



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES

CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS
DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA Y FARMACOLOGÍA

TESIS

“Posibles mecanismos de citotoxicidad del extracto metanólico de *Lepidium virginicum* L. (Brassicaceae) sobre la línea celular Caco-2”

PRESENTA:

Lic. QFB. Renata Gallegos Saucedo

**PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRÍA EN CIENCIAS AREA BIOTECNOLOGÍA
VEGETAL O TOXICOLOGÍA**

TUTORES

Dra. Raquel Guerrero Alba

Dr. Eduardo Emmanuel Valdez Morales

INTEGRANTES DEL COMITÉ TUTORAL

Dra. Yenny Adriana Gómez Aguirre

Aguascalientes, Ags, Marzo de 2023

VOTO APROBATORIO COMITÉ TUTORAL

CARTA DE VOTO APROBATORIO
COMITÉ TUTORAL

M. EN C. JORGE MARTÍN ALFÉREZ CHÁVEZ
DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS

PRESENTE

Por medio del presente como **Miembros del Comité Tutorial** designado del estudiante **RENATA GALLEGOS SAUCEDO** con ID **202745** quien realizó la tesis titulado: **POSIBLES MECANISMOS DE CITOTOXICIDAD DEL EXTRACTO METANÓLICO DE *Lepidium Virginicum* L. (BRASSICACEAE) SOBRE LA LÍNEA CELULAR CACO-2**, un trabajo propio, innovador, relevante e inédito y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia damos nuestro consentimiento de que la versión final del documento ha sido revisada y las correcciones se han incorporado apropiadamente, por lo que nos permitimos emitir el **VOTO APROBATORIO**, para que ella pueda proceder a imprimirla así como continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

Ponemos lo anterior a su digna consideración y sin otro particular por el momento, le enviamos un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"Se Lumen Proferre"

Aguascalientes, Ags., a 23 de marzo de 2023.



Dra. Raquel Guerrero Alba
Tutora de tesis



Dr. Eduardo Emmanuel Valdez Morales
Co-Tutor de tesis

Yenny Adriana Gómez A.
Dra. Yenny Adriana Gómez Aguirre
Asesora de tesis



c.c.p.- Interesado
c.c.p.- Secretaría Técnica del Programa de Posgrado

Elaborado por: Depto. Apoyo al Posgrado.
Revisado por: Depto. Control Escolar/Depto. Gestión de Calidad.
Aprobado por: Depto. Control Escolar/ Depto. Apoyo al Posgrado.

Código: DO-SEE-FO-16
Actualización: 00
Emisión: 17/05/19

RENATA GALLEGOS SAUCEDO
ESTUDIANTE DE LA MAESTRÍA
EN CIENCIAS AREA BIOTECNOLOGÍA VEGETAL O TOXICOLOGÍA
P R E S E N T E .

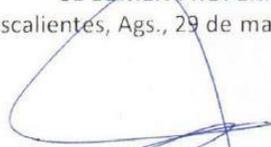
Estimada Alumna Renata Saucedo:

Por medio de este conducto me permito comunicar a Usted que habiendo recibido los votos aprobatorios de los revisores de su trabajo de tesis y/o trabajo práctico titulado: "POSIBLES MECANISMOS DE CITOTOXICIDAD DEL EXTRACTO METANÓLICO DE *Lepidium Virginicum* L. (BRASSICACEAE) SOBRE LA LINEA CELULAR CACO-2", hago de su conocimiento que puede imprimir dicho documento y continuar con los trámites para la presentación de su examen de grado.

Sin otro particular me permito saludarle muy afectuosamente.

ATENTAMENTE
"SE LUMEN PROFERRE"

Aguascalientes, Ags., 29 de marzo del 2023



EL DECANO
M. en C. JORGE MARTIN ALFEREZ CHAVEZ

DICTAMEN DE LIBERACIÓN ACADÉMICA



DICTAMEN DE LIBERACIÓN ACADÉMICA PARA INICIAR LOS TRÁMITES DEL EXAMEN DE GRADO



Fecha de dictaminación dd/mm/aa: 23 de marzo de 2023

NOMBRE: Renata Gallegos Saucedo **ID** 202745

PROGRAMA: Maestría en ciencias del área de toxicología **LGAC (del posgrado):** Toxicología

TIPO DE TRABAJO: (X) Tesis () Trabajo práctico

TÍTULO: POSIBLES MECANISMOS DE CITOTOXICIDAD DEL EXTRACTO METANÓLICO DE *Lepidium virginicum* L. (BRASSICACEAE) SOBRE LA LÍNEA CELULAR CACO-2 conocimiento nuevo que puede potencialmente dar lugar a un paradigma de nuevos compuestos terapéuticos para el tratamiento de cáncer colorrectal. Así como, la conservación y recuperación del conocimiento de las plantas medicinales que forman parte de la herbolaria tradicional mexicana desde épocas prehispánicas

IMPACTO SOCIAL (señalar el impacto logrado):

INDICAR SI/NO SEGÚN CORRESPONDA:

Elementos para la revisión académica del trabajo de tesis o trabajo práctico:

- Si El trabajo es congruente con las LGAC del programa de posgrado
- Si La problemática fue abordada desde un enfoque multidisciplinario
- Si Existe coherencia, continuidad y orden lógico del tema central con cada apartado
- Si Los resultados del trabajo dan respuesta a las preguntas de investigación o a la problemática que aborda
- Si Los resultados presentados en el trabajo son de gran relevancia científica, tecnológica o profesional según el área
- Si El trabajo demuestra más de una aportación original al conocimiento de su área
- Si Las aportaciones responden a los problemas prioritarios del país
- Si Generó transferencia del conocimiento o tecnológica

El egresado cumple con lo siguiente:

- Si Cumple con lo señalado por el Reglamento General de Docencia
- Si Cumple con los requisitos señalados en el plan de estudios (créditos curriculares, optativos, actividades complementarias, estancia, predoctoral, etc)
- Si Cuenta con los votos aprobatorios del comité tutorial, en caso de los posgrados profesionales si tiene solo tutor podrá liberar solo el tutor
- Si Cuenta con la carta de satisfacción del Usuario
- Si Coincide con el título y objetivo registrado
- Si Tiene congruencia con cuerpos académicos
- Si Tiene el CVU del Conacyt actualizado
- NA Tiene el artículo aceptado o publicado y cumple con los requisitos institucionales (en caso que proceda)

En caso de Tesis por artículos científicos publicados:

- NA Aceptación o Publicación de los artículos según el nivel del programa
- NA El estudiante es el primer autor
- NA El autor de correspondencia es el Tutor del Núcleo Académico Básico
- NA En los artículos se ven reflejados los objetivos de la tesis, ya que son producto de este trabajo de investigación.
- NA Los artículos integran los capítulos de la tesis y se presentan en el idioma en que fueron publicados
- NA La aceptación o publicación de los artículos en revistas indexadas de alto impacto

Con base a estos criterios, se autoriza se continúen con los trámites de titulación y programación del examen de grado

Si X
No

FIRMAS

Elaboró:

* NOMBRE Y FIRMA DEL CONSEJERO SEGÚN LA LGAC DE ADSCRIPCIÓN:

Elio Masada Quiñones

NOMBRE Y FIRMA DEL SECRETARIO TÉCNICO:

Raquel Guerrero Alba

* En caso de conflicto de intereses, firmará un revisor miembro del NAB de la LGAC correspondiente distinto al tutor o miembro del comité tutorial, asignado por el Decano.

Revisó:

NOMBRE Y FIRMA DEL SECRETARIO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO:

Juan José Rodríguez

Autorizó:

NOMBRE Y FIRMA DEL DECANO:

Nota: procede el trámite para el Depto. de Apoyo al Posgrado

En cumplimiento con el Art. 105C del Reglamento General de Docencia que a la letra señala entre las funciones del Consejo Académico: Cuidar la eficiencia terminal del programa de posgrado y el Art. 105F las funciones del Secretario Técnico, llevar el seguimiento de los alumnos.

Elaborado por: D. Apoyo al Posg.
Revisado por: D. Control Escolar/D. Gestión de Calidad.
Aprobado por: D. Control Escolar/ D. Apoyo al Posg.

Código: DO-SEF-FO-15
Actualización: 01
Emisión: 20/06/19

AGRADECIMIENTOS

Primero que nada, quiero agradecer al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), ya que por medio de la beca me brindó los recursos necesarios para lograr llevar a cabo el proyecto de investigación.

De manera especial a mi tutora la Dra. Raquel Guerrero Alba por haberme guiado, en la elaboración de este trabajo de investigación y por haberme brindado el apoyo para desarrollarme profesionalmente y seguir cultivando mis conocimientos, ya que me enseñó a tener esa necesidad de seguir aprendiendo cada día más.

A mi cotutor el Dr. Eduardo Emmanuel Valdez Morales por sus enseñanzas, dentro de las más importante fue el preguntar antes de actuar y saber aceptar los errores. Gracias por ayudarme a ser una persona más precisa y clara.

A mi asesora la Dra. Yenny Adriana Gómez Aguirre por su apoyo en la elaboración del extracto metanólico de *Lepidium virginicum*, por guiarme durante todo este proceso con sus enseñanzas, apoyo, dedicación y motivación.

A el Dr. Tonatiuh Barrios García por enseñarme lo increíble que es el mundo del cultivo celular, por su paciencia al momento de compartirme cada una de las técnicas. Gracias por ser un gran maestro para mí, pero más que un profesor gracias por ser un gran amigo.

A la Biotecnóloga Vicky, técnica del laboratorio de la Dra. Yenny. La cual, gracias a su conocimiento, me enseñó a realizar el método de extracción de las plantas. Y además me ayudo a conocer técnicas para la identificación de diferentes contaminantes en los medios de cultivo.

A mis compañeros del laboratorio, gracias por su apoyo en los momentos difíciles, por estar conmigo en los logros y en las derrotas. Gracias a ustedes fue más ameno el tiempo en el laboratorio.

