. Gámez y L. A. Medina. 2021. Determination of chemical constituents and antioxidant activities of leaves and stems from *jatropha cinerea* (Ortega) müll. arg and *jatropha cordata* (ortega) müll. arg. *Plants*, 10(2): 1–13. doi: 10.3390/10020212
- Veltman, C. H. J., J. L. A. Pennings, B. van de Water y M. Luijten. 2023. An adverse outcome pathway network for chemically induced oxidative stress leading to (Non)genotoxic carcinogenesis. *Chemical Research in Toxicology* 36: 805–817. doi: 10.1021/2c00396
- Vivarelli, M. y A. Risaliti. 2011. Liver transplantation for hepatocellular carcinoma on cirrhosis: Strategies to avoid tumor recurrence. *World Journal of Gastroenterology*, 17(43): 4741–4746. doi: 10.3748/17.i43.4741
- Wan, Y., E. L. Sorensen y G. H. Liang. 1988. Genetic control of *in vitro* regeneration in alfalfa (*Medicago sativa* L). *Euphytica*, 39: 3–9. doi: 10.1007/BF00025103
- Weitzel, J. N., K. R. Blazer, D. J. MacDonald, J. O. Culver y K. Offit. 2011. Genetics, genomics, and cancer risk assessment. CA: A Cancer Journal for Clinicians, 61(5): 327–359. doi: 10.3322/20128
- Wurdack, K. J. y C. C. Davis. 2009. Malpighiales phylogenetics: Gaining ground on one of the most recalcitrant clades in the angiosperm tree of life. *American Journal of Botany*, 96(8): 1551–1570. doi: 10.3732/0800207

- Yeshi, K., G. Turpin, T. Jamtsho y P. Wangchuk. 2022. Indigenous uses, phytochemical analysis, and anti-Inflammatory properties of australian tropical medicinal plants. *molecules*, 27(12): 1–50. doi: 10.3390/27123849
- Yu, K., Y. Song, J. Lin y R. A. Dixon. 2022. The complexities of proanthocyanidin biosynthesis and its regulation in plants. *Plant Communications*, 4(100498): 1–16. doi: 10.1016/2022.100498
- Yuniarti, R., S. Nadia, A. Alamanda, M. Zubir, R. A. Syahputra y M. Nizam. 2020. Characterization, phytochemical screenings and antioxidant activity test of kratom leaf ethanol extract (*Mitragyna speciosa* Korth) Using DPPH Method. *Journal of Physics: Conference Series* 1462(1): 1–8. doi: 10.1088/1742-6596/1462/1/012026
- Zhang, Y., P. Cai, G. Cheng y Y. Zhang. 2022. A brief rdeview of phenolic compounds identified from plants: Their extraction, analysis, and biological activity. *Natural product communications*, 17(1): 1–14. doi: 10.1177/1934578X211069721
- Zhao, H., L. Wu, G. Yan, Y. Chen, M. Zhou, Y. Wu y Y. Li. 2021. Inflammation and tumor progression: signaling pathways and targeted intervention. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 6(263): 1–46. doi: 10.1038/s41392-021-00658-5
- Zhou, S., Y. Ma, Y. Shang, X. Qi, S. Huang y J. Li. 2022. Functional diversity and metabolic engineering of plant specialized metabolites. *Life Metabolism*, 1(2): 109–121. doi: 10.1093/loac019