



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO
FACULTAD DE CIENCIAS

Evaluación del efecto de extractos de *Carica papaya* y *Justicia spicigera* sobre la migración y citotoxicidad en dos líneas cancerígenas.

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
LICENCIADO EN BIOTECNOLOGÍA**

P R E S E N T A :

Ailinne Xail De León Cortés



COMITÉ DE TUTORES:

DIRECTORA: PhD. CARLA GARCIA MORALES

ASESORA: DRA. MA DEL CARMEN HERNÁNDEZ JAIMES

El Cerrillo Piedras Blancas, Toluca, Estado de México, marzo de 2025.

ÍNDICE

	Página
Índice de figuras	IV
Índice de tablas	V
Listado de abreviaturas	VI
Nomenclatura	VII
Resumen	VIII
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. El cáncer	1
1.1.1. Leucemias	3
1.1.1.1. Leucemia mieloide crónica	4
1.1.2. Cáncer cervicouterino	5
1.2. Líneas celulares cancerígenas	6
1.2.1. Cultivos celulares <i>in vitro</i>	6
1.2.2. Células K562	7
1.2.3. Células HeLa	8
1.3. Citotoxicidad	9
1.4. Viabilidad células y ensayo MTS	10
1.5. Migración celular y ensayo de cierre de herida	11
1.6. Plantas de interés medicinal	13
1.6.1. Fitoquímicos	13
1.6.1.1. Fenoles y flavonoides	15
1.6.2. <i>Carica papaya</i>	16
1.6.3. <i>Justicia spicigera</i>	17
2. JUSTIFICACIÓN	19
3. OBJETIVOS	19
3.1. Objetivo general	19
3.2. Objetivos particulares	19
4. HIPOTESIS	20
4.1. Hipótesis general	20
4.2. Hipótesis específicas	20

5. MÉTODO.....	21
5.1. Establecimiento de la línea celular K562	21
5.2. Establecimiento de la línea celular HeLa	21
5.3. Establecimiento de la línea celular NIH 3T3.....	21
5.4. Obtención de extractos	21
5.5. Aplicación de extractos	22
5.5.1. Establecimiento del control positivo de muerte.....	22
5.5.2. Células K562	23
5.5.3. Células HeLa y NIH 3T3	23
5.6. Ensayo MTS.....	23
5.7. Ensayo de cierre de herida	24
5.8. Cálculo de área de herida en el software ImageJ	24
5.9. Análisis de resultados	24
6. RESULTADOS	25
6.1. Efecto de los extractos sobre la viabilidad en células NIH 3T3.....	25
6.2. Efecto de los extractos sobre la viabilidad en células K562	27
6.3. Efecto de los extractos sobre la viabilidad en células HeLa.....	30
6.4. Ensayo de cierre de herida para las células NIH 3T3	32
7. DISCUSIÓN	40
7.1. Citotoxicidad y extractos	40
7.1.1. <i>Carica papaya</i>	42
7.1.2. <i>Justicia spicigera</i>	45
7.2. Ensayo de cierre de herida	49
8. CONCLUSIONES.....	50
9. PERSPECTIVAS.....	52
10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54
11. ANEXOS	68

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Metástasis	2
Figura 2. Hematopoyesis.....	3
Figura 3. Células de leucemia mieloide crónica K562.....	7
Figura 4. Células de cáncer cervicouterino HeLa.....	8
Figura 5. Protocolo estándar para el ensayo MTS	11
Figura 6. Pasos para realizar la herida.....	12
Figura 7. Clasificación de los fitoquímicos	14
Figura 8. Estructura química de las clases de flavonoides.....	16
Figura 9. <i>Justicia spicigera</i>	18
Figura 10. Ensayo MTS con extracto etanólico-acuoso de <i>Carica papaya</i> en células NIH-3T3.....	25
Figura 11. Ensayo MTS con extracto acuoso de <i>Carica papaya</i> en células NIH-3T3	26
Figura 12. Ensayo MTS con extracto etanólico-acuoso de <i>Justicia spicigera</i> en células NIH-3T3.....	26
Figura 13. Ensayo MTS con extracto acuoso de <i>Justicia spicigera</i> en células NIH-3T3.....	27
Figura 14. Ensayo MTS con extracto etanólico-acuoso de <i>Carica papaya</i> en células K562.....	28
Figura 15. Ensayo MTS con extracto acuoso de <i>Carica papaya</i> en células K562..	28
Figura 16. Ensayo MTS con extracto etanólico-acuoso de <i>Justicia spicigera</i> en células K562.....	29
Figura 17. Ensayo MTS con extracto acuoso de <i>Justicia spicigera</i> en células K562	29
Figura 18. Ensayo MTS con extracto etanólico-acuoso de <i>Carica papaya</i> en células HeLa.....	30
Figura 19. Ensayo MTS con extracto acuoso de <i>Carica papaya</i> en células HeLa..	31
Figura 20. Ensayo MTS con extracto etanólico-acuoso de <i>Justicia spicigera</i> en células HeLa.....	31
Figura 21. Ensayo MTS con extracto acuoso de <i>Justicia spicigera</i> en células HeLa	32

Figura 22. Ensayo de cierre de herida con extracto etanólico-acuoso de <i>Carica papaya</i> en células NIH-3T3.....	33
Figura 23. Ensayo de cierre de herida con extracto acuoso de <i>Carica papaya</i> en células NIH-3T3.....	33
Figura 24. Ensayo de cierre de herida con extracto etanólico-acuoso de <i>Justicia spicigera</i> en células NIH-3T3	34
Figura 25. Ensayo de cierre de herida con extracto acuoso de <i>Justicia spicigera</i> en células NIH-3T3.....	34
Figura 26. Fotografías del ensayo de cierre de herida con extracto etanólico-acuoso de <i>Carica papaya</i> en células NIH-3T3.....	36
Figura 27. Fotografías del ensayo de cierre de herida con extracto acuoso de <i>Carica papaya</i> en células NIH-3T3.....	37
Figura 28. Fotografías del ensayo de cierre de herida con extracto etanólico-acuoso de <i>Justicia spicigera</i> en células NIH-3T3	38
Figura 29. Fotografías del ensayo de cierre de herida con extracto acuoso de <i>Justicia spicigera</i> en células NIH-3T3	39

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Contenido total de fenoles de los extractos de hoja de <i>Justicia spicigera</i> y <i>Carica papaya</i>	68
Tabla 2. Contenido total de flavonoides de los extractos de hoja de <i>Justicia spicigera</i> y <i>Carica papaya</i>	69
Tabla 3. Actividad antioxidante de los extractos de hoja de <i>Justicia spicigera</i> y <i>Carica papaya</i>	71

Listado de abreviaturas

ADN	Ácido desoxirribonucleico
LMC	Leucemia mieloide crónica
MEC	Matriz extracelular
NIC	Neoplasia intraepitelial cervical
PBS	Buffer Fosfato Salino
pH	Potencial de hidrógeno
PLE	Extracto de hoja de papaya
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SDS	Dodecilsulfato sódico
SFB	Suero Fetal Bovino
TKI	Inhibidores de la tirosina quinasa
VPH	Virus del papiloma humano

Nomenclatura

°C	Grados Celsius
μg	Microgramos
μL	Microlitros
M	Molar
μM	Micromolar
mM	Milimolar
cm	Centímetro
L	Litros
mL	Mililitros
g	Gramos
mg	Miligramos
seg	Segundos
min	Minutos
h	Horas
rpm	Revoluciones por minuto
hz	Hertz

RESUMEN

El cáncer es una enfermedad que se caracteriza por el desarrollo de células anormales que se dividen sin control y tienen la capacidad de infiltrarse y destruir el tejido corporal normal. A menudo, el cáncer tiene la capacidad de propagarse por el cuerpo. El cáncer es una de las principales causas de muerte en el mundo. Entre los tipos de cáncer más comunes se encuentran la leucemia mieloide aguda y el cáncer cervicouterino. Para este trabajo se propuso investigar el efecto citotóxico de los extractos etanólico-acuoso y acuoso de *Carica papaya* y *Justicia Spicigera*, dos plantas con propiedades antioxidantes, en células K562 y HeLa, correspondientes a estos tipos de cáncer. Además, se evaluó el efecto citotóxico de estos mismos extractos en células de fibroblastos NIH 3T3 como un control de comparación entre células de cáncer y células sanas. Para ello, los extractos obtenidos fueron aplicados en tratamientos de 25, 50, 100 y 300µg/mL, e incubados durante 24 y 48 horas para posteriormente interpretar los resultados por medio del ensayo MTS. Para analizar si dichos extractos tienen un efecto sobre la migración en células sanas, se realizó un ensayo de cierre de herida sobre células de fibroblastos NIH 3T3. Los resultados mostraron que los tratamientos con extractos etanólico-acuoso y acuoso de *Carica papaya* no tienen efecto citotóxico significativo sobre ninguna de las líneas celulares evaluadas. Los tratamientos con extracto etanólico-acuoso de *Justicia spicigera* tienen un efecto citotóxico significativo ($p < 0.05$) sobre las células HeLa a las concentraciones de 50, 100 y 300µg/mL luego de 48 horas de tratamiento, mientras que el extracto acuoso de *Justicia spicigera* no mostró efecto citotóxico significativo sobre ninguna de las líneas celulares evaluadas. Además, ninguno de los extractos utilizados mostró efecto citostático, en cambio mostraron efecto de cierre de herida sobre las células de fibroblastos NIH 3T3.

Palabras clave: Cáncer, *Carica papaya*, *Justicia spicigera*, citotóxico, citostático.

ABSTRACT

Cancer is a disease characterized by the development of abnormal cells that divide uncontrollably and can infiltrate and destroy normal body tissue. Cancer often can spread throughout the body. Cancer is one of the leading causes of death in the world. Among the most common types of cancer are acute myeloid leukemia and cervical cancer. Therefore, for this work it was proposed to evaluate the cytotoxic effect of the ethanolic-aqueous and aqueous extracts of *Carica papaya* and *Justicia spicigera*, two plants with antioxidant potential, in K562 and HeLa cells, corresponding to these types of cancer. Furthermore, the cytotoxic effect of these same extracts was evaluated in NIH 3T3 fibroblast cells as a comparison control between cancer cells and healthy cells. To do this, the extracts obtained were applied in treatments of 25, 50, 100 and 300µg/mL, and incubated for 24 and 48 hours to subsequently interpret the results using the MTS assay. To analyze whether these extracts influence migration in healthy cells, a wound healing assay was performed on NIH 3T3 fibroblast cells. The results showed that treatments with ethanolic-aqueous and aqueous extracts of *Carica papaya* do not have a significant cytotoxic effect on any of the cell lines evaluated. Treatments with ethanolic-aqueous extract of *Justicia spicigera* have a significant cytotoxic effect ($p < 0.05$) on HeLa cells at concentrations of 50, 100 and 300µg/mL after 48 hours of treatment, while the aqueous extract of *Justicia spicigera* did not show a significant cytotoxic effect on any of the cell lines evaluated. Furthermore, none of the extracts used showed cytostatic effect, instead they showed wound closure effect on NIH 3T3 fibroblast cells.

Keywords: Cancer, *Carica papaya*, *Justicia spicigera*, cytotoxic, cytostatic.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. El cáncer

El cáncer es una enfermedad en la que algunas células del cuerpo crecen sin control y se propagan a otras partes del cuerpo; se caracteriza por la presencia de células malignas que sufren aceleración del ciclo celular, alteraciones genómicas, crecimiento invasivo, aumento de la movilidad celular, entre otros aspectos (Baba & Câtoi, 2007). Morfológicamente, la célula cancerosa se caracteriza por un núcleo grande de tamaño y forma irregular, los nucléolos son prominentes, el citoplasma es escaso e intensamente coloreado o, por el contrario, pálido. Las mitosis son características de las células malignas. El número de mitosis aumenta, aparecen formas de mitosis atípicas con defectos en el huso mitótico, lo que da como resultado ásteres triples o cuádruples y estructuras asimétricas y formas atípicas de cromosomas. Los cambios nucleares explican la presencia de diferentes clones celulares y anomalías genéticas asociadas a estos cambios (Baba & Câtoi, 2007).

Las células cancerígenas proliferan hasta formar agregados o tumores. Los tumores se clasifican tradicionalmente de cuatro maneras en términos generales: por su ubicación en un tejido, órgano o sistema, luego por el tipo de tejido específico en el que se desarrolla (carcinoma, sarcoma, mieloma múltiple, leucemia o linfoma), por el grado del tumor, lo cual describe la diferenciación de las células del cáncer y su anormalidad, y finalmente por estadio, es decir, el grado de diseminación de este (Carbone, 2020).

La diseminación de las células tumorales e invasión a otros tejidos se conoce como metástasis (figura 1) y depende de varios mecanismos mutados en la célula, por ejemplo, la pérdida de uniones celulares, capacidad de extravasación e invasión, capacidad de renovar uniones, pérdida de inhibición por contacto, entre otras. Esta capacidad de migración se puede evaluar mediante ensayos simples como el de cierre de herida (Wang et al., 2019).

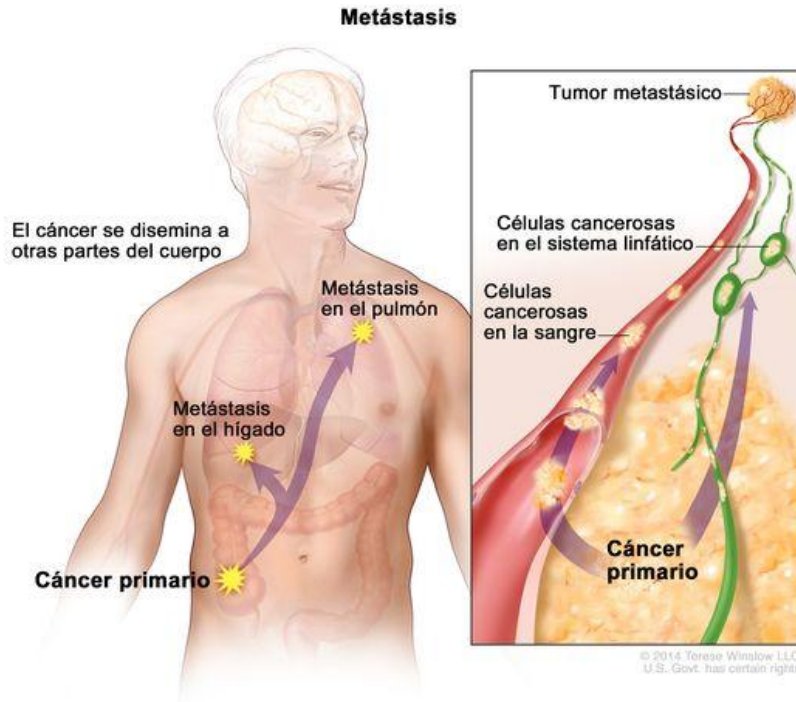


Figura 1. Metástasis: en la metástasis, las células cancerosas se desprenden del tumor original (cáncer primario), viajan a través de la sangre y el sistema linfático, y forman nuevos tumores (tumores metastásicos) en otras partes del cuerpo. El tumor metastásico es el mismo tipo de cáncer que el tumor primario (Instituto Nacional del Cáncer). Imagen tomada de Instituto Nacional del Cáncer.

Los cánceres más comunes (enumerados en orden descendente según los nuevos casos estimados en 2024) son el cáncer de mama, el cáncer de próstata, el cáncer de pulmón y bronquios, el cáncer de colon y recto, el melanoma de piel, el cáncer de vejiga, el cáncer de riñón y pelvis renal, el linfoma no Hodgkin, el cáncer de endometrio, el cáncer de páncreas, la leucemia, el cáncer de tiroides y el cáncer de hígado. En niños, el cáncer más común es la leucemia, que representa alrededor del 52% de los casos de cáncer en menores de 18 años en México (Beltrán et al., 2022). En la mujer, los cánceres que más se diagnostican en México son el de mama y el cervicouterino, y son las dos primeras causas de muerte por neoplasias malignas en mujeres mayores de 25 años (Sánchez et al., 2022).

1.1.1. Leucemias

La hematopoyesis es un proceso altamente regulado por el cual las células madre se diferencian y maduran en eritrocitos, megacariocitos y células inmunes de linaje mieloide, linfoide o monocítico en la médula ósea o los tejidos linfáticos (figura 2). Los errores genéticos, como las translocaciones cromosómicas recíprocas, las deleciones cromosómicas, las mutaciones puntuales y las alteraciones epigenéticas, pueden detener la maduración de las células madre en diferentes etapas de la hematopoyesis, lo que da lugar a la proliferación descontrolada de células inmunes leucémicas inmaduras (Bispo et al., 2020).

La leucemia se refiere a la expansión clonal de células leucémicas en la médula ósea, que clásicamente da como resultado un número elevado de células del linaje afectado en la sangre circulante y, con ciertas neoplasias malignas linfoides, una proliferación celular anormal en el tejido linfático (Hurtado et al., 2012). Se pueden clasificar como agudas o crónicas según la rapidez de proliferación y mieloides o linfoides según la célula de origen. Los subtipos predominantes son la leucemia mieloide aguda (LMA) y la leucemia mieloide crónica (LMC), que afectan al linaje mieloide; la leucemia linfoblástica aguda (LLA); y la leucemia linfocítica crónica (LLC), que afecta a la cadena linfoide. Otras variantes menos comunes, como las leucemias de células B y T maduras, y las leucemias relacionadas con células NK, por nombrar algunas, surgen de los glóbulos blancos maduros (Chennamadhavuni et al., 2023).

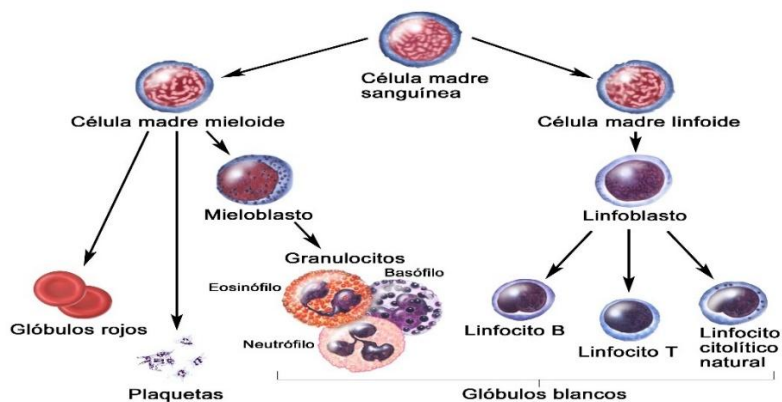


Figura 2. Hematopoyesis. Imagen tomada de Instituto Nacional del Cáncer.

1.1.1.1. Leucemia mieloide crónica

La leucemia mieloide crónica (LMC), BCR-ABL1-positiva, se clasifica como una neoplasia mieloproliferativa compuesta predominantemente por granulocitos proliferantes y que tiene el cromosoma Filadelfia/translocación t(9;22) (q34;q11.2). La LMC afecta tanto la sangre periférica como la médula ósea. Existe una mayor incidencia de LMC entre los sobrevivientes de la bomba atómica; sin embargo, se desconocen los factores de riesgo predisponentes (Eden et al., 2023).

La oncoproteína de fusión BCR-ABL1 define la LMC. Entre el 90% y el 95% de los pacientes con LMC tienen un cromosoma 22 acortado debido a una translocación recíproca t(9;22) (q34;q11.2) llamada cromosoma Filadelfia. El gen ABL1 codifica una tirosina quinasa no receptora en el cromosoma 9, y BCR es una región de grupo de puntos de ruptura en el cromosoma 22 (Meza-Espinoza et al., 2022). La oncoproteína traducida, en la mayoría de los casos, es de 210 kd y se llama p210 BCR-ABL1. El empalme alternativo da como resultado p190 y p230 BCR-ABL1, que pueden mostrar diferentes presentaciones. Esta oncoproteína actúa como una tirosina quinasa defectuosa expresada de forma constitutiva. Las vías descendentes afectadas incluyen JAK/STAT, PI3K/AKT y RAS/MEK; Implican el crecimiento celular, la supervivencia celular, la inhibición de la apoptosis y la activación de factores de transcripción (Faderl et al., 1999).

En México, estas enfermedades se presentan generalmente en pacientes más jóvenes en comparación con los de la población caucásica. Las pruebas de rutina BCR/ABL, disponibles desde 1994 en México, han permitido la verificación molecular del diagnóstico de LMC, el seguimiento de los pacientes y, más recientemente, la elección del tratamiento. El tratamiento con TKI, como imatinib, dasatinib y nilotinib, entre otros, sigue siendo el tratamiento de elección para los pacientes con LMC. Lamentablemente, los tratamientos con TKI son muy costosos, lo que restringe su uso en economías limitadas, que son prevalentes en México (Ruiz, 2016).

1.1.2. Cáncer cervicouterino

El cáncer de cuello uterino es el cuarto cáncer más común entre las mujeres en todo el mundo y es causado casi en su totalidad por el virus del papiloma humano (VPH). La infección por VPH es un paso necesario para la formación de casi todas las lesiones precancerosas y cancerosas. La cepa del VPH que causa la infección también afecta el riesgo. Múltiples subtipos del VPH infectan a los seres humanos; los subtipos 16 y 18 son los que exhiben una relación más estrecha con la formación de una displasia de grado alto y cáncer (Fowler et al., 2023).

La detección temprana incluye pruebas de VPH y pruebas de Papanicolaou. Las pruebas de VPH identifican la exposición a tipos de VPH de bajo y alto riesgo, mientras que las pruebas de Papanicolaou identifican citología anormal. La prevención primaria del cáncer de cuello uterino consiste en la vacunación contra el VPH para prevenir esta enfermedad. La eficacia estimada de la vacunación contra el VPH es del 90 % (Spinner et al., 2019).

El cuello uterino está revestido por epitelio escamoso estratificado que cubre el exocérnix y el epitelio columnar secretor de moco característico del canal endocervical. La transición entre estas dos poblaciones de células se denomina unión escamocolumnar y se cree que es esta área la que corre mayor riesgo de transformación neoplásica viral (Grases et al., 2005). Los tumores que surgen en el exocérnix suelen ser carcinomas de células escamosas, que representan aproximadamente el 75% de los casos de carcinoma cervical invasivo. Por el contrario, los tumores que surgen del endocérnix tienen más probabilidades de ser adenocarcinomas. Los carcinomas de cuello uterino adenoescamosos, de células pequeñas o neuroendocrinos, papilares serosos y de células claras son subtipos histológicos menos comunes (Small et al., 2017).