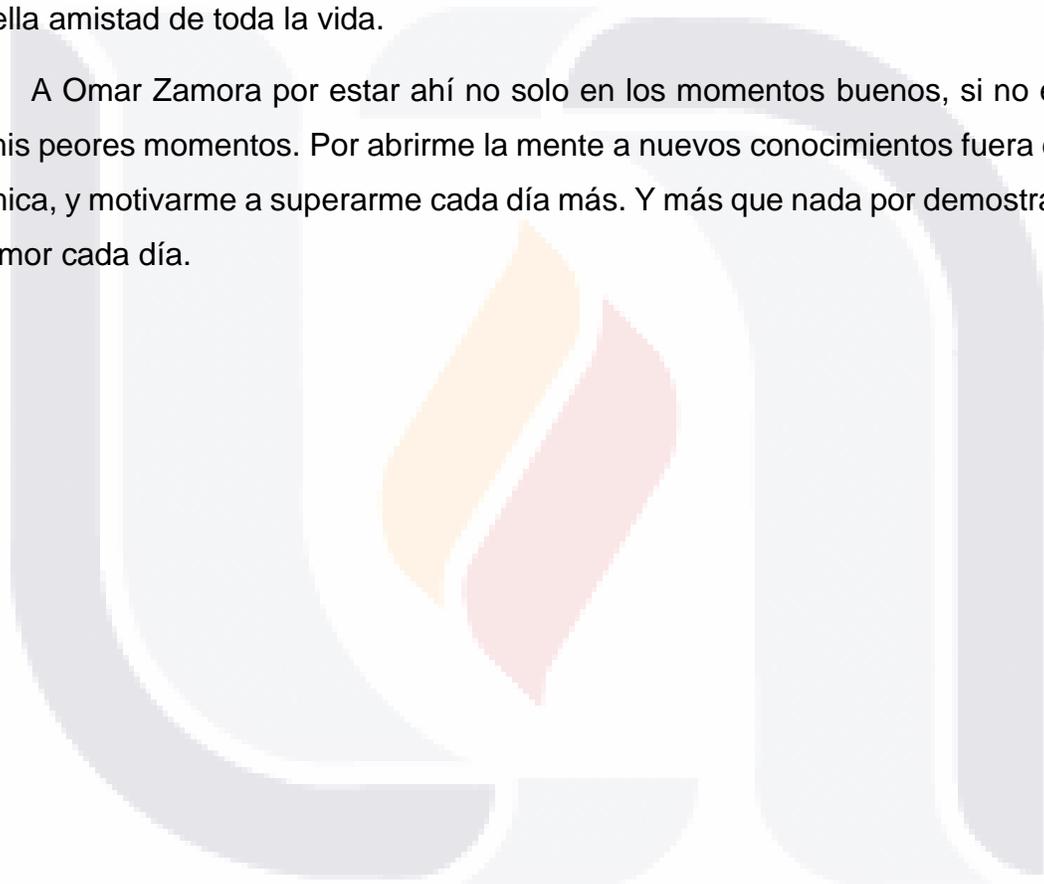
A mis padres Alejandro Gallegos Álvarez y Martha Araceli Saucedo Herrera, quienes con su amor, paciencia y esfuerzo me han permitido cumplir con todas mis

metas, gracias por inculcar en mí el ejemplo de esfuerzo y valentía, y de no temer a ninguna adversidad porque ellos siempre estarán conmigo.

A mi hermana Andrea, por ser mi mayor motivación para el seguir cumpliendo cada una de mis metas. Y a mi hermano Diego por su cariño y apoyo incondicional, durante todo este proceso, por estar conmigo en todo momento gracias.

A mi amigo Alejandro Israel Muñoz Nieto y Blanca Esthela Cárdenas porque me ofrecieron su apoyo moral en los momentos buenos y malos. Gracias por ser aquella amistad de toda la vida.

A Omar Zamora por estar ahí no solo en los momentos buenos, si no estar en mis peores momentos. Por abrirme la mente a nuevos conocimientos fuera de la química, y motivarme a superarme cada día más. Y más que nada por demostrarme su amor cada día.



1. ÍNDICE GENERAL

1. ÍNDICE GENERAL.....	1
ÍNDICE DE TABLAS	4
ÍNDICE DE FIGURAS	5
ACRÓNIMOS	6
RESUMEN	7
ABSTRACT	8
2 INTRODUCCIÓN	9
3 MARCO TEÓRICO	10
3.1 CÁNCER COLORRECTAL	10
3.2 PLANTAS MEDICINALES Y SUS COMPONENTES BIOACTIVOS	13
3.2.1 Estructura y clasificación de los metabolitos secundarios.....	14
Compuestos fenólicos	14
a. Fenol	14
b. Ácidos fenólicos	14
c. Xantonas, estilbenos y benzofenonas.....	15
d. Flavonoides.....	15
e. Cumarinas.....	15
Terpenoides	16
Saponinas	17
3.2.2 Alcaloides.....	19
3.3 PLANTAS MEDICINALES EN MÉXICO.....	19

3.4 GENERALIDADES DE <i>Lepidium virgnicum</i> L.	20
3.5 PLANTAS MEDICINALES PARA EL TRATAMIENTO DEL CÁNCER COLORECTAL....	22
3.6 LINEA CELULAR CACO-2.....	22
4 JUSTIFICACIÓN	23
5 HIPOTESIS.....	24
6 OBJETIVOS.....	24
6.1 General	24
6.2 Específicos.....	24
7 METODOLOGIA	24
7.1 Recolección de plantas silvestres <i>L. virginicum</i>.	24
7.2 Preparación del extracto orgánico del tallo de <i>L. virginicum</i>.	25
7.3 Separación e identificación tentativa de los compuestos fitoquímicos de extracto metanólico de <i>L. virginicum</i> mediante la técnica de cromatografía de gases acoplada a espectrofotometría de masas (GC- MS).	25
7.4 Determinación de la actividad citotóxica del extracto metanólico de <i>L. virginicum</i>	26
Ensayo de MTT	26
Ensayo colorimétrico de lactato deshidrogenasa (LDH).....	27
7.5 Ensayo de fragmentación de ADN celular.....	28
7.6 Extracción de ARN, retro transcripción y qPCR	29
8 RESULTADOS.....	30
8.1 Análisis de los compuestos fitoquímicos del extracto metanólico de <i>L. virginicum</i>	30
8.2 El extracto metanólico de <i>L. virginicum</i> reduce la viabilidad celular en las células Caco-2, pero no reduce la de los fibroblastos Detroit 548.	34
8.3 Efecto del extracto metanólico de <i>Lepidium virginicum</i> sobre la fragmentación de ADN	37
8.4 Efecto del extracto metanólico de <i>L. virginicum</i> sobre la expresión de genes	

reguladores de apoptosis en la línea celular Caco-2. 38

9 DISCUSIÓN 39

10 CONCLUSIONES 42

11 BIBLIOGRAFÍA 42



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Estructura de los tipos de compuestos fenólicos..... 18

tabla 2. Taxonomía de *L. virginicum* 20

tabla 3. Secuencia de oligos utilizados en el qpcr..... 30

tabla 4. Principales compuestos fitoquímicos identificados por gc-ms..... 32



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura del paclitaxel. 17

Figura 2. Ejemplares de *L. virginicum* 21

Figura 3. Línea celular caco-2 23

Figura 4. Cromatogramas de gc-ms. Extracto metanólico del tallo de *L. virginicum*.
..... 31

Figura 5. Efecto del extracto metanólico de *L. virginicum* (ELV) a diferentes concentraciones sobre la viabilidad celular en células cancerosas caco-2 incubadas 24 (a) y 48 horas (b). Efecto sobre la viabilidad celular de los fibroblastos detroit-548 expuestos a diferentes concentraciones del elv durante 24 (c) y 48 horas (d). 35

Figura 6. Efecto del extracto metanólico de *L. virginicum* a diferentes concentraciones sobre la liberación de ldh en las células caco-2 incubadas durante 24 (a) y 48 horas (b), así como en la línea celular de fibroblastos humanos detroit 548 en periodos de incubación de 24 horas (c) y 48 horas (d).
..... 36

Figura 7. El extracto metanólico de *Lepidum virginicum* induce fragmentación de adn y apoptosis en células caco-2. (a) células caco-2 fueron tratadas con elv (0.01, 0.1 y 1 mg/ml) y 48 horas después las células fueron lisadas para cuantificar el adn fragmentado usando el kit de ELISA. (b) cinética de la muerte celular apoptótica inducida por el extracto metanólico de *L. virginicum* en células caco-2. 37

Figura 8. Efecto del extracto metanólico de *L. virginicum* (1 mg/ml) sobre la expresión génica de caspasa-3 (a), p53 (b) y bcl-2 (c) en células caco-2. 38

ACRÓNIMOS

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

Bcl-2: linfoma 2 de las células B

BrdU: 5'-bromo-2'-desoxiuridina.

CCR: Cáncer colorrectal.

CIN: Inestabilidad cromosómica

EGFR: Receptor del factor de crecimiento epidérmico.

ELISA: Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas.

ELv: Extracto metanólico de *Lepidium virginicum*

FADD: Dominio de muerte asociado a Fas

FPH: Fibroblastos pulpaes humanos.

GC-MS: Cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas.

HUAA: Herbario de la Universidad Autónoma de Aguascalientes.

IC50: Concentración inhibitoria máxima media.

LDH: Lactato deshidrogenasa.

MSI: inestabilidad de microsatélites.

MTT: Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difeniltetrazolio

NL20: Línea celular epitelial bronquial humana.

P53: Proteína supresora de tumores 53.

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.

RNA: Ácido ribonucleico.

UAA: Universidad Autónoma de Aguascalientes.

VEGF-A: Factor de crecimiento endotelial vascular A.

