UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

Evaluación de la actividad citotóxica de extractos de *Prosopis juliflora* y *Acacia farnesiana* en una línea celular de cáncer cérvico uterino (HeLa)

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

LICENCIADO EN BIOTECNOLOGÍA

P R E S E N T A:

ANTONIO CUENCA MEJÍA

DIRECTORA
DRA. LETICIA BUENDÍA GONZÁLEZ
CO – DIRECTORA
DRA. CARLA GARCÍA MORALES

JUNIO 2021

Tabla de contenido

Índice de tablas 3
Índice de figuras 3
Resumen 5
Introducción 6
Cáncer 6
El cáncer en el mundo 10
Cáncer en México 11
Tratamientos actuales y problemas 13
Biotecnología en la generación de nuevos fármacos 13
Metabolitos secundarios 14
Antecedentes 19
Plantas con propiedades anticancerígenas en México 19
Género *Prosopis* 20
Genero *Acacia* 20
Acacia farnesiana 21
Objetivos 22
Hipótesis 22
Materiales y métodos 23
Elaboración de extractos 23
Prueba cualitativa de Dragendorff 26
Cuantificación de alcaloides totales 26
Mantenimiento y proliferación de la línea celular HeLa 28
Bioensayo de citotoxicidad de los extractos vegetales en la línea celular HeLa a través del ensayo de viabilidad celular MTT 29
Análisis estadístico 31
Resultados y discusión 32
Presencia de alcaloides en los extractos de *P. juliflora* y *A. farnesiana* por la prueba cualitativa de Dragendorff 32
Bioensayo de citotoxicidad de los extractos de *P. juliflora* y *A. farnesiana* en la línea celular HeLa 37
Conclusiones **42**
Bibliografía 43

Índice de tablas

Tabla 1. Determinación cualitativa de la presencia de alcaloides por la prueba de Dragendorff en extractos de *Prosopis juliflora* y *Acacia farnesiana,* evaluando diferentes tipos de secado, extracción y tejidos. 32

Tabla 2. Análisis para la optimización de la respuesta para el modelo experimental. 36

Tabla 3. Rendimiento de los extractos seleccionados para P. juliflora y A. farnesiana..... 36

Índice de figuras

Figura 1. Procesos biológicos alterados en las células de cáncer. Tomado de Hanahan & Weinberg, (2011)..... 6

Figura 2. Metodología general del trabajo 23

Figura 3. Esquema general de la metodología de extracción de acuerdo con Statz & Coon (1967) 24

Figura 4. Esquema de la metodología de extracción de Keller (1983) “acid shakeout” …….25

Figura 5. Esquema de la metodología de cuantificación de alcaloides Fazel et al., (2010) …….28

Figura 6. Diagrama de carga de la multiplaca de 96 pozos 30

Figura 7. Pruebas de Dragendorff de detección de alcaloides en extractos de A. farnesiana y P. juliflora (a y b): a: tubo control color amarillo, extracto de hoja P. juliflora (+++) y tallo (-); b: extractos de hoja de A. farnesiana (++) 33

Figura 8. Contenido de alcaloides totales en extractos de *A. farnesiana* y *P. juliflora* (1 y 2), empleando diferentes procesos de secado, distintos métodos de extracción, dos solventes y un tejido (hoja). Los datos representan el promedio de tres repeticiones ± DS. …… 34

Figura 9. Contribuciones principales de los diferentes factores evaluados en el contenido de alcaloides totales (R^2 ajustada por grados de libertad = 97.7835 %) ……..……35

Figura 10. Viabilidad de los cultivos de la línea celular HeLa expuestos a diferentes concentraciones de los extractos de *P. juliflora* y *A. farnesiana*, durante 24, 48 y 72 horas: ctrl: control negativo, ctrlslv : control de solvente, ctrl + : paclitaxel…… 38

Figura 11. Representación gráfica del fenómeno de hormesis como una respuesta dosis-tiempo dependiente. Tomado de Calabrese et al., (2007) 39

Figura 12. Curva de viabilidad de la línea celular HeLa expuesta a los extractos P. juliflora y A. farnesiana a las 72 h de cultivo..... 40

Figura 13. Micrografías (10x) de cultivos celulares expuestos extractos de *A. farnesiana a las 72h*: (a): control - , (b): tratamiento 300 µg/mL, (c): control + ... 40

Resumen

De acuerdo con la última estimación, en el año 2018, la Organización Mundial de la Salud reportó al cáncer como la segunda causa de muerte a nivel mundial, con 9.9 millones de personas fallecidas. Los fármacos actuales para el tratamiento del cáncer han demostrado ser efectivos; sin embargo, tienen un costo elevado y ocasionan diversos efectos secundarios. Los efectos pueden ser menores como vómito, alopecia, diarrea, constipación, hasta mayores como mielo-supresión, toxicidad neurológica, cardiaca, pulmonar y/o renal. Es por esto, la necesidad de descubrir nuevos medicamentos/tratamientos que puedan ser más potentes, selectivos y menos tóxicos que los empleados hoy en día. Los productos naturales cuentan con una amplia variedad de bioactividades, entre ellas la anticancerígena. En este sentido, *Acacia farnesiana y Prosopis juliflora* son dos especies vegetales usadas comúnmente de manera tradicional, como tratamiento a sintomatologías parecidas al cáncer, y pertenecen a una de las familias que ha presentado los mayores reportes de actividades citotóxicas en al menos una línea celular, lo cual las convierte en buenas candidatas como fuente de compuestos anti proliferativos. En este trabajo se presenta la evaluación de extractos alcaloideos obtenidos de estas dos especies, sobre la línea celular HeLa (cáncer cérvico uterino), a través de la prueba con 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5 difenil tetrazolio bromuro (MTT). Los extractos de *P. juliflora* y *A. farnesiana* presentaron una dosis inhibitoria media (IC_{50}) de 52.83 y 28.83 µg/mL, respectivamente, lo que demuestra que el extracto de *A. farnesiana* es citotóxicamente activo para pruebas *in vitro,* de acuerdo con la clasificación del National Cancer Institute (NCI).

Introducción

Cáncer

En términos generales, una neoplasia se define como una masa anormal de tejido con un crecimiento excesivo y descoordinado, en relación con el tejido sano, que persiste de forma exagerada cuando cesan los estímulos que inducen crecimiento. También, es definida como una alteración del crecimiento celular desencadenada por una serie de mutaciones adquiridas que afectan a una sola célula y a su progenie clónica (Kumar et al., 2015). La carcinogénesis comienza con daño genético no letal, el cual crea una célula transformada, a esta modificación se le denomina mutación iniciadora, el objetivo de estas mutaciones es la modificación de protooncogenes, los cuales resultan en una pérdida o ganancia de función de dichos genes, con productos aberrantes los cuáles son críticos en los procesos celulares de inhibición o proliferación de crecimiento. Una vez que se ha adquirido esta inestabilidad genética, las posteriores células hijas mantendrán estas características que les confieren ventajas sobre las células normales, teniendo una evolución parecida a la planteada por Darwin (Kumar et al., 2015). De esta manera, se puede entender que la adquisición y evolución de la carcinogénesis no es el resultado de una única mutación, por lo que su estudio implica un gran reto si se toman en cuenta los 34,000 genes que componen el genoma humano; sin embargo, se tiene muy bien identificado el fenotipo adquirido por estas células al cual se le conoce como los rasgos característicos del cáncer **(Fig. 1)** (Hanahan & Weinberg, 2011)**.**



Figura 1. Procesos biológicos alterados en las células cancerígenas. Tomado de Hanahan & Weinberg, (2011).

Mantenimiento de la señalización de proliferación celular

En una célula normal, el crecimiento es un proceso controlado por vías de señalización celular. Para su activación son necesarios factores de crecimiento y que estos se unan a un receptor especifico, que a su vez activará proteínas traductoras de esta señal, para iniciar la transcripción de ADN. De esta manera, induciendo a la célula a entrar al ciclo de división celular, paralelamente se producen cambios en la expresión de otros genes que respaldan la supervivencia y modifican rutas metabólicas necesarias para su crecimiento óptimo (Hanahan & Weinberg, 2011). De esta manera, para poder proliferar se necesitan promotores de crecimiento, que actúan en una célula vecina mediante acción paracrina, muchas células cancerígenas son capaces de sintetizar estos mismos promotores de crecimiento y al mismo tiempo los receptores de estos, creándose un bucle autocrino, y como consecuencia no necesitan señalizaciones externas. Un ejemplo de esa autosuficiencia es el receptor de tirosina cinasa el cual deja de depender de un ligando para su activación y queda activo de manera constitutiva, como resultado de la acumulación de mutaciones (Ian, 2013). En una célula tumoral, las principales vías de señalización que regulan el comportamiento celular son la vía de la tirosina cinasa, la vía de receptor acoplado a proteína G, vía JAK/STAT, vía WNT, vía Notch, vía Hedgehog, vía TGF-B/SMAD y la NF-KB, las anomalías en todas estas vías son las responsables de la génesis y progresión de diversos tipos de cánceres (Kumar et al., 2015).

Insensibilidad a los mecanismos de inhibición del crecimiento

Además de la capacidad de autonomía en la producción de señales de crecimiento celular, una célula cancerígena debe ser capaz de modificar el programa de regulación que media estas señales. Este mecanismo de regulación está compuesto por genes supresores de tumores. Existen varios genes de este tipo, de los más importantes y estudiados son los genes de la proteína de retinoblastoma (pRB) y el gen p53. Ambas proteínas se encargan de regular puntos de control del ciclo celular como respuesta a estímulos extracelulares e intracelulares; mientras que Rb regula el tránsito de la célula de la fase G1 a S, p53 se encarga de examinar la integridad del ADN y restringir el tránsito tanto de G1 a S como de G2 a M cuando el ADN está dañado (Hanahan & Weinberg, 2011).

La pérdida de función de pRB puede ocurrir de dos maneras: mediante la pérdida de la función de los dos alelos de pRB y por desplazamiento de estado hipo fosforilado (activo) a un estado hiperfosforilado (inactivo), permitiendo la transición constante de G1 a S. En el caso del gen p53, se puede deber a una pérdida de su función o bien por la inactivación de oncoproteínas víricas, como en el caso del VPH que se inactiva por medio de la proteína E6 de este virus. De esta manera, al procesar la mayoría de las señales de inhibición a través de estos dos genes supresores de tumores, cuando se pierde la funcionalidad en estos puntos clave de regulación se permite la entrada a un ciclo de replicación continuo sin puntos de control, como los habría en una célula normal (Kumar et al., 2015).

Alteración metabólica en las células cancerosas

Las células tumorales obedecen un metabolismo aeróbico que se denomina efecto Warburg que facilita la síntesis de macromoléculas y organelos necesarios para una tasa de replicación rápida (Kumar et al., 2015). En las células normales, la principal fuente de energía es la glucosa, la cual se internaliza hacia el citosol por medio de las proteínas GLUT (transportador de glucosa) y SGLT (transportador de glucosa dependiente de sodio), es ahí donde a través de la glucólisis es degradada generando energía en forma de dos moléculas de adenosín trifosfato (ATP). En condiciones de oxigenación suficiente (condición aeróbica), las células transforman el piruvato en diferentes intermediarios metabólicos a través del ciclo de Krebs en la mitocondria obteniendo 36 ATP mediante fosforilación oxidativa. En cambio, en condiciones anaeróbicas donde la disposición de oxígeno es pobre, el piruvato es transformado en lactato sin que exista generación de ATP (Vander Heiden et al., 2009). La mayoría de las células cancerígenas dirigen su metabolismo hacia la vía anaerobia aún en condiciones de oxigenación normal, produciendo ácido láctico y obteniendo solo la energía (ATP) proveniente de la glucólisis, a esto se le conoce como el efecto Warburg o glucólisis aerobia (Vander Heiden et al., 2009). Si bien este mecanismo parecería poco eficiente respecto a la cantidad de energía que una célula con alta tasa de crecimiento y proliferación necesita, este requerimiento parecer ser compensado en las células tumorales a través de la sobreexpresión del transportador GLUT1 y varias enzimas de la vía glucolítica (hexocinasa, fosfofructocinasa, etc.) (Kumar et al., 2015), lo cual incrementa sustancialmente el aporte demandado de glucosa y por lo tanto la producción de ATP, incluso más que el obtenido por fosforilación oxidativa. Se sabe que el proceso glucolítico aporta intermediarios metabólicos que nutren varias vías anabólicas, entre ellas la síntesis de aminoácidos, nucleótidos y lípidos, los cuales son recursos necesarios para la generación de nuevas células (Hanahan & Weinberg, 2011). Además, algunos estudios demuestran que la glucólisis aerobia está presente en tejidos embrionarios de proliferación rápida (Vander Heiden et al., 2009).

Evasión de la muerte celular programada (apoptosis)

El mecanismo del proceso de apoptosis puede ser dividido en dos componentes, sensores y efectores. Los sensores evalúan el entorno extracelular e intracelular buscando condiciones de normalidad o anormalidad que puedan influenciar en la supervivencia celular. Estas señales de normalidad son las que regulan a la segunda clase, que funcionan como los efectores de la muerte celular. Dentro de los centinelas se incluyen receptores de membrana que se unen a factores de supervivencia o muerte, como los IGF -1R o IL-3R que se unen con moléculas de supervivencia celular. En cambio, las señales de muerte celular son mediadas por FAS y TNFα. A nivel intracelular los centinelas activan las vías de señalización cuando detectan anormalidades en el ADN o una disrupción del balance de señales debido a la acción de un oncogén, insuficiencia de señales de supervivencia o hipoxia (Kumar et al., 2015). La mayoría de estas señales apoptóticas convergen en la

mitocondria, que responde liberando el citocromo C, esta liberación es gobernada por miembros de la familia BCl-2 y por p53 que activa la expresión de BAX, que a su vez también induce la liberación del citocromo C. La última línea de acción incluye a dos caspasas 9 y 8 que son activadas por este citocromo C y por FAS, estas a su vez activan más proteasas que terminan por ejecutar el programa de muerte celular (Kumar et al., 2015). Una de las maneras más comunes por las que las células cancerosas evitan esta muerte celular, es mediante la perdida de función de p53, siendo esta vía afectada en al menos el 50% de cánceres (Hanahan & Weinberg, 2011).

Potencial de replicación ilimitado

Las tres características anteriormente mencionadas, autonomía de señales de crecimiento, insensibilidad a las señales de paro de crecimiento y la resistencia a apoptosis, llevan a una incapacidad de las células para evaluar su medio ambiente; sin embargo, esto no es suficiente. Debido a que las células tienen ciclos finitos de replicación, una vez que este potencial replicativo es alcanzado se entra en una etapa de senescencia, esta puede ser superada debido a la falta de acción de la pRB y p53 (Hanahan & Weinberg, 2011). Una vez superado este proceso y si continúa la replicación se entra en una segunda etapa llamada crisis, distinguida por una muerte celular masiva, desarreglos cariotípicos, uniones end-end de cromosomas y la aparición de una variante inmortal (1 en 10^7). El mecanismo por el cual se lleva a cabo este conteo de ciclos de replicación, son los telómeros que se degradan por cada ciclo, por lo que esta variable inmortal parece adquirir la capacidad de síntesis de telomerasa, que regenera estos telómeros permitiendo de esta manera ciclos celulares infinitos (Kumar et al., 2015).

Angiogénesis

Todas las células normales y tumorales necesitan de nutrientes, oxigenación y eliminación de desechos. Un tumor, aunque haya adquirido todas las modificaciones genéticas anteriormente mencionadas no tienen la capacidad de inducción de angiogénesis, este proceso esta mediado por equilibrio de señales entre promotores e inhibidores, por lo que estos tumores pueden estar latentes por años hasta que la conmutación angiogénica los saca de este estado (Kumar et al., 2015). La manera de regulación local entre factores promotores e inhibidores de la angiogénesis en células tumorales puede ser activada por la falta de oxígeno, esta hipoxia puede estabilizar un sitio de transcripción sensible al oxígeno, que activa a las citocinas VEGF, estas crean un gradiente de factores angiógenicos estimulando el crecimiento de células endoteliales, así como el crecimiento de vasos sanguíneos hacia el tumor (Hanahan & Weinberg, 2011). P53 estimula la expresión de moléculas que impiden la angiogénesis, es entonces que la pérdida o mutación de este protooncogén no solo elimina los puntos de regulación de ciclo celular, alteraciones en el metabolismo, sino que su ausencia proporciona un entorno más permisivo a angiogénesis (Kumar et al., 2015).