1.2. Líneas celulares cancerígenas

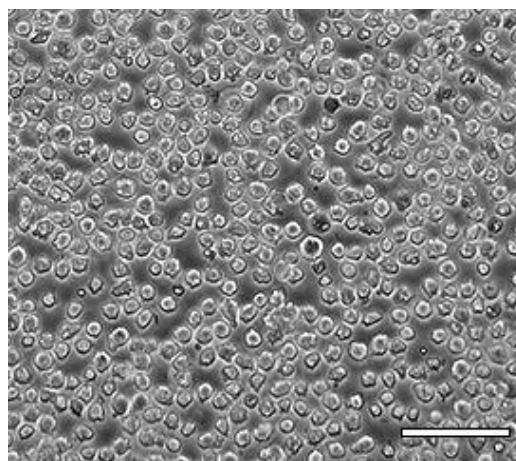
1.2.1. Cultivos celulares *in vitro*

El cultivo celular se refiere a los métodos de laboratorio que permiten el crecimiento de células eucariotas o procariotas en condiciones fisiológicas (figura 3). Su origen se remonta a principios del siglo XX, cuando se introdujo para estudiar el crecimiento y la maduración de los tejidos, la biología de los virus y el desarrollo de vacunas, el papel de los genes en la enfermedad y la salud, y el uso de líneas celulares híbridas a gran escala para generar productos biofarmacéuticos (Santacruz et al., 2017). Las aplicaciones experimentales de las células cultivadas son tan diversas como los tipos de células que se pueden cultivar *in vitro*. Sin embargo, en un contexto clínico, el cultivo celular se vincula más comúnmente a la creación de sistemas modelo que estudian la biología celular básica, replican los mecanismos de las enfermedades o investigan la toxicidad de nuevos compuestos farmacológicos (Segeritz & Vallier, 2017).

Es evidente que el estudio de la actividad celular *in vitro* tiene varias ventajas y desventajas. La principal ventaja es la consistencia y reproducibilidad de los resultados que se pueden obtener al utilizar un lote de células clonales. Los cultivos celulares tienen un alto control del entorno fisicoquímico (es decir, pH, temperatura, presión osmótica, oxígeno y tensión de dióxido de carbono) que se puede controlar con mucha precisión, y el control de las condiciones fisiológicas, que se pueden examinar constantemente (Zhao, 2023). Por otro lado, las principales desventajas del cultivo celular son que requiere personal altamente calificado, las técnicas deben realizarse utilizando estrictas técnicas de asepsia porque las células animales crecen más lentamente que muchos de los contaminantes comunes (por ejemplo, bacterias, virus y hongos). Además, las células animales pueden no sobrevivir cuando están aisladas y, por lo tanto, no son capaces de una existencia independiente y sostenible sin proporcionar un entorno complejo. Una de las principales limitaciones del cultivo celular es el gasto y el esfuerzo que se debe aplicar para obtener una cantidad relativamente baja de células (Arango et al., 2013).

1.2.2. Células K562

Las células de leucemia mieloide, como lo son las células K562 (figura 3), pueden ser un modelo útil para el estudio de este cáncer; estas células tienen una ventaja de crecimiento sobre las células normales. La ventaja de crecimiento se debe a la rápida tasa de proliferación de las células blásticas de la leucemia, ya que estas células en general se dividen más rápidamente que las células sanas. Las células leucémicas se acumulan debido a su incapacidad para madurar hasta convertirse en células terminales funcionales que no se dividen. Dado que la maduración y la proliferación son eventos vinculados, el crecimiento de células leucémicas podría disminuir en gran medida si pudiera inducirse la maduración celular (Hartmann & Metzeler, 2019). La línea K562 está compuesta por células blásticas indiferenciadas con un diámetro de aproximadamente 20 μm que son ricas en glicoforina. Estas células tienen un citoplasma basófilo que no contiene gránulos y hay dos o más nucléolos prominentes. Una característica destacada de la línea celular K562 es la marcada anomalía cariotípica. Estas células tienen casi 1,5 veces el número normal de cromosomas: 70 XXX, -13, -17, +7, +9 (p11), más un pequeño cromosoma metacéntrico, Xp-, 3p-, 9p-, t(15;18) (q21;q23), r(22), o 22q-. Las células tienen un pequeño anillo cromosómico r(22) o retienen el cromosoma Filadelfia (22q-) (Koeffler & Golde, 1980).



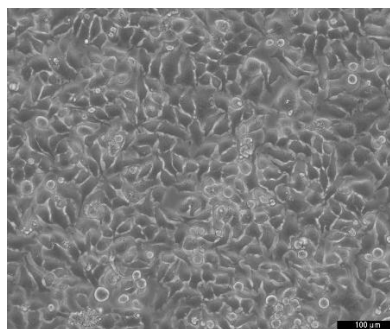
Barra de escala= 100 μm

Figura 3. Células de leucemia mieloide crónica K562. Imagen tomada de la ATCC.

1.2.3. Células HeLa

Las células HeLa (figura 4) fueron la primera línea celular humana establecida; originada de una biopsia de carcinoma cervical de la paciente Henrietta Lacks. A diferencia de una población normal de células humanas, que se dividen de 40 a 50 veces antes de morir, las células HeLa pueden dividirse rápida e indefinidamente (Hsu et al., 1976). El cariotipo de las células humanas normales contiene 46 cromosomas, mientras que las células HeLa tienen de 76 a 80 cromosomas, este cariotipo está asociado con el VPH, VPH18, que es responsable de casi todos los casos de cáncer de cuello uterino. El VPH inserta su ADN en la célula huésped, como resultado, la célula huésped comienza a sintetizar la proteína E6 que se une e inactiva a la proteína p53, conocida como “guardián del genoma” debido a su papel en la prevención de mutaciones y la supresión del tumor. Por lo tanto, la inactivación de la proteína p53 puede tener consecuencias desastrosas (Kochetkov et al., 2007).

Las células HeLa han tenido un impacto significativo en la ciencia y la medicina moderna. Desde su aislamiento en 1951, estas células han revolucionado el estudio de enfermedades. Se han utilizado en más de 70,000 investigaciones en todo el mundo, contribuyendo a importantes avances médicos y terapéuticos, las cuales incluyen la prueba de la vacuna de la polio por Jonas Salk en la década de 1950, descubrimientos cruciales en el estudio del cáncer, el SIDA y otras enfermedades, así como contribuciones al desarrollo de tratamientos médicos y terapias (Arana et al., 2022).



Barra de escala= 100µm

Figura 4. Células de cáncer cervicouterino HeLa. Imagen tomada de Villavicencio et al., 2008.

1.3. Citotoxicidad

Un compuesto es citotóxico cuando daña la subestructura o función de una célula, a menudo provocando la muerte celular, mientras que la toxicidad generalmente se refiere a los efectos dañinos de los compuestos en organismos completos. La citotoxicidad se utiliza para intentar predecir la toxicidad *in vivo* de los compuestos y a menudo se mide en paralelo con las funciones celulares diana del fármaco para medir la especificidad de un compuesto a la hora de afectar la función celular deseada (Dougall & Unitt, 2015). La toxicidad es un evento complejo *in vivo*, donde puede haber daño celular directo, como ocurre con un fármaco anticancerígeno citotóxico, efectos fisiológicos, como el transporte de membrana en el riñón o neurotoxicidad en el cerebro, efectos inflamatorios, tanto en el lugar de aplicación como en otros lugares, y otros efectos sistémicos. Actualmente, es difícil monitorear efectos sistémicos y fisiológicos *in vitro*, por lo que la mayoría de los ensayos determinan efectos citotóxicos a nivel celular. Las definiciones de citotoxicidad varían dependiendo de la naturaleza del estudio y si las células mueren o simplemente tienen su metabolismo alterado (Freshney & Freshney, 2005).

La citotoxicidad es un término simplificado que se utiliza para describir un único efecto tóxico sobre cualquier tipo de célula que puede tener diversos orígenes, incluidas las células endoteliales, epiteliales o mesenquimales; o si se trata de un tipo de célula específico, por ejemplo, el término hemólisis puede utilizarse para describir el impacto citotóxico sobre un glóbulo rojo (Salazar et al., 2022). La citotoxicidad (incluida la hemólisis) es uno de los primeros puntos finales evaluados en el desarrollo de fármacos y proporciona información útil para establecer parámetros experimentales relacionados con la dosis para experimentos farmacológicos *in vitro* (Gould & Templin, 2023). La exposición celular a un compuesto citotóxico puede resultar en varios escenarios dentro de la célula. Para este punto, la célula activa progresivamente la fase de muerte celular, ya sea por medio de la activación de la muerte celular programada (apoptosis) o por medio de necrosis, donde la integridad de la membrana celular o el control de muerte se ven perdidos (Istifli et al., 2019).

1.4. Viabilidad celular y ensayo MTS

La viabilidad celular se define como el número de células sanas en una muestra y la proliferación de células es un indicador vital para comprender los mecanismos de acción de ciertos genes, proteínas y vías involucradas en la supervivencia o muerte celular después de la exposición a agentes tóxicos. Existe una variedad de métodos de ensayo basados en varias funciones celulares. Estos métodos se pueden clasificar en diferentes categorías: métodos de exclusión de colorantes, métodos basados en la actividad metabólica, ensayo de ATP, etc (Huang et al., 2004).

MTS (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio) es una sal de tetrazolio, descrita después de los compuestos MTT y XTT. MTS, en presencia de metosulfato de fenazina (PMS), un agente de acoplamiento electrónico se reduce a cristales de formazán por enzimas reductasas mitocondriales en células vivas (Aysun et al., 2016). Los cristales de formazán reducido son solubles en agua, se disuelven en medio de cultivo celular directamente y eliminan el uso de cualquier solución adicional o paso de lavado. La solución reactiva MTS tiene más estabilidad de almacenamiento en comparación con MTT o compuestos XTT aunque necesita confirmación con observación microscópica. Este ensayo es útil para detectar la viabilidad celular en respuesta a fármacos, varios tipos de citocinas, factores de crecimiento, fármacos citotóxicos y agentes anticancerígenos (Aysun et al., 2016).

El ensayo MTS a menudo se describe como un ensayo MTT de “un solo paso”, que ofrece la comodidad de agregar el reactivo directamente al cultivo celular sin los pasos intermitentes requeridos en el ensayo MTT (Kuetze et al., 2017). En las células viables, las enzimas oxidorreductasas dependientes de NAD(P)H expresadas en las mitocondrias son capaces de convertir el tetrazolio en formazán coloreado, proporcional a la actividad metabólica de las enzimas mitocondriales en las células vivas. La cantidad de formazán producido se puede cuantificar a través de la absorbancia medida por un espectrofotómetro y se utiliza para estimar el número de células. El protocolo estándar para el ensayo MTS es muy simple (figura 5). El reactivo MTS se agrega directamente a las células cultivadas y la absorbancia se mide después de un período definido de incubación (Wang et al., 2021).

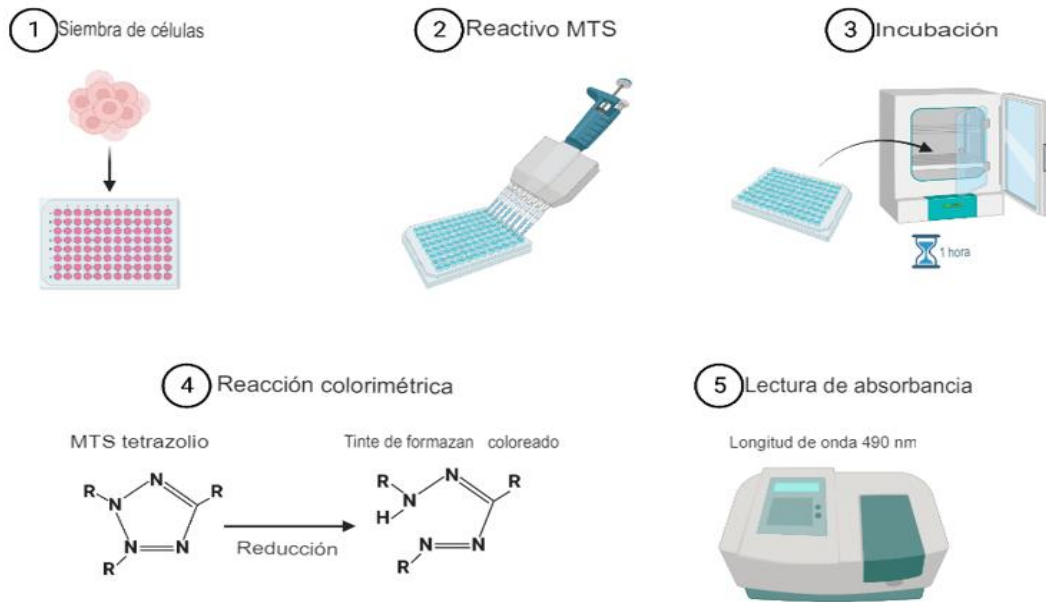


Figura 5. Protocolo estándar para el ensayo MTS. Imagen tomada y traducida de Kong, 2023.

1.5. Migración celular y ensayo de cierre de herida

La migración de células es parte integral de diversos procesos fisiológicos en todas las facetas de la vida. Estos van desde el desarrollo embrionario, la morfogénesis y la cicatrización de heridas hasta la patología de enfermedades como la metástasis del cáncer. Durante estos procesos de migración, las células tienen que navegar a través del espacio extracelular con una amplia variedad de microestructuras y propiedades bioquímicas (Charras y Sahai, 2014). Esta matriz extracelular (MEC) abarca desde superficies 2D, como la membrana basal, hasta entornos 3D complejos, como los tejidos conectivos. Además de proporcionar la estructura que sustenta la integridad del tejido, la MEC funciona como sustrato de unión, medio de señalización y pistas de movimiento, pero al mismo tiempo también puede actuar como una barrera física para las células (Kurniawan et al., 2016).

La importancia de los estudios sobre la migración celular en células de cáncer radica en que es un factor clave para el entendimiento de la metástasis, con ellos pueden determinarse aquellos compuestos que puedan detener la invasión celular (Migliaccio et al., 2023). Por su parte, los fibroblastos desempeñan un papel

fundamental en la cicatrización de heridas. *In vivo* e *in vitro*, los fibroblastos migran hacia las heridas y, en el proceso, las células adquieren señales que les permiten secretar proteínas de la MEC y proliferar. Sin embargo, migran *in vitro* con diferentes velocidades y morfología en comparación con los fibroblastos individuales en cultivos celulares (Trepap et al., 2012).

Los ensayos de cicatrización de heridas son importantes porque pueden ayudar a estudiar los mecanismos moleculares de reparación de heridas y ayudar a desarrollar nuevos tratamientos (González, 2002). También se pueden utilizar para estudiar la migración e interacción celular en una monocapa celular y para detectar fármacos que puedan mejorar la curación. Los ensayos de cicatrización de heridas también son importantes porque son una alternativa sencilla, económica y ética a los modelos animales (Jonkman et al., 2014).

El ensayo de cicatrización de heridas es sencillo, económico y uno de los primeros métodos desarrollados para estudiar la migración celular direccional bidimensional (2D) *in vitro*. Este método imita la migración celular durante la cicatrización de heridas *in vivo*. Los pasos básicos implican crear una "herida" con un objeto afilado, como la punta de una pipeta, en una monocapa de células (figura 6), capturar las imágenes al principio y a intervalos regulares durante la migración celular para cerrar la herida y comparar las imágenes para cuantificar la tasa de migración de las células (Rodríguez et al., 2005). Los métodos más avanzados producen tamaños de herida más controlables con bordes claramente definidos, sin dañar la matriz subyacente (Hernández et al., 2019).

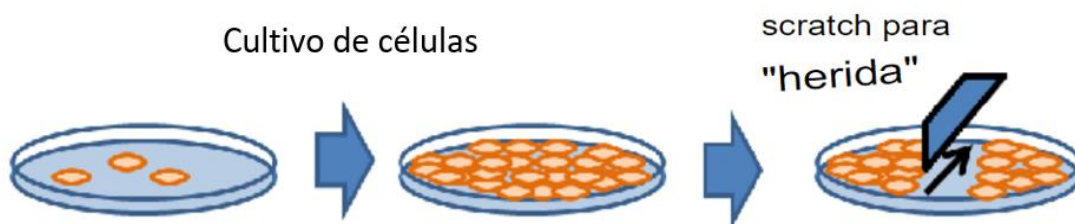


Figura 6. Pasos para realizar la herida. Imagen tomada y traducida de Bise & Kanade., 2010.

1.6. Plantas de interés medicinal

Las plantas medicinales representan la forma más antigua de medicación utilizada desde hace miles de años en la medicina tradicional en muchos países del mundo. El conocimiento empírico sobre sus efectos beneficiosos se transmitió a lo largo de los siglos dentro de las comunidades humanas. La información sobre la selección de las plantas adecuadas, el momento preciso de recolección y el método de producción de medicamentos con su uso detallado se transmitió verbalmente de una generación a otra (García et al., 2012). A finales del siglo XVIII y principios del XIX, con los avances en la química orgánica y la investigación química adecuada, se realizó una investigación sistemática de los mecanismos de los principios bioactivos de las plantas medicinales para la purificación y caracterización después del aislamiento de muchos principios bioactivos a base de hierbas (Marrelli, 2021).

Desde la antigüedad, los seres humanos buscaban remedios en la naturaleza para curar sus enfermedades. El uso de las plantas medicinales fue instintivo, como en el caso de los animales. En vista de que en esa época no había suficiente información sobre las causas de las enfermedades ni sobre qué planta y cómo podía utilizarse como cura, todo se basaba en la experiencia (Petrovska, 2012). Con el tiempo, se fueron descubriendo las razones para el uso de plantas medicinales específicas para el tratamiento de ciertas enfermedades. Los productos naturales desempeñan un papel fundamental como fuente de compuestos farmacológicos y, actualmente, en la farmacoterapia moderna se utilizan varios fármacos modernos derivados de la medicina herbaria tradicional (Chandra et al., 2023).

1.6.1. Fitoquímicos

Los fitoquímicos son componentes bioactivos que están naturalmente presentes en las plantas y su presencia y secreciones varían de una planta a otra. Las clases más predominantes son los terpenoides, polifenoles, constituyentes fenólicos, alcaloides, carotenoides, fitoesteroles, saponinas y fibras (Gasaly et al., 2020). Desempeñan un papel fundamental en la salud humana a través de varias formas

efectivas como propiedades antioxidantes, efecto de diferenciación celular, mantenimiento de la reparación del ADN, aumento de la apoptosis de las células cancerosas, disminución de la proliferación celular, etcétera (Takur et al., 2020).

Muchos de los fitoquímicos como lo son los carotenoides, polifenoles, organosulfuros, alcaloides y derivados presentes en las plantas (figura 7) han demostrado ser opciones prometedoras para mejorar la eficiencia del tratamiento en pacientes con cáncer y disminuir las reacciones adversas. Varios de estos fitoquímicos son compuestos biológicamente activos de origen natural con un importante potencial antitumoral (Drago et al., 2006). El desarrollo de una terapia anticancerígena basada en fitoquímicos eficaz y con un perfil menor de efectos secundarios comienza con la prueba de extractos naturales (de material vegetal seco o húmedo) para determinar la posible actividad biológica anticancerígena, seguido de la purificación de fitoquímicos activos basados en el fraccionamiento guiado por bioensayo y pruebas *in vitro* (Choudhari et al., 2020).

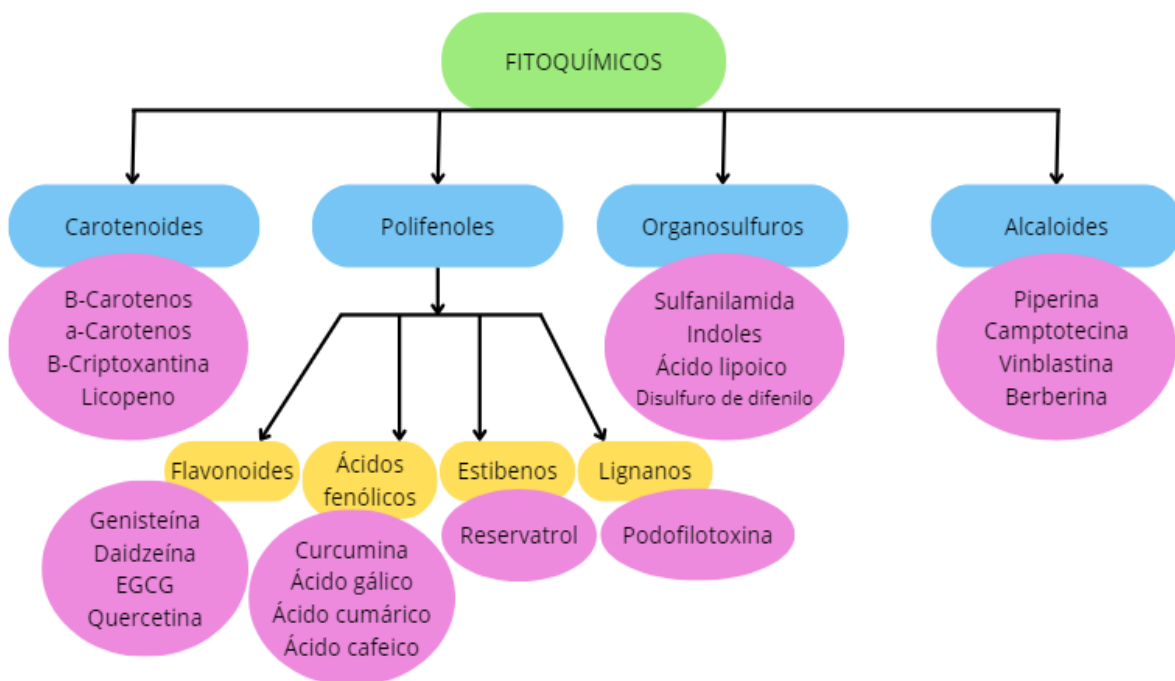


Figura 7. Clasificación de los fitoquímicos. Imagen tomada y traducida de Srivastava et al., 2013.

1.6.1.1. Fenoles y flavonoides

Los compuestos fenólicos son una gran clase de metabolitos secundarios ampliamente distribuidos en varios órganos de las plantas, como verduras, frutas, especias, granos, legumbres y nueces, que desempeñan papeles importantes en diversos procesos fisiológicos como la calidad de la planta, coloración, sabor y resistencia al estrés (Zhang et al., 2022). Las actividades antioxidantes, antimicrobianas, anticancerígenas y antiinflamatorias naturales de los compuestos fenólicos se han convertido en un tema de relevancia en términos de investigación y utilización en la actualidad. Los compuestos fenólicos poseen una estructura química común que comprende un anillo aromático con uno o más sustituyentes hidroxilo que se pueden dividir en varias clases, y los principales grupos de compuestos fenólicos incluyen flavonoides, ácidos fenólicos, taninos, estilbenos y lignanos (Peñarrieta et al., 2014).

Los flavonoides y otros compuestos fenólicos se conocen comúnmente como metabolitos secundarios de las plantas que tienen un anillo aromático que lleva al menos un grupo hidroxilo (figura 8). Se han reportado más de 8000 compuestos fenólicos como sustancias naturales de las plantas (Zhang et al., 2022). Es muy interesante notar que la mitad de estos compuestos fenólicos son flavonoides que se presentan como aglicona, glicósidos y derivados metilados. Estas sustancias fitoquímicas se presentan en nutrientes y medicinas herbales, se ha reportado que tanto los flavonoides como muchos otros componentes fenólicos son antioxidantes efectivos, anticancerígenos, antibacterianos, agentes cardioprotectores, antiinflamatorios, promotores del sistema inmunológico, protectores de la piel de la radiación UV y candidatos interesantes para aplicaciones farmacéuticas y médicas (Tungmunnithum et al., 2018).