RESUMEN

El cáncer colorrectal (CCR) ocupa el tercer tipo de cáncer más común en todo el mundo, es difícil de tratar debido a que un gran porcentaje de pacientes con CCR no responden al tratamiento y/o presentan efectos secundarios adversos. El uso de plantas medicinales representa una alternativa cada vez más explorada y promisorio para el tratamiento del CCR, ya que son ampliamente reconocidas como fuente de compuestos bioactivos contra el cáncer. La planta *Lepidium virginicum* L. (Brassicaceae), conocida como “lentejilla de campo”, ha sido empleada como un remedio natural para diversas afecciones; sin embargo, a la fecha no existe un estudio científico que demuestre su posible efecto citotóxico contra células cancerosas. Por tal motivo, el objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto citotóxico del extracto metanólico de *L. virginicum* sobre una línea celular de adenocarcinoma colorrectal de humano (Caco-2). Se obtuvo el extracto metanólico a partir de los tallos de *L. virginicum* los cuales fueron recolectados, desecados a temperatura ambiente, pulverizados y macerados en metanol. Los componentes del extracto metanólico fueron analizados por cromatografía de gases acoplada a espectrofotometría de masas (GC/MS) y la actividad citotóxica se evaluó mediante ensayos de viabilidad celular por reducción del compuesto bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difenil tetrazolio (MTT) y de lactato deshidrogenasa (LDH). El cromatograma GC/MS mostró la presencia de 28 picos. Entre los compuestos identificados se encuentran compuestos aromáticos y ésteres. Los ensayos de MTT y LDH revelaron que el extracto metanólico de *L. virginicum* disminuye la viabilidad celular dependiente de la concentración en la línea celular Caco-2 a las 48 h. Se determinó la concentración inhibitoria del 50% de la viabilidad celular (IC50), siendo de 1.06 mg/mL, esta disminución de la viabilidad celular al parecer es por vía apoptótica. En conclusión, nuestros hallazgos demuestran que el extracto de *L. virginicum* posee propiedades citotóxicas sobre Caco-2 sugiriendo que podría ser una posible fuente potencial de nuevos fármacos contra el CCR.

ABSTRACT

Colorectal cancer (CRC) is the third most common type of cancer worldwide. It is challenging to treat because many patients with CRC do not respond to treatment or have adverse side effects. The use of medicinal plants represents an increasingly explored and promising alternative for treating CRC since they are widely recognized as a source of bioactive compounds against cancer. *Lepidium virginicum* L. (Brassicaceae), known as "field lentil," has been used as a natural remedy for various conditions; however, no scientific study has demonstrated its possible cytotoxic effect on cancer cells to date. For this reason, the objective of this work was to evaluate the cytotoxic effect of the methanolic extract of *L. virginicum* on a human colorectal adenocarcinoma cell line (Caco-2). The methanolic extract was obtained from the stems of *L. virginicum*, which were collected, dried at room temperature, pulverized, and macerated in methanol. It was filtered, concentrated, and lyophilized. The components of the methanolic extract were analyzed by gas chromatography coupled to mass spectrophotometry (GC/MS), and the cytotoxic activity was evaluated using cell viability assays by reduction of the compound 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) and lactate dehydrogenase (LDH). The GC/MS chromatogram showed the presence of 28 peaks. Among the compounds identified are aromatic compounds and esters. MTT and LDH assays revealed that the methanolic extract of *L. virginicum* decreases concentration-dependent cell viability in the Caco-2 cell line at 48 h. The inhibitory concentration of 50% cell viability (IC₅₀) was determined as being 1.06 mg/mL. This decrease in cell viability was caused by apoptosis. In conclusion, our findings demonstrate that the extract of *L. virginicum* possesses cytotoxic properties on Caco-2, suggesting that it could be a possible potential source of new drugs against CRC.

2 INTRODUCCIÓN

El cáncer de colorrectal (CCR) es la segunda causa de mortalidad relacionada con el cáncer, causando hasta 1 millón de muertes al año (Sung et al., 2021). Desafortunadamente, el 20 al 25% de los pacientes con CCR presentan metástasis al inicio de la enfermedad y el 50% de los pacientes eventualmente la desarrollan (Guren, 2019). En estos casos, las terapias actuales disponibles no han logrado modificaciones significativas en las tasas de supervivencia global (Morano & Sclafani, 2018). Además, la disminución de la esperanza y calidad de vida por la presencia de efectos adversos y resistencia a las terapias actuales del CCR exigen el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas. En este contexto, los extractos de plantas son una fuente importante de compuestos bioactivos antitumorales que se están considerando como una alternativa de tratamiento (Goyal et al., 2017). Específicamente, los extractos de la familia Brassicaceae contiene abundantes compuestos bioactivos directamente relacionados con propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y antitumorales (Peña et al., 2022); sin embargo, pocos son los estudios de las propiedades farmacológicas que pudieran tener la planta *Lepidium virginicum* L., la cual es una especie de esta gran familia, distribuida ampliamente en México y utilizada en la medicina tradicional mexicana para el tratamiento de diarrea y disentería (Berlín et al., 1995).

En un estudio previo, reportan que *L. virginicum* contiene glucosinolato de bencilo con propiedades anti protozoarias contra *Entamoeba histolytica* (Calzada et al., 2003). En otro estudio, se demostró que los aceites esenciales de *L. virginicum* contienen fenilacetronilo y el α -terpinol con propiedades antifúngicas (Pacheco-Hernández et al., 2021) y recientemente se demostró que el extracto etanólico del tallo tiene actividad antiinflamatoria en un modelo de colitis aguda (Cruz-Muñoz et al., 2022). Se desconoce si los extractos de *L. virginicum* poseen actividad citotóxica contra células de CCR. Por tal motivo, el objetivo del presente estudio fue proporcionar la primera evaluación de los posibles efectos y mecanismos citotóxicos del extracto metanólico de *L. virginicum* utilizando un modelo *in vitro* de cáncer colorrectal.

3 MARCO TEÓRICO

3.1 CÁNCER COLORRECTAL

El CCR es uno de los cánceres diagnosticados con mayor frecuencia; en general, el CCR representa el 9,4 % de todos los cánceres en mujeres y el 10,6 % en hombres, el segundo cáncer más común diagnosticado en mujeres y el tercero en hombres (Chetroui et al., 2021). La edad de incidencia del CCR es mayor de 50 años. La mortalidad depende de la distribución por etapas al momento del diagnóstico, lo que influye en la disponibilidad de un programa de tamizaje poblacional y el nivel de atención en cada país. El CCR es la segunda causa más común de muerte relacionada con el cáncer en todo el mundo (Sung et al., 2021).

La incidencia varía geográficamente, con la incidencia más alta en Australia y Nueva Zelanda (44.8 y 32.2 por cada 100.000 hombres y mujeres, respectivamente). La incidencia más baja se encuentra en África Occidental (4.5 y 3.4 por cada 100.000 hombres y mujeres, respectivamente). Las regiones más desarrolladas (Europa, América del Norte, Japón, Nueva Zelanda) tienen una mayor incidencia que las regiones menos desarrolladas (África, América Latina y el Caribe), asociándose con los diferentes niveles socioeconómicos (Kuipers et al., 2015). En México, según la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) en 2020, el CCR es el tercer cáncer más común y tiene una tasa de mortalidad de 63.2 por cada 100,000 habitantes, siendo más frecuente en hombres.

La etiología del CCR es compleja y multifactorial y está asociada a factores de riesgo modificables y no modificables. Los factores de riesgo no modificables incluyen raza, etnia, sexo, edad y mutaciones hereditarias. Entre el 2% y el 5% de los pacientes con CCR tienen mutaciones genéticas heredadas que causan síndromes de cáncer familiar, incluido el síndrome de Lynch (cáncer colorrectal hereditario sin poliposis o HNPCC), poliposis adenomatosa familiar (FAP), poliposis asociada a MUTYH (MAP), síndrome de Peutz- Síndrome de Jeghers (PJS), poliposis juvenil y síndrome de Hamartoma de Cowden/PTEN. El cáncer colorrectal hereditario más común es el síndrome de Lynch, que es causado por una mutación en un alelo de un gen de reparación de errores de emparejamiento del ADN, más

comúnmente MLH1 y MSH2 (hasta 90 %) o con menos frecuencia MSH6 (alrededor del 10 %) (Giglia & Chu 2016).

Aproximadamente el 60-65 % de los casos de CCR se atribuyen principalmente a factores modificables (Keum & Giovannucci, 2019). El factor de riesgo modificable incluye factores ambientales del estilo de vida, como el tabaquismo, la ingesta de alcohol, la dieta, la obesidad y la inactividad física. Estos dos últimos constituyen el contribuyente de comportamiento más importante para el desarrollo de CCR asociado con un aumento del riesgo de hasta un 50 % (Rawla et al., 2019). La dieta puede desempeñar un papel adverso en el desarrollo de CCR, independientemente de la obesidad. Un estudio de metaanálisis encontró que la ingesta de carne roja y procesada aumenta el riesgo de CCR en aproximadamente 1.16 veces por cada 100 g de aumento de la ingesta diaria (Lippi et al., 2016). Además, el alto consumo de alcohol está relacionado con un aumento del 50 % en el riesgo de CCR y de tabaquismo intenso crónico que tiene un efecto de magnitud similar (Botteri et al., 2008; Liang et al., 2009; Fedirko et al., 2011).

El CCR se considera un grupo heterogéneo de enfermedades con diferentes alteraciones genéticas y epigenéticas. Estas alteraciones conducen a una pérdida o ganancia de función en genes supresores y oncogenes, respectivamente, impulsando la progresión desde el epitelio colónico normal hacia el adenocarcinoma al alterar las vías de señalización que regulan los comportamientos del cáncer. La pérdida de estabilidad genómica y epigenética se ha observado en la mayoría de las lesiones neoplásicas tempranas en el colon. Es probable que sea un evento molecular y fisiopatológico principal en el inicio y la formación de CRC (Kuipers et al., 2015).

Las alteraciones genómicas pueden desarrollarse a partir de dos vías moleculares: inestabilidad cromosómica (CIN) e inestabilidad de microsatélites (MSI). Las características de CIN son aneuploidía (número anormal de cromosomas) y pérdida de heterocigosidad en 10q y 17q cromosómico o ganancias de secuencias de ADN en 5p y 6p cromosómico en las células. Aunque los mecanismos subyacentes de la CIN durante la carcinogénesis colorrectal aún se

desconocen, se cree que la CIN podría ser causada por la segregación cromosómica y la respuesta inadecuada al daño del ADN que puede alterar los genes supresores de tumores o activar los oncogenes (Hong, 2018). La MSI es causada por mutaciones en los genes de reparación de errores de emparejamiento del ADN, como MLH1, MSH2, MSH6 y PMS2, y se encuentra en el 10 % al 15 % de los cánceres colorrectales esporádicos (CCR) (Kang et al., 2018). Se han encontrado otras mutaciones genéticas en el CCR, por ejemplo, mutaciones en los protooncogenes RAS (HRAS, KRAS y NRAS) y p53, éste último se clasifica como un gen supresor de tumores, y su inactivación permite una proliferación celular excesiva que impulsa la progresión tumoral (Hong, 2018).