Metástasis

Además del potencial ilimitado de replicación, las células cancerígenas también disminuyen la expresión de las proteínas de anclaje, ocasionando la pérdida de las uniones célula-célula y del anclaje a la matriz extracelular, facilitando el desprendimiento y la migración celular hacia otros tejidos —a través del sistema linfático y el torrente sanguíneo— donde pueden establecerse, proliferar y generar nuevos tumores. La disminución en la expresión o en la función de la E-cadherina (proteína de unión adherente intercelular) potencia los procesos metastásicos. Por el contrario, la N-cadherina, la cual es expresada por neuronas migratorias y células mesenquimales en el proceso de organogénesis, se encuentra sobre expresada en carcinomas altamente invasivos (Hanahan & Weinberg, 2011).

El cáncer en el mundo

A nivel mundial, una de cada 7 muertes es debido al cáncer, causando así más muertes que el VIH, tuberculosis y malaria combinadas. El cáncer es el resultado de la interacción de varios factores, los cuales se categorizan en tres grupos: factores genéticos, factores físicos, y factores de riesgo. En el año 2020, la organización mundial de la salud reportó a esta enfermedad como la segunda causa de muerte a nivel mundial, alcanzando los 9.9 millones de personas fallecidas. Asimismo, se muestra que el 70% de las muertes están localizadas en países en vías de desarrollo, mientras que un tercio del total de muertes están asociadas a 5 factores de riesgo correlacionados a hábitos alimenticios como: alto índice de masa corporal, bajo consumo de frutas y verduras, sedentarismo, tabaquismo y alcoholismo. Dentro de estos factores de riesgo, el tabaquismo es el más importante pues es responsable de aproximadamente el 22% de las muertes por cáncer (Torre et al., 2015). Por su parte, el cáncer causado por infección como hepatitis y virus del papiloma humano (VPH) es responsable de poco más del 25% de los casos en países en vías de desarrollo. En estos países, es muy común que el diagnóstico y los tratamientos sean inaccesibles. Se reportó en 2017 que solo el 26% de los países en vías de desarrollo contaban con servicios de patología disponibles en el sector público, en contraste con los países de primer mundo donde cerca del 90% de ellos ofrece tratamientos. Lo anterior tiene gran impacto, pues solo 1 de cada 5 de países en vías de desarrollo y subdesarrollados, cuentan con las herramientas para implementar políticas necesarias para el manejo de la enfermedad (Torre et al., 2015).

De acuerdo con un estimado de la Agencia Internacional de Investigación en Cáncer (IARC, por sus siglas en inglés), existen 19.3 millones de nuevos casos de esta enfermedad a nivel mundial, de los cuales 8 millones se presentaron en países en vía de desarrollo, que a su vez concentran el 82% de la población mundial. Se espera que para el año 2030 los nuevos casos aumenten hasta los 21.7 millones y que la cantidad de muertes ascienda a unos 13 millones, simplemente debido al crecimiento y envejecimiento de la población. Sin embargo, se espera que el estimado sea considerablemente mayor debido a la adopción de estilos

de vida que son conocidos como factores de riesgo para contraer esta enfermedad. Los cánceres asociados a estos factores (pulmón, mama y colorrectal), ya están presentando un incremento en países en vías de desarrollo (Bray et al., 2018).

En países desarrollados, los tres cánceres más diagnosticados en hombres fueron próstata, pulmón y colorrectal. Para el caso de las mujeres, fueron cáncer de mama, colorrectal y pulmón. Mientras que, en países en vías de desarrollo, en hombres se diagnosticó mayoritariamente cáncer de pulmón, hígado y estómago; en mujeres fueron el cáncer cérvico uterino, pulmón y mama. Tanto para países desarrollados y en vías de desarrollo los tres cánceres más comunes también son los que causan más decesos (IARC, 2016).

De acuerdo con el área geográfica, también se observa una variación en los cánceres más comunes, *ej.* en mujeres el cáncer de mama es el más común en 19 de 21 áreas del mundo, mientras que el cáncer cervicouterino es el más común en las 2 restantes. También, se advierten variaciones al analizar individualmente a los países. Por ejemplo, en Europa, Eslovaquia y Japón los cánceres más comunes entre varones son el cáncer de pulmón, cáncer colorrectal y cáncer de estómago, respectivamente. Entre los factores que contribuyen a esta variación geográfica en la incidencia de cáncer, se encuentran la edad y estructura de las poblaciones, la prevalencia de factores de riesgo, la disponibilidad y uso de pruebas diagnósticas, así como la disponibilidad y calidad de los tratamientos (Kumar et al., 2015). Un ejemplo de lo anterior se observa en los cánceres asociados a infecciones, los cuales tienen una mayor incidencia en países en vías de desarrollo, siendo 3 veces más alto el porcentaje (23%) que en los países desarrollados (7%) (International Agency for Research, 2020).

Cáncer en México

De acuerdo con el INEGI, la tercera causa de muerte en mexicanos se debe a neoplasias, las cuales totalizaron 84,142 casos, sobresaliendo los cánceres de órganos digestivos con 27,403 casos (32.6%), seguidos de los órganos genitourinarios con 19,408 casos (23.1%), y los de huesos, cartílagos articulares, tejido conjuntivo, piel y de mama con 11,138 casos (13.2%). Del total de muertes por tumores malignos, 41,088 casos (48.8%) correspondieron a hombres y 43,053 a mujeres (51.2%). Mientras que por grupos de edad, se observa que el rango más afectado es el de > 65 años (54.6%) (INEGI, 2018).

En México, de 2011 a 2016, cerca del 50% de las muertes observadas en población menor a 18 años, se debieron a cánceres hematopoyéticos para ambos sexos, seguido de cáncer de encéfalo, huesos, cartílagos articulares, tejido linfático y tejidos mesoteliales. De manera general, para este grupo, 2 de cada 100 mil neoplasias son causadas por tumores en órganos hematopoyéticos. Para el grupo de 18-29 años, los cánceres que se presentan son una mezcla entre aquellos asociados a factores de riesgo como vida poco saludable, así como por cambios celulares. Por ejemplo, en adultos menores de 25 años es más común la leucemia y los linfomas, mientras que para el grupo de 26 a 29 años se observan cànceres cervicales, de mama y colon, cuya tendencia se incrementa con la edad (INEGI, 2018). En el grupo de edad de 30 a 59 años, comienzan a hacerse presentes aquellos

tumores relacionados a factores de riesgo asociados a estilos de vida no saludables, por ejemplo, el tabaquismo. De acuerdo a la evidencia médica, este no solo está relacionado al desarrollo de cáncer respiratorio sino también de cáncer de vejiga, riñón, páncreas, estómago, colon, recto y cuello uterino. Por otra parte, dentro de este grupo se observa una tendencia hacia la obesidad y este padecimiento genera cambios hormonales y se relaciona con el cáncer de mama, endometrial, páncreas, riñón, colon y vesícula. Por su parte, el consumo de alcohol se asocia al cáncer oral, de esófago, mama, hígado, colon y recto. Para este grupo de edad, los 5 tumores principales que son causa de defunción son los de órganos digestivos, órganos genitales, mama, órganos hematopoyéticos y órganos respiratorios. En contraste con los grupos anteriores, el cáncer de órganos hematopoyéticos paso de la primera causa a ser la cuarta (INEGI, 2018).

Los cambios fisiológicos, así como una protección inmune disminuida, desajustes hormonales y la interacción de comorbilidad, aumentan el riesgo de padecimiento de cáncer para la población de >60 años. Dentro de este grupo el porcentaje más alto de incidencia se debe a tumores malignos de órganos digestivos, a diferencia del grupo anterior, las mujeres son las que presentan un porcentaje de defunción más alto. De acuerdo con las tasas de mortalidad por cáncer identificadas para este grupo, se muestra que la población femenina es más vulnerable frente a los tumores de órganos digestivos. Para 2016 se reportaban 153 fallecimientos por cada 100 mil personas (INEGI, 2018).

De acuerdo con Reynoso-Noverón & Mohar (2014), en relación con las cifras a nivel mundial, México tiene una tasa de mortalidad menor que muchos países; sin embargo, la migración a estilos de vida menos saludables o con un mayor número de factores de riesgo asociados, hará que esta tendencia aumente.

Como se observa, la edad juega un papel importante frente a la morbilidad y mortalidad por este tipo de enfermedades, aunque no es posible decir que este sea el único factor, pues hasta el momento no hay una única causa directa. De acuerdo con la IARC, se pueden clasificar a los agentes cancerígenos en 3 grupos:

- Agentes físicos: radiaciones ionizantes y ultravioleta.
- Agentes químicos: tabaco, alcohol, asbestos, arsénico, aflatoxinas.
- Agentes biológicos: infecciones causadas por ciertos virus, bacterias y parásitos.

La exposición a estos, en combinación con factores ambientales y genéticos, como costumbres o estilos de vida poco saludables, aumentan la posibilidad de contraer algún tipo de cáncer (IARC, 2016).

Tratamientos actuales y problemas

Los tratamientos convencionales para esta enfermedad incluyen cirugía, radioterapia y quimioterapia. La cirugía primaria es la más usada de las terapias contra el cáncer, una de sus desventajas incluye el daño casi inevitable de órganos y tejidos sanos circundantes al tumor, así mismo, es posible que se activen tumores pequeños que están latentes conocidos como *pet cancer cells* (National Cancer Institute, 2021). El objetivo de la cirugía primaria es poder obtener un control "local óptimo", definido como la eliminación del proceso neoplásico y establecer un medio en el cual la recurrencia local del tumor sea minimizada. Históricamente, esto se ha alcanzado mediante la implementación de procesos quirúrgicos radicales, como la mastectomía propuesta por Halstead en1907 que si bien fue una medida extrema, fue adoptada como un estándar en los tratamientos debido a que se pudo alcanzar un control local, mayor al 90%, independientemente de que la tasa de supervivencia de los pacientes no mejoró (World Health Organisation, 2021). Con el empleo de terapias adyuvantes como la radioterapia, se alcanzó un control local mejor sin tener que recurrir a procedimientos tan radicales, así mismo mejoró la calidad de vida de los pacientes.

La radiación empleada es del tipo ionizante, los iones formados depositan su energía en las células de los tejidos que son irradiados, esta energía es capaz de causar muerte celular o generar daño en el material genético de las células impidiendo su división y proliferación. Aunque la radiación afecta también a las células normales, el objetivo de la radiación es maximizar la dosis en las células anormales y minimizar la exposición en células normales, debido a que éstas posen mecanismos de reparación más eficientes que una célula cancerígena, esto permite hacer diferencia en cuanto al radio de eficiencia de la terapia. Dentro de las ventajas que presenta es la preservación anatómica de los órganos adyacentes y puede destruir células no visibles para el cirujano; sin embargo, no presenta efecto letal contra células metastásicas, y dentro de sus efectos secundarios esta la neurotoxicidad y la mielo supresión (National Cancer Institute, 2021).

Por otro lado, la quimioterapia está basada en la administración sistémica de fármacos antineoplásicos, que pueden viajar en el torrente sanguíneo. En esencia el objetivo es limpiar la mayor cantidad de colonias de células cancerosas de los pacientes, incluyendo células metastásicas; sin embargo, la mayoría de las neoplasias no son curadas con el uso exclusivo de quimioterapia. Asimismo, presenta efectos secundarios como náusea, anemia, mielo supresión, diarrea, alopecia, y por otro lado, es posible que las células cancerígenas desarrollen resistencia a los fármacos quimioterapéuticos (Abbas, 2018)

Biotecnología en la generación de nuevos fármacos

Tradicionalmente, la biotecnología fue definida como la aplicación de diferentes técnicas, donde se emplean organismos vivos o sus derivados para la obtención de un bien o servicio (Kirakosyan & Kaufman, 2007). De las primeras aplicaciones empleadas por la humanidad se distinguen cultivos celulares de diferentes tipos, en la elaboración de cerveza, pan, queso, producción de antibióticos, fármacos y vacunas (Kirakosyan & Kaufman, 2007). Con la llegada de la tecnología del DNA recombinante, se comenzaron a usar nuevas

aproximaciones genómicas, metabolómicas y proteómicas, así como estrategias de sistemas biológicos. Es en este punto, es donde se reexamina la posibilidad de los cultivos de células vegetales como candidatos razonables para la producción de metabolitos de alto valor. Adicionalmente, las células vegetales representan un sistema efectivo de biotransformación, requiriendo la adición de varios sustratos al medio de cultivo para inducir la producción de moléculas no presentes en la planta. Asimismo, una vez que este proceso es comprendido y se identifican las enzimas involucradas, estas se pueden inmovilizar para su aplicación en biorreactores (Kirakosyan & Kaufman, 2007).

Este campo conocido como biotecnología vegetal es multidisciplinario, relacionando desde la química orgánica, hasta la filogenia molecular, además del entendimiento quimio-taxonómico, se centra en la descripción estructural de los compuestos. Es por esto, que podemos dar con una definición desde el entendimiento del metabolismo de las plantas, la síntesis de metabolitos por ciertas enzimas, factores de transcripción, disponibilidad del sustrato y productos finales y la aplicación de este conocimiento a la producción viable de plantas diseñadas para aplicaciones en la agricultura, medicina e industria (Bieto & Talon, 2013). White en 1963 introduce el cultivo de células vegetales, Cocking en el mismo año logra el cultivo de protoplastos, y Murashige & Skoog, (1962) identifican el radio de auxinas y citocininas en el cultivo de tejidos vegetales, siendo estos tres estudios considerados como la raíz de la biotecnología vegetal clásica, de estos emanaron investigaciones de agronomía, horticultura, patología, botánica y farmacéutica. Con el objetivo de resolver problemas asociados a áreas de aplicación de manera general: control del crecimiento y desarrollo de las plantas; protección contra estrés bióticos y abióticos; producción de sustancias de interés farmacéutico, bioquímico y alimentario a gran escala (Kirakosyan & Kaufman, 2007).

Respecto a la producción de sustancias de interés farmacéutico, este tema ha cobrado relevancia en los últimos años, debido a los efectos adversos presentados por los fármacos sintéticos y la ventaja que plantea el hecho de obtener sustancias funcionales de manera natural. En una forma colectiva, las plantas representan un vasto arreglo de compuestos de bajo peso molecular, la mayoría de estos no son esenciales en el metabolismo básico de la planta; sin embargo, juegan un papel importante en la relación de esta con su medio ambiente, estos compuestos también son llamados metabolitos secundarios. De estos compuestos se han identificado al menos 100,000, pero se estima que el total en el reino vegetal sea mucho más alto (Bieto & Talon, 2013).

Metabolitos secundarios

En la naturaleza, las plantas se enfrentan a un número considerable de ataques por parte de bacterias, nemátodos, hongos, arácnidos, insectos y herbívoros. Como se mencionó anteriormente, existe un conjunto de moléculas que ayudan a las plantas a lidiar con estas interacciones, conocidos como compuestos naturales o de manera más correcta metabolitos secundarios, debido a que no tienen una función reconocida o directa en los procesos de fotosíntesis, respiración o transporte de solutos. A diferencia de los metabolitos

primarios que son ubicuos en el reino vegetal, los metabolitos secundarios presentan una distribución restringida a una especie o un grupo de especies (Bieto & Talon, 2013). El estudio de estos compuestos, en sus inicios, fue realizado por químicos orgánicos en el siglo XIX y principios del XX, quienes tenían un interés debido a su potencial como drogas, venenos, saborizantes y materiales industriales. Posteriormente, se descubriría su función ecológica, de protección contra ingestión por herbívoros e interacción con patógenos. También, presentan función como atrayentes de polinizadores, dispersores de semillas y agentes de competencia planta – planta (Taíz & Zeiger, 2006). Un consenso entre los biólogos evolutivos es que estas defensas se adquirieron por mutaciones al azar en las rutas metabólicas básicas, las cuales dieron como resultado productos residuales con una característica tóxica o disuasoria para los depredadores, y como no presentaron toxicidad para la planta misma, así como el coste metabólico era mínimo, presentaron una ventaja evolutiva (Taíz & Zeiger, 2006).