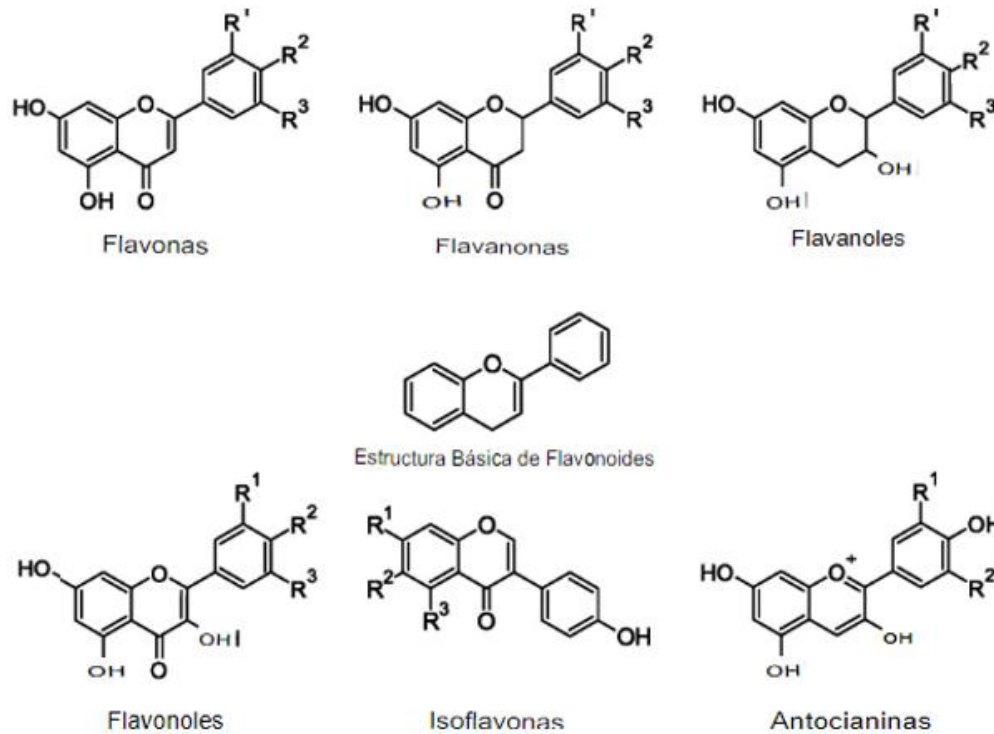


Figura 8. Estructura química de las clases de flavonoides. Imagen tomada y traducida de Mutha et al., 2021.

1.6.2. *Carica papaya*

Carica papaya es una planta herbácea que pertenece a la familia Caricaceae. Las plantas crecen bien en los trópicos y pueden alcanzar hasta 10 m de altura. La planta se ha utilizado como etnomedicina durante décadas en los trópicos y subtropicos, donde se cultiva principalmente. Los motivos terapéuticos para su uso varían, siendo probablemente el más común el antihelmíntico y como agente abortivo potencial (Joachim et al., 2021). Las semillas y las hojas de papaya se han asociado con la mejora de la diabetes mellitus, las complicaciones hepáticas y renales, la fertilidad, la hiperglucemia, la disentería amebiana y, recientemente, actividades antitumorales. Los fitoquímicos se concentran principalmente en las semillas y hojas de papaya, como los flavonoides, los fitoesteroles, los carotenoides, los alcaloides, los compuestos fenólicos y los compuestos cianogénicos (glucosinolato de bencilo) están detrás del poder terapéutico de la planta (Mora & Bogantes, 2004).

Los estudios de las últimas tres décadas han proporcionado información importante sobre las propiedades antitumorales de los extractos de papaya en una serie de células cancerosas, como los preadipocitos humanos (SW872) y las células de carcinoma hepatocelular (HepG2 y Huh-7); macrófagos asociados a tumores, células de cáncer de pulmón humano (H69), células de leucemia (K562), células de leucemia promielocítica aguda (HL-60), células de cáncer de mama (T47D), líneas celulares de cáncer de mama (ER- y Her-2), células pancreáticas de rata, eritrocitos humanos, líneas celulares de cáncer de próstata (CRL-1435, LNCaP, DU145, PC-3) y células epiteliales de próstata (RWPE-1), células de adenocarcinoma de pulmón (PC14), células T (Jurkat, Molt-4, carcinoma cervical) y células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC) (Joachim et al., 2021). Actualmente, se han utilizado varios métodos para la preparación de extracto de hoja de papaya (PLE), los más comunes son extracto acuoso, extracto etanólico y extracto metanólico (Marroquín-Tun et al., 2017). El jugo de hoja de papaya se ha utilizado para la prevención de varias enfermedades, entre ellas se encuentran el dengue, el cáncer y la diabetes (Singh et al., 2020).

1.6.3. *Justicia spicigera*

Una de las plantas con gran potencial como fuente de fitoquímicos es *Justicia spicigera*, conocida como “hierba de la virgen”, “muicle”, “hierba delimalin”, “muhuite”, “expaxihuitl”, entre otras, que pertenece a la familia de las Acanthaceae (figura 9). Se cree que *J. spicigera* es una planta nativa de países de América Latina como Belice, Costa Rica, México, Honduras, entre otros (Fernández et al., 2017). Esta planta se puede cultivar a pleno sol o sombra parcial. Crece preferentemente en climas cálidos, pero también puede soportar temperaturas frías (-3 °C). *J. spicigera* comúnmente alcanza de 60cm a 1.5m de altura y sus hojas pueden alcanzar alrededor de 0,02 m de largo. Esta planta presenta flores de color que varían de rojo a azul oscuro, y ha sido ampliamente utilizada como colorante natural y en la medicina tradicional como antidepresivo y ansiolítico (López & Estrada, 2016).

Kaempferitrina, O-sitosterol-3- β -glucósido, alantoina y criptoxantina son algunos compuestos que se encuentran en *Justicia spicigera* (Velazco-Escobar, 2008). Varios estudios han informado los efectos de los extractos de *J. spicigera* en las líneas celulares de cáncer, incluidas las células de cáncer de próstata, los cuales tienen efectos sobre la proliferación de estas células (Vega et al., 2012). Se ha demostrado que los extractos etanólicos y acuosos de *J. spicigera* ejercen efectos citotóxicos en líneas celulares de cáncer humano de cuello uterino, mama, colon y ovario (por ejemplo, CALO, INBL, HeLa, T47D, MCF-7, SW-480 y SKOV- 3 celdas) y pueden reducir el crecimiento de células tumorales HeLa en un modelo de ratón inmunodeficiente (Fernández et al., 2017).



Figura 9. *Justicia spicigera*. Imagen tomada de Esquivel, 2016.

2. JUSTIFICACIÓN

El cáncer es una enfermedad grave que resulta en la muerte de millones de personas alrededor del mundo, por lo que la investigación dirigida a nuevas terapias contra el cáncer que resulten en beneficios como la atenuación del régimen terapéutico, la elusión a posibles efectos secundarios graves que puedan desarrollar resistencia a tratamientos y la disminución del costo de tratamiento son importantes para los avances en la medicina. Gracias a ensayos *in vitro* sobre citotoxicidad en líneas celulares cancerosas es posible identificar fitoquímicos con propiedades antitumorales. Es por ello que la finalidad de este proyecto es identificar la capacidad citotóxica de dos extractos de *Justicia spicigera* y dos de *Carica papaya* en células cancerígenas, y su posible efecto en la migración de fibroblastos.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general

Evaluar la citotoxicidad de extractos de *Carica papaya* y *Justicia spicigera* sobre las líneas celulares K652 y HeLa, así como su efecto sobre la migración celular en células NIH 3T3.

3.2. Objetivos particulares

- Establecer el cultivo de las líneas celulares K562, HeLa y NIH 3T3.
- Analizar el efecto de la concentración de extractos etanólico-acuoso y acuoso de *Carica papaya* y *Justicia spicigera* sobre la viabilidad de las líneas celulares K562, HeLa y NIH 3T3.
- Evaluar el efecto de la concentración de extractos etanólico-acuoso y acuoso de *Carica papaya* y *Justicia spicigera* sobre la migración celular por el ensayo de cierre de herida en células NIH 3T3.

4. HIPÓTESIS

4.1. Hipótesis general

Los extractos etanólico-acuoso y acuoso de *Carica papaya* y *Justicia spicigera* tienen un efecto citotóxico significativo sobre las células K562 y HeLa en comparación con las células sanas de fibroblastos NIH 3T3.

4.2. Hipótesis específicas

-El extracto etanólico-acuoso de *Carica papaya* y de *Justicia spicigera* presenta un mayor efecto citotóxico en las células K562 y HeLa en comparación con el extracto acuoso.

-Los extractos de *Carica papaya* y *Justicia spicigera* no tienen un efecto citotóxico sobre las células de fibroblastos NIH 3T3, lo que indica una selectividad hacia las células cancerosas.

-Los tratamientos con extractos etanólico-acuoso y acuoso de *Carica papaya* y *Justicia spicigera* no afectan la migración de las células de fibroblastos NIH 3T3 en el ensayo de cierre de herida.

5. MÉTODO

5.1. Establecimiento de la línea celular K562

Las células de esta línea fueron almacenadas en ultracongelación a -80°C . Luego de descongelarse, se expandieron a una confluencia no mayor de 2×10^6 células/mL. Las células se mantuvieron en medio RPMI 1640 suplementado con SFB al 10% más una solución de penicilina/estreptomicina al 1%, preparada como una solución de 50.5 mL (45 mL de medio, 5 mL de SFB, y 500 μL de antibiótico), y crecidas en condiciones estándar a 37°C y con 5% de CO_2 (Lozzio & Lozzio, 1975).

5.2. Establecimiento de la línea celular HeLa

Las células de esta línea fueron almacenadas en ultracongelación a -80°C . Luego de descongelarse, se expandieron a una confluencia no mayor de 1×10^6 células/mL. Las células se mantuvieron en medio Eagle modificado de Dulbecco suplementado con SFB al 10% más una solución de penicilina/estreptomicina al 1%, preparada como una solución de 50.5 mL (45 mL de medio, 5 mL de SFB, y 500 μL de antibiótico), y crecidas en condiciones estándar a 37°C y con 5% de CO_2 (Horoszewics et al., 1983).

5.3. Establecimiento de la línea celular NIH 3T3

Las células de esta línea fueron almacenadas en ultracongelación a -80°C . Luego de descongelarse, se expandieron a una confluencia no mayor de 1×10^6 células/mL. Las células se mantuvieron en medio DMEM alto en glucosa suplementado con SFB al 10% más una solución de penicilina/estreptomicina al 1%, preparada como una solución de 50.5 mL (45 mL de medio, 5 mL de SFB, y 500 μL de antibiótico), y crecidas en condiciones estándar a 37°C y con 5% de CO_2 (Lozzio & Lozzio, 1975).

5.4. Obtención de extractos

Los extractos etanólico-acuoso y acuoso de *Carica papaya* y *Justicia spicigera* fueron obtenidos y caracterizados para el proyecto de maestría de la alumna Olivia Mena Neve dentro de la Universidad Autónoma del Estado de México. Para ello, las

hojas, el tallo de la hoja y peciolo de *Carica papaya* y *Justicia spicigera* fueron almacenadas en ultracongelación durante 24h, posteriormente se liofilizaron en frío y al vacío, al terminar este proceso, las partes de las plantas se molieron en mortero y se agregó 1g de masa en 15mL de agua con 15mL de etanol para el caso de la solución 50:50 etanólico-acuosa (proporción volumen/ volumen), mientras que para la solución acuosa se agregó 1g de masa en 30mL de agua. Luego, las soluciones se agitaron durante 1h repitiendo este paso, posteriormente las soluciones fueron tratadas en baño ultrasónico a 40 kHz durante 40 min. Luego de filtrar las soluciones, la masa obtenida se colocó en un rotavapor para eliminar el etanol. Con la finalidad de maximizar la obtención de extractos, la masa obtenida se almacenó en frascos de vidrio con una tapa de aluminio agujerada y se liofilizó durante 24 horas. Para el almacenamiento de los extractos se cubrió totalmente el frasco con aluminio sin permitir la exposición a la luz. Para la cuantificación de los fenoles totales se empleó el método de Folin-Ciocalteu descrito por Singleton *et al.*, 1965. El método utilizado para la determinación de flavonoides totales fue el de reactividad diferencial del tricloruro de aluminio (Christ & Muller, 1960). Así mismo, se determinó la actividad antioxidante de los extractos por los métodos DPPH y ABTS, descritos junto con los resultados obtenidos en la sección de anexos (Blois, 1998).

5.5. Aplicación de extractos

5.5.1. Establecimiento del control positivo de muerte

Basado en la literatura, se probaron distintas concentraciones de SDS (0.1, 1, 2, 5 y 10%) en medio de cultivo para determinar la concentración que induce la muerte celular del 100% en todos los tipos celulares utilizados en este trabajo (Sæbo *et al.*, 2023). Se determinó que para las células K562 todas las concentraciones probadas indujeron al 100% la muerte celular, mientras que para las células HeLa y NIH 3T3 únicamente la concentración de 10% SDS indujo la muerte celular al 100%, por lo tanto, se utilizó esta última como control positivo de muerte celular para todas las líneas celulares.

5.5.2. Células K562

En 100 μL de medio, se sembraron 2×10^4 células por pocillo en una placa de 96 pozos. Durante un período de 24 y 48 horas, las células fueron tratadas con los extractos acuoso y etanólico-acuoso previamente obtenidos y caracterizados en el proyecto de maestría de la alumna Olivia Mena Neve en dosis de 300, 100, 50 y $25 \mu\text{g}/\text{mL}$. Como control positivo de muerte celular se utilizó 10% SDS. Las células fueron almacenadas bajo incubación a 37°C y 5% de CO_2 , renovando el medio de cultivo cada 24 horas. Este ensayo se realizó por triplicado.

5.5.3. Células HeLa y NIH 3T3

En 100 μL de medio, se sembraron 4×10^3 células por pocillo en una placa de 96 pozos y se dejaron adherirse 24 horas. Durante un período de 24 y 48 horas, las células fueron tratadas con los extractos acuoso y etanólico-acuoso previamente obtenidos y caracterizados en el proyecto de maestría de la alumna Olivia Mena Neve en dosis de 300, 100, 50 y $25 \mu\text{g}/\text{mL}$. Como control positivo de muerte celular se utilizó 10% SDS. Las células fueron almacenadas bajo incubación a 37°C y 5% de CO_2 , renovando el medio de cultivo cada 24 horas. Este ensayo se realizó por triplicado.

5.6. Ensayo MTS

Una vez concluido el tiempo de cultivo con cada extracto se realizó el ensayo de citotoxicidad MTS añadiendo 20 μL de CellTiter 96® AQueous One Solution Reagent formulado por Promega (5 mg/mL) previamente preparada (50 μL de solución PMS en 1 mL de solución MTS) en 100 μL de medio directamente a los pocillos de cultivo, incubando durante 1h a 37°C , luego se registró la absorbancia medida a 490nm con un lector de placas. La cantidad de producto de formazán medida por la cantidad de absorbancia de 490 nm es directamente proporcional al número de células vivas en cultivo.

5.7. Ensayo de cierre de herida

Las células adherentes NIH 3T3 también fueron cultivadas en placas de 24 pozos hasta una confluencia del 90% para realizar el ensayo de cierre de herida, una vez alcanzada la confluencia se realizó una herida utilizando una punta de micropipeta de 10 μ L, posteriormente se retiró el medio y se realizó un lavado a cada pozo con solución PBS para después reemplazar por medio con extractos acuoso y etanólico-acuoso (v/v) previamente obtenidos y caracterizados en el proyecto de maestría de la alumna Olivia Mena Neve dentro en dosis de 300, 100 y 50 μ g/mL. Para el control de este ensayo se utilizó únicamente medio de cultivo. Este ensayo se realizó por triplicado. Se fotografiaron las células a las 0h de realizarse la herida y a las 24h posteriores bajo microscopía óptica y con ayuda del software ImageJ se calculó el área de herida. Todas las fotografías fueron tomadas en el mismo punto con la finalidad de hacer un cálculo exacto de la herida luego de 24 horas.

5.8. Cálculo de área de herida en el software ImageJ

El software y la herramienta “wound healing” fueron obtenidos de los siguientes links: <https://imagej.net/software/fiji/> y [Inicio·AlejandraArnedo/Herramienta de cicatrización de heridas Wiki · GitHub \(en inglés\)](#) (Arnedo, 2021). Luego de la instalación del software, las imágenes a analizar se abrieron en el programa dando click en File/Open, posteriormente se abrió la herramienta Wound Healing dando click en Plugings/Macros/Instal abriendo el archivo wound healing en formato .ijm dentro de la carpeta con el mismo nombre. Finalmente se utilizaron los íconos en la parte superior derecha para después seleccionar el área de herida a calcular.

5.9. Análisis de resultados

Los resultados representan la media \pm la desviación estándar (DE) de un experimento por triplicado. Indicando diferencias significativas según la prueba ANOVA ($p \leq 0.05$), seguida de una prueba de Tukey. Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software GraphPad Prism10. Para asegurar la viabilidad y la consistencia de los resultados, se emplearon células con un número de pases inferior a 10 en todos los experimentos.

6. RESULTADOS

6.1. Efecto de los extractos sobre la viabilidad en células NIH 3T3

Los extractos etanólico-acuoso y acuoso de *Carica papaya* y *Justicia spicigera* no mostraron tener efecto citotóxico bajo ninguna de las concentraciones propuestas ($p > 0.05$ para todas las comparaciones) sobre las células de fibroblastos NIH 3T3 comparado con el control no tratado y mostraron incremento en la densidad celular a 24 y 48 horas de tratamiento (figuras 10, 11, 12 y 13).

MTS con extracto etanólico-acuoso de *C. papaya* en células NIH 3T3

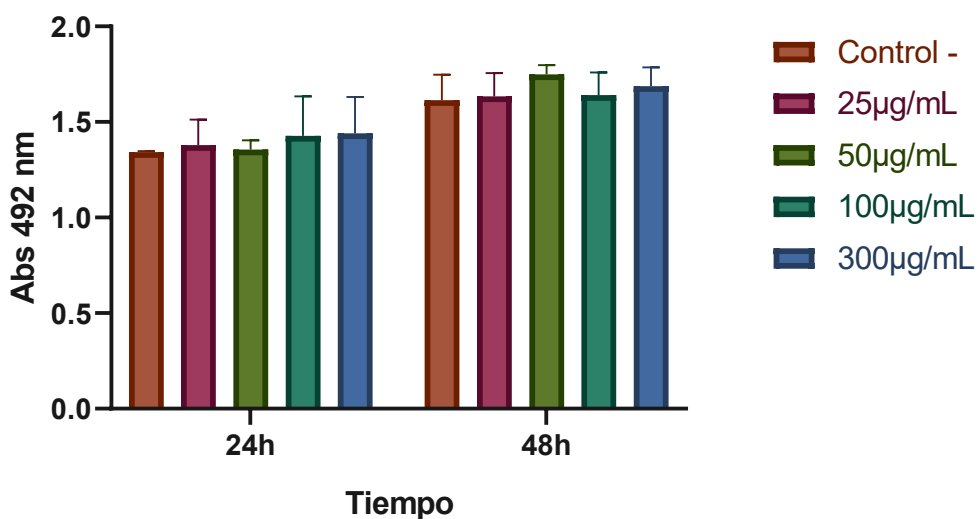


Figura 10. Ensayo MTS con extracto etanólico-acuoso de *Carica papaya* en células NIH-3T3. Valor $p=0.771$.

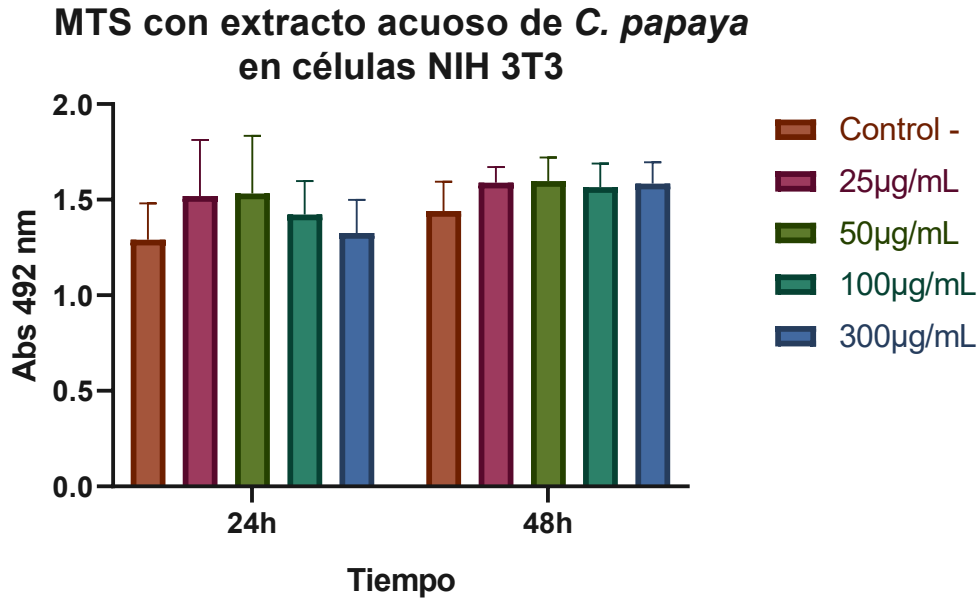


Figura 11. Ensayo MTS con extracto acuoso de *Carica papaya* en células NIH-3T3. Valor $p=0.896$.

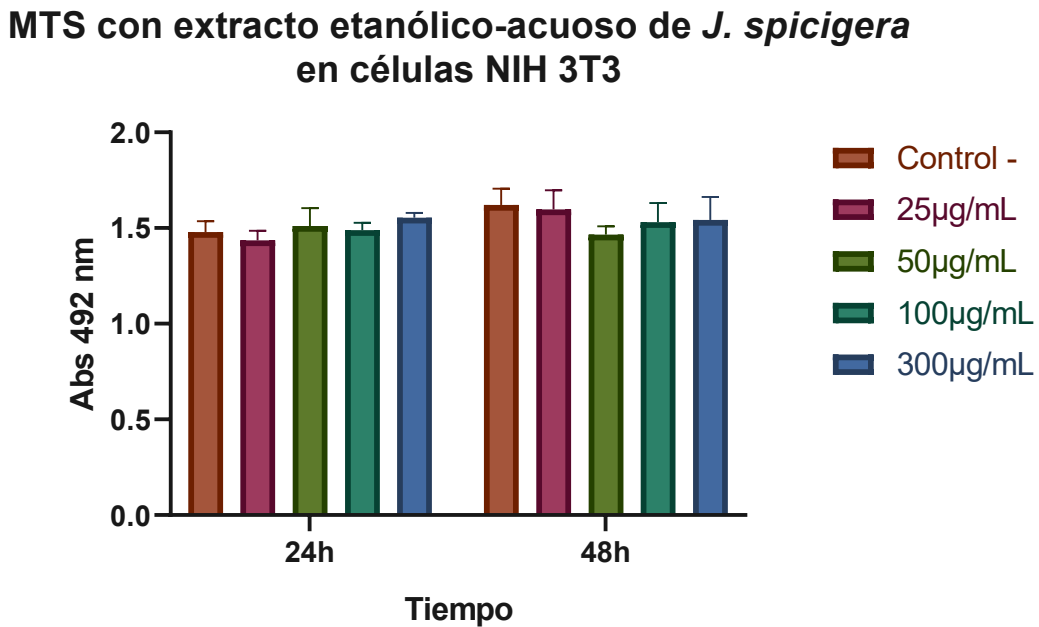


Figura 12. Ensayo MTS con extracto etanólico-acuoso de *Justicia spicigera* en células NIH-3T3. Valor $p=0.124$.