Además de las alteraciones genómicas, las alteraciones epigenéticas ocurren con frecuencia en el CCR y parecen colaborar con las mutaciones genéticas para impulsar la progresión del pólipo hacia el cáncer. La inestabilidad epigenética se caracteriza por la metilación del ADN que afecta las regiones ricas en CpG (islas CpG), que a menudo se ubican en la región 5' de los genes y pueden provocar un silenciamiento transcripcional a través de efectos en la unión del factor de transcripción y cambios en la estructura de la cromatina. Las modificaciones en la metilación del ADN relacionadas con el desarrollo del cáncer incluyen dos cambios fundamentales: la hipermetilación de las islas CpG en los promotores de genes, que pueden silenciar los genes supresores de tumores, y la hipometilación de elementos genéticos repetitivos, que pueden provocar inestabilidad genómica o activación de oncogenes (Kuipers et al., 2015).

El CCR a menudo no presenta síntomas hasta que se encuentra en una etapa avanzada, y los datos recientes indican que la cantidad de casos nuevos de cáncer colorrectal está aumentando en personas más jóvenes. La supervivencia a largo plazo de la población con CCR sigue siendo baja, con una tasa de supervivencia a 5 años de casi el 60% de los pacientes en etapa inicial (Siegel et al., 2020).

El diagnóstico de CCR comienza con la evaluación de los síntomas, que incluyen sangre en las heces, cambios en los hábitos intestinales, dolor abdominal, fatiga y pérdida de peso. Seguimiento de colonoscopia y técnicas endoscópicas como

endoscopia de luz blanca de alta definición, cromoendoscopía, endoscopia de aumento, etc. (Kuipers et al. 2015).

El tratamiento para el CCR incluye cirugía laparoscópica para la enfermedad primaria, radioterapia para el cáncer de recto y para el CCR metastásico es una terapia sistémica como quimioterapia citotóxica, anticuerpos contra factores de crecimiento celular, inmunoterapia y su combinación (Biller & Schrag, 2021). Sin embargo, estas opciones de tratamiento han tenido un impacto limitado en las tasas de curación y la supervivencia a largo plazo. Por lo tanto, existe una gran necesidad de descubrir y desarrollar nuevos agentes anticancerígenos. En este sentido, las plantas medicinales han sido una fuente invaluable de compuestos antitumorales relevantes en la terapia contra el cáncer.

3.2 PLANTAS MEDICINALES Y SUS COMPONENTES BIOACTIVOS

Las plantas medicinales han sido utilizadas en la medicina tradicional en la prevención de enfermedades y como remedio para aliviar un gran número de afecciones (González-García et al., 2020). Alrededor del 50% de los medicamentos usados en la actualidad se basan en productos naturales (Barkat et al., 2021), y no menos del 80% de la población mundial los emplea para la atención médica básica (Ekor, 2014).

El potencial terapéutico de las plantas medicinales está relacionado con los compuestos bioactivos, a los que se les ha atribuido propiedades antiinflamatorias, citotóxicas y antioxidantes, empleándose como la base de muchos fármacos comerciales (Li et al., 2021). Tales metabolitos son extremadamente diversos, y dependiendo de cada familia, género y especie de plantas, se puede producir una mezcla propia de productos fitoquímicos en cada planta en particular (Kabera, 2014).

Dichos compuestos bioactivos son metabolitos secundarios que se sintetizan y acumulan en las plantas en respuesta a factores ambientales y genéticos (Li et al., 2020)

3.2.1 Estructura y clasificación de los metabolitos secundarios

Los metabolitos secundarios son moléculas orgánicas derivados del metabolismo primario en las plantas y se clasifican de acuerdo con su ruta biosintética en: (1) compuestos fenólicos, (2) terpenos y esteroides, (3) Compuestos nitrogenados (Kabera, 2014), mismos que son descritos a continuación.

Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos de las plantas son uno de los grupos más grande de metabolitos secundarios. Se caracterizan por tener propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, anticancerígenas, entre otras propiedades biológicas, además pueden proteger del estrés oxidativo y de algunas enfermedades. Son de estructura diversa y presentan en común anillos aromáticos hidroxilados (Tabla 1).

a. Fenol

El fenol es la molécula básica de los compuestos fenólicos, consiste en un anillo aromático (fenil) unido a un grupo hidroxilo (OH) (Tabla 1), siendo el anillo aromático el que tiene un papel importante en las propiedades antioxidantes. Además de la propiedad antioxidante, hay pruebas de que éstos tienen una actividad biológica antimicrobiana, antiparasitaria y citotóxica (Kozubek & Tyman, 1999; Ross et al., 2003).

b. Ácidos fenólicos

Los ácidos fenólicos son dos grupos: los ácidos hidroxibenzoicos e hidroxicinámicos. La presencia de más de un grupo hidroxilo y una separación mayor en el grupo carbonilo al anillo aromático aumenta la actividad antioxidante (Tabla 1) (Dziedzic & Hudson, 1984).

- **Ácidos hidroxibenzoicos:** Son compuestos que presentan un grupo carboxílico y uno o más grupos hidroxilos, por ejemplo, el ácido protocatéquico tiene un efecto protector frente a las lesiones del hígado en un modelo animal (Liu et al., 2002).

- TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS
- **Ácidos hidroxicinámicos:** Estos ácidos fenólicos se caracterizan por la presencia de $\text{CH} = \text{CH}-\text{COOH}$ en lugar del grupo COOH presente en el ácido hidroxibenzoicos. El doble enlace aumenta la resonancia química lo que aumentara la capacidad antioxidante. A parte de su capacidad antioxidante, los ácidos hidroxicinámicos han mostrado actividad antígeno tóxica y anti proliferativa en células (Ferguson et al., 2005).

c. Xantonas, estilbenos y benzofenonas

Estos tres compuestos se encuentran de forma natural en las plantas. Sus estructuras se relacionan porque tienen dos anillos aromáticos unidos por una cetona, heterocíclicas o grupos vinilo (Tabla 1). Han presentado actividad frente a varias enfermedades crónicas, como inflamación, artritis y enfermedades cardiovasculares (Dua et al., 2009).

d. Flavonoides

Son compuestos químicos naturales, solubles en agua y tienen un peso molecular bajo; estos se pueden encontrar ya sea de forma libre (aglicona) o conjugados con azúcares (Glucósidos) en los frutos, flores, semilla, hojas y en una forma muy ampliamente distribuida en el reino vegetal, aunque principalmente en las angiospermas (Bispo da Silva et al., 2017; Lopes et al., 2013). Se ha comprobado en estudios previos que los flavonoides vegetales tienen propiedades antioxidantes y antiinflamatoria, estas propiedades se han atribuido al compuesto rutina, la cual tiene la capacidad de inhibir la agregación plaquetaria y de la beta-amiloide, el estrés oxidativo y la producción de citocinas proinflamatorias (Bispo da Silva et al., 2017; Tian et al., 2016).

e. Cumarinas

Son lactonas insaturadas, que cuenta con un hetero núcleo, el cual se denomina benzo 2-pirona y su formación es clave para la síntesis de ciclación. Son solubles en soluciones acuosas o alcohólicas de hidróxido de sodio (Ávalos García & Pérez-Urria Carril, 2009). La mayoría de las cumarinas se encuentran de manera libre en las plantas, encontrándose con mayor probabilidad en leguminosa, orchidaceas,

rutáceas y umbelíferas en las raíces, frutos y flores. Se clasifican como cumarinas simples, complejas y diversas. Se le han atribuido propiedades farmacológicas, como son antimicrobianas, antiinflamatoria, antiespasmódicas, antivirales, antihelmínticas, antioxidantes o inhibidores enzimáticos (Jacobo-Herrera & Quimis-Ponce, 2017).

Terpenoides

Estos constituyen el grupo más grande de metabolitos secundarios, con más de 40,000 moléculas diferentes. Suelen ser insolubles en el agua y todos los terpenos derivan de la unión de unidades de isopreno, de este modo los terpenos se suelen clasificar por el número de unidades de isopropilo que contiene en monoterpeno, sesquiterpenos, diterpeno, triterpenos, tetraterpenos y politerpenos (Ávalos García & Pérez-Urria Carril, 2009).

En muchas de las plantas como el limón, menta, eucalipto, etc. se producen mezclas de alcoholes, aldehídos, cetonas y terpenoides los cuales se denominan aceites esenciales, estos suelen ser los responsables de los olores y sabores, que hacen característicos a estas plantas (Ávalos García & Pérez-Urria Carril, 2009). Muchos de ellos se han aislado de plantas medicinales, como *Ginkgo biloba*, *Taxus chinensis*, *Artemisia annua*, *Salvia miltiorrhiza* y *Panax ginseng*. Los terpenoides de las plantas, como la artemisinina, el taxol y las ginkgólidos, tienen buenos efectos curativos en una variedad de enfermedades. Por ejemplo, la artemisinina, una lactona sesquiterpenoide derivada de *A. annua*, es actualmente el mejor tratamiento contra las cepas de *Plasmodium falciparum* resistentes a los medicamentos y causantes del paludismo cerebral (Weathers et al., 2006).

El paclitaxel (Figura 1), un diterpenoide producido por *Taxus brevifolia* y otras especies de *Taxus*, es un importante agente anticancerígeno (Lenka et al., 2012). Los ginkgólidos, una familia estructuralmente única de diterpenoides, son antagonistas del receptor del factor activador de plaquetas altamente específicos (Stromgaard y Nakanishi, 2004).

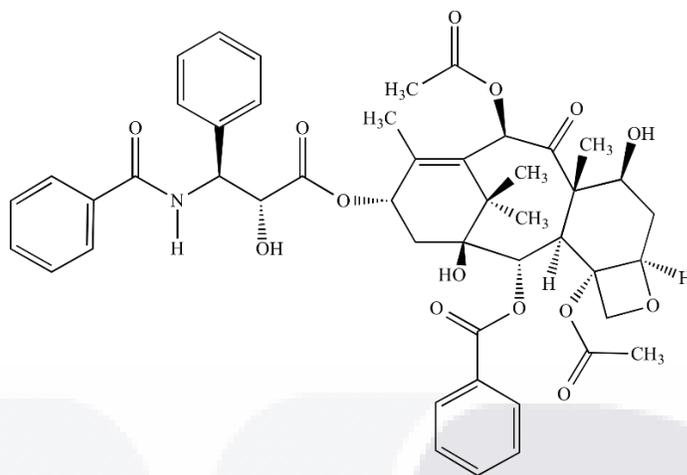
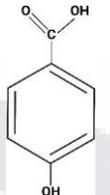
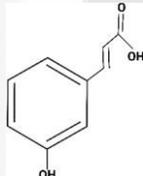
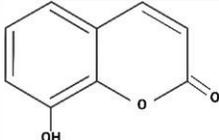
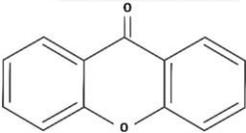
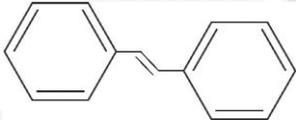
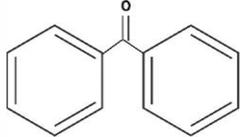
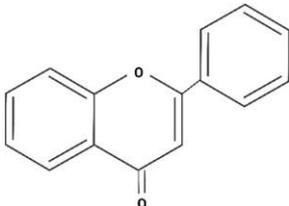


Figura 1. Estructura del paclitaxel.