Clasificación de metabolitos secundarios.

De manera básica, los metabolitos secundarios, se clasifican en 3 grupos: **terpenos, fenoles y compuestos nitrogenados.**

Terpenos

Los terpenos son el mayor grupo de metabolitos secundarios, son insolubles en agua y sintetizados a partir de Acetil CoA, deriva de la unión de 5 carbonos o tienen un esqueleto ramificado de isopreno. Su unidad básica es el isopreno, presentan dos rutas de síntesis, la del ácido mevalónico y la ruta del metileritritol fosfato (Bieto & Talon, 2013). Los terpenos son toxinas y repelentes de un gran número de insectos y mamíferos, *ej.* los piretroides presentes en las hojas del crisantemo tienen una actividad insecticida muy alta. En coníferas, los monoterpenos se acumulan en los productos de la resina de las acículas, ramas y tronco, también, presentan mezclas de monoterpenos y sesquiterpenos volátiles llamados aceites esenciales. Estudios recientes han mostrado que especies vegetales como el en maíz, algodón y tabaco silvestre, al recibir un ataque, inician la producción de terpenos volátiles como los limonoides, fitoecdisona y cardenólidos, que atraen enemigos naturales de las plagas (Taíz & Zeiger, 2006).

Compuestos fenólicos

Forman un grupo químicamente heterogéneo de unos 10,000 compuestos, algunos son solubles en solventes orgánicos, otros son ácidos carboxílicos y glucósidos solubles en agua, mientras otros, son polímeros de gran tamaño insolubles en agua. Son sintetizados a partir de la ruta del ácido shikímico y la ruta del ácido malónico, la primera es responsable de la mayoría de los fenoles en plantas. La mayor parte de los compuestos fenólicos derivan de la fenilalanina por eliminación de una molécula de amonio que forma ácido cinámico. Esta reacción es catalizada por la fenilalanina amonio liasa (PAL), esta enzima es un punto de ramificación entre el metabolismo primario y secundario, su actividad se ve incrementada

por factores ambientales como nutrientes bajos, luz e infecciones fúngicas (Evans, 1991). Los compuestos fenólicos al estar extendidos en las plantas vasculares tienen diferentes funciones; como los compuestos fenólicos activados por UV, compuestos alelopáticos, y flavonoides. Los compuestos fenólicos activados por UV se pueden dividir como fenilpropanoides, lactonas fenilpropanoides y derivados del ácido benzoico. Estos compuestos al ser activados adquieren un estado energético más alto que les permite intercalarse en las cadenas de ADN, bloqueando de esta manera la transcripción, respiración y eventualmente causan muerte celular, algunos de los compuestos más conocidos son las cumarinas y furanocumarinas, los cuales actúan como mecanismo de defensa contra la depredación por insectos (Wang, 2014). Además de la capacidad de defenderse de depredadores, las plantas son capaces de liberar compuestos fenólicos al entorno a través de sus hojas y raíces que causan algún efecto al interactuar con sus plantas vecinas, a este efecto se le conoce como alelopatía. Si bien el concepto se ha centrado en la limitación de crecimiento o efecto dañino sobre las plantas de la periferia, en este efecto también es posible incluir efectos benéficos de sinergia (Taíz & Zeiger, 2006).

Otro grupo dentro de los compuestos fenólicos son los flavonoides, de estos se distinguen 4 grupos principales: **antocianinas, flavonas, flavonoles e isoflavonas** (Taíz & Zeiger, 2006).

- **Antocianinas:** además de la relación depredador-presa, existen otras asociaciones importantes en el transporte de polen o semillas, una vez que es ingerido el néctar o pulpa de la fruta por los depredadores. Por tanto, es importante que exista un mecanismo de atracción, el cual es llevado a cabo por pigmentos presentes en las plantas, de éstos existen dos tipos, los carotenoides y los flavonoides. La antocianinas son los responsables del color rojo, rosa, morado y azul, normalmente son glucósidos con su azúcar en el carbono 3 o sin azúcar llamados antocianidinas.
- **Flavonas y flavonoides:** este tipo de flavonoides absorben longitudes de onda más corta por lo cual no son visibles para los humanos, al contrario de las abejas que ven el rango ultravioleta, por lo que éstas son atraídas por flavonas y flavonoles. Estos no están restringidos a las flores, también se pueden presentar en hojas, ya que cumplen una función de pigmento secundario que confiere protección de la radiación UV-B permitiendo que la luz visible pueda penetrar de forma ininterrumpida.
- **Isoflavonoides:** se encuentran normalmente en legumbres, tienen actividades como insecticidas, otras presentan actividad anti-estrogénica debido a su conformación en su sistema de anillos tridimensional que le confiere una estructura análoga a la de los esteroides lo cual permite su unión a receptores de estrógeno, también presentan actividad antimicrobiana y son conocidos como fitoalexinas.

Compuestos nitrogenados

Glucósidos cianogénicos y glucosinatos

Un grupo dentro de los compuestos nitrogenados son los glucósidos cianogénicos y glucosinatos. Este tipo de compuestos por sí mismos no son tóxicos, pero al degradarse se convierten en venenos volátiles como el gas cianuro. Normalmente en una planta intacta los glucósidos y las enzimas degradativas se encuentran separadas en diferentes compartimientos celulares, sin embargo; al ser la planta triturada permite que estos compuestos entren en contacto con la enzima dando como resultado la producción de cianuro (Taíz & Zeiger, 2006).

Alcaloides

Dentro de los compuestos nitrogenados, los más conocidos son los alcaloides, que representan una familia de alrededor de 15,000 metabolitos secundarios y se encuentran en un 20% de las especies de plantas vasculares, en su estructura el átomo de nitrógeno está formando un anillo heterocíclico. Como su nombre lo indica son alcalinos a pH normales del citosol (7.2) o de la vacuola (5-6), el átomo de nitrógeno esta protonado, por lo que son solubles en agua (Pallardy, 2008). Son sintetizados a partir de lisina, tirosina y triptófano, su papel fisiológico es aún incierto pues se creía que eran un desecho de nitrógeno análogo a la urea o ácido úrico en los mamíferos. Actualmente se consideran un mecanismo de defensa contra mamíferos herbívoros debido a su toxicidad y capacidad de disuasión, debido a esto, se han registrado un gran número de muertes de ganado en Estados Unidos, como consecuencia de la ingestión de plantas con un contenido alto de alcaloides. Casi todos los alcaloides son dañinos para los humanos cuando se ingieren en cantidades suficientes; por ejemplo, la estricnina, atropina y cicutina, son alcaloides venenosos clásicos pero útiles en cantidades pequeñas. Asimismo, la morfina, codeína y escopolamina son usados en medicina, o la cocaína, nicotina y cafeína, que carecen de efecto médico, pero son poderosos sedantes o enervantes de uso recreativo. A nivel celular tienen mecanismos de acción en el sistema nervioso alterando el transporte de membrana, síntesis de proteínas y actividades enzimáticas (Cholich et al., 2021). Se ha observado que no todos los alcaloides presentes en las plantas son producidos por ellas, algunas herbáceas hospedan simbiontes fúngicos endógenos que crecen en el apoplasto y sintetizan una gran variedad de alcaloides (Taíz & Zeiger, 2006).

Descubrimiento de nuevos fármacos

A lo largo de la historia de la humanidad, las plantas han sido nuestra primera fuente de tratamiento médico, en el caso de los agentes anticancerígenos también han representado una fuente importante, por lo que durante la década de 1960 se estableció un programa de evaluación de compuestos naturales por parte del National Cancer Institute (NCI), con el objetivo de encontrar nuevas sustancias que pudieran ser agentes quimioterapéuticos, determinando como criterio, considerar un extracto como activo si se obtiene una dosis inhibitoria media $IC_{50} \leq 30\mu g/mL$ y una $IC_{50} \leq 4\mu g/mL$ si se trata de un compuesto aislado, al ser evaluados en una línea celular cancerígena (Boyd, 1997). Derivado de este programa

se han encontrado sustancias como los alcaloides anti leucémicos como la vinblastina y vincristina, los cuales fueron aislados de *Catharanthus roseus* (Buyel, 2017). En años posteriores, debido a este descubrimiento fue posible obtener derivados semisintéticos de los compuestos anteriormente mencionados como la vinorelbina, que presenta una actividad antitumoral uniéndose a la tubulina dando como resultado una inhibición del ensamble de microtúbulos, de tal forma que para el año 1994 fue aprobado en estados unidos como la primera línea de tratamiento para cáncer pulmonar (NSCLC). En estudios posteriores, también mostró actividad contra el cáncer de seno cuando es usado en combinación con Thiotepa, en casos de pacientes con cáncer metastásico, aunque también presenta citotoxicidad ésta es moderada, y presenta una neurotoxicidad menor que otros vinca alcaloides (Malik, 2017).

Otro compuesto muy importante origen vegetal es el paclitaxel, el cual fue descubierto en los años 60 durante un ensayo de screening de gran escala conducido por el National Cancer Institute (NCI) en Estados Unidos. Este compuesto fue identificado como el responsable de la actividad anticancerígena en extractos crudos de corteza del árbol *Taxus brevifolia* (Mans, 2000), tiene el mecanismo de unión a la tubulina, creando ensambles disfuncionales de microtúbulos en la célula, arrestando a la célula en el ciclo celular. En esta fase de arresto, la célula es más sensible a la radiación; sin embargo, existía una limitante para los estudios de la efectividad de este compuesto, debido a que la fuente natural contiene muy poca concentración, se necesitan recolectar cerca de 9,000 kg de corteza para producir un kilogramo de compuesto, en promedio se necesitarían cerca de 3 árboles para tratar a una persona, por lo que actualmente este compuesto es obtenido por síntesis semisintética. El paclitaxel ha mostrado actividad contra el cáncer de ovario en diferentes etapas de la enfermedad, en 1992 fue aprobado como tratamiento recurrente en pacientes metastásicos. También, presenta actividad contra cáncer de mama, carcinomas escamosos, NSCLC y cáncer de pulmón de células pequeñas, de igual forma, mostró actividad moderada en melanoma y linfoma diferente de Hodgkin, cáncer colorrectal, prostático, renal y pancreático. Su principal limitante es su efecto tóxico de mielosupresión, neurotoxicidad, hipertensión y cariotoxicidad (Greenwell & Rahman, 2015).

Dentro del screening hecho por el NCI, también se pudo observar la actividad presentada por compuestos de la especie vegetal *Camptotheca acuminata*, en cultivos celulares expuestos al alcaloide camptothecina, el desarrollo e investigación de este compuesto fue puesto en pausa debido a la toxicidad presentada como mielosupresión, diarrea y cistitis hemorrágica. El interés sobre este compuesto regresó cuando en 1985 se descubrió su mecanismo de acción único, el cual involucra la inhibición de la topoisomerasa I, la cual es uno de los pasos importante en la división celular; algunos de sus análogos, además de presentar este mecanismo de acción pueden presentar inhibición de la síntesis de DNA y RNA, así como inhibición de la formación de microtúbulos (Boyd, 1997). Los estudios realizados con este compuesto, permitieron desarrollar análogos sintéticos como el irinotecan y topotecan, que actualmente son comercializados y se ha demostrado que poseen una menor toxicidad que el compuesto original (Buyel, 2017). Si bien algunos compuestos “clásicos” derivados de plantas han perdido campo contra sus competidores

sintéticos, esto no implica que ya no sea necesario o importante el estudio de compuestos derivados de plantas, pues aún se cuentan con limitantes como la toxicidad de los compuestos empleados, o las bajas concentración en la naturaleza, así como el impacto ambiental que su explotación genera. Lo anterior pone de manifiesto la necesidad de la búsqueda de nuevos compuestos, así como fuentes alternativas de obtención de estos, abriendo un campo de oportunidad para el empleo de la biotecnología (Kirakosyan & Kaufman, 2007).

Antecedentes

Plantas con propiedades anticancerígenas en México

En México existe una diversidad botánica enorme, así como un uso cotidiano de la medicina tradicional basada en la herbolaria De acuerdo con Taddei-Bringas (1999), poco más del 90% de la población utiliza plantas medicinales para tratar diferentes enfermedades, en el caso de los pacientes diagnosticados con cáncer emplean extractos como terapia alternativa o complementaria. Sin embargo, existe muy poca información sobre sus efectos, su toxicología, y solo un número reducido de toda esta variedad de plantas medicinales, ha sido sometida a estudios para determinar su potencial anticancerígeno (De Cicco et al., 2018). Por otro lado, aunque el conocimiento etnobotánico es una primera aproximación, hay que considerar la información con cautela ya que el término cáncer en la medicina tradicional no se encuentra bien definido, incluso se usa a padecimientos asociados con irritación o inflamación (Alonso-Castro et al., 2011), es por esto que son necesarios análisis de la composición de los extractos empleados y de su bioactividad en modelos biológicos.

De acuerdo con Alonso-Castro, (2011) existen cerca de 300 plantas pertenecientes a 90 familias, de las cuales 181 han sido estudiadas en modelos *in vivo* e *in vitro*. Las 119 plantas restantes son usadas en tratamientos empíricos con sintomatologías parecidas al cáncer, pero sin evidencia científica. De las plantas empleadas de manera empírica que han sido sometidas a estudios científicos, el 56% presentan efectividad al menos contra alguna línea celular. Aunque este número puede ser sobrestimado, debido a que, aunque presentan actividad, no podrían ser clasificados de acuerdo con el estándar del NCI. En ese estudio las familias con el número más alto de plantas con efectos anticancerígenos en modelos *in vivo* e *in vitro* son las Asteraceae con 34 plantas, Fabaceae con 19, Lamiaceae con 7 y Convulaceae con 6 plantas. En el caso de las Asteraceae, aunque tiene el número más alto solo 9 se consideran como extractos activos con una $IC5_0 \leq 30$ µg/mL (Boyd, 1997).

Plantas de la familia de las Fabaceae, son de las más usadas para tratar sintomatologías parecidas al cáncer, pero con poca o ninguna información basada en estudios biológicos. Dentro de estas, a continuación se muestra una lista de las más importantes (Alonso-Castro et al., 2011):

1. *Aeschynomene fascicularis*
2. ***Acacia farnesiana***
3. *Acacia macracantha*

4. *Centrosema pubescens*
5. *Leucaena esculenta*
6. *Lysiloma acapulcense*
7. *Mimosa brandegei*
8. *Pithecellobium dulce*
9. ***Prosopis juliflora***

Género *Prosopis*

El género *Prosopis* tiene 44 especies distribuidas en el norte, centro y sur de América, Asia y África; Argentina es el país que concentra mayor diversidad con 27 especies. El género *Prosopis* ha sido usado en la medicina tradicional alrededor del mundo, muchas especies de *Prosopis* han sido introducidas o reintroducidas a ciertas áreas de Argentina, Chile, Perú, México y Estados Unidos, así como en algunas regiones de Asia, África, India y Australia. La mayoría de estas especies pertenecen a *P. juliflora, P. pallida, P. glandulosa, P. velutina,* estas se observan en climas tropicales, y también se tiene la presencia de *P. alba, P. chilensis*, en regiones subtropicales (Henciya et al., 2016).

En la composición fitoquímica de las especies del género, se ha reportado el contenido de celulosa, hemicelulosa, lignanos, compuestos extraíbles (azúcares, resinas, aceites volátiles, ácidos grasos, taninos, y fenoles) y agua. Se tienen reportes de semillas de *P. alpataco* que muestran actividad antibacterial y antifúngica, asociados a extractos que al ser analizados por cromatografía de masas muestran ácidos grasos como hexadecanoícos, octadecanoícos y glucopirosanos (Sharifi-Rad et al., 2019). Estas bioactividades se asocian principalmente a sus compuestos fitoquímicos, donde los estudios fitoquímicos de la planta revelan la presencia de diferentes metabolitos secundarios, principalmente flavonoides, alcaloides, saponinas, fenoles y taninos (Sanjay Biradar, 2013).