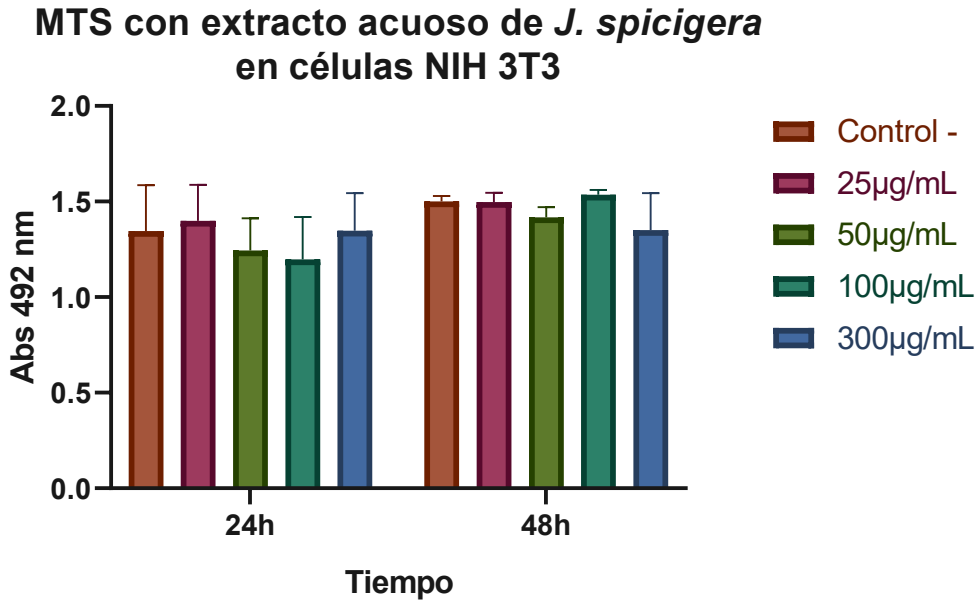


Figura 13. Ensayo MTS con extracto acuoso de *Justicia spicigera* en células NIH-3T3. Valor $p=0.493$.

6.2. Efecto de los extractos sobre la viabilidad en células K562

El extracto etanólico-acuoso de *Carica papaya* no mostró diferencias notables en la citotoxicidad sobre células K562 a diferentes concentraciones (25, 50, 100 y 300 µg/mL) y tiempos (24 y 48 horas), según se observa en la gráfica (figura 14). Sin embargo, el análisis estadístico reveló una diferencia significativa ($p < 0.05$), sugiriendo un efecto sutil que no es fácilmente apreciable visualmente, además mostró proliferación celular a partir de las 48 horas de tratamiento a las concentraciones de 50, 100 y 300 µg/mL. El extracto etanólico-acuoso de *Justicia spicigera* no mostró efecto citotóxico significativo sobre las células K562 desde la concentración más baja y hasta la más alta luego de 24 y 48 horas de tratamiento ($p > 0.05$) (figura 16). Por otra parte, los extractos acuosos de *Carica papaya* y *Justicia spicigera* tampoco mostraron tener efecto citotóxico significativo sobre las células K562 bajo ninguna de las concentraciones propuestas ($p > 0.05$) a ningún tiempo de incubación (figuras 15 y 17).

MTS con extracto etanólico-acuoso de *C. papaya* en células K562

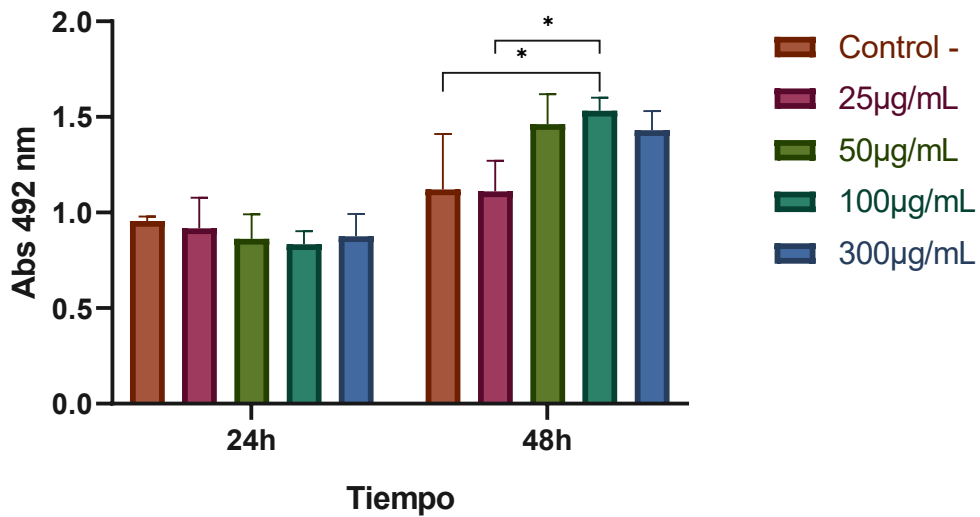


Figura 14. Ensayo MTS con extracto etanólico-acuoso de *Carica papaya* en células K562. Los asteriscos (*) indican diferencia estadística significativa (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$). Valor $p = 0.011$.

MTS con extracto acuoso de *C. papaya* en células K562

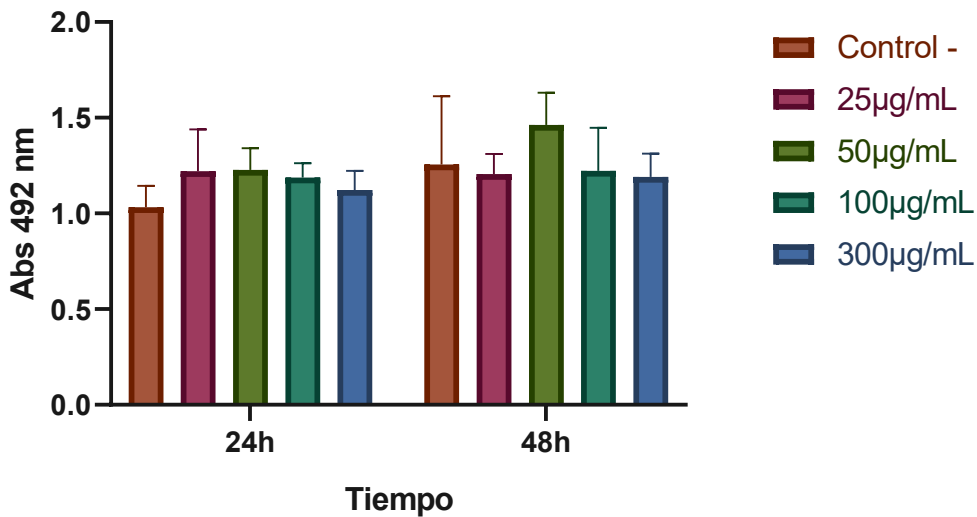


Figura 15. Ensayo MTS con extracto acuoso de *Carica papaya* en células K562. Valor $p = 0.663$.

MTS con extracto etanólico-acuoso de *J. spicigera* en células K562

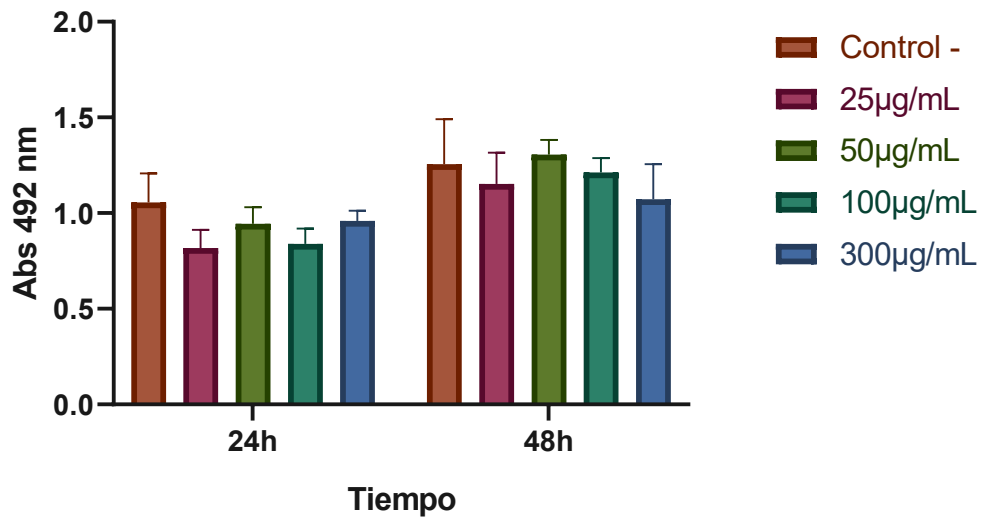


Figura 16. Ensayo MTS con extracto etanólico-acuoso de *Justicia spicigera* en células K562. Valor $p=0.377$.

MTS con extracto acuoso de *J. spicigera* en células K562

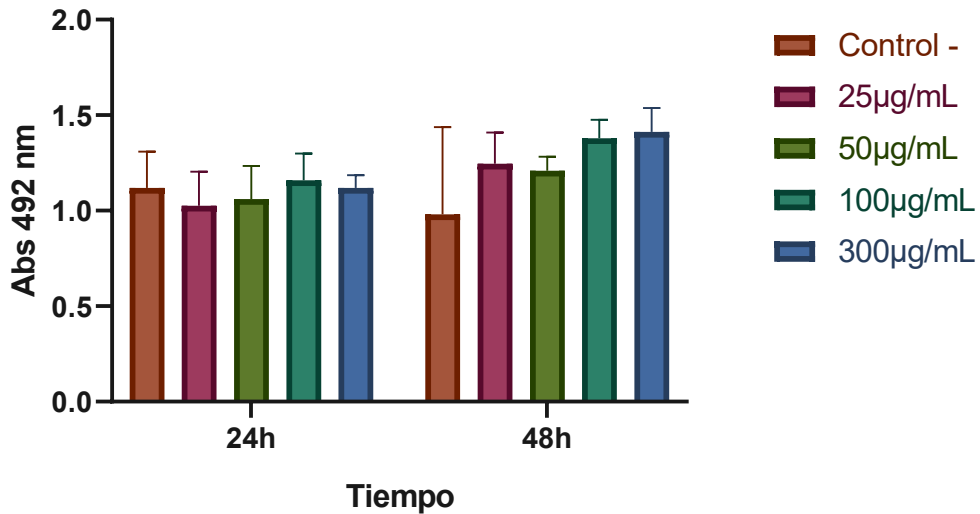


Figura 17. Ensayo MTS con extracto acuoso de *Justicia spicigera* en células K562. Valor $p=0.390$.

6.3. Efecto de los extractos sobre la viabilidad en células HeLa

Los ensayos biológicos realizados con extractos etanólico-acuoso y acuoso de *Carica papaya* no mostraron tener efecto citotóxico sobre las células HeLa bajo ninguna de las concentraciones propuestas a ningún tiempo de incubación con los extractos ($p > 0.05$) (figuras 18 y 19). El extracto etanólico-acuoso de *Justicia spicigera* a las concentraciones de 50, 100 y 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ mostró tener efecto citotóxico sobre las células HeLa únicamente después de 48 horas de tratamiento ($p < 0.05$), con un efecto directamente proporcional a la concentración utilizada, mientras que el extracto acuoso de *Justicia spicigera* no mostró un efecto citotóxico significativo para ninguna de las concentraciones utilizadas a ningún tiempo propuesto de incubación con los extractos ($p > 0.05$) sobre estas células (figuras 20 y 21).

MTS con extracto etanólico-acuoso de *C. papaya* en células HeLa

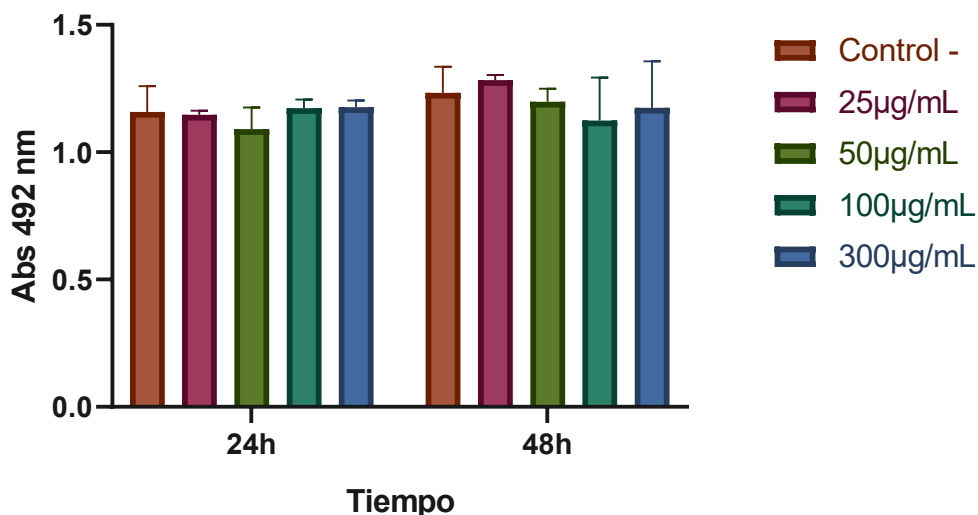


Figura 18. Ensayo MTS con extracto etanólico-acuoso de *Carica papaya* en células HeLa. Valor $p=0.457$.

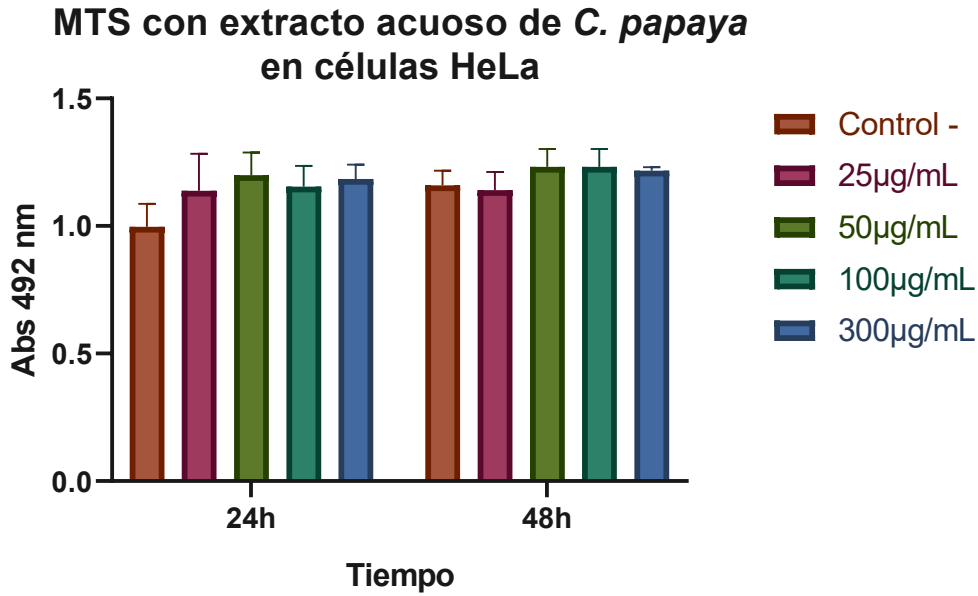


Figura 19. Ensayo MTS con extracto acuoso de *Carica papaya* en células HeLa. Valor $p=0.486$.

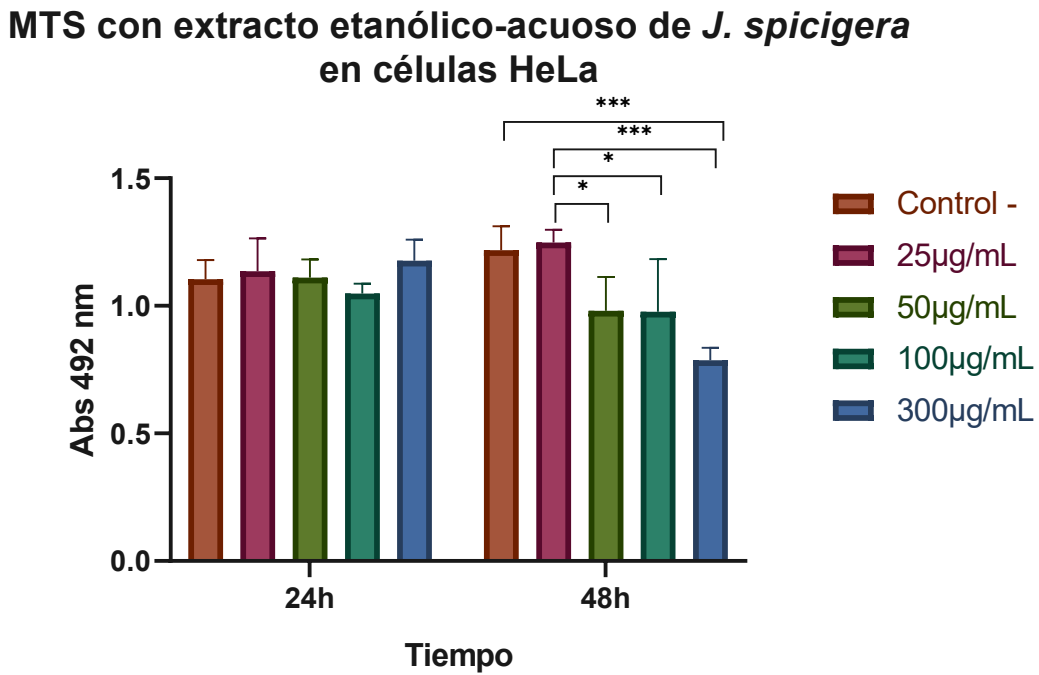


Figura 20. Ensayo MTS con extracto etanólico-acuoso de *Justicia spicigera* en células HeLa. Los asteriscos (*) indican diferencia estadística significativa (* $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$). Valor $p=0.003$.

MTS con extracto acuoso de *J. spicigera* en células HeLa

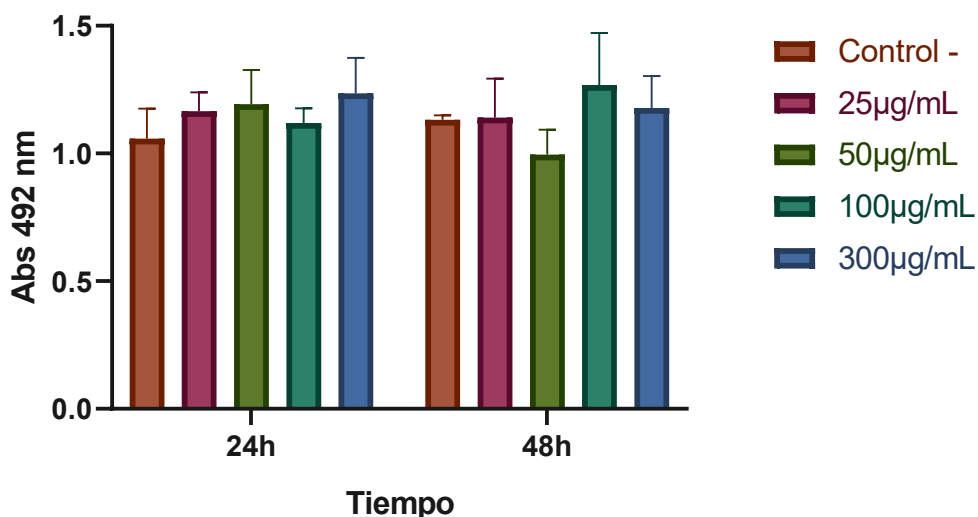


Figura 21. Ensayo MTS con extracto acuoso de *Justicia spicigera* en células HeLa. Valor $p=0.180$.

6.4. Ensayo de cierre de herida para las células NIH 3T3

Los ensayos biológicos realizados con extracto etanólico-acuoso y acuoso de *Carica papaya* y *Justicia spicigera* no detuvieron la migración celular en células de fibroblastos NIH 3T3 bajo ninguna de las concentraciones propuestas (50, 100 y 300µg/mL) y mostraron incremento en la densidad celular a las 24 horas de aplicar los extractos ($p > 0.05$ para todas las comparaciones), determinado por el incremento del área cubierta por células (figuras 22, 23, 24 y 25).

Ensayo de cierre de herida con extracto etanólico-acuoso de *C.papaya* en células NIH 3T3

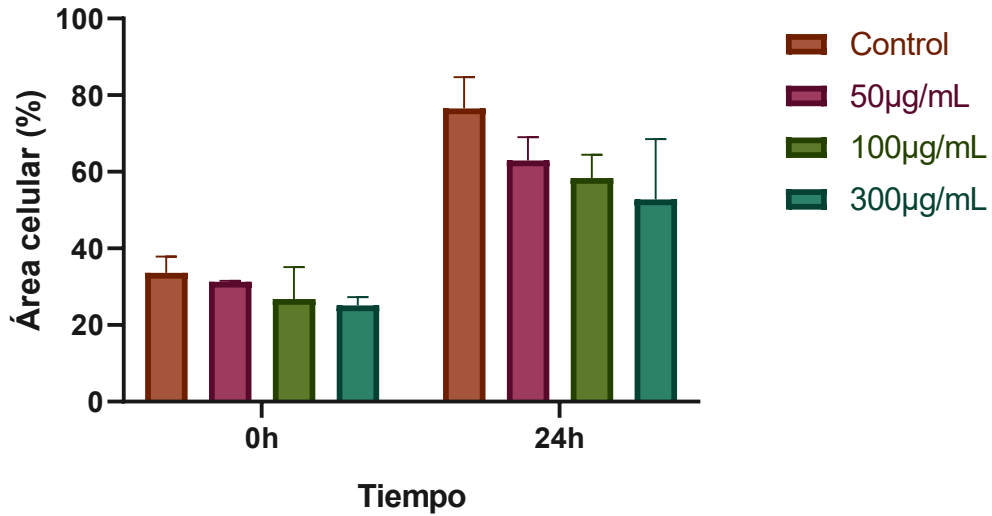


Figura 22. Ensayo de cierre de herida con extracto etanólico-acuoso de *Carica papaya* en células NIH. Valor $p=0.385$.