Saponinas

Son metabolitos secundarios las cuales están constituidas por una familia de compuestos estructurales, que están formados por un anillo terpenoide, y que son conocidos como aglicona o sapogenina. Estas no resisten cambios bruscos de pH, debido a que, si se llega a medios muy ácidos o básicos, se causa la ruptura de los enlaces o-glucosídicos (Ahumada et al., 2016; Ávalos García & Pérez-Urria Carril, 2009).

Tabla 1. Estructura de los tipos de compuestos fenólicos.

Compuesto fenólico		Estructura
Fenoles simples		
Fenoles ácidos	Ácidos hidroxibenzóicos	
	Ácidos hidroxicinámicos	
Cumarinas		
Xantonas		
Estilbenos		
Benzofenonas		
Flavonoides		

3.2.2 Alcaloides

Representan un grupo diverso de compuestos y se caracterizan por ser compuestos nitrogenados de bajo peso molecular. Derivados de aminoácidos, la mayoría son insolubles o poco solubles en agua, y reaccionan con ácidos para hacer la formación de sales. Generalmente, los alcaloides son incoloros, cristalinos y no volátiles. Estos se suelen clasificar en 4 clases: Alcaloides verdaderos, protoalcaloides, pseudoalcaloides y alcaloides imperfectos (Arango Acosta, 2008; Espinoza Olaya & Rojas de Astudillo, 2014; Martínez Lombardo & Cano Ortiz, 2009).

Los alcaloides han sido la base para el desarrollo de diversos fármacos como son analgésicos, antiinflamatorios, antibacterianos y antitumorales. Además, han demostrado su eficacia en la supresión de la oncogénesis (Habli, et al., 2017).

3.3 PLANTAS MEDICINALES EN MÉXICO

Se sabe que desde tiempos prehispánicos hubo un aprovechamiento de las plantas medicinales, lo cual se hace constar en los códices florentinos, y destaca la importancia de las plantas en la vida humana (Manzanero-Medina et al., 2020; Ortega-Cala et al., 2019); sin embargo, en la actualidad, tales conocimientos se pueden perder sino se tienen estudios científicos que sustenten el uso de la medicina tradicional (Mares Guerrero & Ocampo, 2020; Ortega-Cala et al., 2019).

México tiene un estimado de 30,000 especies de plantas, de las cuales aproximadamente 3,000 a 5,000 especies tienen uso medicinal (Huerta, 1997). A nivel mundial, México ocupa el segundo lugar en el número de plantas medicinales registradas (Guzmán Gutiérrez et al., 2014). A pesar de lo anterior, solo el 5% de las plantas medicinales cuentan con estudios farmacológicos, fitoquímicos y toxicológicos (Jacobo-Herrera et al., 2017), adicional a esto, se sabe que la mayoría de las plantas medicinales son recolectan de la naturaleza y solo el 15% son cultivadas, lo que pone en peligro la existencia de estas plantas en su entorno natural (Palma Tenango et al., 2017).

En el caso particular de este trabajo nos enfocamos en la planta *Lepidium virginicum* L. ya que es una de las especies de plantas mexicanas poco estudiada, pero que se ha utilizado tradicionalmente como remedio para dolores de cabeza y espalda, trastornos biliares, enteritis aguda y crónica (García Regalado, 2015).

3.4 GENERALIDADES DE *Lepidium virgnicum* L.

L. virginicum pertenece a la familia Brassicaceae (Tabla 2), se distribuye alrededor de México en sus diferentes estados, como son Aguascalientes, Jalisco, Estado de México, Chiapas, Oaxaca, entre otros (Brucato et al., 2014). Esta especie cuenta con una gran variedad de nombres muy populares, tanto en español como en las lenguas indígenas, de las cuales algunos de ellos son: lentejas de campo, hierba de pájaros, cola de Zorrilla, entre muchos más. Mientras que en la cultura maya se le dan nombres más descriptivos cómo el 'tuluk' qué significa pellizcar, lo cual puede hacer referencia a las semillas planas que tiene esta planta, otro nombre que se le da es sakil jomol lo cual significa hierba o flor blanca, qué hace referencia a la flor de esta planta (Berlin & Berlin, 1995; Olvera Bautista, 2008).

Tabla 2. Taxonomía de <i>L. virginicum</i> .	
Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Brassicales
Familia	Brassicaceae
Género	<i>Lepidium</i>
Especie	<i>Lepidium virginicum</i> L.

L. virginicum es una hierba anual, sus hojas suelen ser lanceoladas y dentadas, las cuales pueden llegar a medir de 3 a 8 cm de largo, 1 a 3 mm de ancho y 20 a 70 cm de altura como se puede ver en la Figura 3 (Alonso-Castro et al., 2011; Berlin &

Berlin, 1995). Suele crecer en terrenos baldíos, campos agrícolas, bordes de caminos y también se pueden encontrar en vegetación natural, como es el caso de los bosques de pino-encino y sabana. *L. virginicum* normalmente suele encontrarse en lugares con elevaciones superiores a los 1,500 m. Se sabe actualmente que es una planta que cuenta con una alta disponibilidad (Jang et al., 2014; Park et al., 2021).

L. virginicum tradicionalmente es empleada como un remedio natural para afecciones de la piel, encías, útero, escorbuto y cólicos (Brucato et al., 2014). Recientemente, se ha demostrado que el extracto de esta planta es efectivo para el tratamiento de infecciones gastrointestinales y posee efectos benéficos en aquellas personas que padecen enfermedades cardíacas, inflamatorias y en el control de parásitos como la *Entamoeba histolytica* (Olvera Bautista, 2008).

Existen muy pocos estudios acerca de las propiedades fitoquímicas y farmacológicas de esta planta. En un estudio previo, se logró identificar un glucosinolato con actividad anti protozoaria, el cual se caracterizó como una glucotropeolina con fórmula química $C_{14}H_{18}O_9NS_2Na$ (Brucato et al., 2014; Olvera Bautista, 2008). Por otro lado, recientemente se ha demostrado que el extracto etanólico de *L. virginicum* tiene propiedades antiinflamatorias en un modelo de colitis (Cruz-Muñoz et al., 2022).



Figura 2. Ejemplares de *L. virginicum*. A) Planta completa, creciendo en asfalto; B) Detalle de las hojas, fruto y flores blancas: C) Flor blanca y fruto tipo lenteja

3.5 PLANTAS MEDICINALES PARA EL TRATAMIENTO DEL CÁNCER COLORECTAL.

Las plantas medicinales son ampliamente reconocidas como fuente de compuestos contra el cáncer; de hecho, más del 60% de los fármacos comúnmente utilizados en el tratamiento del cáncer se obtienen de plantas (Babaei et al., 2018). Por ejemplo, los alcaloides de la vinca, los di-terpenoides de taxanos, los derivados de la camptotecina y la epipodofilotoxina son las cuatro clases principales de anticancerígenos derivados de plantas que se utilizan clínicamente (Choudhari et al., 2020).

En México, se han reportado evidencias de 25 familias y 39 especies de plantas con actividad anti proliferativa en estudios *in vitro* e *in vivo* de cáncer colorrectal (Jacobo-Herrera et al., 2017). En un estudio preliminar, se encontró que el extracto metanólico de tallos de la planta medicinal tradicional *L. virginicum* tiene actividad citotóxica sobre la línea celular de cáncer colorrectal Caco-2 de una manera dependiente de la concentración, pero no así para la línea celular HT-29, ni para la línea celular de fibroblastos Detroit 548, lo que indica que el extracto metanólico tiene una citotoxicidad selectiva (Martínez Imamura et al., 2021). Sin embargo, se desconoce cuál es el mecanismo de citotoxicidad en la línea celular Caco-2.

3.6 LINEA CELULAR CACO-2

Caco 2 es una línea celular inmortalizada derivada de un adenocarcinoma colorrectal humano. Suele presentar uniones estrechas entre células, microvellosidades, expresar un alto número de enzimas y transportadores de membrana (Lea, 2015; Sun et al., 2008).

En confluencia, esta línea celular forma una monocapa de células epiteliales polarizadas, las cuales van a proporcionar una barrera física y bioquímica para el paso de los iones y moléculas de un tamaño pequeño (Sun et al., 2008). Estas células son usadas en la industria farmacéutica, como modelo *in vitro* de la mucosa intestinal humana y son empleadas para predecir el método de absorción de los

nuevos fármacos administrados de vía oral y para determinar compuestos potenciales anti-proliferativos como tratamiento para el cáncer de colon (de León-Rendón et al., 2019; Sun et al., 2008).