Por otro lado, en extractos de las partes áreas de las plantas pertenecientes a este género como *P. alpataco, P. argentina y P. chilensis,* se ha demostrado que poseen propiedades de unión al ADN, lo cual fue asociado a la presencia de alcaloides (Sharifi-Rad et al., 2019). También, se ha mostrado que algunos extractos pueden inhibir la proliferación celular, así como el arresto del ciclo celular en diferentes líneas celulares cancerígenas (Sathiya & Muthuchelian, 2011).

Genero *Acacia*

Acacia es un género de arbustos y árboles de la Familia Leguminosae, Subfamilia Mimosoideae, compuesto por más de 1300 especies, que se distribuyen en forma natural en todos los continentes, con la excepción de Europa. Más de 900 de estas especies son nativas de Australia y las restantes de las regiones tropicales secas y templadas cálidas de África, sur de Asia y América. Al tratarse de un género tan grande y de tan amplia distribución, que prospera bajo una gran variedad de sitios, sus especies proporcionan múltiples productos y servicios, maderables, no maderables y ambientales, en sus áreas de origen y en regiones en donde se las ha introducido. Se trata de especies que son desde

pequeños arbustos hasta grandes árboles y muchas de estas son especies forestales, de las cuales se puede producir madera aserrada, pulpa y papel, tableros y chapas y otros bienes. Muchas acacias también producen gomas, productos químicos, alimento humano, forraje, leña, carbón, postes y materiales para cercos, sin mencionar una variedad de aplicaciones ambientales, como protección de suelos, mejoramiento de suelos mediante fijación de nitrógeno, cortinas cortavientos y abrigo, contención de dunas, protección de riberas y otros (Barros Asenjo, 2007).

El género *Acacia* es bastante amplio, se considera un aglomerado de al menos 5 grupos que, aunque se encuentran en todo el mundo, se conoce muy poco sobre su composición química debido a lo extenso del género. Sin embargo, se han podido identificar metabolitos secundarios como aminas y alcaloides, glucósidos cianogénicos, terpenos, taninos, flavonoides y taninos condensados (Seigler, 2003)

Prosopis juliflora

Prosopis juliflora, es una planta perteneciente a la familia de las Fabáceas, es una planta conocida como “mezquite”. Es un árbol o arbusto espinoso, caducifolio, nativo de México, América Central y Norte de América del Sur, es cultivada en varias partes del mundo por sus múltiples usos y su adaptación al clima árido, es considerada una especie pionera, colonizadora e importante para los procesos de regeneración ya que facilita el establecimiento de otros elementos del ecosistema (Duke, 2005). Algunos estudios han reportado diferentes actividades medicinales como antioxidantes, hepatoprotectoras, hemolíticas, antibacteriales, antifúngicas, antidiabéticas, antinflamatorias y anticancerígenas, las cuales fueron asociadas a diferentes tipos de metabolitos secundarios, entre ellos, a la presencia de alcaloides, taninos, fenoles, flavonoides, terpenos y esteroides, que fueron extraídos de diferentes secciones de la planta. Dentro de la medicina tradicional, el cocimiento de su resina se usa para curar la disentería y para algunas afecciones de los ojos, mientras que la infusión de las hojas se usa como remedio para la inflamación de los ojos, la corteza se emplea como astringente, las flores en cocción y la corteza de la raíz como vomitivo y purgante, así como para curar heridas, antihelmíntico y para el dolor de estómago (Henciya et al., 2017).

Acacia farnesiana

A. farnesiana es un arbusto espinoso o árbol pequeño, perennifolio de 1 a 2 m de altura la forma arbustiva, y de 3 a 10 m la forma arbórea, perteneciente a la subfamilia Mimosideae de las Fabáceas. La especie es originaria de América tropical y naturalizada en todo el mundo tropical y en el Mediterráneo. Las sustancias con mayor presencia en la especie son fenoles complejos (taninos condensados) y polisacáridos en forma de gomas. *A. farnesiana* es conocida por sus propiedades antinflamatorias, antidiarreicas, así como por su actividad contra el veneno de serpiente. En la medicina tradicional, se cuecen las flores para emplearse como remedio en casos de dispepsia, también de las flores se hace un ungüento que se usa para el dolor de cabeza. Con el fruto verde, que es muy astringente, se prepara una infusión para las inflamaciones de la piel y de las membranas mucosas (fuegos y

hemorragias) y para calmar trastornos del sistema nervioso, mientras que el cocimiento de la raíz se usa para tratar la disentería, tuberculosis y dolor de abdomen. Por su parte, el tallo es usado para el tratamiento del estado bilioso, las evacuaciones amarillas, ictericia, dolor de muelas, mientras que las hojas secas y pulverizadas se aplican como vendaje en las heridas, y finalmente, en medicina casera, se emplea para tratar la fiebre tifoidea, hemorragias, problemas menstruales, artritis y dolores reumáticos, tónico digestivo, diarrea, irritación de mucosas, conjuntivitis y malaria (CONABIO, 2021).

Sin embargo, para ambas plantas existe poca información respecto a su actividad en modelos biológicos. Se ha reportado que extractos de alcaloides de *P. juliflora* han mostrado actividad citotóxica contra células Molt-4-línea celular de cáncer de leucemia (Mani & Krishnaswamy, 2016). Por otra parte, extractos etanólicos de *A. farnesiana* han mostrado una buena actividad antioxidante pero poca actividad citotóxica en modelos de *Artemia salina* (Ramli et al., 2011). Los estudios a nivel fitoquímico, así como su empleo en la medicina tradicional, permiten proponer a estas dos especies como buenos sujetos de estudio para la extracción de compuestos con posible actividad anticancerígena.

Objetivos

General

Evaluar la actividad citotóxica de extractos alcaloideos de *Acacia farnesiana* y *Prosopis juliflora* en la línea celular HeLa de cáncer cérvico uterino.

Particulares

i. Evaluar dos métodos para la obtención de extractos vegetales con alto contenido de alcaloides
ii. Propagar la línea celular de cáncer cérvico uterino HeLa
iii. Evaluar el porcentaje de viabilidad de la línea celular HeLa expuesta a diferentes concentraciones del extracto alcaloideo de *P. juliflora*
iv. Evaluar el porcentaje de viabilidad de la línea celular HeLa expuesta a diferentes concentraciones del extracto alcaloideo de *A. farnesiana*

Hipótesis

Los extractos de alcaloides de *Acacia farnesiana* y *Prosopis juliflora* presentarán actividad citotóxica *in vitro* contra la línea celular HeLa.

Materiales y métodos

Material vegetal. Especímenes completos de *Prosopis juliflora* y *Acacia farnesiana* fueron adquiridos durante marzo y abril del 2018, en invernaderos de San Lorenzo Tlacotepec, Estado de México. Los ejemplares con tallo, hojas y flores se prensaron y se enviaron para su identificación al herbario de la Facultad de Ciencias Agrícolas, UAEMéx.

Elaboración de extractos

De ambas especies vegetales se cosecharon hojas, tallos y una combinación de ambos. Las muestras fueron secadas por horno a una temperatura de 60°C durante 72 horas o secadas por liofilización durante 24 horas. Para el proceso de extracción, se evaluaron dos metodologías, una desarrollada por Statz & Coon (1976)**,** a la que se le designa con el código “S”. El método pretende abarcar varias moléculas con potencial a ser candidatos como fármacos en ensayos celulares. La segunda metodología es la propuesta por Keller (1983) denominada “Acid shakeout” con el Código “A”, dirigida a la extracción de alcaloides totales. Ambas parten de un extracto metanólico. Debido a sus implicaciones toxicológicas, se decidió evaluar etanol como un solvente alterno menos tóxico. En la **Figura 2** se muestra el proceso general de ambos métodos.

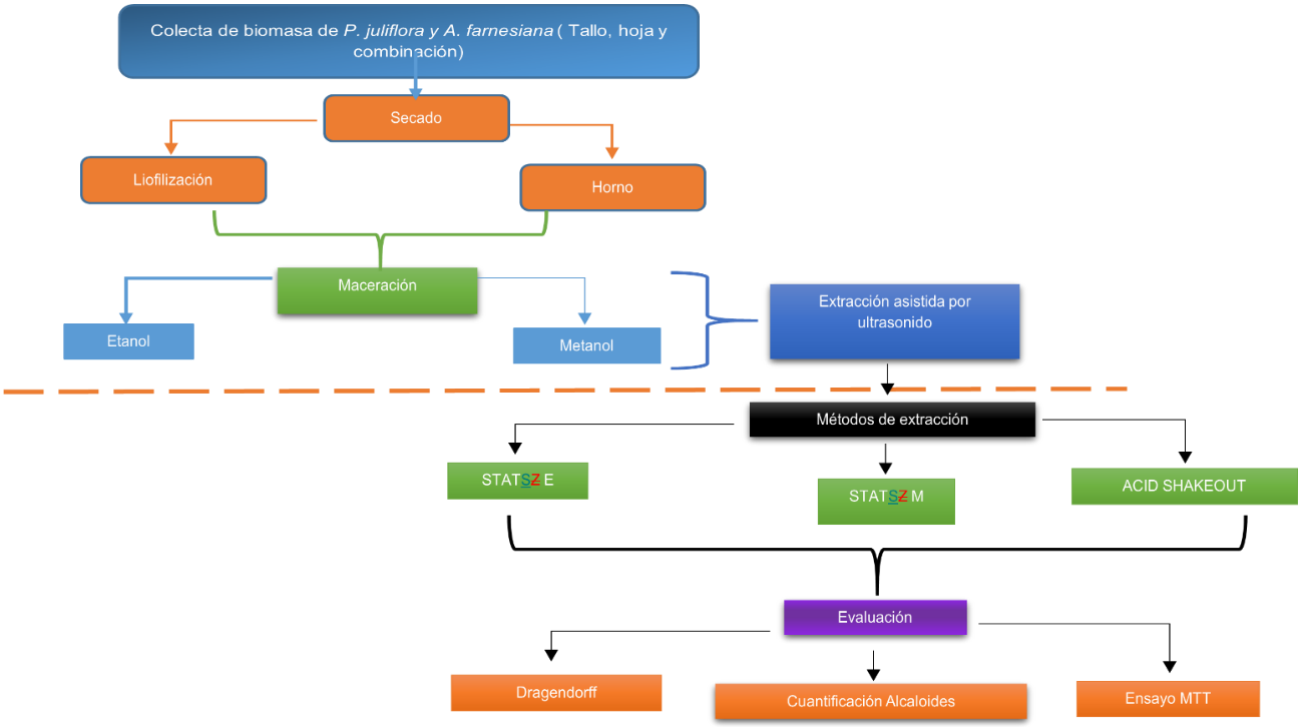


Figura 2. Metodología general del trabajo

Obtención de extracto etanólico y metanólico de *Prosopis juliflora* y *Acacia farnesiana* de acuerdo con la metodología de Statz & Coon (1967)

Muestras secas de biomasa (tallo, hoja y combinación de ambas), fueron pulverizadas con ayuda de un mortero. Posteriormente se maceró la biomasa con dos solventes diferentes (1:30 p/v; etanol o metanol) y se mantuvieron en agitación constante a 100 rpm durante 24 h. Al término del periodo de maceración, se realizó una extracción asistida con baño ultrasónico a 40°C, 53 KHz y durante 40 minutos. De esta mezcla, se recuperó el sobrenadante, el cual pasó por un proceso de desengrasado, en un embudo de separación, empleando hexano en volúmenes iguales, recuperándose la parte inferior que contendrá el extracto libre de lípidos. El extracto desengrasado fue concentrado en rotavapor y reconstituido en agua [1:9], posteriormente se realizó una partición en un embudo de separación para remover los compuestos más polares, empleando cloroformo en volúmenes iguales, colectándose la fracción orgánica. Este proceso se realizó por triplicado y se mezclaron los extractos obtenidos, la mezcla fue concentrada al vacío. El extracto orgánico obtenido fue sometido a una remoción parcial de taninos empleando una solución al 1% de NaCl. Finalmente, el extracto resultante fue concentrado hasta su sequedad para determinar su rendimiento **(Fig. 3**).



Figura 3. Esquema general de la metodología de extracción de acuerdo con Statz & Coon (1967).

Elaboración de extractos alcaloideos por el método Acid shake out (Keller, 1983)

Las muestras secas de biomasa fueron sometidas al mismo proceso de secado y maceración (con metanol) como en la subsección previa, posteriormente el extracto fue desengrasado tres veces con hexano, las particiones resultantes fueron concentradas al vacío. El extracto resultante fue disuelto en una solución de ácido tartárico 1M para obtener un extracto a pH 5. Posteriormente, se procedió a realizar una partición en embudo de separación, empleando volúmenes iguales del extracto y acetato de etilo, la fracción inferior resultante fue ajustada a pH 10 con una solución de Na_2CO_3. En seguida se procedió a realizar una segunda partición con acetato de etilo. Finalmente, la fracción acuosa resultante contendrá aminas cuaternarias y alcaloides **(Fig. 4).**

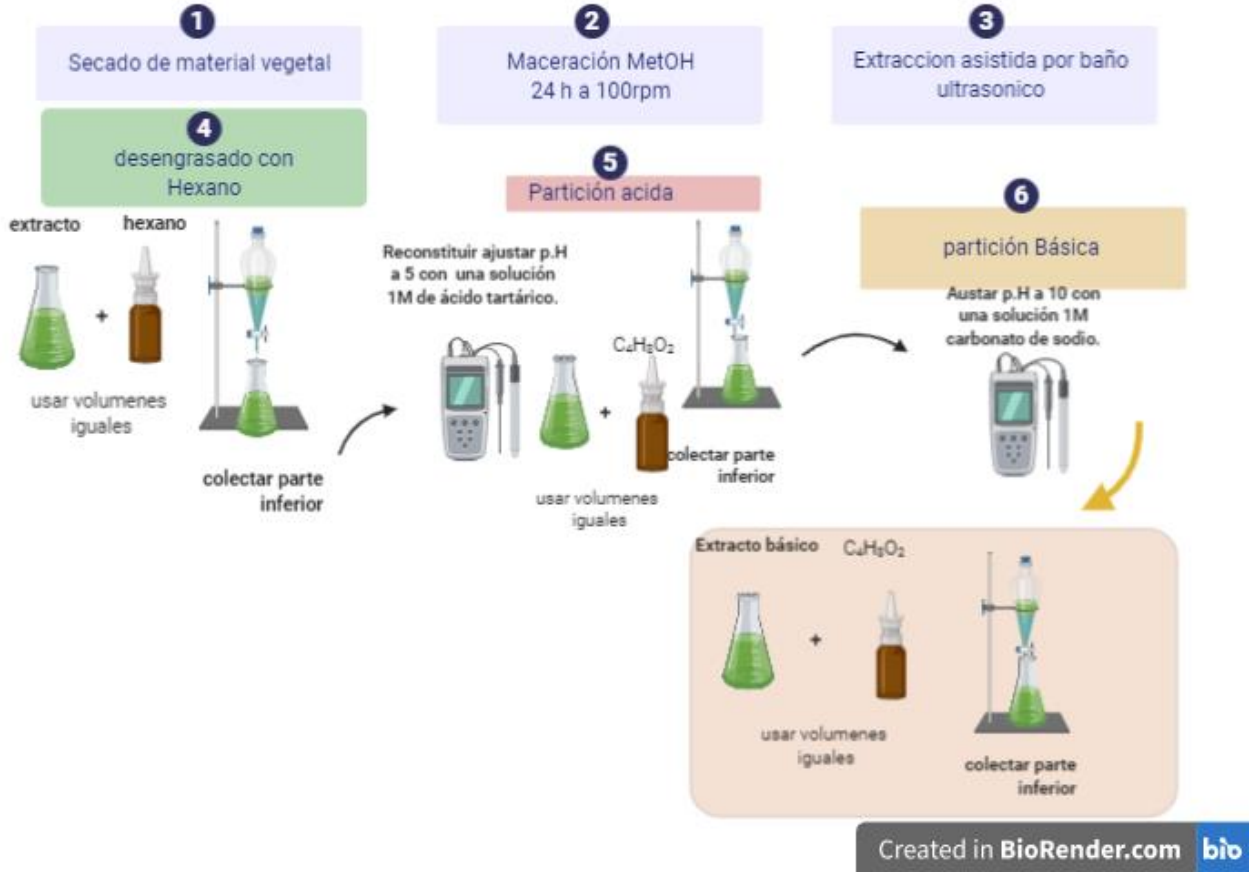


Figura 4. Esquema de la metodología de extracción de Keller (1983) "acid shake out"

Rendimiento de extracción

Una vez obtenido el extracto, se llevó a sequedad por presión reducida en matraces de bola previamente llevados a peso constante. Se registró el peso obtenido y se realizó una diferencia entre el peso constante del matraz sin extracto y el matraz con extracto para obtener el peso del extracto seco (Satyajit Sarker, 2006).