Ensayo de cierre de herida con extracto acuoso de *C.papaya* en células NIH 3T3

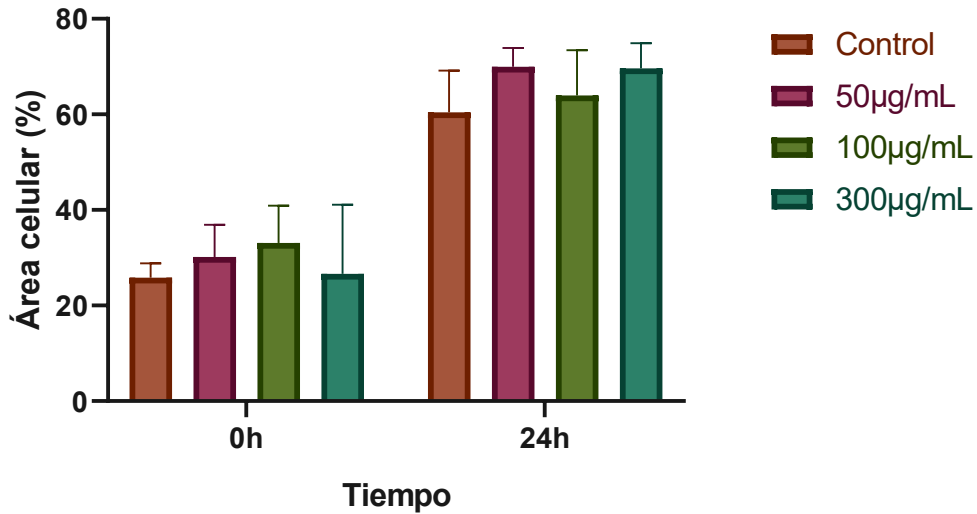


Figura 23. Ensayo de cierre de herida con extracto acuoso de *Carica papaya* en células NIH. Valor $p=0.596$.

Ensayo de cierre de herida con extracto etanólico-acuoso de *J. spicigera* en células NIH 3T3

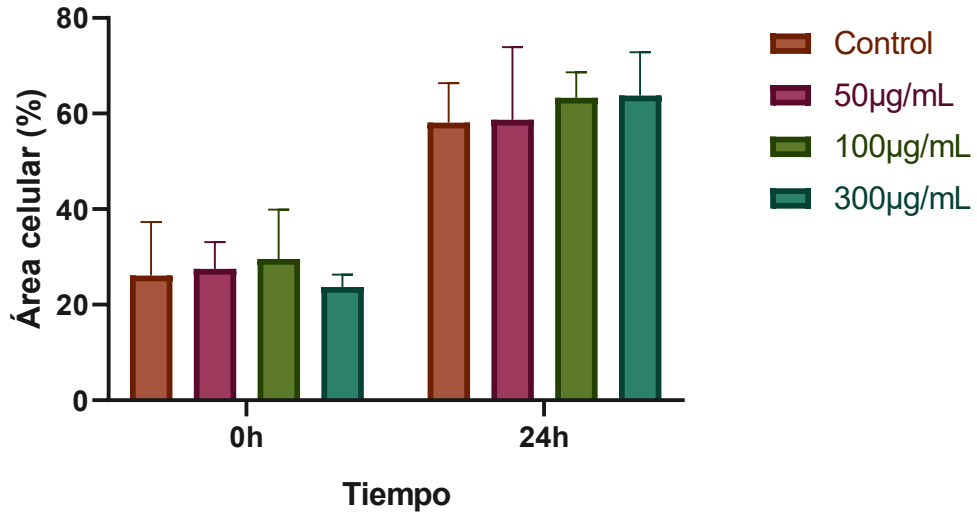


Figura 24. Ensayo de cierre de herida con extracto etanólico-acuoso de *Justicia spicigera* en células NIH. Valor $p=0.839$.

Ensayo de cierre de herida con extracto acuoso de *J. spicigera* en células NIH 3T3

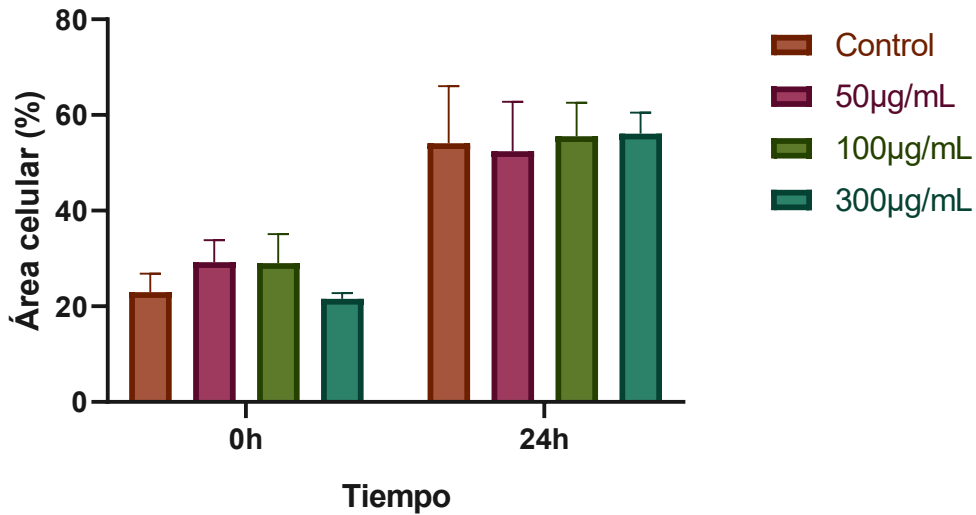


Figura 25. Ensayo de cierre de herida con extracto acuoso de *Justicia spicigera* en células NIH. Valor $p=0.529$.

El área celular del grupo control aumentó en promedio 43.54%. Para el ensayo con extracto etanólico-acuoso de *Carica papaya*, el área celular aumentó en promedio 49.63, 45.96 y 47.6% para las concentraciones de 50, 100 y 300µg/mL respectivamente. Para el ensayo con extracto acuoso de *Carica papaya*, el área celular aumentó en promedio 43.09, 51.67 y 38.27% para las concentraciones de 50, 100 y 300µg/mL respectivamente. Para el ensayo con extracto etanólico-acuoso de *Justicia spicigera*, el área celular aumentó en promedio 46.79, 46.73, 37.22% para las concentraciones de 50, 100 y 300µg/mL respectivamente. Finalmente, para el ensayo con extracto acuoso de *Justicia spicigera*, el área celular aumentó en promedio 55.79, 52.21 y 38.41% para las concentraciones de 50, 100 y 300µg/mL respectivamente.

Las siguientes imágenes (figura 26, 27, 28 y 29) contienen fotografías obtenidas mediante microscopía óptica bajo el objetivo 10x de los ensayos de cierre de herida realizados en células NIH 3T3. En ellas se muestran las células NIH 3T3 bajo la aplicación de los extractos etanólico-acuoso y acuoso de *Carica papaya* y *Justicia spicigera* a las concentraciones de 50, 100 y 300 µg/mL luego de 0 y 24 horas de realizarse la herida. Las células fueron sembradas en una microplaca con 24 pozos. Como puede observarse, en todos los tratamientos aplicados existe migración celular, lo que puede notarse como la disminución del área de herida ahora ocupada por células.

Ensayo de cierre de herida con extracto etanólico-acuoso de *C. papaya* en células NIH 3T3

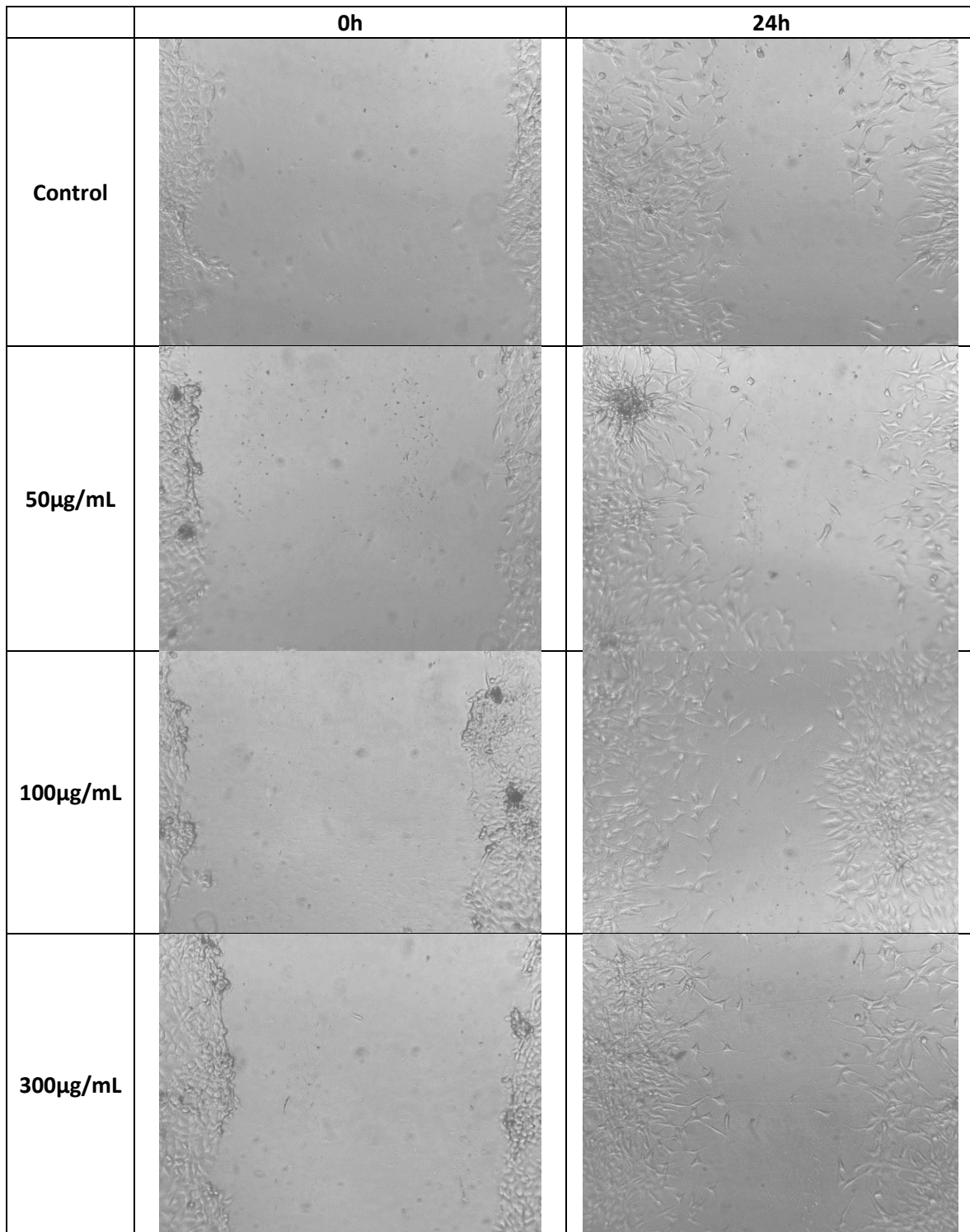


Figura 26. Fotografías del ensayo de cierre de herida con extracto etanólico-acuoso de *Carica papaya* en células NIH.

Ensayo de cierre de herida con extracto acuoso de *C. papaya* en células NIH 3T3

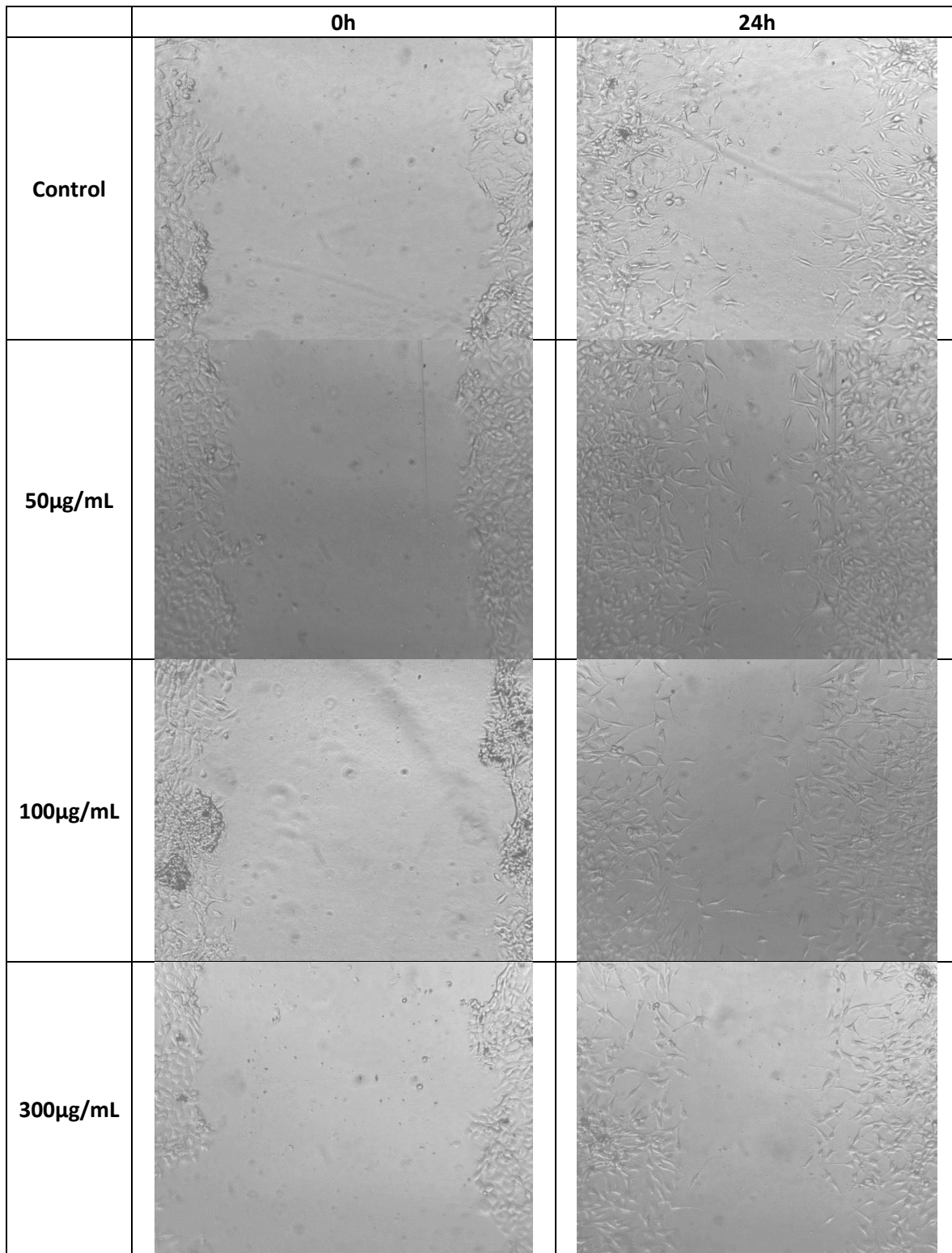


Figura 27. Fotografías del ensayo de cierre de herida con extracto acuoso de *Carica papaya* en células NIH.

Ensayo de cierre de herida con extracto etanólico-acuoso de *J. spicigera* en células NIH 3T3

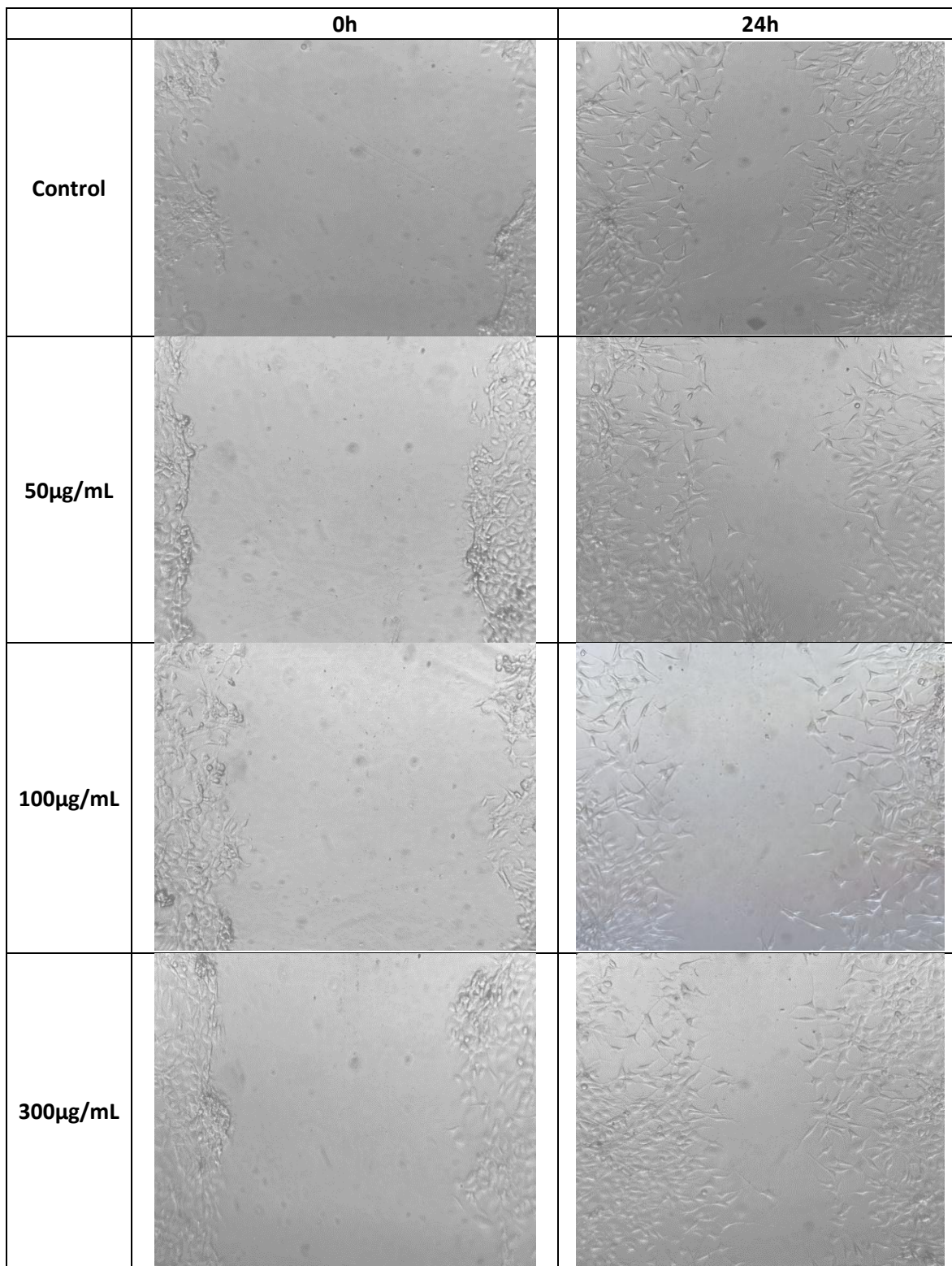


Figura 28. Fotografías del ensayo de cierre de herida con extracto etanólico-acuoso de *Justicia spicigera* en células NIH.

Ensayo de cierre de herida con extracto acuoso de *J. spicigera* en células NIH 3T3

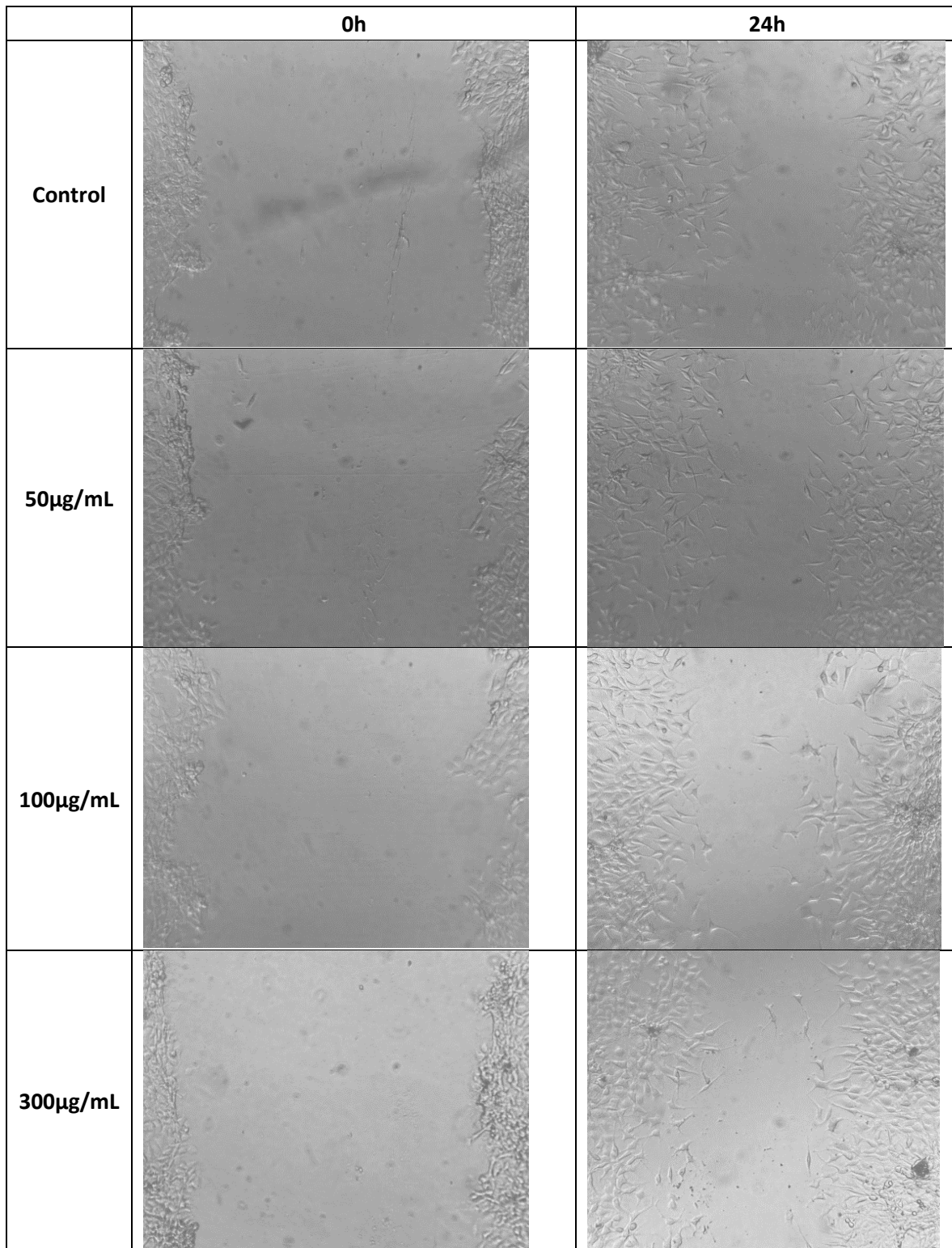


Figura 29. Fotografías del ensayo de cierre de herida con extracto acuoso de *Justicia spicigera* en células NIH.