ATCC Number: HTB-37
Designation: Caco-2

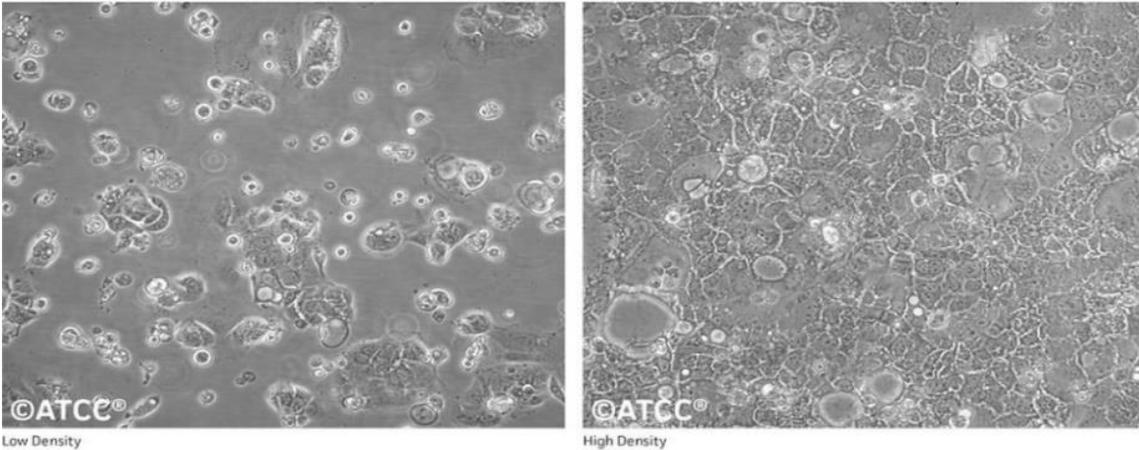


Figura 3. Línea celular Caco-2; A) Baja confluencia; B) Alta confluencia. (ATCC, 2013)

4 JUSTIFICACIÓN

El uso de plantas medicinales o de sus componentes bioactivos representa una alternativa cada vez más explorada para el tratamiento de cáncer colorrectal. *L. virginicum* conocida comúnmente como lentejilla ha sido usada de manera tradicional para el tratamiento de procesos inflamatorios; sin embargo, a la fecha no hay estudios científicos que demuestren su potencial terapéutico anticáncer. Por tal motivo, es necesario investigar los posibles efectos y mecanismos citotóxicos del extracto metanólico de *L. virginicum* utilizando un modelo *in vitro* de cáncer colorrectal. Los datos obtenidos en este trabajo van a contribuir a la generación de conocimiento nuevo que puede potencialmente dar lugar a un paradigma de nuevos compuestos terapéuticos para el tratamiento de cáncer colorrectal. Así como, a la conservación y recuperación del conocimiento de las plantas medicinales que forman parte de la herbolaria tradicional mexicana desde épocas prehispánicas.

El trabajo en desarrollo se ubica dentro del objetivo 3 del desarrollo sustentable de la ONU “Salud y bienestar” y en los Programas Nacionales Estratégico de la salud (López Cruz, 2022; ONU, 2022), al buscar generar nuevos conocimientos para la solución de los principales retos en la salud humana.

5 HIPOTESIS

El extracto metanólico de *L. virginicum* induce citotoxicidad en la línea celular Caco-2 a través de la vía apoptótica

6 OBJETIVOS

6.1 General

Determinar los mecanismos de citotoxicidad del extracto metanólico de *L. virginicum* sobre la línea celular Caco-2.

6.2 Específicos

- Identificar los compuestos fitoquímicos mayoritarios del extracto metanólico de *L. virginicum* mediante la técnica de cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas.
- Determinar la actividad citotóxica del extracto metanólico de *L. virginicum*.
- Investigar los mecanismos de citotoxicidad del extracto metanólico de *L. virginicum* en una línea celular Caco-2.

7 METODOLOGIA

7.1 Recolección de plantas silvestres *L. virginicum*.

L. virginicum fue recolectada dentro de las instalaciones de la Universidad Autónoma de Aguascalientes (UAA) (21°54'49.8"N 102°18'59.5"O) durante el mes de octubre del año 2021. La identificación taxonómica de *L. virginicum* fue realizada por el biólogo Julio Martínez Ramírez, profesor del Herbario de la Universidad

Autónoma de Aguascalientes (HUAA). El ejemplar de *L. virginicum* se encuentra registrado con el voucher N°. 30775. Como criterio de selección se recolectaron aquellas plantas con un tamaño mayor a 25 cm de longitud desde el tallo hasta la inflorescencia y que estuvieran en su fase de floración o fructificación. Se recolectó un total de 2.5 kg de material vegetal fresco, el cual se llevó a un proceso de secado a temperatura ambiente, a total oscuridad por un periodo de 30 días (Martínez-Imamura et al., 2021).

7.2 Preparación del extracto orgánico del tallo de *L. virginicum*

El material vegetal seco se separó en sus diferentes órganos (tallo, hojas del tallo, hojas que contienen la semilla, semillas, inflorescencia). Cada órgano se sometió a un proceso de molienda en una licuadora (Osterizer®). Posterior a la molienda se llevó el 90% del peso seco final del tallo, hoja del tallo y hoja que contiene la semilla a maceración con metanol ($\geq 99.8\%$) por separado (J.T. Baker, México). Este macerado se llevó a agitación en oscuridad en un agitador orbital (Sev-Prendo, AGO 6090) por 24 horas, después se filtró y se repitió el proceso de maceración hasta observar ausencia de color verde. El filtrado y el extracto metanólico (17.274 g) fue almacenado a una temperatura de 4°C en oscuridad.

7.3 Separación e identificación tentativa de los compuestos fitoquímicos del extracto metanólico de *L. virginicum* mediante la técnica de cromatografía de gases acoplada a espectrofotometría de masas (GC-MS).

A partir de los extractos metanólico de tallo, se realizó una re-suspensión del extracto metanólico del tallo, usando una relación volumen/volumen de 1:1, con acetona, después de esto, se centrifugaron las soluciones a 2800 rpm por 15 min. Los extractos obtenidos se transfirieron a un vial para ser analizado por cromatografía de gases acoplada a espectrofotometría de masas (GC-MS).

Para el análisis químico se utilizó el cromatógrafo de gases (Hewlett Packard; HP 6890) acoplado a detector de espectrometría de masas (GC-MS, por sus siglas en inglés; Agilent Technologies, Palo Alto, CA, EE. UU.) con una fuente de ionización de impacto electrónico (HP 5973) y con una columna capilar (HP-5ms; Agilent J&W Ultra Inert; 60m x 0,25 mm x 0,25 μ m). Se utilizó helio como gas portador y la velocidad del flujo fue de 1 mL/min. El gradiente de temperatura del horno GC inicio con 60 °C y se mantuvo por 3 min, luego se aumentó 5°C cada minuto hasta 300°C, esta temperatura final se mantuvo por 5 minutos. La temperatura de la línea de transferencia fue de 280 °C. La temperatura de la fuente de iones fue de 230 °C y el espectrómetro de masas se escaneó en un rango de masas de 50 a 550 nm. Los compuestos fueron identificados usando la biblioteca de espectros NIST98 (Instituto Nacional de Estándares y Tecnología), basándose en la base de datos de referencia estándar SRD 69 del NIST Chemistry WebBook.

7.4 Determinación de la actividad citotóxica del extracto metanólico de *L. virginicum*.

Ensayo de MTT

Para determinar la citotoxicidad de las líneas celulares Caco-2 (ATCC® HTB-37™) y fibroblastos humanos Detroit 548 (ATCC® CCL-116™), ésta última como control de una línea celular no cancerosa. Se realizaron ensayos por reducción metabólica del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)2,5-difeniltetrazolio (MTT). Las líneas celulares se sembraron en placas estériles de 96 pozos con una densidad de 3×10^5 células/mL en medio DMEM/F-12 HAM, suplementado con 10% de suero fetal bovino, 1 μ L/mL de antibiótico penicilina/estreptomina (100 UI/mL-100 μ g/mL) y 1.2 g/L de bicarbonato de sodio (NaHCO₃). Las células fueron tratadas con diferentes concentraciones del extracto metanólico de *L. virginicum* (0.01, 0.1 y 1 mg/mL) durante 24 y 48h, excepto las células control que solo se agregó el medio de cultivo. Las células tratadas con 10% de DMSO o 2% de Tritón X-100 fueron usadas como controles positivos de muerte celular. Las células se incubaron a 37°C en una atmósfera húmeda con 5% de CO₂ y 95% O₂.

Después del período de incubación con el extracto metanólico, se retiró el medio de las células y se reemplazó por medio fresco con 100µl de MTT (0.5 mg/mL) y se incubaron a 37°C en una atmósfera húmeda con 5% de CO₂ y 95% O₂ durante 4 h. Pasado el tiempo de incubación, se retiró el MTT de los pozos y los cristales de formazan formados se disolvieron con 200 µL isopropanol ácido 0.1 N. La cuantificación colorimétrica se llevó a cabo con un espectrofotómetro de microplacas (Multiskan Sky, Thermo Scientific®) a una longitud de onda de 595 nm. Los resultados se expresaron como el porcentaje de viabilidad y citotoxicidad celular. Se hicieron 3 experimentos independientes por triplicado para cada uno de los tiempos (24 y 48 h).

Ensayo colorimétrico de lactato deshidrogenasa (LDH)

También se evaluó el efecto citotóxico del extracto metanólico de *L. virginicum* en la línea celular Caco-2 midiendo la liberación de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH). La determinación de la liberación enzimática de LDH se realizó de acuerdo con las especificaciones del kit *Cytotoxicity Detection* (Roche 11644793001 Germany).

Las células Caco-2 o Detroit 548 se colocaron en una placa de 96 pozos con una densidad de 3×10^4 células/pozo, siendo incubadas durante 24 h para lograr la adherencia celular en el pozo. Después de ese periodo, las células fueron incubadas con diferentes concentraciones del extracto metanólico de *L. virginicum* (0.01-1 mg/mL) durante 24 y 48 h, a 37°C, 5% de CO₂ y 95% O₂. Para el análisis se incluyó un control positivo que consistió en exponer las células a una solución de lisis (2% de tritón X-100 en medio DMEM), un control negativo con células en medio DMEM y un blanco con medio DMEM sin células. Al terminar el tiempo de incubación, se retiraron 100 µL de sobrenadante y transfirieron a una nueva placa de 96 pozos. Donde se le adicionaron a cada pozo 100µL de solución de sustrato de acuerdo con las especificaciones del fabricante, incubándose a 37°C, 5% de CO₂ y 95% O₂ en oscuridad durante 30 min. Después se cuantificó en un lector de placas Multiskan Sky (Thermo scientific®) a una longitud de onda de 492 nm. Se realizaron 3

experimentos independientes por triplicado. La citotoxicidad se midió cuantificando la cantidad de LDH, una enzima citosólica liberada en el sobrenadante de cultivos por células dañadas. Los resultados son expresados en % de liberación de LDH con relación al control negativo. Los resultados se analizaron por ANOVA de una vía con una prueba poshoc de Dunnet.