Con los datos resultantes, se calcula el rendimiento de extracción con la siguiente formula:

$$Rendimiento\ de\ extracción\ (\%) = \frac{peso\ del\ extracto, PS}{peso\ de\ la\ biomasa, PS} \times (100)$$

Prueba cualitativa de Dragendorff

Se preparó reactivo de Dragendorff mezclando 8 g de nitrato de bismuto pentahidratado en 20 ml de ácido nítrico al 30% con una solución de 27.2 g de yoduro de potasio en 50 ml de agua. Se deja en reposo por 24 horas, se decanta y se afora a 100 ml (Sarker, 2006). A cada extracto obtenido se le realizó una prueba con el reactivo de Dragendorff, colocando ~0.5 mL de extracto con 1mL del reactivo, esta prueba detecta la presencia de alcaloides mediante la formación de un precipitado naranja rojizo.

Cuantificación de alcaloides totales

Previo al análisis se prepararon soluciones de verde de bromocresol, solución de ácido nítrico, buffer de fosfato ácido y del estándar de atropina de acuerdo a Fazel et al., (2010a), las cuales se describen a continuación.

- Solución de verde de bromocresol: se pesaron 68.9 mg de verde de bromocresol (BCG) y se mezclaron con 3 mL de una solución 2 mol/L de NaOH y 5 mL de agua destilada, hasta que esté completamente disuelto. La solución se lleva a un volumen de 1000 mL.

- Solución de ácido cítrico 0.2 mol/L: se pesaron 42.02 g de ácido cítrico monohidratado y se disolvieron en agua destilada. Se llevaron a un volumen de 1L.

- Solución de buffer de fosfato acido de sodio a pH 4.7: se pesaron 71.6 g de Na_2HPO_4 y se disolvieron en agua destilada aforando a un litro, y se ajustó el pH con la solución 0.2 mol/L de ácido cítrico hasta llegar a un pH de 4.7.

Solución estándar de atropina: se pesó1 mg de atropina y se disolvió en agua destilada, se aforó a 10 mL.

Preparación para la curva de calibración

Se tomaron alícuotas de 0.5, 0.8, 1.0, 1.2, 1.5 y 2.0 mL de la solución estándar de atropina con una pipeta automática y se transfirieron en diferentes embudos de separación.

- Blanco: 2 mL de agua destilada + 5 mL Na_2HPO_4 + 5 mL BCG.

- Patrón 1: 0.5 mL de solución de trabajo de atropina+ 5 mL Na_2HPO_4 a pH 4.7 + 5 mL BCG.
- Patrón 2: 0.8 mL de solución de trabajo de atropina + 5 mL Na_2HPO_4 a pH 4.7 + 5 mL BCG.
- Patrón3: 1.0 mL de solución de trabajo de atropina + 5 mL Na_2HPO_4 a pH 4.7 + 5 mL BCG.
- Patrón 4: 1.2 mL de solución de trabajo de atropina + 5 mL Na_2HPO_4 a pH 4.7 + 5 mL BCG.
- Patrón 5: 1.5 mL de solución de trabajo de atropina + 5 mL Na_2HPO_4 a pH 4.7 + 5 mL BCG.
- Patrón 6: 2.0 mL de solución de trabajo de atropina + 5 mL Na_2HPO_4 a pH 4.7 + 5 mL BCG.

A continuación, se añadieron 2 mL de cloroformo a cada embudo de separación. La fase clorofórmica se separó y se recogió en un matraz volumétrico de 10 mL. Se agregó consecutivamente al embudo de separación 2 mL de cloroformo y dos veces más con 3 mL de cloroformo, después se aforó a 10 mL con cloroformo. La absorbancia del complejo formado y disuelto en cloroformo se midió a 470 nm frente al blanco preparado, como anteriormente se describió, pero sustituyendo la atropina por agua destilada (2 mL). Con los valores de las absorbancias y las concentraciones de atropina en cada estándar se hizo la gráfica de la curva de calibración que debe ser lineal, con un valor de r^2 aceptable (≥0.9).

Cuantificación de alcaloides en los extractos vegetales

Se transfirieron 5 mL del extracto a un embudo de separación con 5 mL de solución de BCG y 5 mL de solución de fosfato. La mezcla se agitó y se retiró el tapón del embudo para expulsar el gas en el embudo. El complejo formado fue extraído con 2-2-3-3 mL de cloroformo, agregados por separado y de forma consecutiva, de la misma forma como se extrajeron los estándares, separando la capa de cloroformo. Los extractos de cloroformo se recogieron en un balón volumétrico de 10 mL y se completó el volumen con cloroformo. La absorbancia del complejo formado y disuelto en cloroformo fue medida en un espectrofotómetro (Thermo, Estados Unidos) a una longitud de onda de 470 nm. El experimento se realizó por triplicado **(Fig.5).**

El método descrito está basado en la reacción de alcaloides (para aquellos que tienen nitrógeno en el interior de su estructura) con verde de bromocresol (BCG), dando lugar a la formación de un complejo de transferencia de carga alcaloide-verde de bromocresol, a un pH 4.7, de color amarillo, susceptible de una determinación espectrofotométrica a 470 nm, el cual es expresado en miligramos de equivalentes de atropina por gramo de biomasa seca (mg EA/g PS) (Fazel et al., 2010b).

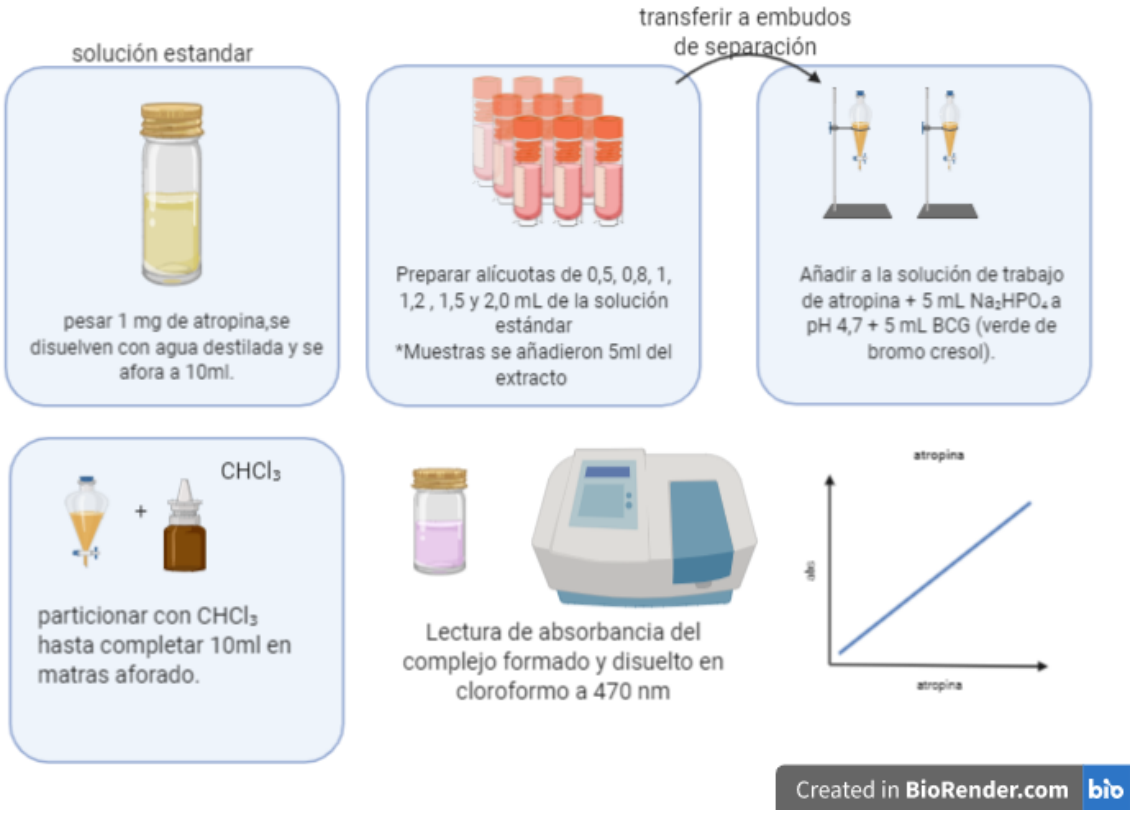


Figura 5. Esquema de la metodología de cuantificación de alcaloides (Fazel et al., 2010).

Mantenimiento y proliferación de la línea celular HeLa

La línea celular HeLa se obtuvo por donación del Dr. Juan Carlos Vázquez Chagoyán del Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal de la UAEMex. Al llegar al laboratorio, se realizó un pase con el objetivo de observar alguna señal de contaminación y se colocaron en cuarentena durante una semana (Freshney, 2010). Al concluir el tiempo no se observaron señales de contaminación, por lo cual se procedió con la expansión de la línea celular. Una vez alcanzada una población celular de 15 cajas (t25), se procedió a ultracongelar 2 millones de células en crio viales, con un total de 10 viales como banco de trabajo. La línea celular fue mantenida empleando medio mínimo esencial de Eagel (EMEM, sigma), suplementado con 10 % de suero fetal bovino (SFB, thermo), 2 mM de L–glutamina y 1% de aminoácidos no esenciales (NEA, sigma), a 37°C, en una atmosfera de 5% de CO_2 y un 80% de humedad relativa. El subcultivo se realizó al 70% de confluencia mediante tripsinización en un radio 1:10, con cambio de medio de cultivo dos veces por semana.

Bioensayo de citotoxicidad de los extractos vegetales en la línea celular HeLa a través del ensayo de viabilidad celular MTT

El principio del ensayo de viabilidad MTT se basa en que la mayoría de las células viables muestran actividad mitocondrial constante, por lo tanto, un incremento o decremento en el número de células viables tendrá una relación directamente proporcional con la actividad de la mitocondria. Esta actividad mitocondrial se ve reflejada en la conversión de la sal de tetrazolio a cristales de formazan, los cuales pueden ser solubilizados para realizar mediciones homogéneas de densidad óptica.

Preparación de la multiplica: Las células fueron sembradas por triplicado, el volumen final recomendado para células adherentes es de 150 uL, en una placa de fondo plano. Cada placa contenía un pozo blanco (sin células), un pozo control (células sin exposición a fármaco), un control positivo (células + 2 ng/mL paclitaxel) y control del solvente utilizado. Los pozos no utilizados contenían PBS, con el fin de controlar la evaporación de la placa al mínimo. Asimismo, se tuvo cuidado de separar los pozos para evitar influencia entre pozos vecinos **(figura 6)**. El volumen final en cada pozo, 150 *µL,* fue distribuido de la siguiente manera: 120 *µL* de células + 30 *µL* de la solución de extracto correspondiente.

Siembra de células: El número de células por pozo se basó en el trabajo reportado por Sadeghi-Aliabadi et al., (2010). Así mismo se realizaron siembras de distintos números partiendo de 2.5 x 10^6 hasta 2.5 x10^3 cel/pozo en un intervalo de 72 horas de acuerdo con la metodología de la ATCC para determinar el número de células a emplear. A partir de una caja t25, con confluencia de 80%, se realizó un conteo y se concentró en un vial que contenía ~2x 10^6 cel/mL aproximadamente y se tomaron alícuotas de la siguiente manera:

- *[(2.5x10^4cel/mL) (150 µL)]/ (2 x10^6 cel/mL) = 1.875 µL + 148.225 µL de medio de cultivo *para el caso del pozo control*
- *[(2.5x10^4cel/mL) (150 µL)]/ (2 x10^6 cel/mL) = 1.875 µL + 118.13 µL de medio de cultivo +30uL de la solución de extracto*

Una vez sembradas, las células se dejaron reposar durante 24 h, ya que al ser células adherentes es necesario que recuperen su conformación y se realice la medición en la fase log del crecimiento celular (Van Meerloo et al., 2011).

Preparación y adición de los extractos al cultivo celular

Se realizaron extractos con las condiciones seleccionadas a partir de 10 g de biomasa seca. Una vez obtenidos los extractos, se llevan a sequedad por presión reducida, y posteriormente, el extracto fue resuspendido en etanol a un volumen de 10 mL, a partir de esta solución se ajusta hasta alcanzar una concentración de ~10 mg/mL. A partir de esta solución, se preparó una solución stock del extracto de *A. farnesiana* o *P. juliflora* a una concentración de 3000 µg/mL disueltos en medio de cultivo celular (EMEM+ SFB al 10%). Esta solución fue filtrada (0.22 µm) en una unidad de filtración estéril, a partir de esta

solución se realizaron diluciones seriadas para obtener las siguientes concentraciones: 300, 30, 3 y 0.3 µg/mL.

Para el caso del control del solvente se empleó como base una solución al 90% de etanol, tomando el volumen correspondiente a la concentración más alta de los tratamientos empleados (45 µL) y diluyéndose en el medio de cultivo.

Incubación MTT

Una vez culminado el tiempo de exposición a los extractos (24, 48 y 72 h), a cada pozo se le agregó 15 µL del reactivo MTT (1:10; v/v), se agitaron a 600 rpm x 1min, y finalmente se incubaron durante 4 h a 37°C en la incubadora de CO_2. Transcurrido el tiempo de incubación, se retiró el medio de cultivo y se disolvieron los cristales con 150 *µL* de alcohol isopropílico acidificado, pipeteando 2-3 veces por pozo, iniciando con los pozos control. Finalmente, la placa se dejó reposar por 10 minutos y se procedió a su lectura espectrofotométrica a 570 nm en un lector de multiplacas Epoch (Biotek, Estados Unidos)

Mediciones de densidad óptica

Los datos de absorbancia fueron transformados a % de células vivas y fueron analizados mediante una regresión no lineal para encontrar la concentración inhibitoria media (IC_{50}) empleando el programa estadístico GRAFPAD.

Viabilidad celular (%) = $\frac{DO\ pozo\ tratamiento - DO\ blanco}{promedio\ DO\ pozo\ control - DO\ blanco]} \times 100$

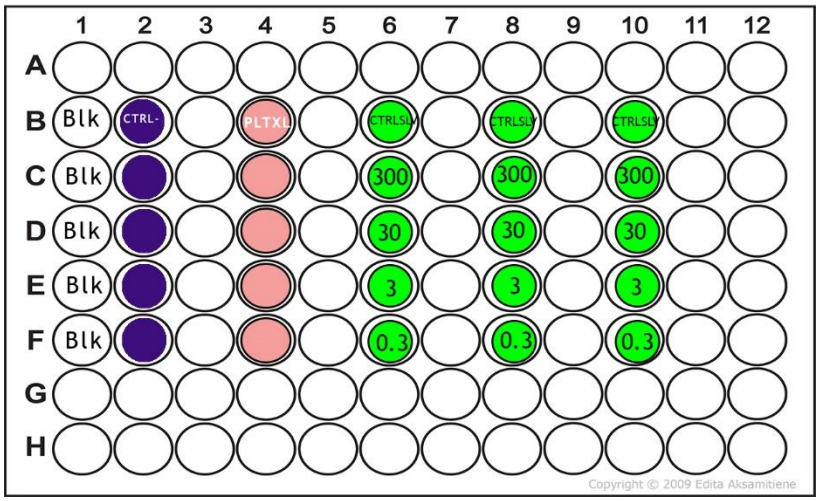


Figura 6. Diagrama de carga de la multiplaca de 96 pozos. Mencionar qué es cada cosa

Análisis estadístico

Para la concentración de alcaloides totales, se empleó un análisis multifactorial mixto, con las variables de entrada; “planta y secado” en dos nivele, método de extracción en 3 niveles, se analizaron los resultados empleando un ANOVA multifactorial para el análisis del modelo completo, y una ANOVA simple para comparar los extractos de cada especia, así como una prueba de rangos múltiples o tukey con un 95% de confianza. Los datos obtenidos de la evaluación de la actividad citotóxica del extracto se sometieron a un análisis de regresión no lineal, en GRAPHPAD prism versión 8.01

Resultados y discusión

Presencia de alcaloides en los extractos de *P. juliflora* y *A. farnesiana* por la prueba cualitativa de Dragendorff

Derivado de la evaluación de dos especies vegetales, diferentes tejidos, procesos de secado del material vegetal, solventes y procesos de extracción, se obtuvieron un total de 36 extractos, a los que se les aplicó la prueba cualitativa de Dragendorff para detección de alcaloides. En este primer screening se determinó la presencia de este tipo de compuestos a partir del precipitado color naranja que se forma por la reacción de Dragendorff, y el resultado se clasificó como negativo (-), poco presente (+), presente (++) y abundante (+++).