7. DISCUSIÓN

7.1. Citotoxicidad y extractos

La investigación sobre extractos de plantas como agentes antitumorales es prometedora, ya que ofrece la posibilidad de desarrollar tratamientos menos tóxicos y con mayor selectividad hacia las células cancerosas. En este contexto, el presente estudio se centró en evaluar el potencial citotóxico de extractos de plantas como una estrategia para eliminar las células tumorales sin afectar las células sanas.

Los fenoles y flavonoides exhiben actividad antioxidante debido a su capacidad para proteger contra el estrés oxidativo. Estos compuestos son susceptibles a la oxidación, lo que les otorga un carácter antioxidante marcado. Los fenoles experimentan la oxidación antes que otras especies susceptibles, lo que les permite proteger a las células de ataques oxidativos, como la acción de los radicales libres y la luz (Yu et al., 2021). Además, los fenoles pueden neutralizar los radicales libres, quelar catalizadores metálicos, activar enzimas antioxidantes e inhibir oxidasas, lo que contribuye a su actividad antioxidante. Los mecanismos específicos por los cuales los fenoles presentan esta propiedad antioxidante son diversos y dependen de las propiedades químicas de cada fenol en particular (Yu et al., 2021).

Los fenoles y flavonoides presentan actividad antioxidante a través de diversos mecanismos que permiten a los fenoles exhibir propiedades antioxidantes, protegiendo las células contra el estrés oxidativo. Estos incluyen la transferencia de átomo de hidrógeno (H): un mecanismo común que implica la transferencia de un átomo de hidrógeno de un antioxidante fenólico a una cadena que lleva un radical libre (ROO•). Este proceso ayuda a neutralizar los radicales libres y proteger contra el daño oxidativo (Ramos et al., 2023). Los compuestos fenólicos reaccionan con una variedad de radicales libres mediante la transferencia de electrones, lo que contribuye a su acción antioxidante. Otro mecanismo de acción implica la pérdida secuencial de protones y la transferencia de electrones, lo que permite neutralizar los radicales libres y prevenir el estrés oxidativo. Los fenoles también pueden actuar como antioxidantes al quelar metales de transición, evitando así su participación en reacciones generadoras de especies reactivas de oxígeno (Durán & Padilla., 1993).

Los flavonoides presentes en *Carica papaya*, como la quercetina, la catequina y la epicatequina, son compuestos bioactivos con propiedades antioxidantes que pueden contribuir a la citotoxicidad en células de cáncer a través de varios mecanismos (Avello & Suwalsky, 2006). Algunas formas en las que los flavonoides de *Carica papaya* participan en la citotoxicidad en células de cáncer incluyen su actividad antioxidante, inhibición de la proliferación celular, inducción de apoptosis y modulación de la inflamación. Estos mecanismos antioxidantes y citotóxicos de los flavonoides presentes en *Carica papaya* pueden trabajar en conjunto para ejercer efectos beneficiosos en la inhibición del crecimiento y la viabilidad de las células cancerosas. (Kumar et al., 2022). En cuanto a *Justicia spicigera*, al igual que con *Carica papaya*, los mecanismos por los cuales los fenoles y flavonoides de sus extractos actúan son los similares. Dentro de estos, entre los flavonoides más comunes presentes en *Justicia spicigera* se encuentran la quercetina, la luteolina y kaempferitrina (Pavón et al., 2022)

Las ROS son moléculas que contienen oxígeno y tienen mayor reactividad que el estado fundamental oxígeno molecular. Estas especies incluyen no sólo los radicales de oxígeno (superóxido, hidroxilo y peróxido) sino también moléculas no radicales como el hidrógeno, el peróxido y el oxígeno singlete (Ray et al., 2012). Las ROS se producen durante el metabolismo aeróbico normal, cuando las células están expuestas a ciertas formas de estrés se generan mayores niveles ROS. Los niveles altos de ROS son perjudiciales para las células a través de reacciones con muchos objetivos intracelulares, incluyendo proteínas, lípidos y ADN. Sin embargo, numerosos estudios han indicado que las especies de oxígeno en bajas concentraciones tienen una variedad de funciones fisiológicas, incluida la regulación de genes, la transcripción, la transducción de señales, la mitosis, apoptosis y senescencia (Oberley & Oberley, 1997).

La producción de ROS está elevada en las células cancerosas como resultado del aumento de la tasa metabólica, la mutación genética y la hipoxia relativa. Por lo que, en general se considera que los antioxidantes son beneficiosos tanto para la prevención como para el tratamiento del cáncer, ya que pueden reducir los niveles

de ROS, lo que lleva a una reducción del estrés oxidativo. Sin embargo, estudios anteriores demostraron que las células cancerosas se adaptan a un alto nivel de ROS activando vías antioxidantes, lo que resulta en una mayor eliminación de ROS. (Nakamura & Takada, 2021). Por lo tanto, para atacar eficazmente las células cancerosas es necesario identificar vías de señalización específicas de detección de ROS que median las diversas funciones celulares reguladas por el estrés, pues se requiere un delicado equilibrio de los niveles intracelulares de ROS para la función de las células cancerosas (Nakamura & Takada, 2021).

Además, Las especies reactivas de oxígeno pueden regular positivamente los niveles de ARNm de las ciclinas que participan en el ciclo celular para acelerar la transición de la fase G1 a la S, incluidas la ciclina B2, la ciclina D3, la ciclina E1 y la ciclina E2. Siendo así, para este caso que convendría atacar a las células de cáncer con un antioxidante en lugar de aumentar las ROS hasta un punto en que las células decidan entrar a muerte celular (Liou & Storz, 2010).

7.1.1. *Carica papaya*

Carica papaya posee una excelente actividad antioxidante (anexos III Y IV) que juegan un papel en la neutralización de la generación de radicales libres y la prevención de patogénesis. Los PLE interactúan con una amplia gama de moléculas objetivo como lo son los antioxidantes o las enzimas y ejercen actividad terapéutica contra diversas enfermedades (Ramos et al., 2023). Los objetivos moleculares vitales implicados en la prevención del cáncer son la supresión de la actividad de la ADN topoisomerasa I/II, alteración de las vías de señalización, regulación negativa de la expresión genética de Bcl-2 y Bcl-XL, regulación positiva de la expresión genética de Bax, Bak, caspasa 3 escindida y aumento de la expresión de P53 (Singh et al., 2020).

Las diferencias entre las actividades antioxidantes de las plantas se pueden atribuir a sus diferencias en el contenido fenólico y sus composiciones, así como a otros compuestos no fenólicos (Mahattanatawee et al., 2006). Además, el contenido total de fenoles y flavonoides pueden ser vinculados a diferentes variedades de plantas

y a los diferentes métodos de extracción de antioxidantes utilizados. Factores como la madurez del fruto, el clima, la postcosecha y el almacenamiento a diferentes pH también influyen en el TCP y TFC. Se sabe que las condiciones de almacenamiento son otro factor que afectan el contenido de polifenoles y flavonoides en plantas (Mahattanatawee et al., 2006).

Las hojas de *Carica papaya* contienen varios fitoquímicos identificados con propiedades antioxidantes. Se han encontrado flavonoides en las hojas de papaya, que se denominaron quercetina, kaempferol 3-rutinósido, quercetina3-(2G-rhamnosilrutinosido), quercetina 3-rutinósido, kaempferol 3-(2G-rhamnosilrutinosido), miricetina 3-rutinósido. El ácido cafeico, el ácido protocatequico, la quercetina, la 5,7-dimetilcumarina, el ácido p-cumárico y el ácido clorogénico se encuentran entre las sustancias fenólicas que se encuentran en las hojas (Sharma et al., 2020). Existe evidencia que sugiere que las hojas contienen una amplia gama de fitoquímicos, incluida carpaína, kaempferol 3-(2G-glucosilrutinosido), kaempferol 3-(2-rhamnosilgalactósido), 7-rutinósido, kaempferol 3-rutinósido-(1->2)-galactósido-7-rutinósido, luteolina 7-galactosil-(1->6)-galactósido, orientina 7-O-rutinósido, ácido 11-hidroperoxi-12,13-epoxi-9-octadecenoico, palmiticamida y 2-hexaprenilo. -6-metoxifenol (Anshu et al., 2022).

Según Otsuki et al., el extracto acuoso de *Carica papaya* en concentraciones entre 0,625 a 20 mg/ mL inhibió el crecimiento celular en la línea celular de leucemia (K562) y la línea celular de carcinoma cervical (Hela). Sin embargo, el extracto acuoso de *Carica papaya* en este trabajo se aplicó a menores concentraciones (25, 50, 100 y 300µg/mL) y no mostró efecto citotóxico significativo sobre las células de cáncer K562 y HeLa, esto pudo deberse a que las concentraciones propuestas fueron bajas para apreciar un efecto citotóxico sobre estas células de cáncer. Por su parte, el extracto etanólico-acuoso de *Carica papaya* no mostró un efecto citotóxico significativo a las concentraciones de 25, 50, 100 y 300µg/mL en células K562 a las 24 ni a las 48 horas de tratamiento. Se observó una tendencia hacia una mayor citotoxicidad a las 24 horas en comparación con las 48 horas. Esto puede ser explicado por mecanismos de defensa, reparación o adaptación de las células

cancerígenas que mitiguen el efecto inicial del extracto (Dehghan-Nayeri et al., 2020).

Entre las posibles razones que pueden ayudar a contextualizar la falta de efectos citotóxicos del extracto acuoso de *Carica papaya* sobre células K562 y HeLa se encuentra la dosis baja, ya que como se describió anteriormente, se han probado concentraciones más altas de extractos de *Carica papaya* que mostraron ser citotóxicas en células K562 y HeLa. Se encuentran también el tiempo de exposición, la resistencia celular y algunos mecanismos de acción específicos, pues los mecanismos de acción de los compuestos de la papaya en células K562 y HeLa pueden no estar directamente relacionados con la inducción de citotoxicidad en estas líneas celulares (Priyadurai et al., 2020).

La resistencia de las células K562 a los extractos de *Carica papaya* y la falta de citotoxicidad podrían estar relacionadas con varios mecanismos que explican la capacidad de las células para adaptarse y sobrevivir a tratamientos citotóxicos. Algunas posibles razones incluyen el desarrollo de resistencia, pues las células K562 pueden desarrollar resistencia a los compuestos presentes en los extractos de *Carica papaya* debido a la selección de subpoblaciones celulares resistentes durante la exposición repetida a tratamientos citotóxicos (Martínez-Torres et al., 2016). Esta resistencia puede estar mediada por mecanismos como la sobreexpresión de proteínas de resistencia a fármacos o la activación de vías de supervivencia celular. Otra posible razón es la activación de vías de supervivencia. Las células K562 pueden activar vías de supervivencia celular, como la vía de señalización del factor de transcripción NF- κ B o la vía de PI3K/Akt, que les permiten contrarrestar los efectos citotóxicos de los extractos de *Carica papaya* y promover su supervivencia (Martínez-Torres et al., 2016).

Otras razones que pueden explicar la resistencia de las células K562 hacia los extractos de *Carica papaya* son las alteraciones en la expresión génica y las interacciones con el microambiente celular. La adaptación de las células K562 a los extractos de *Carica papaya* puede implicar alteraciones en la expresión génica que les confieren resistencia a los compuestos citotóxicos (Avelino-Flores et al., 2016).

Estos cambios genéticos pueden modificar la respuesta celular y reducir la eficacia de los tratamientos. Por otra parte, el microambiente celular, que incluye factores como la presencia de células vecinas, factores de crecimiento y sustancias secretadas, puede influir en la respuesta de las células K562 a los extractos de *Carica papaya*. Las interacciones con el entorno celular pueden modular la sensibilidad de las células a los tratamientos citotóxicos. Estos mecanismos de resistencia pueden conferir a las células la capacidad de sobrevivir y proliferar a pesar de la exposición a compuestos citotóxicos de la papaya (Avelino-Flores et al., 2016).

Las células K562 pueden hacerse resistentes a los extractos de *Carica papaya* y no exhibir citotoxicidad debido a su capacidad de diferenciarse en progenitores de granulocitos, eritrocitos y monocitos, así como a su producción de hemoglobinas embrionarias en fetos. Además, la relación entre los niveles intracelulares de ROS y la respuesta a diferentes tratamientos con extractos de plantas en las líneas celulares K562 sugiere posibles mecanismos de resistencia y citotoxicidad en estas células, lo que podría estar vinculado a la inmunidad innata y adquirida (Benezer-Benezer et al., 2008). Por ejemplo, la activación de macrófagos proinflamatorios M1 mediante citocinas y componentes microbianos, así como la estimulación de macrófagos M2 antiinflamatorios por otras citocinas, podrían influir en la respuesta de las células K562 a los extractos de *Carica papaya*. Estudios experimentales han demostrado el potencial de compuestos como quinonas para actuar como agentes antitumorales con alta selectividad en líneas celulares neoplásicas, lo que abre la puerta a investigaciones futuras sobre la resistencia y citotoxicidad en células como las K562 (Arencibia, et al., 2003).

7.1.2. *Justicia spicigera*

Justicia spicigera es una planta muy utilizada en la medicina tradicional mexicana, y su uso para el tratamiento del cáncer ha aumentado en los últimos años. Hoy en día, se sabe que varios tipos de compuestos, incluidos los carbohidratos simples; pectinas; glicoproteínas; compuestos fenólicos (tales como glucósidos de

kaempferol) y antocianinas (tales como cianidina 3-O-glucósido y cianidina 3,5-diglucósido); resina; y los aceites esenciales y minerales (potasio, acetato y oxalato de calcio, sulfato y cloruro de sodio) están presentes en la planta *Justicia spicigera* (Alonso et al., 2012). Además, se han determinado compuestos fenólicos específicos de la planta, como la campferitrina y el kaempferol-3-o-ramnosido (Lin et al., 2016). Estas últimas moléculas se han aislado de las hojas, mientras que los taninos se han extraído de las flores. En estudios actuales, se han identificado muchos tipos de fitoquímicos en *J. spicigera*, estos compuestos, que se extraían principalmente de las hojas, se les han atribuido propiedades biológicas específicas, como actividad antioxidante, antibacteriana, antifúngica y antidiabética, junto con otras propiedades farmacológicas contra la gonorrea, enfermedades orales, disentería, parásitos, anticancerígeno, antileucemia y antianemia. (Castro et al., 2022).

El extracto acuoso de *Justicia spicigera* en células K562 no resultó citotóxico a las concentraciones de 25, 50, 100 y 300 µg/mL. No existen resultados reportados sobre la citotoxicidad de extractos de *Justicia Spicigera* en células de cáncer K562, por lo que este es el primer trabajo que describe el efecto citotóxico de los extractos etanólico-acuoso y acuoso de *Justicia Spicigera* en células K562, para el caso de las células NIH 3T3, Vega et al., (2009) reportan que el extracto acuoso de *Justicia Spicigera* no es citotóxico para esta línea celular. Debido a que los resultados demostraron la nula citotoxicidad del extracto acuoso de *Justicia spicigera* en células K562, HeLa y NIH 3T3 luego de realizar la medición de absorbancia a 490nm del ensayo biológico MTS a las 24 y 48 h, el extracto acuoso de *Justicia Spicigera* no fue citotóxico para las células de cáncer probadas y tampoco para las células control.

El extracto etanólico-acuoso de *Justicia spicigera* no mostró un efecto citotóxico significativo en células K562 a las concentraciones de 25, 50, 100 y 300 µg/mL luego de 24 ni 48 horas de tratamiento. Sin embargo, se observó una tendencia hacia una mayor citotoxicidad a las 24 horas en comparación con las 48 horas. En cambio, mostró efecto citotóxico en células HeLa en las concentraciones de 50, 100 y

300µg/ML luego de 48 horas, lo que corresponde con la literatura reportada (Alonso et al., 2012). Además, los extractos etanólico-acuoso y acuoso de *Justicia spicigera* no mostraron a su vez efecto citotóxico en células sanas de fibroblastos NIH 3T3.

Para hacer un análisis completo de los extractos, es necesario considerar la composición de los extractos analizados, que depende de factores como el tiempo de cosecha, el clima, el tipo de suelo, la humedad, la altitud y la presión; además de que las condiciones de extracción son las que, en última instancia determinan la cantidad y la naturaleza química de los metabolitos extraídos (Stanciauskaite et al., 2021). En este sentido, mientras los estudios previos solo reportan compuestos polifenólicos como parte del contenido de sus extractos, algunos análisis fitoquímicos del extracto etanólico/acuoso sugiere la existencia de metabolitos secundarios como cumarinas, flavonoides, esteroides y saponinas. La presencia de estos compuestos en el extracto etanólico-acuoso de *Justicia spicigera* podrían respaldar el efecto biológico alcanzado en la línea celular de cáncer de cáncer cervical HeLa, ya que algunos flavonoides y cumarinas ejercen una actividad antiproliferativa a través de varios mecanismos en varias líneas celulares de cáncer (Marshall et al., 1994).

El método de obtención de extractos de plantas puede afectar significativamente su efecto citotóxico debido a la influencia que tiene en la composición química final del extracto, así, la citotoxicidad puede variar dependiendo de cómo se extraen los compuestos bioactivos. Uno de los métodos de extracción es la utilización de solventes, como en el caso del método de extracción utilizado para realizar este proyecto. Aquí la polaridad del solvente utilizado para la extracción juega un papel crucial en la selección de los compuestos que se extraen (Lin et al., 2016). Solventes polares como el agua o el etanol extraen principalmente compuestos polares como polifenoles, flavonoides y taninos, mientras que solventes apolares como el hexano o el cloroformo extraen principalmente compuestos apolares como lípidos, resinas y aceites esenciales. La composición química del extracto resultante, determinada por la polaridad del solvente, puede influir directamente en su efecto citotóxico. La extracción por ultrasonido también puede afectar el

rendimiento de los extractos en su efecto citotóxico. Este método utiliza ondas de ultrasonido para acelerar el proceso de extracción. La energía de las ondas de ultrasonido puede romper las paredes celulares de las plantas, liberando más compuestos bioactivos. Sin embargo, también puede causar la degradación de algunos compuestos sensibles al calor (Cosquillo et al., 2020).

Una variable importante dentro del método de extracción que influye en la citotoxicidad del extracto es la temperatura. Las temperaturas altas pueden descomponer algunos compuestos bioactivos sensibles al calor, reduciendo su efecto citotóxico. Otro factor potencial influyente en el potencial citotóxico de los extractos obtenidos es el tiempo de extracción (Huertas et al., 2013). Un tiempo de extracción prolongado puede llevar a la extracción de una mayor cantidad de compuestos, pero también puede aumentar la degradación de algunos componentes, lo que puede afectar la citotoxicidad. Así mismo, la presencia de otros compuestos en el extracto, como los taninos, puede afectar la citotoxicidad de los compuestos bioactivos. Algunos taninos pueden aumentar la citotoxicidad de otros compuestos, mientras que otros pueden reducirla (Díaz et al., 2011).

De igual forma debe considerarse que el efecto alcanzado en los extractos dependerá de la sensibilidad de la línea celular utilizada (Marshall et al., 1994). En ensayos preliminares, se observó un efecto diferencial del extracto etanólico-acuoso de *Justicia spicigera* en otra línea celular, siendo tóxico para las células DU-145 (células de carcinoma prostático independientes de andrógeno) a dosis menores que las necesitadas para alcanzar el efecto antiproliferativo en la línea dependiente de andrógeno LNCaP. Este hallazgo sugiere la posible participación del receptor de andrógenos en el mecanismo de acción del extracto etanólico-acuoso de *Justicia spicigera* (Fernández, 2015).

Existen estudios que señalan la efectividad del extracto acuoso de *Justicia spicigera* como efecto citotóxico en la línea celular de cáncer de mama humano T47D, en la línea celular de adenocarcinoma de próstata PC3, en células humanas de adenocarcinoma de seno MCF7, en células humanas de adenocarcinoma colorrectal Caco-2 y en células de cáncer de próstata LNCaP, siendo la mayoría

efectivo luego de 72 horas de incubación con el extracto (Vega et al., 2009; González & Emiko, 2021).

7.2. Ensayo de cierre de herida

Los resultados presentados en este trabajo sobre el ensayo de cierre de herida con extractos etanólico-acuoso y acuoso de *Carica papaya* y *Justicia spicigera* no muestran un efecto potencial de cicatrización, pues no tienen diferencia significativa respecto al tratamiento control en el que no se aplicó ningún extracto. Esto no puede ser directamente comparado con la literatura reportada, ya que los estudios sobre el efecto de *Carica papaya* en ensayos de cierre de herida solo se han realizado *in vivo* en ratas, en otros tipos celulares diferentes a la línea celular NIH o con extractos de diferentes partes de la planta a las utilizadas en este trabajo, mostrando un efecto positivo en la cicatrización de la herida (Nayak et al., 2012) (Salazar-Gómez & Alonso-Castro, 2022).

Es importante destacar que las células de fibroblastos NIH 3T3 tienden a migrar y cambiar de posición, esto se debe a que son células móviles que desempeñan un papel crucial en la reparación de tejidos y la formación de la matriz extracelular (Fernández, 2015). En un cultivo *in vitro*, los fibroblastos se mueven en respuesta a señales químicas y físicas, como la presencia de factores de crecimiento o la presencia de una superficie adecuada para la adhesión, como lo es la superficie del pozo de una microplaca. Esta capacidad de migración es esencial para su función en la cicatrización de heridas y en la regeneración de tejidos (Ramírez-Farías et al., 2023). Por lo tanto, es posible que dentro de las imágenes pueda apreciarse un cambio organizacional de la monocapa celular.

8. CONCLUSIONES

El extracto etanólico-acuoso de *Carica papaya* no tiene efectos citotóxicos significativos *in vitro* a las concentraciones de 25, 50, 100 y 300µg/mL luego de 24 y 48 horas de tratamiento en células de leucemia mieloide K562, en células de cáncer cervicouterino HeLa ni en células de fibroblastos NIH 3T3, utilizadas como células control. Además, dichos extractos no muestran un efecto inhibitorio *in vitro* sobre la migración celular en células NIH 3T3.

El extracto acuoso de *Carica papaya* no tiene efectos citotóxicos significativos *in vitro* a las concentraciones de 25, 50, 100 y 300µg/mL luego de 24 y 48 horas de tratamiento en células de leucemia mieloide K562, en células de cáncer cervicouterino HeLa ni en células de fibroblastos NIH 3T3, utilizadas como células control. Además, dichos extractos no muestran un efecto inhibitorio *in vitro* sobre la migración celular en células NIH 3T3.

El extracto etanólico-acuoso de *Justicia spicigera* no tiene efectos citotóxicos significativos *in vitro* a las concentraciones de 25, 50, 100 y 300µg/mL luego de 24 y 48 horas de tratamiento en células de leucemia mieloide K562 ni en células de fibroblastos NIH 3T3, utilizadas como células control. Además, dichos extractos no muestran un efecto inhibitorio *in vitro* sobre la migración celular en células NIH 3T3.