7.5 Ensayo de fragmentación de ADN celular

Para determinar el tipo de muerte celular se utilizó el kit Cellular DNA Fragmentation ELISA (ELISA, por sus siglas en inglés *enzyme-linked immunosorbent assay*; Roche Applied Science®; cat. no. 11585045001) de acuerdo con las indicaciones del fabricante. El fundamento del ensayo es la identificación del tipo de muerte celular mediante el marcaje de fragmentos de ADN con 5-bromo-2'-desoxiuridina (BrdU). Estos fragmentos de ADN marcados se detectan inmunológicamente mediante la técnica de ELISA usando el anticuerpo anti-ADN para capturar los fragmentos de ADN, y un conjunto anti-BrdU-anticuerpo-PaD para detectar el BrdU contenida en los fragmentos de ADN capturados.

Las células se sembraron con una densidad de 1×10^5 células por mL en placas de 96 pozos. Las células se incubaron durante 48 h con diferentes concentraciones del extracto metanólico de *L. virginicum* (0.01, 0.1 y 1 mg/mL). Posteriormente se agregó el BrdU 10 μ M y se incubó durante 24 h. Al terminar este tiempo se obtuvo el sobrenadante y se transfirió a una placa de 96 pozos previamente recubierta con el anticuerpo anti-BrdU. Por otro lado, las células fueron lisadas con la solución tampón de incubación y el lisado fue colocado en la placa recubierta con el anticuerpo. La detección de fragmentos de ADN marcados con BrdU liberados de células dañadas se llevó a cabo utilizando el espectrofotómetro de microplacas (Multiskan Sky; Thermo scientific®) a una longitud de onda de 370 nm. Se realizaron 3 experimentos independientes por triplicado.

7.6 Extracción de ARN, retro transcripción y qPCR

Para determinar la expresión de los genes proapoptóticos se extrajo el ARN total de las células de la línea celular Caco-2 tratadas con 1 mg/mL del extracto de *L. virginicum* durante 48 h, empleando el método del TRizol de la casa comercial Ambion®. Brevemente, las células fueron lisadas con 1 mL del reactivo TRizol® durante 5 min, después se adicionaron 0.2 mL de cloroformo, se agitó durante 15 s e incubó a temperatura ambiente durante 3 min. Posteriormente, las muestras fueron centrifugadas a 13,000 rpm durante 15 min a 4°C en una microcentrífuga marca HERMLE (Z216 MK) y se recuperó el sobrenadante. El ARN se precipitó con isopropanol en relación 1:1 durante 10 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó durante 10 min a 13,000 rpm a temperatura ambiente. Posteriormente, se removió el sobrenadante y la pastilla se lavó con isopropanol al 75%. Finalmente, el ARN obtenido se resuspendió en agua libre de nucleasas en un volumen de 10 µl.

Se determinó la pureza del ARN en cada muestra por medio de la relación de absorbancia A260/A280 y A260/A230. Únicamente se utilizaron los ARN que tenían una pureza A260/A280 mayor a 1.9 y A260/A230 mayor a 2.0. Las muestras se almacenaron a -80°C en un ultracongelador (Thermo Scientific™ Forma™ 88000 Series -86°C Upright Ultra-Low Temperature Freezers, Model 88400A) hasta su uso.

El ARN total obtenido se utilizó para la síntesis de ADN complementario (ADNc) mediante un proceso de retro transcripción empleando oligos dT y la enzima transcriptasa reversa del kit First Strand ADNc Synthesis Kit (Thermo Scientific, #K1612). Brevemente, las muestras de ARN se descongelaron en hielo y los reactivos del kit se agregaron en el siguiente orden en un tubo de PCR para un volumen final de 20 µL: 1 µg de ARN total y 1 µL de oligo (dT)₁₈, 4 µL de 5X Reaction Buffer, 1 µL de RiboLock RNase Inhibitor (20 U/µL), 2 µL de 10 mM dNTPs y 1 µL de M-MuLV Reverse Transcriptase (20 U/µL). Los componentes se mezclaron suavemente y las muestras se colocaron en el termociclador (Bio-Rad®, T100 Thermal Cycler #1861096) con la siguiente programación de temperaturas y

tiempos: 60 min a 37°C y 5 min a 70°C. Al finalizar la programación, el ADNc fue almacenado a -20°C hasta su uso.

Una vez obtenido el ADNc se procedió a cuantificar la expresión génica de p53, Bcl-2 y Caspasa 3 mediante la técnica de PCR en tiempo real (qPCR) empleando el kit SYBR Green Master mix (Bio Rad) según el protocolo del fabricante. Se empleó el termociclador (CFX96™ Real-Time system; Bio Rad ®). Los oligos utilizados para la cuantificación de la expresión de ARNm se en listan en la Tabla 3. El nivel de expresión se determinó de 3 experimentos independientes por triplicado con el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ usando GAPDH como control de expresión constitutiva y se representó como las veces de cambio.

Tabla 3. Secuencia de oligos utilizados en el qPCR.

Gen y número de acceso (NCBI)	Secuencia de oligonucleótidos (5'-3')	*pb	*Tm (°C)
Caspasa (NM_032991)	3 Fw: CAA TGG ACT CTG GAA TAT CC Rv: GCT GCA TCG ACA TCT GTA C	139	55
Bcl-2 (NM_000633.3)	Fw: GAC TGA GTA CCT GAA CCG GC Rv: GCA GAG TCT TCA GAG ACA GC	131	55
p53 (NM_001407269.)	Fw: CGA CAT AGT GTG GTG GTG CC Rv: CCA TGC AGG AAC TGT TAC AC	94	55
GAPDH (NM_001289726.1)	Fw: AGTCTACTGGCGTCTTCACC Rv: CCACGATGCCAAAGTTGTCA	225	60

*pb, pares de bases esperadas; Tm, temperatura de alineamiento.

8 RESULTADOS

8.1 Análisis de los compuestos fitoquímicos del extracto metanólico de *L. virginicum*.

Se realizó la caracterización de 28 compuestos en el extracto metanólico de *L. virginicum*, mediante GC-MS (Figura 4). La identificación se realizó con base en

el índice de similitud superior a 80 de la base de datos NIST y se enlistan en la Tabla 4.

Entre los compuestos tentativamente identificados se encuentran compuestos aromáticos, cetonas y ésteres. Los compuestos con mayor porcentaje de similitud fueron el ácido n-hexadecanoico (99%), benceno, 1-isociano-2-metilo (97%), ácido hexadecanoico, éster metílico (95%), óxido de trifenilfosfano (94%) y fenol, 2-metoxi-4-(1-propenilo) (93%).

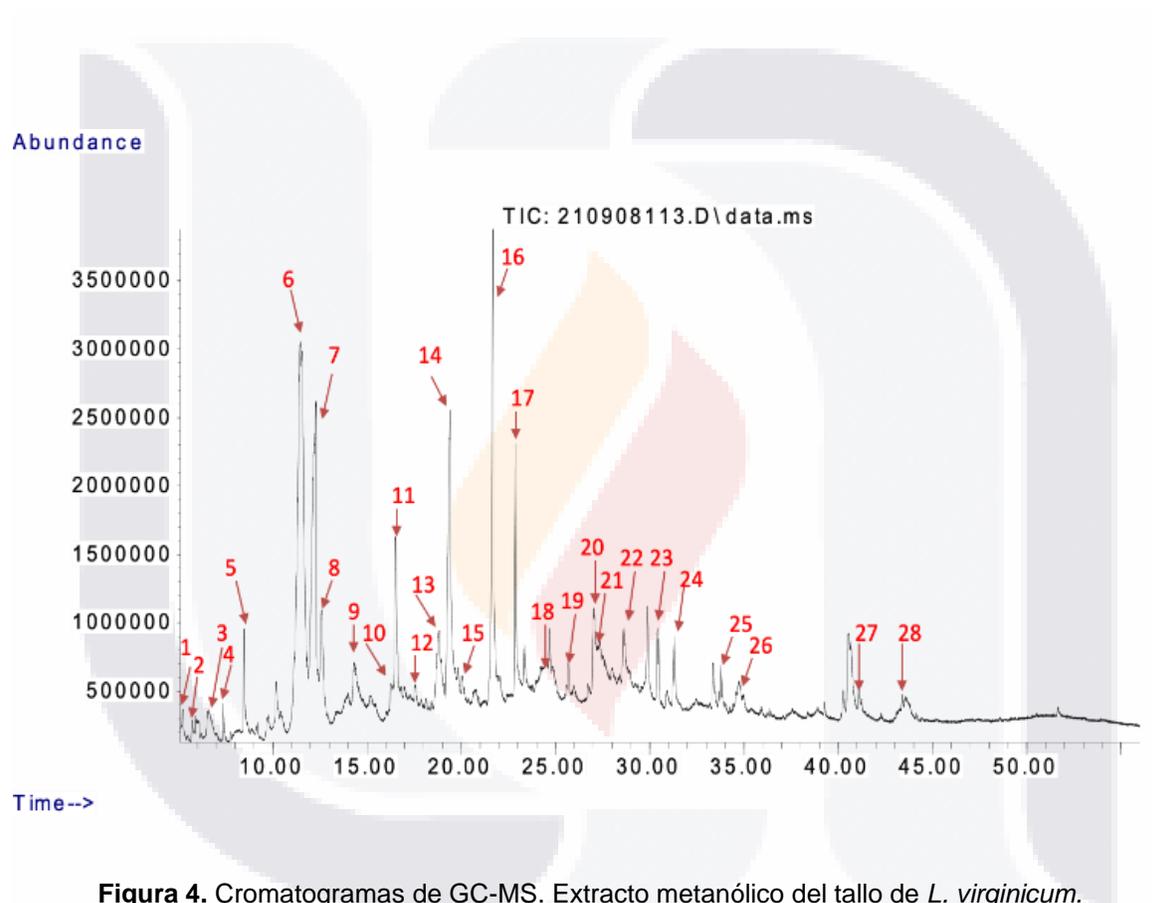


Figura 4. Cromatogramas de GC-MS. Extracto metanólico del tallo de *L. virginicum*.

Tabla 4. Compuestos identificados tentativamente por GC-MS en la fracción acetónica de *L. virginicum*.