Tabla 1. Determinación cualitativa de la presencia de alcaloides por la prueba de Dragendorff en extractos de *Prosopis juliflora* y *Acacia farnesiana,* evaluando diferentes tipos de secado, extracción y tejidos.

Tratamiento	Resultado	Tratamiento	Resultado	Tratamiento	Resultado
S1hHE	+	S2hHE	+++	A1hH	+
S1tHE	-	S2tHE	-	A1tH	-
S1cHE	*ND*	S2cHE	*ND*	A1cH	*ND*
S1hLE	+	S2hLE	+++	A1hL	+
S1tLE	-	S2tLE	-	A1tL	-
S1cLE	*ND*	S2cLE	*ND*	A1cL	*ND*
S1hHM	++	S2hHM	+++	A2hH	+
S1tHM	-	S2tHM	-	A2tH	-
S1cHM	*ND*	S2cHM	*ND*	A2cH	*ND*
S1hLM	++	S2hLM	+++	A2hL	+
S1tLM	-	S2tLM	-	A2tL	-
S1cLM	*ND*	S2cLM	*ND*	A2cL	*ND*

Código: S: metodología Stats & Coon, **A**: metodología Acid shakeout, **1**: *Acacia farnesiana*, **2**: *Prosopis juliflora*, **h:** hoja, **t**: tallo, **c**: combinación de tejidos, **H**: secado por horno, **L**: secado por liofilizado, **E**: etanol, **M:** metanol, **+:** poco presente, **++:** presente, **+++:** abundante, **- :** negativo, **ND:** no determinado.

Para ambas especies, se observó la presencia de alcaloides. En relación con el método de extracción usado, hay una diferencia notable en la intensidad del precipitado **(Fig. 7),** siendo el método Statz & Coon (S) el que presentó mayor intensidad con respecto al Acid shakeout (A). Respecto a la especie, se notó una mayor presencia de compuestos alcaloideos en *Prosopis juliflora* respecto a *Acacia farnesiana.* Por otra parte, al evaluar los diferentes tejidos, las hojas mostraron un resultado positivo, mientras que los tallos presentaron resultados negativos para ambas especies, permitiendo descartar una

combinación de tejidos al no existir contribución por parte de los tallos **(Tabla 1).** De acuerdo con los resultados obtenidos, solo 12 extractos mostraron una prueba positiva para la presencia de alcaloides, que corresponden a los extractos de hojas sin importar el tipo de extracción, secado o solvente empleado. Estos fueron seleccionados para la cuantificación de alcaloides totales por un método espectrofotométrico.

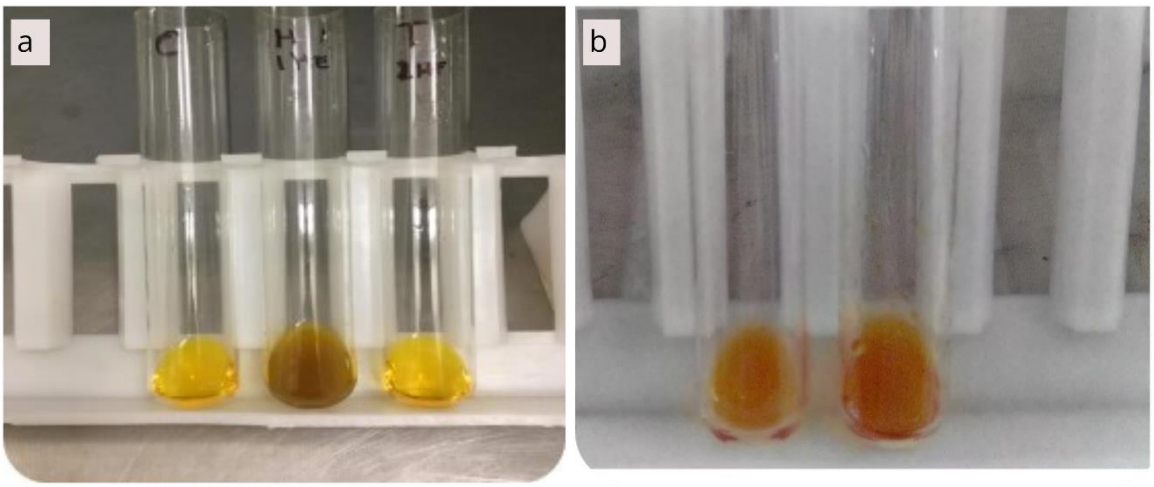


Figura 7. Pruebas de Dragendorff de detección de alcaloides en extractos de *A. farnesiana* y *P. juliflora* (a y b): a: tubo control color amarillo, extracto de hoja *P. juliflora* (+++) y tallo (-); b: extractos de hoja de *A. farnesiana* (++)

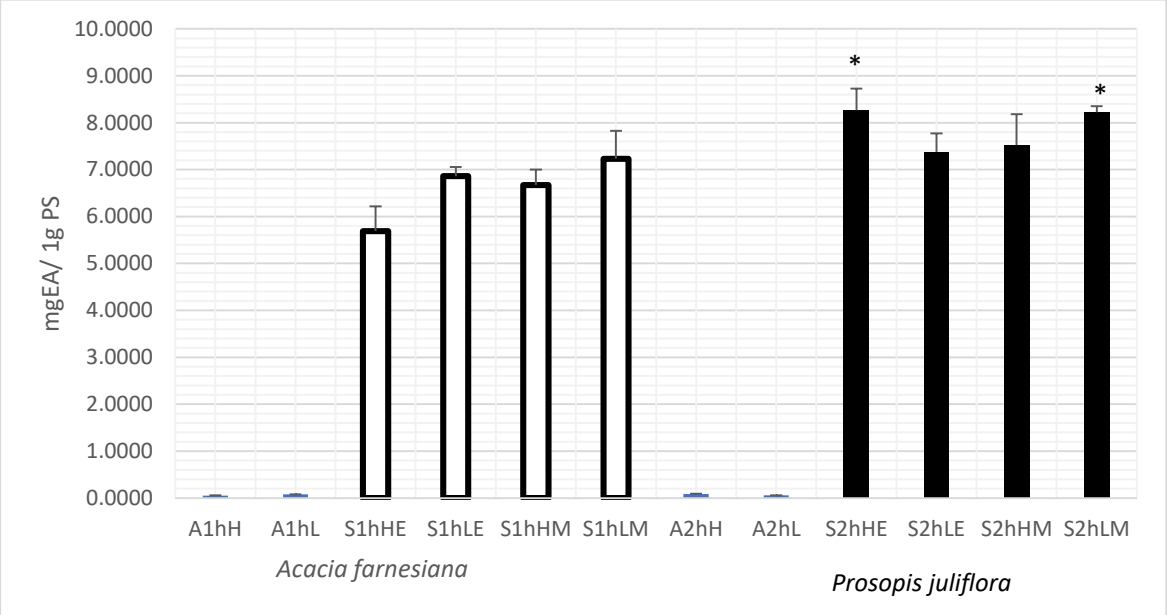
De manera general, los alcaloides se concentran en órganos específicos, principalmente las hojas, raíces y tallos algunas veces. Por ejemplo, aunque la nicotina es sintetizada en las raíces, el 85% de este alcaloide se encuentra concentrado en las hojas de las plantas de tabaco (Pallardy, 2008). La función de estos compuestos suele ser atribuida a un mecanismo de defensa contra herbívoros (Silva et al., 2007), por lo que su concentración es mayor en hojas haciendo de este un excelente tejido para la extracción de estos compuestos.

Contenido de alcaloides en los extractos de *P. juliflora* y *A. farnesiana*

Entre los métodos de extracción evaluados, se observó una diferencia significativa en el contenido de alcaloides, siendo casi 100 veces mayor el contenido de alcaloides determinado en las diferentes muestras por el método desarrollado por Statz & Coon (1976) que para los extractos obtenidos por el método de extracción Acid shake out (Keller, 1983). Para ambas plantas, se mantuvo la misma tendencia observada en el primer análisis cualitativo, *P. juliflora* fue la especie que presentó el mayor contenido de alcaloides, con respecto a *A. farnesiana* **(Fig. 8).**

Probablemente el mayor contenido de alcaloides en el método Statz y Coon, se deba a que esta metodología fue optimizada específicamente para ensayos de screening biológico de compuestos naturales (Boyd, 1997) teniendo como finalidad la extracción de la mayor

cantidad de constituyentes con posible actividad anticancerígena como los alcaloides, por otro lado el extracto resultante de esta metodología es un extracto soluble en cloroformo, el cuál preserva la estructura y función de los compuestos extraídos (Jones & Kinghorn, 2006). Siendo esta la diferencia principal al método de extracción de Keller, donde no se considera esta preservación de la estructura del compuesto posiblemente resultando en una menor concentración en estos extractos.



Acidshake out		Stats & Coon		Acidshake out		Stats & Coon	
Horno	Liofilización	Etanol Horno/Liofilización	Metanol Horno/Liofilización	Horno	Liofilización	Etanol Horno/Liofilización	Metanol Horno/Liofilización
Acacia farnesiana				*Prosopis luliflora*			

Figura 8. **Contenido de alcaloides totales en extractos de *A. farnesiana* y *P. juliflora* (1 y 2), empleando diferentes procesos de secado, distintos métodos de extracción, dos solventes y un tejido (hoja). Los datos representan el promedio de tres repeticiones ± DS.**

Para el análisis del modelo experimental, se realizó una prueba de ANOVA multifactorial. De acuerdo con la prueba de ANOVA ($p < 0.5$) se observó una diferencia significativa entre los extractos, y la prueba de rangos múltiples mostró que los extractos con el significativamente mayor contenido de alcaloides fueron los extractos de *P. juliflora* obtenidos con la metodología de Statz & Coon, en hojas secadas en horno con el solvente etanol (S2hHE) y en hojas liofilizadas, empleando metanol como solvente de extracción (S2hLM). Se determinó una concentración de 8.26 y 8.12 mg EA/g PS respectivamente **(Fig. 8)**. Por otro lado, al realizar un análisis para la optimización del modelo se obtuvo un valor igual a 8.69 mg EA/g PS **(Tabla 2),** valor que es muy cercano al obtenido de manera experimental, lo que refuerza la elección de esta metodología.

Por otro lado, el diagrama de Pareto resume de manera global la contribución de los efectos principales de forma individual y en conjunto para la elaboración de los extractos. ese observa que el método de extracción es el elemento con mayor peso para explicar los resultados del contenido de alcaloides, seguido por la especie, mientras que el método de secado no tiene incidencia en la extracción y el contenido de alcaloides **(Fig. 9)**. Esto se debe a que los alcaloides son un grupo de compuestos relativamente estables debido a su estructura que suele estar compuesta por átomos de nitrógeno dentro un anillo como en los alcaloides tropánicos o bien dentro de una cadena (Taíz & Zeiger, 2006)

Si se comparan de manera individual a los tratamientos, se observa una diferencia estadísticamente significativa para el solvente, siendo el metanol el tipo de solvente con la mayor capacidad de extracción, pero solo en el caso de *A. farnesiana*, en el caso de *P. juliflora* no se observó ningún efecto del tipo de solvente, por lo que éste se podría remplazar por etanol en los siguientes estudios, dado que el metanol es un solvente tóxico.

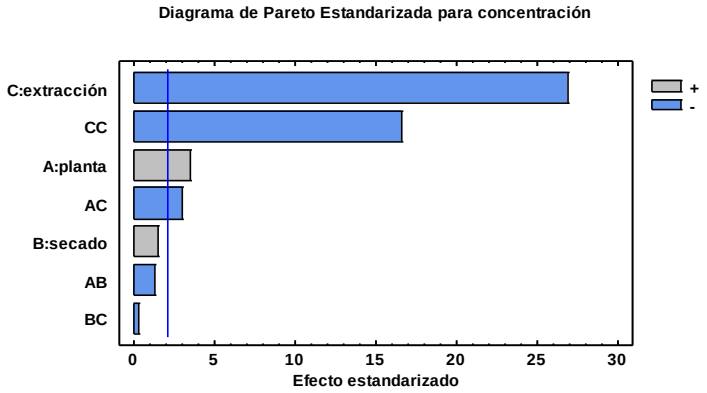


Figura 9. Contribuciones principales de los diferentes factores evaluados en el contenido de alcaloides totales (R^2 ajustada por grados de libertad = 97.7835 %)

El estadístico R cuadrada del modelo explica el **97.78%** de la variabilidad en la concentración de alcaloides si está siendo explicada por los factores evaluados, de esta manera al basar la selección de las condiciones de la elaboración de los extractos, en estos resultados tenemos la certeza que se obtendrá un extracto con una concentración adecuada de estos metabolitos para pruebas posteriores. Podemos considerar que las condiciones óptimas para la elaboración de estos extractos, es el secado por liofilización, empleando el método de extracción S, usando como solvente de maceración el etanol.

Finalmente, aunque los extractos que mostraron un significativamente mayor contenido de alcaloides fueron los de *P. juliflora,* la concentración exhibida en los extractos de *A. farnesiana* no fue despreciable (~7.23 mg EA/g PS) por lo que se seleccionaron dos

extractos, uno de cada especie, específicamente los que exhibieron los mayores contenidos de alcaloides totales (S2hHE y S1hLM).

Tabla 2. Análisis para la optimización de la respuesta para el modelo experimental.

Factor	Bajo	Alto	Óptimo
planta	0.0	1.0	1.0
secado	0.0	1.0	0.999966
extracción	-1.0	1.0	-0.525244

Optimizar Respuesta; Meta: maximizar concentración; Valor óptimo = 8.69172

Rendimiento de extracción

Respecto al rendimiento de los extractos, este parámetro solo se determinó en los extractos que mostraron la mayor concentración de alcaloides para ambas plantas. Los resultados demuestran que los mayores rendimientos de extracción corresponden a los tratamientos por el método Acid shakeout (A), siendo casi el doble a lo encontrado para los tratamientos con el método Statz & Coon (S) **(Tabla 3)**; lo cual es contrastante a lo encontrado en la cuantificación espectrofotométrica **(Fig. 8).**

Tabla 3. Rendimiento de los extractos seleccionados para *P. juliflora y A. farnesiana*

Método de extracción	Especie	Tratamiento	Rendimiento (%)
Acidshake out	*P. juliflora*	A2hH	7.63 ± 0.13^{a}
	A. farnesiana	A1hH	7.35 ± 0.19^{a}
Statz y Coon	*A. farnesiana*	S1hHE	4.62 ± 0.20^{b}
	P. *juliflora*	S2hLM	3.84 ± 0.09^{c}
	P. *juliflora*	S2hHE	3.12 ± 0.20^{c}

Los datos representan el promedio de tres repeticiones ± DS. Letras diferentes en superíndice indican diferencias significativas ($p<0.05$).