El extracto etanólico-acuoso de *Justicia spicigera* muestra efectos citotóxicos *in vitro* en células HeLa a las concentraciones de 50, 100 y 300µg/mL luego de 48 horas de tratamiento, siendo 300µg/mL la concentración más eficiente sobre la citotoxicidad de estas células. Mientras que a las mismas concentraciones luego de 24 horas de tratamiento no exhibieron evidencia de citotoxicidad significativa. Así mismo, el extracto etanólico-acuoso de *Justicia spicigera* no es citotóxico a ninguna de las concentraciones y a ningún tiempo de tratamiento utilizados en células de fibroblastos NIH 3T3. Además, este extracto no muestra un efecto inhibitorio *in vitro* sobre la migración celular en células NIH 3T3, es decir, no mostró un efecto citostático sobre estas células.

Por su parte, el extracto acuoso de *Justicia spicigera* no mostró un efecto citotóxico *in vitro* a las concentraciones de 25, 50, 100 y 300µg/mL luego de 24 y 48 horas de

tratamiento en células de leucemia mieloide K562, en células de cáncer cervicouterino Hela ni en células de fibroblastos NIH 3T3, utilizadas como células control. Además, dicho extracto no muestra un efecto inhibitorio *in vitro* sobre la migración celular en células NIH 3T3, es decir, no mostró un efecto citostático sobre estas células.

La relevancia clínica de los efectos observados en las células sanas y cancerosas radica en el potencial de los extractos de plantas para el desarrollo de nuevos tratamientos. El extracto etanólico-acuoso de *Justicia spicigera* mostró citotoxicidad en células de cáncer cervicouterino HeLa, esto sugiere un potencial para el desarrollo de nuevos agentes quimioterapéuticos. Además, el extracto de esta planta mostró selectividad hacia estas células, lo que resulta en un factor positivo, ya que reduce el riesgo de efectos secundarios en células sanas.

Los resultados obtenidos en este trabajo ofrecen alternativas naturales, pues son extractos de plantas alternativos a los tratamientos convencionales, especialmente para pacientes que no toleran bien los tratamientos actuales. Así mismo estos extractos de plantas podrían usarse en combinación con tratamientos convencionales para mejorar su eficacia y reducir los efectos secundarios como una forma de efectos sinérgico.

9. PERSPECTIVAS

Los resultados obtenidos sugieren que el extracto etanólico-acuoso de *Justicia spicigera* tienen un potencial terapéutico hacia células de cáncer cervicouterino HeLa, por lo que es importante identificar los compuestos activos responsables de los efectos observados, así como profundizar en los mecanismos de acción de estos. Lo que puede lograr mediante técnicas de fraccionamiento y análisis químico, que permitirá comprender mejor cómo interactúan con las células y cómo ejercen sus efectos. Se exhorta a profundizar en el estudio de los efectos de los extractos de *Carica papaya* y *Justicia spicigera* en células HeLa para explicar por qué *Carica papaya* no tiene un efecto citotóxico en estas células.

Así mismo, se sugiere investigar las diferencias entre los metabolitos secundarios y su vía de acción, sobre células de cáncer, en extractos de *Carica papaya* y *Justicia spicigera* para explicar porque esta primera planta no tuvo un efecto citotóxico sobre las células HeLa mientras que la segunda planta sí.

Se propone realizar combinaciones con tratamientos convencionales. Pues explorar el potencial de los extractos de plantas para ser utilizados en combinación con tratamientos convencionales para la cicatrización de heridas o el cáncer permitirá mejorar la eficacia de los tratamientos existentes y reducir los efectos secundarios. Se propone también el desarrollo de nuevos productos basados en los extractos de plantas, como medicamentos para el tratamiento del cáncer.

Para demostrar la selectividad de los extractos hacia células de cáncer se propone realizar experimentos dirigidos hacia otros tipos celulares considerados sanos con la finalidad de demostrar que los extractos no afectan a ningún tipo de célula sana. Además, sería útil realizar experimentos *in vivo* para determinar los efectos que los extractos puedan provocar en un sistema complejo u organismo. Si los estudios *in vivo* son exitosos, se pueden realizar estudios clínicos en humanos para evaluar la eficacia y seguridad de los extractos de plantas en pacientes para después optimizar la formulación de los extractos de plantas y garantizar su estabilidad, biodisponibilidad y eficacia.

Finalmente, con la finalidad de obtener resultados que reflejen si existen extractos de plantas que posean potencial anti metastásico, se propone realizar el ensayo de cierre de herida en células cancerígenas para evaluar el potencial citostático de *Carica papaya* y *Justicia spicigera*. Por otra parte, para averiguar si estas plantas tienen un potencial adicional de cicatrización se propone realizar más ensayos de cierre de herida *in vitro*. Además, se sugiere probar con rangos de concentraciones más amplios para los extractos de estas plantas, así como de mayores tiempos de incubación con los extractos para continuar evaluando el efecto citotóxico de estos y optimizar su formulación.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Akshay, A., & Bhanu, A. (2022). *In vitro* anticancer activity of “Methanolic extract of papaya blackseeds” (MPB) in Hep G2 cell lines and its effect in the regulation of bcl-2, caspase-3 and p53 gene expression. *Advances in Cancer Biology - Metastasis*, 4, 2667-3940. <https://doi.org/10.1016/j.adcanc.2021.100025>.
- Alonso-Castro, A., Ortiz-Sánchez, E., Domínguez, F., Arana-Argáez, V., Juárez-Vázquez, M., Chávez, M., Carranza-Álvarez, C., Gaspar-Ramírez, O., Espinosa-Reyes, G., López-Toledo, G., Ortiz-Andrade, R., & García-Carrancá, A. Antitumor and immunomodulatory effects of *Justicia spicigera* Schlttdl (Acanthaceae), *Journal of Ethnopharmacology*, Volume 141, Issue 3, 2012, Pages 888-894, ISSN 0378-8741, <https://doi.org/10.1016/j.jep.2012.03.036>.
- Anshu , Sharma, Ruchi , Sharma, Munisha , Kumar, Manoj , Barbhai, Mrunal Deepak, Lorenzo, José M. , Sharma, Somesh, Samota, Mahesh Kumar, Atanassova, Marí , Caruso, Gianluca , Naushad, Missouri , Radha , Chandran, at al. *Carica papaya* L. Hojas: descifrando sus bioactivos antioxidantes, actividades biológicas, productos innovadores y aspectos de seguridad , medicina oxidativa y longevidad celular, 2022 , 2451733, 20 páginas, 2022 . <https://doi.org/10.1155/2022/2451733>.
- Arana-Luna, Luara L., Alvarado-Ibarra, Martha, Silva-Michel, Luis G., Morales-Maravilla, Adrián, González-Rubio, María del C., Chávez-Aguilar, Lénica A., at al. (2022). Consenso de leucemia mieloide aguda en México. *Gaceta médica de México*, 158 (spe), M1-M51. Epub 16 de mayo de 2022. <https://doi.org/10.24875/gmm.m21000597>.
- Arango MT, Quintero-Ronderos P, Castiblanco J, et al. Cultivo celular y análisis celular. En: Anaya JM, Shoenfeld Y, Rojas-Villarraga A, et al., editores. *Autoinmunidad: del laboratorio a la cabecera del paciente* [Internet]. Bogotá (Colombia): El Rosario University Press; 18 de julio de 2013. Capítulo 45. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK459464/>.
- Arencibia, D., Fernández, R & Sánchez, D. (2003). Principales ensayos para determinar la citotoxicidad de una sustancia, algunas consideraciones y su utilidad. *Revista de toxicología en línea*. P.40.

- Avello, Marcia, & Suwalsky, Mario. (2006). Radicales libres, antioxidantes naturales y mecanismos de protección. *Atenea (Concepción)*, (494), 161-172. <https://dx.doi.org/10.4067/S0718-04622006000200010>.
- Aysun, A., Kiraz, Y & Baran, Y. (2016). Cell proliferation and cytotoxic assays. *Current Pharmaceutical Biotechnology*. 2016, 17, 1213-1221.
- Avelino-Flores, M.C.G.; M.D. Bibbins-Martínez, V. Vallejo-Ruiz, y J. Reyes-Leyva. (2019). *In vitro* EVALUATION OF CYTOTOXIC AND ANTITUMOR ACTIVITY OF MEDICINAL PLANTS RECOMMENDED IN CUETZALAN DEL PROGRESO, PUEBLA, MEXICO. Instituto Politécnico Nacional Núm. 47: 113-135 México. Enero 2019 DOI: 10.18387/polibotanica.47.9
- Baba, A., & Cătoi, C. (2007). Oncología Comparada. Bucarest (RO): *La Editorial de la Academia Rumana*. Capítulo 3, Morfología de las células tumorales. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9553/>.
- Beltran-Ontiveros SA, Contreras-Gutierrez JA, Lizarraga-Verdugo E, Gutierrez-Grijalva EP, Lopez-Lopez K, Lora-Fierro EH, Trujillo-Rojas MA, Moreno-Ortiz JM, Cardoso-Angulo DL, Leal-Leon E, Zatarain-Lopez JR, Cuen-Diaz HM, Montoya-Moreno M, Arce-Bojorquez B, Rochin-Teran JL, Cuen-Lazcano DE, Contreras-Rodriguez VA, Lascurain R, Carmona-Aparicio L, Coballase-Urrutia E, Gallardo-Vera F, Diaz D. National Burden and Trends for 29 Groups of Cancer in Mexico from 1990 to 2019: A Secondary Analysis of the Global Burden of Disease Study 2019. *Cancers (Basel)*. 2023 Dec 28;16(1):149. doi: 10.3390/cancers16010149. PMID: 38201576; PMCID: PMC10778521.
- Beltran-Ontiveros, S.A., Fernandez-Galindo, M.A., Moreno-Ortiz, J.M., Contreras-Gutierrez, J.A., Madueña-Molina, J., Arambula-Meraz, E., Leal-Leon, E., Becerril-Camacho, D.M., Picos-Cardenas, V.J., Angulo-Rojo, C., Velazquez, D.Z., Jimenez-Trejo, F., Gallardo-Vera, F. & Diaz, D. (2022). Incidence, Mortality, and Trends of Prostate Cancer in Mexico from 2000 to 2019: Results from the Global Burden of Disease Study 2019. *Cancers*, 14, 3184. <https://doi.org/10.3390/cancers14133184>.
- Benezer-Benezer, Micaela, Castro-Mercado, Elda, & García-Pineda, Ernesto. (2008). La Producción de Especies Reactivas de Oxígeno Durante la Expresión

de la Resistencia a Enfermedades en Plantas. *Revista mexicana de fitopatología*, 26(1), 56-61. Recuperado en 09 de octubre de 2024, de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0185-33092008000100009&lng=es&tlng=es.

Bispo, J. A. B., Pinheiro, P. S., & Kobetz, E. K. (2020). Epidemiology and Etiology of Leukemia and Lymphoma. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 10(6), a034819. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a034819>.

Carbone, A. (2020). Cancer Classification at the Crossroads. *Cancers (Basel)*, 15;12(4), 980. doi: 10.3390/cancers12040980. PMID: 32326638; PMCID: PMC7226085.

Castanares, MA., Copeland, BT., Chowdhury, WH., Liu, MM., Rodriguez, R., Pomper, MG., Lupold, SE., & Foss, CA. (2015). Characterization of a novel metastatic prostate cancer cell line of LNCaP origin. *Prostate*, 76(2), 215-25. doi: 10.1002/pros.23115. Epub 2015 Oct 26. PMID: 26499105; PMCID: PMC4729204.

Castro, R., León, E., & García, O. (2022). Más allá de la exploración de Muicle (*Justicia spicigera*): revisión de sus propiedades biológicas, moléculas bioactivas y química de materiales. *Procesos*, 10(5), 1035. <https://doi.org/10.3390/pr10051035>.

Chandra, S., Gahlot, M., Choudhary, A., Palai, S., Silva de Almeida, R., Lucena de Vasconcelos, JE., Vieira dos Santos, FA., Maia de Farias, PA., & Melo Coutinho, HE. (2023). Scientific evidences of anticancer potential of medicinal plants. *Food Chemistry Advances*, Volume 2, 100239, ISSN 2772-753X, <https://doi.org/10.1016/j.focha.2023.100239>.

Charras, G., Sahai, E., 2014. Physical influences of the extracellular environment on cell migration. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 15, 813-824.

Chennamadhavuni A, Lyengar V, Mukkamalla SKR, et al. Leucemia. [Actualizado el 17 de enero de 2023]. En: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 Ene-. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK560490/>.

Chhikara, BS., & Parang, K. (2022). Global Cancer Statistics 2022: the trends

- projection analysis. *Chemical Biology Letters*, 10(1), 451. <https://pubs.thesciencein.org/journal/index.php/cbl/article/view/451>.
- Choudhari, AS., Mandave, PC., Deshpande, M., Ranjekar, P., & Prakash, O. (2020). Phytochemicals in Cancer Treatment: From Preclinical Studies to Clinical Practice. *Front Pharmacol*, 10(1614). doi: 10.3389/fphar.2019.01614.
- Cohen, M. Caspasas: las ejecutoras de la apoptosis. *Biochem J* 15 de agosto de 1997; 326 (1): 1–16. doi: <https://doi.org/10.1042/bj3260001>.
- Cooper, GM. (2000). La célula: un enfoque molecular. 2da edición. Sunderland (MA): Sinauer Associates. *El desarrollo y las causas del cáncer*. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9963/>.
- Cosquillo-Rafael, Martha F., Placencia-Medina, Maritza D., Miranda-Tomasevich, Tomás Y., Moreno-Hinojosa, Miriam, & Retuerto-Figueroa, Mónica G.. (2020). Efecto citotóxico y genotóxico *in vitro* del extracto crudo y etanólico del rizoma de *Curcuma longa* L.. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica*, 37(3), 454-461. <https://dx.doi.org/10.17843/rpmesp.2020.373.4817>.
- Dehghan-Nayeri N, Darvishi M, Mashati P, Younesian O. Comparison of cytotoxic activity of herbal extracts on the most commonly used breast cancer cell lines (MCF7 and SKBR3): A systematic review. *J Res Pharm*. 2020; 24(1): 1-22.
- Drago Serrano, ME, López López, M., & Sainz Espuñes, TD (2006). Componentes bioactivos de alimentos funcionales de origen vegetal. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 37 (4), 58-68.
- Durán, R & Padilla, R. (1993). Actividad antioxidante de los compuestos fenólicos. *Grasas y aceites*. 44. 10.3989/gya.1993.v44.i2.1105.
- Eden RE, Coviello JM. Leucemia mielógena crónica. [Actualizado el 16 de enero de 2023]. En: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 Ene-. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK531459/>.
- Esparza, J., Martínez., J., & Ibarra, M. (2019). Deriving Primary Cancer Cell Cultures for Personalized Therapy. *Revista de investigación clínica*, 71(6), 369-380. <https://doi.org/10.24875/ric.19002832>.
- Faderl S, Talpaz M, Estrov Z, O'Brien S, Kurzrock R, Kantarjian HM. La biología de la leucemia mieloide crónica. *N Inglés J Med*. 15 de julio de 1999; 341 (3): 164-

72.

- Fernández-Pomares, C. (2015). Efecto de los extractos etanólico/acuoso de *Moussonia deppeana* y *Justicia spicigera* sobre la proliferación y la viabilidad de la línea celular de carcinoma prostático LNCaP. Universidad Veracruzana.
- Fernández-Pomares, C., Juárez-Aguilar, E., Domínguez-Ortiz, M., Gallegos-Estudillo, J., Herrera-Covarrubias, D., Sanchez-Medina, A., Aranda-Abreu, G., Manzo, J., & Hernandez, M. (2017). Hydroalcoholic extract of the widely used Mexican plant *Justicia spicigera* Schlttdl.exerts a cytostatic effect on LNCaP prostate cancer cells. *Journal of Herbal Medicine* <http://dx.doi.org/10.1016/j.hermed.2017.09.003>.
- Fowler JR, Maani EV, Dunton CJ, et al. (2023). Cáncer de cuello uterino. En: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 Ene-. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK431093/>.
- Freshney, RI y Freshney, RI (2005). Citotoxicidad. En cultivo de células animales, RI Freshney (Ed.). <https://doi.org/10.1002/0471747599.cac022>
- González, N & Emiko, D. (2021). Evaluation of antiproliferative effects of aqueous extract from *Justicia spicigera* in different cancer cell lines. Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey. <https://hdl.handle.net/11285/648411>.
- Gould, S & Templin, MV. (2023). Off target toxicities and links with physicochemical properties of medicinal products, including antibiotics, oligonucleotides, lipid nanoparticles (with cationic and/or anionic charges). Data review suggests an emerging pattern, *Toxicology Letters*, Volume 384, Pages 14-29, ISSN 0378-4274, <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2023.07.011>.
- Grases, Pedro J, Tresserra Casas, Francisco, & López-Marín, Luciano. (2005). Cuello uterino: Atipias y lesiones premalignas no invasoras. *Revista de Obstetricia y Ginecología de Venezuela*, 65(4), 183-192. Recuperado en 08 de octubre de 2024, de http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0048-77322005000400005&lng=es&tlng=es.
- Hartmann, L., & Metzeler, KH. (2019). Clonal hematopoiesis and preleukemia- Genetics, biology, and clinical implications. *Genes Chromosomes Cancer*,

- 58(12), 828-838. doi: 10.1002/gcc.22756. Epub 2019 Apr 16. PMID: 30939217.
- Hernández-Pasteur, Griselda, Silva-Bermúdez, Phaedra S., Reyes-Chilpa, Ricardo, Vibrans, Heike, & Soto-Hernández, Marcos. (2019). EVALUACIÓN in vitro DE LA ACTIVIDAD CICATRIZANTE Y ANTIBACTERIANA DE EXTRACTOS DE *Buddleja cordata* KUNTH Y *Vismia baccifera* (L.) TRIANA & PLANCH. *Revista fitotecnica mexicana*, 42(2), 93-99. Epub 16 de agosto de 2019. Recuperado en 08 de octubre de 2024, de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-73802019000200093&lng=es&tlng=es.
- Horoszewicz, S., et al. (1983). LNCaP model of human prostatic carcinoma. *Cancer Res*, 43, 1809-1818. PubMed: 6831420.
- Huang, KT, Chen, YH y Walker, AM (2004). Inexactitudes en los ensayos MTS: principales efectos distorsionadores del medio, la albúmina sérica y los ácidos grasos. *BioTechniques*, 37 (3), 406–412. <https://doi.org/10.2144/04373ST05>.
- Hurtado Monroy, Rafael, Solano Estrada, Braulio, & Vargas Viveros, Pablo. (2012). Leucemia para el médico general. *Revista de la Facultad de Medicina (México)*, 55(2), 11-25. Recuperado en 08 de octubre de 2024, de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0026-17422012000200003&lng=es&tlng=es.
- García de Alba García, Javier E., Ramírez Hernández, Blanca C., Robles Arellano, Gilberto, Zañudo Hernández, Julia, Salcedo Rocha, Ana L., & García de Alba Verduzco, Javier E.. (2012). Conocimiento y uso de las plantas medicinales en la zona metropolitana de Guadalajara. *Desacatos*, (39), 29-44. Recuperado en 08 de octubre de 2024, de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1607-050X2012000200003&lng=es&tlng=es.
- García-Huertas, P., Pabón, A., Arias, C & Blair, S. (2013). Evaluación del efecto citotóxico y del daño genético de extractos estandarizados de *Solanum nudum* con actividad anti-Plasmodium. *Biomédica*, 33 (1), 78-87. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v33i1.838>.
- García, M, & Vecino, E. (2003). Vías de señalización intracelular que conducen a la

- apoptosis de las células de la retina. *Archivos de la Sociedad Española de Oftalmología*, 78(7), 351-364. Recuperado en 09 de octubre de 2024, de http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0365-66912003000700004&lng=es&tlng=es.
- Gasaly, Naschla, Riveros, Karla, & Gotteland, Martín. (2020). Fitoquímicos: una nueva clase de prebióticos. *Revista chilena de nutrición*, 47(2), 317-327. <https://dx.doi.org/10.4067/S0717-75182020000200317>.
- González Escobar, Raimara. (2002). Modelos experimentales para la evaluación de la acción cicatrizante de medicamentos. *Revista Cubana de Farmacia*, 36(3), 189-196. Recuperado en 08 de octubre de 2024, de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75152002000300008&lng=es&tlng=es.
- Istifli, ES, Hüsunet, MT e Ila, HB (2019). División celular, citotoxicidad y ensayos utilizados en la detección de citotoxicidad. Citotoxicidad: definición, identificación y compuestos citotóxicos , 1 .
- Joachim, M., Dotto, S., & Abihudi, A. (2021). Nutraceutical value of Carica papaya: A review, *Scientific African*, 13, 2468-2276. <https://doi.org/10.1016/j.sciaf.2021.e00933>.
- Jonkman, J. E., Cathcart, J. A., Xu, F., Bartolini, M. E., Amon, J. E., Stevens, K. M., & Colarusso, P. (2014). An introduction to the wound healing assay using live-cell microscopy. *Cell adhesion & migration*, 8(5), 440–451. <https://doi.org/10.4161/cam.36224>.
- Karagiannis, TC, Wall, M., Ververis, K. *et al.* Caracterización de las células K562: descubrimiento de nuevos cromosomas, evaluación de la expresión del receptor de transferrina y estudio de terapias farmacológicas. *Cell. Mol. Life Sci.* 80, 248 (2023). <https://doi.org/10.1007/s00018-023-04905-6>.
- Kochetkov, D.V., Ilyinskaya, G.V., Komarov, P.G., et al., Transcriptional inhibition of the human papilloma virus reactivates tumor suppressor p53 in cervical carcinoma cells, *Mol. Biol.*, 2007, vol. 41, no. 3, pp. 459–466.
- Koeffler, H., & Golde, D. (1980). Human Myeloid Leukemia Cell Lines: A Review. *Blood*, 56(3), 344-350. <https://doi.org/10.1182/blood.V56.3.344.344>.