Los rendimientos que se obtuvieron para los tratamientos con el método de extracción acid shakeout muestran un significativamente mayor rendimiento (>7%), con respecto a Stats & Coon (≤4.6). La mayoría de los estudios reportan este tipo de metodología (rendimiento de extracción) para emitir los resultados del contenido de alcaloides, como Henciya *et al*. (2017), el cual en su trabajo se refiere como cuantificación de alcaloides al peso seco de los extractos realizados con esta metodología. Sin embargo, como se pudo observar al determinar el contenido de alcaloides por el método espectrofotométrico con verde de bromocresol, un mayor peso seco o rendimiento no se traduce en mayor contenido de alcaloides o, dicho de otra forma, no todos los componentes del extracto son alcaloides.

Existen pocos reportes sobre el contenido de alcaloides en el género *Prosopis*. En un estudio realizado por Cholich et al., (2021) en vainas de *P. flexuosa* y *P. nigra* se reportan concentraciones de *200.3 mg* EA/g AEE (extracto enriquecido de alcaloides) y 34.5 mg EA/g AEE respectivamente, por el método espectrofotométrico verde de bromocresol. Si bien estos resultados podrían parecer superar a las concentraciones obtenidas en nuestro trabajo, al comparar realizar la comparación por gramo de extracto se obtienen para *Prosopis juliflora* ~179 mg EA/g E siendo cercano a lo reportado previamente, esto es posiblemente debido a que en algunas especies del género se reporta una mayor concentración de alcaloides en vainas que en hojas (Sharifi-Rad et al., 2019). Por otro lado, ya se han identificado algunos alcaloides presentes en *P. juliflora* y se ha reportado en hojas a la juliflorina, seco-juliprosopinal, juliprosina, isojuliprosina y juliprosinina (Sharifi-Rad et al., 2019). Esto es congruente con los resultados positivos a la prueba cualitativa de Dragendorff y a la cuantificación por verde de bromocresol, ya que esta prueba está diseñada para la identificación de alcaloides con presencia de anillos de nitrógeno, como es el caso de los mencionados anteriormente.

En el caso del género *Acacia* hay pocos reportes del contenido o presencia de alcaloides, mayoritariamente se reportan compuestos fenólicos, terpenos y en una menor frecuencia alcaloides (Almahy & Nasir, 2007). En un reporte para hojas de la especie *Acacia rigidula* se han identificado 29 alcaloides como nicotina, N,N-dimetiltriptamina y mezcalina, además de varios alcaloides tetrahidroisoquinolínicos y 4 anfetaminas (Clement et al., 1998).

Finalmente, es importante recordar que todas las sustancias bioactivas de las plantas o metabolitos secundarios tienden a ser relativamente inestables una vez que son extraídas de la matriz vegetal, por lo que es necesario determinar las condiciones óptimas de extracción para lograr su estabilidad.

Bioensayo de citotoxicidad de los extractos de *P. juliflora* y *A. farnesiana* en la línea celular HeLa

Para las pruebas de viabilidad celular MTT, se eligió un extracto de cada especie vegetal (S2hHE y S1hLM), que corresponden a los tratamientos con altos contenidos de alcaloides procesados bajo las condiciones que provienen de hojas liofilizadas y usando como solvente el etanol. Los cultivos de las células HeLa fueron expuestos a diferentes concentraciones de los extractos de las dos especies. Durante las primeras 24 horas se observó un comportamiento peculiar, exacerbándose la proliferación celular por arriba del 24-51% con respecto al grupo control, este comportamiento fue más notorio en los cultivos con las concentraciones más bajas de los extractos. Para las 48 horas, se comenzó a observar una ligera reducción en la de viabilidad celular (82-97%), donde los extractos de *A. farnesiana* mostraron un efecto más marcado, aunque sin mostrar diferencias significativas con los extractos de *P. juliflora*, y finalmente, a las 72 horas se observó un decaimiento de la viabilidad con un comportamiento dosis-dependiente, siendo más

evidente en los cultivos expuestos a los extractos de *A. farnesiana*. Este comportamiento fue similar a lo observado en los cultivos de los controles positivos con paclitaxel **(Fig. 10).**

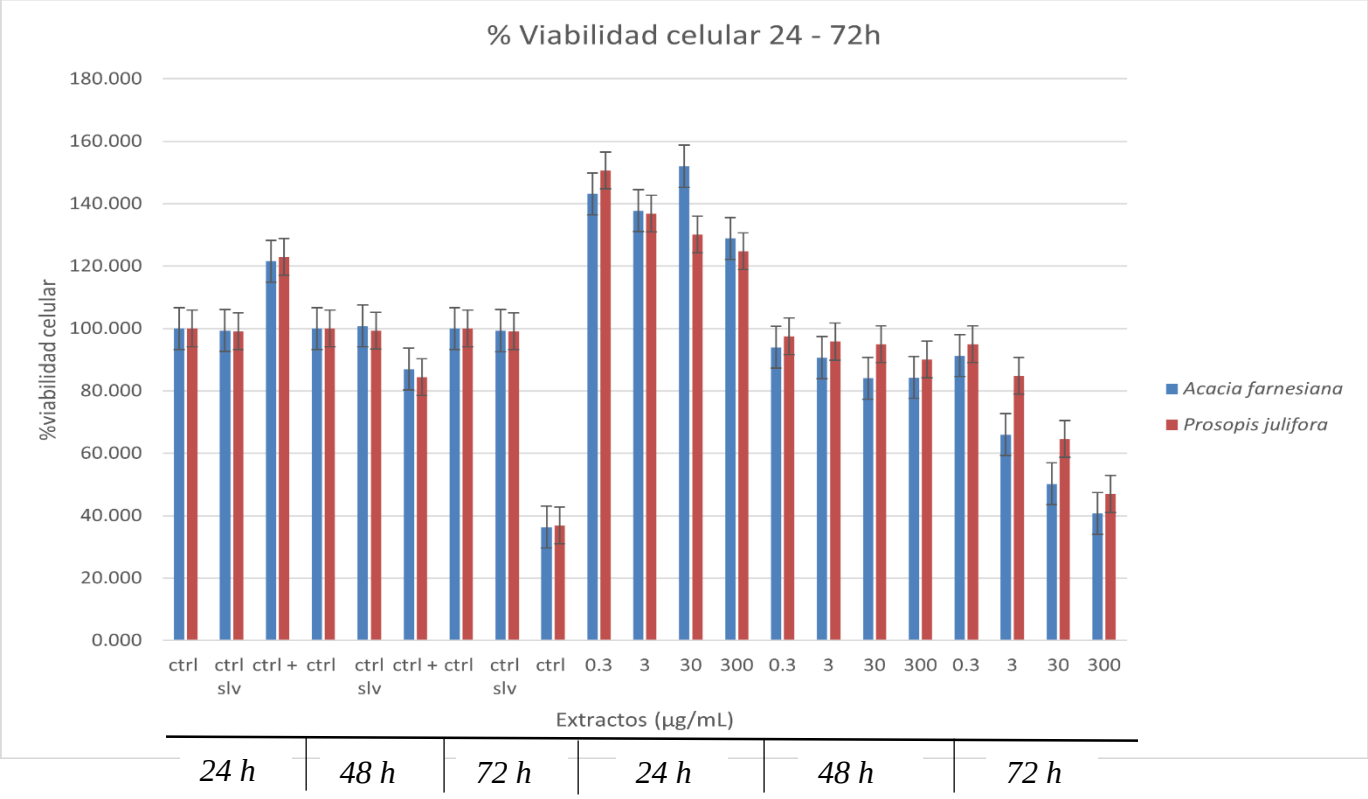


Figura 10. Viabilidad de los cultivos de la línea celular HeLa expuestos a diferentes concentraciones de los extractos de *P. juliflora* y *A. farnesiana*, durante 24, 48 y 72 horas: ctrl: control negativo, ctrlslv: control de solvente, ctrl +: paclitaxel

El aumento en el crecimiento celular en las primeras horas de exposición y con mayor énfasis en los cultivos expuestos a bajas concentraciones de los extractos, puede atribuirse a un efecto llamado hormesis, el cual fue descrito por Mattson (2008). Este se define como una respuesta adaptativa de las células y organismos a un impulso de estrés moderado y en algunos casos intermitente. Algunos ejemplos de este tipo de respuesta se observan mayoritariamente en el pre-condicionamiento isquémico, ejercicio, dietas y restricciones energéticas, así como a tiempos de exposiciones cortos y bajas concentraciones de ciertos fitoquímicos. Como resultado, las células exacerban la producción de agentes citoprotectores y proteínas coadyuvantes para mantener la homeostasis, incluyendo factores de crecimiento, enzimas antioxidantes y proteínas chaperonas (Mattson, 2008). Este mecanismo se puede representar como una curva donde se observa un crecimiento exacerbado en las primeras etapas de la exposición ante la presencia del agente estresante, mientras que al aumentar tanto la dosis como el tiempo de la exposición, el sistema comienza a decaer si el estrés no cesa **(Fig. 11)** (Calabrese et al., 2007). Esto es similar a lo que parece ser el comportamiento que se observa en el presente estudio en las células HeLa expuestas a diferentes dosis de los extractos de *P. juliflora* y *A. farnesiana*.

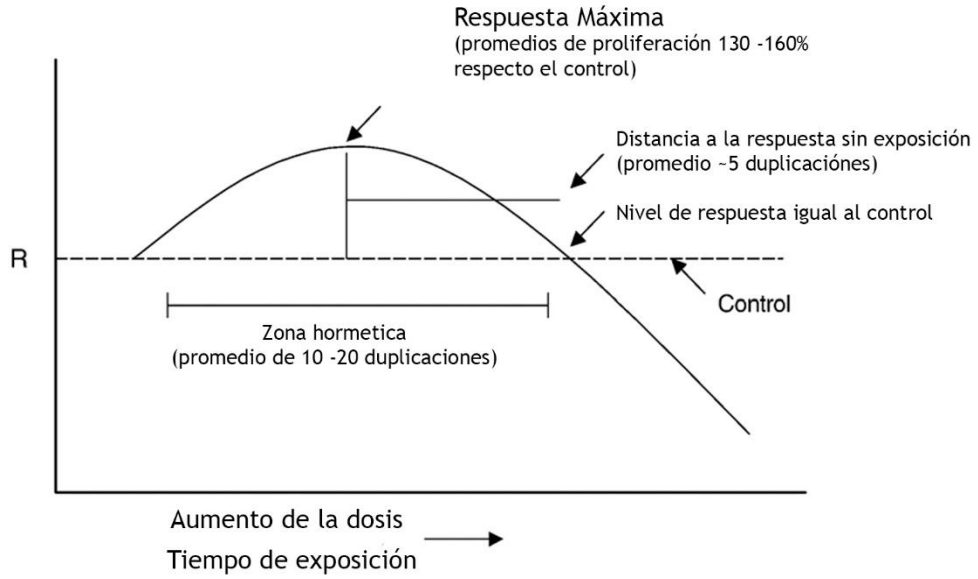


Figura 11. Representación gráfica del fenómeno de hormesis como una respuesta dosis-tiempo dependiente. Tomado de Calabrese et al., (2007)

En el caso del tratamiento control del solvente, se realizó una prueba de T ($p \leq 0.5$). Derivado del análisis, no se detectó diferencia significativa entre los cultivos control y los que contienen el vehículo del extracto, con ello se asegura que el solvente no genera por sí solo, algún efecto sobre la viabilidad celular.

Por otro lado, los cultivos de la línea celular HeLa mostraron un comportamiento dosis dependiente hasta las 72 horas de incubación **(Fig. 12)**. Sorprendentemente, en los resultados del bioensayo celular, no se mantuvo la tendencia observada donde *P. juliflora* mostraba las respuestas significativamente más altas en el contenido de alcaloides totales, por el contrario, los extractos de *A. farnesiana* mostraron un mayor efecto sobre la viabilidad celular. En las concentraciones más altas de los extractos de *A. farnesiana* y bajo 72 h de exposición **(Fig. 13)**, los extractos indujeron una disminución en la viabilidad celular del 60 ± 3.49%. Por su parte, *P. juliflora* disminuyo la población celular en un 54 ± 0.47%, mientras que el paclitaxel mostró una reducción del 65.36 ± 1.16%.

El análisis de la curva se realizó mediante una regresión no lineal, aplicando un modelo de inhibición normalizada, el cuál determinó ($p \leq 0.05$) una IC_{50} para *A. farnesiana.* y *P. juliflora* de 28.08 ± 1.117 µg/mL *y* 52.83 ± 3.9 µg/mL, respectivamente. La IC_{50} mostrada por *A. farnesiana* representa casi la mitad de lo determinado para *P. juliflora,* y al tener un valor menor de 30 µg/mL permite clasificar a este extracto como un activo citotóxico de acuerdo con el criterio propuesto por el NCI (Boyd, 1997).

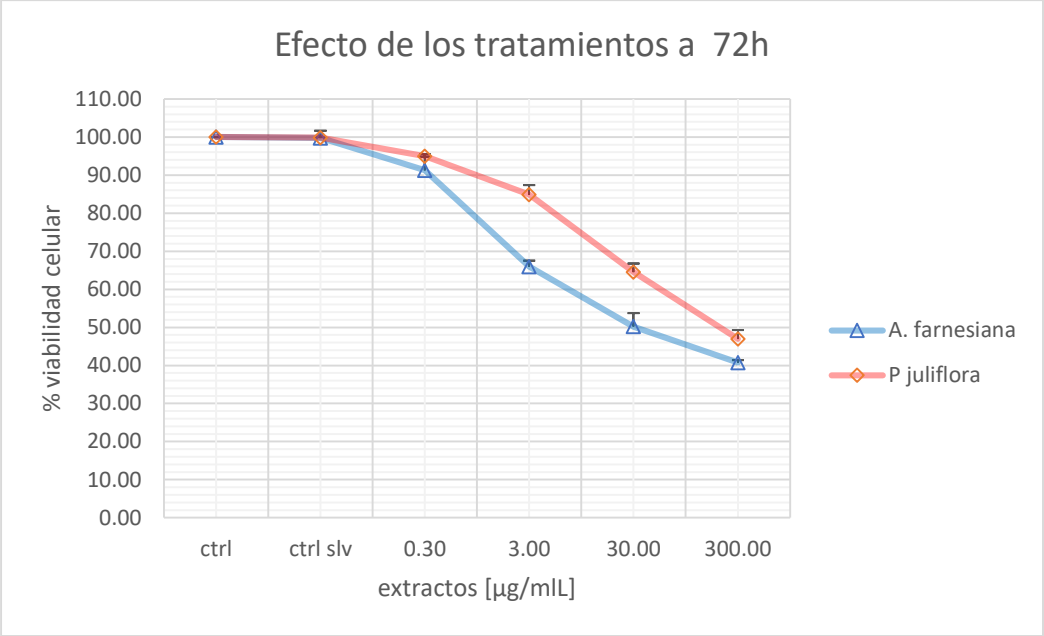


Figura 12. Curva de viabilidad de la línea celular HeLa expuesta a los extractos *P. juliflora* y *A. farnesiana* a las 72 h de cultivo.

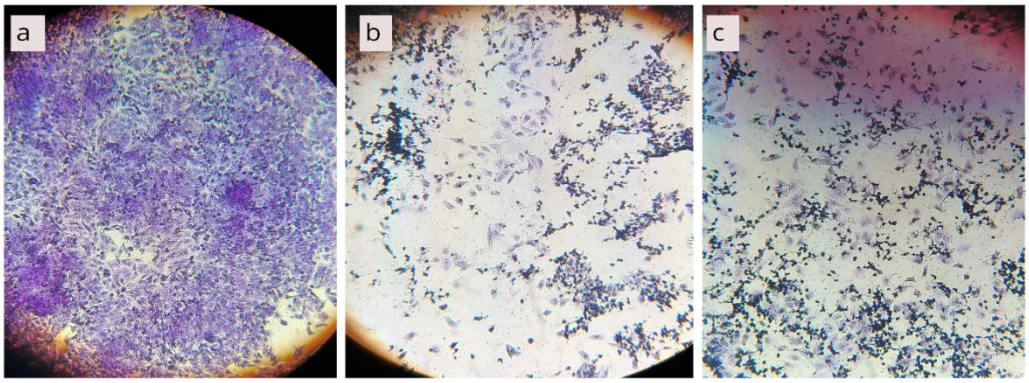


Figura 13. Micrografías (10x) de cultivos celulares expuestos extractos de *A. farnesiana a las 72h*: (a): control - , (b): tratamiento 300 µg/mL, (c): control +

La respuesta que se observa en el presente estudio, respecto al tiempo de exposición es similar a lo reportado por Mani (2016), en un bioensayo con células de leucemia Molt-4, así como también con el trabajo de Gurushidhappa (2018), donde se evalúan extractos de *P. juliflora* en las líneas celulares MCF-7 y HePG2, mostrando una IC_{50} de 18.17 y 33.1 µg/mL, respectivamente, y en el reporte de Eldin (2020), haciendo bioensayos con extractos de *P. juliflora* en la línea celular cancerígena MCF-7, se obtuvo una IC_{50} de 16.8 µg/ mL.

Con respecto a la especie *A. farnesiana,* no existen estudios con condiciones similares, sin embargo, se han evaluado otro tipo de compuestos como los terpenos, *e. g.* farneseno-α,

derivados de extractos de plantas pertenecientes al mismo género que han presentado una IC_{50} desde 1.70 ± 0.04 a 18.84 ± 0.74 µg/mL, en diferentes líneas celulares cancerígenas (Lin et al., 2009). Esto podría explicar la baja concentración de alcaloides y el desempeño observado en los ensayos de viabilidad celular. Sin embargo, en este estudio se emplearon extractos crudos, por lo que resulta difícil afirmar la composición del extracto, y por supuesto, no se tiene ninguna certeza del agente responsable de esta bioactividad.

Así mismo, si bien las células se vieron afectadas en su capacidad de proliferación, en el presente trabajo, no se obtuvo información sobre el mecanismo de muerte celular inducido por la exposición a los extractos. Aunque es posible tener una hipótesis de este mecanismo basado en los estudios anteriores, donde pudieron observar que para los extractos de *P. juliflora* mayoritariamente se presentaba muerte celular por necrosis para células MCF-7 y la apoptosis para HePG2, así mismo observaron un arresto del ciclo celular, principalmente en la fase g2/M, aunque hay que ser cautelosos porque la actividad sobre el ciclo celular es dependiente del tipo celular y del agente (Eldin, 2020).

Conclusiones

Prosopis juliflora fue la planta que mostró mayor contenido de alcaloides con respecto a *Acacia farnesiana*. Siendo las hojas el único tejido que mostró la presencia de alcaloides. Respecto del método de extracción, el propuesto por Statz & Coon tuvo un mayor desempeño en la extracción de alcaloides, siendo de hasta 100 veces más, con respecto al método Acidshake out.

Respecto al bioensayo de viabilidad celular MTT en la línea celular HeLa, los extractos de ambas especies vegetales mostraron citotoxicidad, siendo significativamente mayor la reducción en la viabilidad celular ante el extracto de *A. farnesiana,* determinándose una IC_{50} de 28.08 µg/mL siendo menor a 30 µg/mL, lo que permitiría clasificar el extracto como citotóxico de acuerdo con el criterio del NCI. Por otro lado, si bien la concentración mostrada por *P. juliflora* fue mayor al criterio propuesto por el NCI, es posible considerar a ambas especies como excelentes candidatos para la obtención de agentes quimioterapéuticos. Sin embargo, la interpretación de los resultados debe tomarse con cautela, pues si bien se demostró actividad, aún son necesarios más estudios para la validación de su uso.

Bibliografía

Abbas, Z. (2018). An Overview of Cancer Treatment Modalities. In *Neoplasm* (Vol. 32, Issue tourism, pp. 137–144). https://www.intechopen.com/books/advanced-biometric-technologies/liveness-detection-in-biometrics

Almahy, H. A., & Nasir, O. D. (2007). Phytochemical and Mineral content of the leaves of four Nigerian Pterocarpus species. *Int. J. Mol. Med. Adv. Sci*, *2*(11), 221–226. https://scholar.google.com/scholar?q=Osuagwu+Pterocarpus&btnG=&hl=en&as_sdt=0%2C5#0

Alonso-Castro, A. J., Villarreal, M. L., Salazar-Olivo, L. A., Gomez-Sanchez, M., Dominguez, F., & Garcia-Carranca, A. (2011). Mexican medicinal plants used for cancer treatment: Pharmacological, phytochemical and ethnobotanical studies. *Journal of Ethnopharmacology*, *133*(3), 945–972. https://doi.org/10.1016/j.jep.2010.11.055

Barros Asenjo, S. (2007). El género Acacia, especies multipropósito. *Instituto Forestal Chile*, *5*, 1–26. http://biblioteca.infor.cl/DataFiles/26485.pdf

Bieto, J. A., & Talon, M. (2013). Fundamentos de fisiología vegetal. In *Journal of Chemical Information and Modeling* (Vol. 53, Issue 9). McGraw-hill.

Boyd, M. R. (1997). The NCI In Vitro Anticancer Drug Discovery Screen. *Anticancer Drug Development Guide*, 23–42. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-8152-9_2

Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., & Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, *68*(6), 394–424. https://doi.org/10.3322/caac.21492

Buyel, J. F. (2017). How Plants Can Contribute to the Supply of Anticancer Compounds. In S. Malik (Ed.), *Biotechnology and Production of Anti-Cancer Compounds* (pp. 39–72). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-53880-8_2

Calabrese, E. J., Bachmann, K. A., Bailer, A. J., Bolger, P. M., Borak, J., Cai, L., Cedergreen, N., Cherian, M. G., Chiueh, C. C., Clarkson, T. W., Cook, R. R., Diamond, D. M., Doolittle, D. J., Dorato, M. A., Duke, S. O., Feinendegen, L., Gardner, D. E., Hart, R. W., Hastings, K. L., … Mattson, M. P. (2007). Biological stress response terminology: Integrating the concepts of adaptive response and preconditioning stress within a hormetic dose-response framework. *Toxicology and Applied Pharmacology*, *222*(1), 122–128. https://doi.org/10.1016/j.taap.2007.02.015

Cholich, L. A., Pistán, M. E., Torres, A. M., Ortega, H. H., Gardner, D. R., & Bustillo, S. (2021). Characterization and cytotoxic activity on glial cells of alkaloid-enriched extracts from pods of the plants prosopis flexuosa and prosopis Nigra (Fabaceae). *Revista de Biologia Tropical*, *69*(1), 197–206. https://doi.org/10.15517/RBT.V69I1.43515

Clement, B. A., Goff, C. M., & Forbes, T. D. A. (1998). Toxic amines and alkaloids from Acacia rigidula. *Phytochemistry*, *49*(5), 1377–1380. https://doi.org/10.1016/S0031-9422(97)01022-4

CONABIO. (2021). *Ficha técnica Acacia Farnesiana*. http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/mimosaceae/acacia-farnesiana/fichas

De Cicco, P., Panza, E., Armogida, C., Ercolano, G., Cirino, G., & Ianaro, A. (2018). Current Practices and Awareness of Anticancer Plants in the Traditional Healthcare System. In M. S. Akhtar & M. K. Swamy (Eds.), *Anticancer plants: Properties and Application: Volume 1* (pp. 1–36). Springer Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-10-8548-2_1

Duke, J. A. (2005). Prosopis juliflora DC. *Ecology*, *600*(September), 1–5.

Eldin, S. (2020). Original article : PROSOPIS JULIFLORA LEAVE EXTRACTS INDUCE CELL DEATH. *EXCLI Journal*, 1282–1294.

Evans, C. S. (1991). J. B. Harborne (ED.) Methods in plant biochemistry: 1. plant phenolics. Academic

Press, New York and London, 1990. £65. *Phytochemical Analysis*, *2*(1), 48. https://doi.org/10.1002/pca.2800020110

Fazel, S., Hamidreza, M., Rouhollah, G., & Verdian-Rizi, M. (2010a). Spectrophotometric determination of total alkaloids in some Iranian medicinal plants. *Journal of Applied Horticulture*, *12*(1), 69–70. https://doi.org/10.37855/jah.2010.v12i01.15

Fazel, S., Hamidreza, M., Rouhollah, G., & Verdian-Rizi, M. (2010b). Spectrophotometric determination of total alkaloids in some Iranian medicinal plants. *Journal of Applied Horticulture*, *12*(1), 69–70.

Freshney, R. I. (2010). *CultuFreshney, R. I. (2010). Culture of animal cells : a manual of basic technique and specialized applications. Wiley-Blackwell.re of animal cells : a manual of basic technique and specialized applications*.

Greenwell, M., & Rahman, P. K. S. M. (2015). Medicinal Plants: Their Use in Anticancer Treatment. *International Journal of Pharmacological Science Research*, *6*(10), 4103–4112. https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.6(10).4103-12.Medicinal

Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*, *144*(5), 646–674. https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013

Henciya, S., Seturaman, P., James, A. R., Tsai, Y.-H., Nikam, R., Wu, Y.-C., Dahms, H.-U., & Chang, F. R. (2016). Biopharmaceutical potentials of Prosopis spp. (Mimosaceae, Leguminosa). *Journal of Food and Drug Analysis*, 1–10. https://doi.org/10.1016/j.jfda.2016.11.001

Henciya, S., Seturaman, P., James, A. R., Tsai, Y. H., Nikam, R., Wu, Y. C., Dahms, H. U., & Chang, F. R. (2017). Biopharmaceutical potentials of Prosopis spp. (Mimosaceae, Leguminosa). *Journal of Food and Drug Analysis*, *25*(1), 187–196. https://doi.org/10.1016/j.jfda.2016.11.001

Ian, C. (2013). Cancer cell culture protocols. In *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* (Vol. 731). https://doi.org/10.1039/9781849735414

IARC, I. A. for R. on C. (2016). Cancer Fact Sheets: All Cancers excluding Non-Melanoma Skin Cancer. *Globocan 2012*, 1–10.

INEGI. (2018). “Estadísticas a propósito del... día mundial contra el cáncer (4 de febrero)". *INEGI. México.*, 1–13.

International Agency for Research on. (2020). All cancers factsheet. *World Health Organisationorld*, *419*, 199–200. https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/39-All-cancers-fact-sheet.pdf

Jones, Wi., & Kinghorn, D. (2006). Extraction of plant secondary metabolites. *Drug Discovery Today*, *3*(12), 341–366. https://doi.org/10.1016/s1359-6446(98)01266-5

Keller, W. J. (1983). Introduction to alkaloids–a biogenetic approach. By Geoffrey A. Cordell. Wiley-Interscience, New York, N.Y. 1981. 1055 pp. 17 × 24 cm. Price \$50.00. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, *72*(3), 328. https://doi.org/https://doi.org/10.1002/jps.2600720334

Kirakosyan, A., & Kaufman, peter B. (2007). Recent advances in plant biotechnology. In ***運輸と経済*** (Vol. 67, Issue 6).

Kumar, V., Abbas, A. K., Aster, J. C., & Perkins, J. A. (2015). *Robbins and Cotran pathologic basis of disease*.

Lin, A. S., Lin, C. R., Du, Y. C., Lübken, T., Chiang, M. Y., Chen, I. H., Wu, C. C., Hwang, T. L., Chen, S. L., Yen, M. H., Chang, F. R., & Wu, Y. C. (2009). Acasiane A and B and farnesirane A and B, diterpene derivatives from the roots of Acacia farnesiana. *Planta Medica*, *75*(3), 256–261. https://doi.org/10.1055/s-0028-1112201

Malik, S. (2017). *Biotechnology and Production of Anti- Cancer Compounds* (S. Malik (ed.)). Elsevier Ltd.

Mani, S., & Krishnaswamy, M. (2016). Anti-tumor potential of total alkaloid extract of Prosopis juliflora DC. leaves against Molt-4 cells in vitro. *African Journal of Biotechnology*, *10*(44), 8881–8888. https://doi.org/10.5897/ajb10.875

Mans, D. R. A. (2000). Anti-Cancer Drug Discovery and Development in Brazil: Targeted Plant Collection as a Rational Strategy to Acquire Candidate Anti-Cancer Compounds. *The Oncologist*, *5*(3), 185–198. https://doi.org/10.1634/theoncologist.5-3-185

Mattson, M. P. (2008). Hormesis defined. *Ageing Research Reviews*, *7*(1), 1–7. https://doi.org/10.1016/j.arr.2007.08.007

National Cancer Institute. (2021). *Types of cancer treatment*. https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/types

Pallardy, S. G. (2008). CHAPTER 9 - Nitrogen Metabolism. In S. G. Pallardy (Ed.), *Physiology of Woody Plants (Third Edition)* (Third Edit, pp. 233–254). Academic Press. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-012088765-1.50010-5

Ramli, S., Harada, K., & Ruangrungsi, N. (2011). Antioxidant, Antimicrobial and Cytotoxicity Activities of Acacia farnesiana (L.) Willd. Leaves Ethanolic Extract. *Pharmacognosy Journal*, *3*(23), 50–58. https://doi.org/10.5530/pj.2011.23.8

Reynoso-Noverón, N., & Mohar, A. (2014). El cáncer en México : propuestas para su control. *Salud Publica de Mexico*, *56*(5), 2010–2012.

Sanjay Biradar, S. B. (2013). Qualitative Analysis of Legume Pericarp (Pod Wall) and Seeds of Acacia Farnesiana L. *IOSR Journal of Pharmacy and Biological Sciences*, *6*(3), 43–46. https://doi.org/10.9790/3008-0634346

Sarker, satyajit D. (2006). *natural product isolation* (S. Sarker, Za. Latif, & A. Gray (eds.); second). humana press.

Sathiya, M., & Muthuchelian, K. (2011). Anti-tumor potential of total alkaloid extract of Prosopis juliflora DC. leaves against Molt-4 cells in vitro. *African Journal of Biotechnology*, *10*(44), 8881–8888. https://doi.org/10.5897/AJB10.875

Seigler, D. S. (2003). *Phytochemistry of Acacia — sensu lato*. *31*, 845–873. https://doi.org/10.1016/S0305-1978(03)00082-6

Sharifi-Rad, J., Kobarfard, F., Ata, A., Ayatollahi, S. A., Khosravi-Dehaghi, N., Jugran, A. K., Tomas, M., Capanoglu, E., Matthews, K. R., Popović-Djordjević, J., Kostić, A., Kamiloglu, S., Sharopov, F., Choudhary, M. I., & Martins, N. (2019). Prosopis plant chemical composition and pharmacological attributes: Targeting clinical studies from preclinical evidence. *Biomolecules*, *9*(12). https://doi.org/10.3390/biom9120777

Silva, A. M. M., Silva, A. R., Pinheiro, A. M., Freitas, S. R. V. B., Silva, V. D. A., Souza, C. S., Hughes, J. B., El-Bachá, R. S., Costa, M. F. D., Velozo, E. S., Tardy, M., & Costa, S. L. (2007). Alkaloids from Prosopis juliflora leaves induce glial activation, cytotoxicity and stimulate NO production. *Toxicon*, *49*(5), 601–614. https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2006.07.037

Statz, D., & Coon, F. B. (1976). Preparation of plant extracts for antitumor screening. *Cancer Treatment Reports*, *60*(8), 999—1005. http://europepmc.org/abstract/MED/991158

Taíz, L., & Zeiger, E. (2006). *Fisiología vegetal* (3rd ed., Vol. 1). Universitar jaume.

Torre, L. A., Bray, F., Siegel, R. L., Ferlay, J., Lortet-Tieulent, J., & Jemal, A. (2015). Global cancer statistics, 2012. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, *65*(2), 87–108. https://doi.org/10.3322/caac.21262

Van Meerloo, J., Kaspers, G. J. L., & Cloos, J. (2011). Cell Sensitivity Assays: The MTT Assay. In I. A. Cree (Ed.), *Cancer Cell Culture: Methods and Protocols* (pp. 237–245). Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-080-5_20

Vander Heiden, M. G., Cantley, L. C., & Thompson, C. B. (2009). Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science (New York, N.Y.)*, *324*(5930), 1029–1033. https://doi.org/10.1126/science.1160809

Wang, H. (2014). Plants Against Cancer: A Review on Natural Phytochemicals in Preventing and Treating Cancers and Their Druggability. *Anticancer Agents Med Chem*, *12*(10), 1281–1305.

World Health Organisation. (2021). *Cancer treatment*. https://www.who.int/cancer/treatment/es/