- Kuete, V., Karaosmanoğlu, O & Sivas, H. (2017). Chapter 10 - Anticancer Activities of African Medicinal Spices and Vegetables, Editor(s): Victor Kuete, Medicinal Spices and Vegetables from Africa, Academic Press, Pages 271-297, ISBN 9780128092866, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809286-6.00010-8>.
- Kumar, S., Krishnakumar, K & Mathew, J. (2022). Flavonoids from the butanol extract of *Carica papaya* L. cultivar 'Red Lady' leaf using UPLC-ESI-Q-ToF-MS/MS analysis and evaluation of the antioxidant activities of its fractions, *Food Chemistry Advances*, Volume 1, 100126, ISSN 2772-753X, <https://doi.org/10.1016/j.focha.2022.100126>.
- Leslie, S., Soon-Sutton, T., RIA, et al. Cáncer de próstata. [Actualizado el 30 de mayo de 2023]. En: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): Publicación de StatPearls; 2023 ene-. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470550/>
- Lim, DJ., Liu, XL., Sutkowski, DM., Braun, EJ., Lee, C., & Kozlowski, JM. (1993). Growth of an androgen-sensitive human prostate cancer cell line, LNCaP, in nude mice. *Prostate*. 22(2), 109-18. doi: 10.1002/pros.2990220203. PMID: 7681204.
- Lin, D., Xiao, M., Zhao, J., Li, Z., Xing, B., Li, X., Kong, M., Li, L., Zhang, Q., Liu, Y., Chen, H., Qin, W., Wu, H., & Chen, S. Overview of Plant Phenolic Compounds and Their Importance in Human Nutrition and Management of Type 2 Diabetes. *Molecules*. 21(10), 1374. <https://doi.org/10.3390/molecules21101374>.
- Liou, G. Y., & Storz, P. (2010). Reactive oxygen species in cancer. *Free radical research*, 44(5), 479–496. <https://doi.org/10.3109/10715761003667554>.
- López-Rubalcava, C., & Estrada-Camarena, E. (2016). Mexican medicinal plants with anxiolytic or antidepressant activity: Focus on preclinical research. *J Ethnopharmacol*. 20(186), 377-391. doi: 10.1016/j.jep.2016.03.053. Epub 2016 Mar 25. PMID: 27021688.
- Lozzio, B., & Lozzio, B. (1975). Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome. *Blood*, 45, 321-334. PubMed: 163658.
- Mahattanatawee, K., J.A. Manthey, G. Luzio, S.T. Talcott, K. Goodner and E.A. Baldwin, 2006. Total antioxidant activity and fiber content of select Florida-

- grown tropical fruits. *J. Agric. Food Chem.*, 54(19): 7355-7363.
- Marshall, ME et al. Growth-inhibitory effects of coumarin (1,2-benzopyrone) and 7-hydroxycoumarin on human malignant cell lines in vitro. *J Cancer Res Clin Oncol* 120 Suppl, S3-10, doi:<http://dx.doi.org/10.1007/bf01377114> (1994).
- Marrelli M. (2021). *Medicinal Plants*. *Plants* (Basel, Switzerland), 10(7), 1355. <https://doi.org/10.3390/plants10071355>.
- Martínez-Torres, A.C., Uscanga-Palomeque, A.C., & Rodríguez-Padilla, C. (2016). Actividad citotóxica *in vitro* frente a células tumorales. En RivasMorales, C., Oranday-Cardenas, M.A., & Verde-Star, M.J. (Eds.). *Investigación en plantas de importancia médica*. Barcelona, España: OmniaScience. 269-312.
- Meza-Espinoza, JP., González-García, JR., Contreras-Gutierrez, JA., & Picos-Cárdenas., VJ. (2022). Chronic myeloid leukemia: A science communication paper. *Universidad Autónoma de Sinaloa*. DOI: <http://dx.doi.org/10.28960/revmeduas.2007-8013.v12.n3.010>.
- Migliaccio, G., Ferraro, R., Wang, Z., Cristini, V., Dogra, P., & Caserta, S. (2023). Exploring Cell Migration Mechanisms in Cancer: From Wound Healing Assays to Cellular Automata Models. *Cancers*, 15(21), 5284. <https://doi.org/10.3390/cancers15215284>.
- Nakamura, H., & Takada, K. (2021). Reactive oxygen species in cancer: Current findings and future directions. *Cancer science*, 112(10), 3945–3952. <https://doi.org/10.1111/cas.15068>.
- Nayak, BS, Ramdeen, R., Adogwa, A., Ramsuhag, A. y Marshall, JR (2012), Potencial de cicatrización de heridas de un extracto de etanol de semillas de *Carica papaya* (Caricaceae). *International Wound Journal*, 9: 650-655. <https://doi.org/10.1111/j.1742-481X.2011.00933.x>.
- Nicholas A. Kurniawan, Parthiv Kant Chaudhuri, Chwee Teck Lim, Mechanobiology of cell migration in the context of dynamic two-way cell–matrix interactions, *Journal of Biomechanics*, Volume 49, Issue 8, 2016, Pages 1355-1368, ISSN 0021-9290, <https://doi.org/10.1016/j.jbiomech.2015.12.023>.
- Oberley, TD & Oberley, LW (1997). Niveles de enzimas antioxidantes en el cáncer. *Histología e histopatología*.

- Otsuki N, Dang NH, Kumagai E, Kondo A, Iwata S, Morimoto C. El extracto acuoso de hojas de *Carica papaya* exhibe actividad antitumoral y efectos inmunomoduladores. *J Etnofarmacol.* 2010; 127 (3): 760–767.
- Pavón, D., Lozada-García, JA., Vázquez-Martínez, J., Pacheco-Cobos, L & Hernández, O. (2022). Análisis fitoquímico de *Justicia spicigera* (Schltdl.) en *comunidades totonacas* (Libro).
- Peñarrieta, JM, Tejeda, L., Mollinedo, P., Vila, JL y Bravo, JA (2014). Compuestos fenólicos y su presencia en alimentos. *Revista Boliviana de Química* , 31 (2), 68-81.
- Pérez-Trueba, G. (2003). Los flavonoides: antioxidantes o prooxidantes. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, 22(1) Recuperado en 13 de agosto de 2024, de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-03002003000100007&lng=es&tlng=es.
- Petrovska B. B. (2012). Historical review of medicinal plants' usage. *Pharmacognosy reviews*, 6(11), 1–5. <https://doi.org/10.4103/0973-7847.95849>.
- Priyadurairaj., PalagatiRohith, R., Thirunavukkarasu, P., Sindhu, R., Suganya, K & Rajeswary, H. (2020). Effect of ethanolic extract of *Carica papaya* Leaves and their cytotoxicity and apoptotic potential in human ovarian cancer cell lines- PA-1. *Pharmacognosy Magazine*. 16. 10.4103/pm.pm_117_20.
- Ramírez-Farías, C., González-Blas, D., & Quintanar-Stephano, A. (2023). El papel del microambiente tumoral y los fibroblastos asociados a cáncer en el desarrollo y la progresión del cáncer de mama. *Journal of Senology and Breast Disease*, 36 (2). <https://www.elsevier.es/es-revista-revista-senologia-patologia-mamaria-131-articulo-el-papel-del-microambiente-tumoral-S0214158221000955>
- Ray, P. D., Huang, B. W., & Tsuji, Y. (2012). Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cellular signalling*, 24(5), 981–990. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2012.01.008>.
- Reed, JC. (2000). Mechanisms of Apoptosis, *The American Journal of Pathology*, Volume 157, Issue 5, Pages 1415-1430, ISSN 0002-9440, [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)64779-7](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)64779-7).
- Rodriguez LG, Wu X, Guan JL. Wound-healing assay. *Methods Mol Biol.*

2005;294:23-9. doi: 10.1385/1-59259-860-9:023. PMID: 15576902.

Ruiz-Argüelles, Guillermo José. (2016). Advances in the diagnosis and treatment of acute and chronic leukemia in Mexico. *Salud Pública de México*, 58(2), 291-295. Recuperado en 07 de agosto de 2024, de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0036-36342016000200291&lng=es&tlng=en.

Sæbø, I. P., Bjørås, M., Franzyk, H., Helgesen, E., & Booth, J. A. (2023). Optimization of the Hemolysis Assay for the Assessment of Cytotoxicity. *International journal of molecular sciences*, 24(3), 2914. <https://doi.org/10.3390/ijms24032914>.

Sahoo G, Samal D, Khandayataray P, Murthy MK. A Review on Caspases: Key Regulators of Biological Activities and Apoptosis. *Mol Neurobiol*. 2023 Oct;60(10):5805-5837. doi: 10.1007/s12035-023-03433-5. Epub 2023 Jun 22. PMID: 37349620.

Salazar-Gómez A, Alonso-Castro AJ. Plantas medicinales de América Latina con actividad cicatrizante: etnomedicina, fitoquímica, estudios preclínicos y clínicos: una revisión. *Pharmaceuticals*. 2022; 15(9):1095. <https://doi.org/10.3390/ph15091095>.

Salazar, Lorena, Rivas, Elizabeth, Pavón, Alequis, Wiese, Guillermo, Manzano, Camila, Orellana, Paz, Gutierrez-Moraga, Ana, Cortés-Cortés, Piedad, & Corsini, Gino. (2022). Citotoxicidad in vitro del Polipéptido Antimicrobiano Nisina sobre Células Tumorales Sanguíneas. *International Journal of Morphology*, 40(5), 1276-1283. <https://dx.doi.org/10.4067/S0717-95022022000501276>.

Sánchez-Mercader, A., Cámara-Salazar, A., Traconis-Díaz, V & Sánchez-Buenfil, G. Analysis of cervical cancer mortality in Mexico and the State of Yucatan. *Ginecol Obstet Mex*. 2021; 89 (9): 671-677.

Sandhu, S., Moore, M., Chiong, E., Beltran, H., Bristow, R., & Williams, S. (2021). Prostate cancer. *The Lancet*, 398, 1075-1090. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)00950-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)00950-8).

Santacruz Reyes L, Melo Jimenez Ángel, Rodríguez Herrera C, Moscoso Gama J.

- Historia de los cultivos de células animales in vitro y su importancia en la actualidad. *Bioc.* [Internet]. 25jun.2017 [citado diames.año];12(2). Available from: <http://revistas.unilibre.edu.co/index.php/biociencias/article/view/2293>.
- Segeritz, C & Vallier, L. (2017). Chapter 9 - Cell Culture: Growing Cells as Model Systems *In Vitro*, Basic Science Methods for Clinical Researchers, Academic Press, Pages 151-172, ISBN 9780128030776, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803077-6.00009-6>.
- Sekhoacha, M., Riet, K., Motloun, P., Gumenku, L., Adegoke, A., & Mashele, S. (2022). Prostate Cancer Review: Genetics, Diagnosis, Treatment Options, and Alternative Approaches. *Molecules*, 27(17):5730. <https://doi.org/10.3390/molecules27175730>.
- Singh, SP, Kumar, S., Mathan, SV et al. Aplicación terapéutica del extracto de hoja de *Carica papaya* en el manejo de enfermedades humanas. *DARU J Pharm Sci* 28 , 735–744 (2020). <https://doi.org/10.1007/s40199-020-00348-7>.
- Sfeir, A. and Lange, T.D., Removal of shelterin reveals the telomere end-protection problem, *Science*, 2012, vol. 336, pp. 593–597.
- Sharma A., Bachheti A., Sharma P., Bachheti RK & Husen A., (2020). Fitoquímica, actividades farmacológicas, fabricación de nanopartículas, productos comerciales y utilización de residuos de *Carica papaya L.* 145–160, <https://doi.org/10.1016/j.crbiot.2020.11.001>.
- Small, W., Jr, Bacon, MA, Bajaj, A., Chuang, LT, Fisher, BJ, Harkenrider, MM, Jhingran, A., Kitchener, HC, Mileskin, LR, Viswanathan, AN y Gaffney, DK (2017), Cáncer de cuello uterino: una crisis de salud global. *Cáncer*, 123: 2404-2412. <https://doi.org/10.1002/cncr.30667>.
- Stanciauskaite, M., Marksa, M., Babickaite, L. & Ramanauskiene, K. (2021). Comparison of Ethanolic and Aqueous *Populus balsamifera L.* Bud Extracts by Different Extraction Methods: Chemical Composition, Antioxidant and Antibacterial Activities. *Pharmaceuticals* (Basel, Switzerland), 14(10), 1018. <https://doi.org/10.3390/ph14101018>
- Susan H. Hsu et al., Características genéticas de la célula HeLa. *Ciencia* 191, 392-394 (1976). DOI: 10.1126/ciencia.1246620

- Świątek, M., Lu, Y. C., Konefał, R., Ferreira, L. P., Cruz, M. M., Ma, Y. H., & Horák, D. (2019). Scavenging of reactive oxygen species by phenolic compound-modified maghemite nanoparticles. *Beilstein journal of nanotechnology*, 10, 1073–1088. <https://doi.org/10.3762/bjnano.10.108>.
- Thakur, M., Singh, K., & Khedkar, R. (2020). Phytochemicals: Extraction process, safety assessment, toxicological evaluations, and regulatory issues. *Functional and Preservative Properties of Phytochemicals*, Academic Press, 341-361. ISBN 9780128185933, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818593-3.00011-7>.
- Trepát, X., Chen, Z., & Jacobson, K. (2012). Cell migration. *Comprehensive Physiology*, 2(4), 2369–2392. <https://doi.org/10.1002/cphy.c110012>.
- Tungmunnithum, D., Thongboonyou, A., Pholboon, A., & Yangsabai, A. (2018). Flavonoids and Other Phenolic Compounds from Medicinal Plants for Pharmaceutical and Medical Aspects: An Overview. *Medicines (Basel, Switzerland)*, 5(3), 93. <https://doi.org/10.3390/medicines5030093>.
- Vega-Avila E, Espejo-Serna A, Alarcón-Aguilar F, Velasco-Lezama R. Cytotoxic activity of four Mexican medicinal plants. *Proc West Pharmacol Soc.* 2009; 52:78-82. PMID: 22128430.
- Vega-Avila, E, Tapia-Aguilar, R, Reyes-Chilpa, R, Guzmán-Gutiérrez, SL, Pérez-Flores, J, & Velasco-Lezama, R. (2012). Actividad antibacteriana y antifúngica de Justicia Spicigera. *Revista latinoamericana de química*, 40(2), 75-82. Recuperado en 08 de octubre de 2024, de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0370-59432012000200003&lng=es&tlng=es.
- von Bernhardt M, Rommy. (2004). Mecanismos de muerte celular en las enfermedades neurodegenerativas: ¿apoptosis o necrosis?. *Revista chilena de neuro-psiquiatría*, 42(4), 281-292. <https://dx.doi.org/10.4067/S0717-92272004000400005>.
- Wang, Y., Nguyen, DT., Yang, G., Anesi, J., Kelly, J., Chai, Z., Ahmady, F. & Golledge, J. (2021). A Modified MTS Proliferation Assay for Suspended Cells to Avoid the Interference by Hydralazine and β -Mercaptoethanol. *ASSAY and Drug Development Technologies*. doi: 10.1089/adt.2020.1027.

- Yu, M., Gouvinhas, I., Rocha, J. et al. Análisis fitoquímico y antioxidante de plantas medicinales y alimenticias para la obtención de recursos farmacéuticos y alimentarios bioactivos. *Sci Rep* 11, 10041 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41598-021-89437-4>.
- Zamora S, Juan Diego, Otárola A, Isabel C, & Brenes G, Oscar. (2005). LA APOPTOSIS Y SU RELACIÓN CON DIVERSOS NUTRIENTES. *Revista chilena de nutrición*, 32(3), 178-190. <https://dx.doi.org/10.4067/S0717-75182005000300002>.
- Zhang Y, Cai P, Cheng G, Zhang Y. Una breve revisión de los compuestos fenólicos identificados en plantas: su extracción, análisis y actividad biológica. *Natural Product Communications* . 2022;17(1). doi: 10.1177/1934578X211069721.
- Zhao, C. (2023). Cultivo celular: sistema modelo *in vitro* y un camino prometedor hacia aplicaciones *in vivo*. *Journal of Histotechnology*, 46 (1), 1–4. <https://doi.org/10.1080/01478885.2023.2170772>.

11. ANEXOS

Anexo I. Determinación de compuestos fenólicos totales

Para la cuantificación de los fenoles totales se empleó el método de Folin-Ciocalteu descrito por Singleton *et al.*, 1965. Se elaboró una curva de calibración de ácido gálico (AG) en un rango de concentración de 0 a 100 mg AG/Litro (L), obteniéndose una curva de calibración con una ecuación de la forma $y=0.0109x-0.0008$ donde y =Absorbancia y x = concentración del extracto y un coeficiente de determinación $(R^2)=0.9996$, para la posterior determinación de fenoles totales en los extractos se utilizaron 200 μ l de cada muestra, a los cuales se agregaron 1 mL del reactivo Folin-Ciocalteu diluido 1:9 en agua destilada, se agitó la mezcla por 2-3 segundos y se añadieron 800 μ l de Carbonato de Sodio 7.5% (Na_2CO_3), mezclándose vigorosamente por otros 2-3 segundos.

La reacción se dejó reposar por 2 horas a temperatura ambiente y protegida de la luz. Luego, se midió la absorbancia por duplicado a 760 nm mediante un espectrofotómetro GENESYS 10S de espectroscopia ultravioleta-visible (UV-Vis). El contenido de compuestos fenólicos totales en los extractos se expresó en mg equivalentes de ácido gálico por gramo de extracto (mEAG/g).

		Solvents					
		<i>J. spicigera</i> leaves extract					F Test
		MetOH	EtOH	MetOH- H ₂ O (50/50% v/v)	EtOH- H ₂ O (50/50% v/v)	H ₂ O	
Phenols (mgGAE/g extract)		45.985 $\pm 2.517a$	46.598 $\pm 6.161 a$	53.692 $\pm 6.540 b$	89.024 $\pm 3.158 c$	42.638 $\pm 5.842 a$	F38,4=91.24
	<i>C. papaya</i> leaves extract						
		23.037 $\pm 1.151a$	31.405 $\pm 5.88 b$	52.943 $\pm 0.664 c$	71.322 $\pm 0.984 d$	79.821 $\pm 1.415e$	F44,4=688.91
	Different letters in superscripts indicate statistically significant differences at $P < 0.0001$.						

Tabla 1. Contenido total de fenoles de los extractos de hoja de *Justicia spicigera* y *Carica papaya*.

Anexo II. Determinación de flavonoides totales

El método utilizado para la determinación de flavonoides totales fue el de reactividad diferencial del tricloruro de aluminio. Para preparar la curva de calibración, se utilizó Quercetina (Q) con un rango de concentración de 0-0.020 mgQ/mL. La curva de calibración obtenida fue de 0.004-0.02 mgQ/ml, representada por la ecuación $y=31.95x-0.02$ donde y =Absorbancia y x = concentración del extracto y con un coeficiente de determinación (R^2) de 0.9918.

Para medir los flavonoides totales en los extractos, se tomó 1mL de cada extracto y se le añadió 1mL de tricloruro de aluminio 1% ($AlCl_3$) disuelto en una mezcla 1:1 de etanol y agua destilada. Se homogeneizó vigorosamente por 2-3 segundos, se dejó reposar por 10 minutos a temperatura ambiente y protegido de la luz. Después del tiempo de reacción, se midió la absorbancia por duplicado a 410nm utilizando un espectrofotómetro GENESYS 10S UV-Vis. Finalmente, el contenido de flavonoides totales se expresó en mg Equivalentes de quercetina por gramo de extracto (mEQ/g).

Solvents						
Flavonoids (mgQE/g extract)	<i>J. spicigera</i> leaves extract					F Test
	MetOH	EtOH	MetOH- H ₂ O (50/50% v/v)	EtOH- H ₂ O (50/50% v/v)	H ₂ O	
	33.522 ±3.580 <i>c</i>	38.813 ±4.127 <i>b</i>	20.562 ±2.854 <i>d</i>	45.049 ±1.074 <i>a</i>	16.791 ±2.508 <i>e</i>	F _{32,4} =113.8
	<i>C. papaya</i> leaves extract					
56.545 ±3.028 <i>a</i>	51.887 ±1.763 <i>b</i>	15.132 ±0.307 <i>c</i>	19.335 ±0.45 <i>d</i>	51.276 ±4.076 <i>b</i>	F _{35,4} =521.53	
Different letters in superscripts indicate statistically significant differences at P<0.0001.						

Tabla 2. Contenido total de flavonoides de los extractos de hoja de *Justicia spicigera* y *Carica papaya*.

Anexo III. Determinación de actividad antioxidante por el método de DPPH

Se preparó una curva de calibración de Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico (Trolox) en un rango de concentración de 0-100 $\mu\text{gTrolox/mL}$, obteniendo una curva de calibración representada por la ecuación $y = -0.141x + 1.2501$ donde $y = \text{Absorbancia}$ y $x = \text{concentración del extracto}$ y $R^2 = 0.9963$.

Luego, se tomaron 200 μl de cada extracto y se les añadieron 800 μl de buffer tris(hidroximetil)aminometano clorhidrato (Tris-HCl) 0.1M, se homogeneizaron vigorosamente por 2-3 segundos y se les agregó 1 mL del reactivo DPPH. Se homogeneizaron vigorosamente por 2-3 segundos y se dejaron en reposo por 30 minutos a temperatura ambiente y protegidos de la luz. Después del tiempo de reacción, se midió la absorbancia por duplicado a 515nm utilizando el espectrofotómetro GENESYS 10S UV-Vis. La capacidad antioxidante fue expresada en mg Equivalentes de Trolox por gramo de extracto (mgETrolox/g).

Anexo IV. Determinación de actividad antioxidante por el método de ABTS

Se preparó una curva de calibración de Trolox 2mM en un rango de concentración de 0-0.8, representada por la ecuación $y = -0.1446x + 0.8789$ donde $y = \text{Absorbancia}$ y $x = \text{concentración del extracto}$ y $R^2 = 0.9836$. Luego, se tomaron 100 μl de cada extracto y se les añadieron 3 mL del reactivo ABTS adicionado con 88 μl de persulfato de potasio 140 mM (K_2SO_4) ajustado a 0.74 unidades de absorbancia a 734nm utilizando metanol.

Se homogeneizaron por 2-3 segundos, se dejaron en reposo por 10 minutos a temperatura ambiente y protegidos de la luz. Después del tiempo de reacción, se midió la absorbancia por duplicado a 734nm utilizando el espectrofotómetro GENESYS 10S UV-Vis. La capacidad antioxidante fue expresada en mg Equivalentes de Trolox por gramo de extracto (mETrolox/g).

	Solvents					
	<i>J. spicigera</i> leaves extracts					F test
	MetOH	EtOH	MetOH- H ₂ O (50/50% v/v)	EtOH- H ₂ O (50/50% v/v)	H ₂ O	
ABTS (mgTrolox/g extract)	17.237 ±1.716 ^c	18.023 ±1.949 ^c	8.338 ±0.125 ^a	12.72 ±0.165 ^b	9.679 ±0.209 ^a	F _{29,4} =83.22
DPPH (mgTrolox/g extract)	8.673 ±0.502 ^c	9.852 ±0.310 ^d	2.974 ±0.280 ^a	4.028 ±0.068 ^b	2.778 ±0.102 ^a	F _{29,4} =762.7
	<i>C. papaya</i> leaves extract					
ABTS (mgTrolox/g extract)	22.535 ±0.427 ^a	25.941 ±1.66 ^b	21.804 ±1.205 ^a	29.002 ±0.9 ^b	45.877 ±5.426 ^c	F _{29,4} =83.94
DPPH (mgTrolox/g extract)	18.187 ±0.662 ^a	21.07 ±0.387 ^b	14.635 ±0.3 ^c	17.29 ±0.28 ^d	12.7 ±0.97 ^e	F _{29,4} =187.23
	Different letters in superscripts indicate statistically significant differences at P<0.0001.					

Tabla 3. Actividad antioxidante de los extractos de hoja de *Justicia spicigera* y *Carica papaya*.