No de pico	Tiempo de retención (min)	Nombre del compuesto	Peso molecular Teórico (g/mol)	Área pico (%)	Similitud (%)	Formula molecular	Tipo de compuesto
1	5.7	Oxima-, metoxi-fenil-2	151.16	0.33	87	C ₈ H ₉ NO ₂	Hidrocarburo aromático
2	5.9	Butirolactona	86.09	0.20	50	C ₄ H ₆ O ₂	Esteres
3	6.5	2-furancarboxa ldehído, 5-metil-	110.11	1.19	87	C ₆ H ₆ O ₂	Aldehído
4	7.3	4H-pirano-4-ona, 2,3-dihidro-3,5-dihidroxi-6-metil-	144.12	0.41	64	C ₆ H ₈ O ₄	Cetona
5	8.4	1-butanamina, N-metil-N-2-propenil-	127.23	1.19	64	C ₈ H ₁₇ N	Amina
6	11.4	Benceno, 1-isociano-2-metil-	118.16	13.36	97	C ₈ H ₈ N ⁺	Hidrocarburo aromático
7	12.2	4H-pirano-4-ona, 2,3-dihidro-3,5-dihidroxi-6-metil-	114.12	12.17	72	C ₆ H ₈ O ₄	Cetona
8	12.5	Ácido bencenoacético, éster metílico	150.17	3.07	60	C ₉ H ₁₀ O ₂	Esteres
9	14.0	Ácido benzoico	122.12	0.30	80	C ₇ H ₆ O ₂	Hidrocarburo aromático
10	16.2	Pirazina, 2-etil-5-metil-	122.17	0.65	87	C ₇ H ₁₀ N ₂	Hidrocarburo aromático
11	16.5	2-Metoxi-4-vinilfenol	150.17	3.45	87	C ₉ H ₁₀ O ₂	Hidrocarburo aromático
12	17.5	Fenol, 2,6-dimetoxi-	154.16	0.28	62	C ₈ H ₁₀ O ₃	Hidrocarburo aromático
13	18.8	DL-Prolina, 5-oxo-, éster metílico	143.14	2.52	86	C ₆ H ₉ NO ₃	Esteres

14	19.4	Benzeneacet amida	135.16	9.27	91	C ₈ H ₉ NO	Hidrocarburo aromático
15	20.0	Fenol, 2-metoxi 4-(1-propenilo)-	164.2	0.65	93	C ₁₀ H ₁₂ O ₂	Hidrocarburo aromático
16	22.0	Acetamida, N-metil-N-[4-(1-hexahidropiridil)-2-butilil]-	208.3	0.69	56	C ₁₂ H ₂₀ N ₂ O	Amida
17	22.8	2,5-Dimetoxi-4-etilamfetamina	223.31	3.53	59	C ₁₃ H ₂₁ NO ₂	Amina
18	24.2	Biciclo [2.2.2] octanona, 4-metoxi-1-metil-	168.23	0.26	53	C ₁₀ H ₁₆ O ₂	Cetona
19	25.6	Fenotanamina, N-acetil-3-hidroxi	209.24	0.37	64	C ₁₁ H ₁₅ NO ₃	Amida
20	27.0	1,2,4-ciclopentanotriona, 3-(2-pentenil)-	180.2	2.24	58	C ₁₀ H ₁₂ O ₃	Hidrocarburo aromático
21	27.2	9-Etoxi-10-oxatriciclo [7.2.1.0(1,6)]dodecan-11-ona	224.3	0.33	90	C ₁₃ H ₂₀ O ₃	Cetona
22	28.6	2-Ciclohexen-1-ona, 4-hidroxi-3,5,6-trimetil-4-(3-oxo-1-butenil)-	222.28	1.22	53	C ₁₃ H ₁₈ O ₃	Cetona
23	30.4	Ácido hexadecenoico, éster metílico	270.5	0.67	95	C ₁₇ H ₃₄ O ₂	Esteres
24	31.2	Ácido n-hexadecenoico	256.42	1.06	99	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	Ácido carboxílico
25	33.7	Ácido 9,12,15-octadecatrienoico, éster	292.5	0.62	89	C ₁₉ H ₃₂ O ₂	Esteres

		metílico, (Z,Z,Z)-						
26	34.5	Metil (Z)- 5,11,14,17- eicosatetraen oato	318.5	0.16	60	C ₂₁ H ₃₄ O ₂	Esteres	
27	41.1	Óxido de trifenilfosfina	278.3	0.25	94	C ₁₈ H ₁₅ OP	Hidrocarburo aromático	
28	43.3	Ácido octadecanoic o, 2-hidrox- 1- (hidroximetil) éster	358.6	0.20	89	C ₂₁ H ₄₂ O ₄	Esteres	

8.2 El extracto metanólico de *L. virginicum* reduce la viabilidad celular en las células Caco-2, pero no reduce la de los fibroblastos Detroit 548.

Para investigar el efecto citotóxico del extracto metanólico de *L. virginicum* sobre las líneas celulares Caco-2 y Detroit 548, las células fueron expuestas a varias concentraciones del extracto (0, 0.01, 0.1 y 1 mg/mL) durante 24 y 48 h, y se determinó y analizó mediante el ensayo de MTT y liberación de LDH. Los resultados del ensayo de MTT se muestran en la figura 5, donde se puede observar que el extracto metanólico de *L. virginicum* (ELv) no tiene efecto sobre la viabilidad celular de Caco-2 a las 24 horas de exposición (Figura 5A). Sin embargo, a las 48 horas de exposición con el ELv 1 mg/mL reduce significativamente la viabilidad celular de Caco-2 ($P = 0.007$; Figura 5B), esta reducción fue del 37 ± 3.6 % en comparación con el grupo control. Con los datos del ensayo de MTT se calculó el IC₅₀ con una regresión lineal. Este valor indica la concentración que produce la reducción del 50% de viabilidad celular en las células Caco-2. El valor de IC 50 del ELv fue de 34.56 ± 1.56 y 1.06 ± 0.14 mg/mL a las 24 y 48 horas de incubación, respectivamente.

Por otro lado, el ELv a las diferentes concentraciones probadas (0.01, 0.1 y 1 mg/mL) no tuvo cambios significativos en la viabilidad celular de los fibroblastos Detroit 548 expuestos durante 24 (Figura 5C) y 48 horas (Figura 5D) comparada con la viabilidad celular de las células control (sin tratamiento). En conjunto los

resultados del ensayo de MTT indican que el ELv tiene un efecto citotóxico selectivo sobre las células cancerosas colorrectales Caco-2 a concentraciones altas.

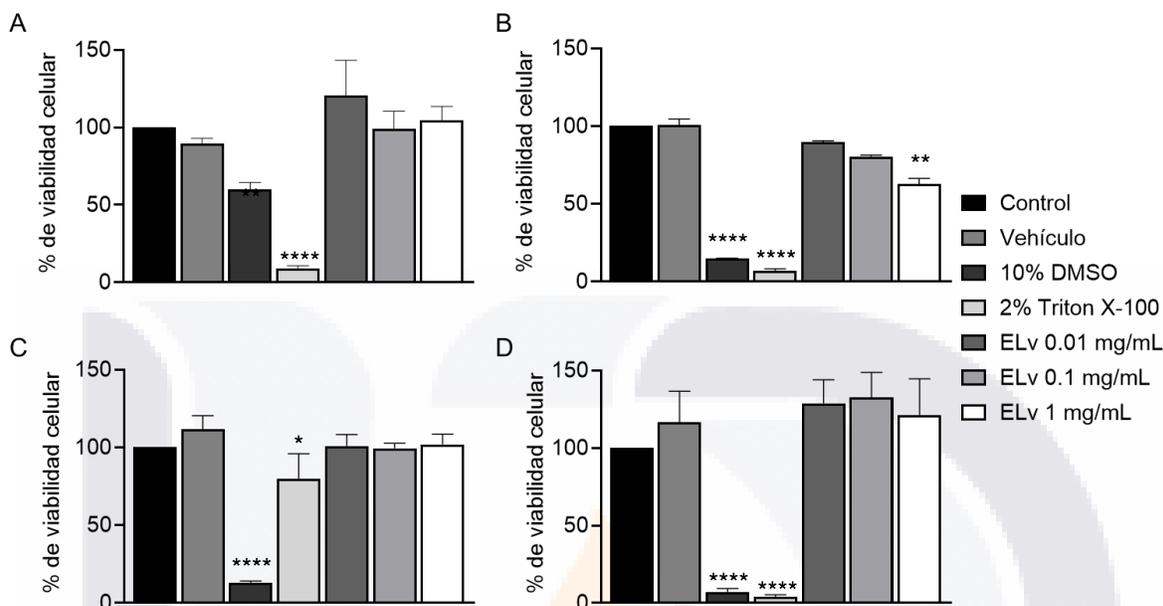


Figura 5. Efecto del extracto metanólico de *L. virginicum* (ELv) a diferentes concentraciones sobre la viabilidad celular en células cancerosas Caco-2 incubadas 24 (A) y 48 horas (B). Efecto sobre la viabilidad celular de los fibroblastos Detroit-548 expuestos a diferentes concentraciones del ELv durante 24 (C) y 48 horas (D). El análisis de la viabilidad celular se llevó a cabo mediante el ensayo de MTT. Las líneas verticales representan el error estándar (SEM) de la media de cada uno de los tratamientos. Se realizaron tres experimentos independientes (n=3) por triplicado. * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.005$ y **** $P \leq 0.0001$ denota diferencias estadísticamente significativas cuando se compara tratamiento vs control; por una prueba ANOVA de una vía con una prueba post-hoc de Dunnett.

También se realizaron ensayos de liberación de LDH para determinar el efecto citotóxico del ELv sobre las líneas celulares Caco-2 y Detroit 548 en dos tiempos de incubación de 24 y 48 h con tres concentraciones del extracto (0.01, 0.1 y 1 mg/mL). La incubación de las células cancerosas Caco-2 con las diferentes concentraciones del ELv durante 24 horas no tuvo efectos significativos sobre la liberación de LDH en comparación con el control (células incubadas con solo medio de cultivo) indicando que no hay efecto citotóxico (Figura 6A). Sin embargo, a las 48 horas de incubación con 1 mg/mL de ELv, las células Caco-2 mostraron un incremento de 1.8 veces mayor la liberación de LDH comparadas con las células control ($P = 0.004$; Figura 6B) indicando que a esa concentración del ELv durante 48 horas tiene un efecto citotóxico sobre las células cancerosas colorrectales, corroborándose lo

observado con el ensayo de MTT. Por otro lado, el ELv no aumento significativamente la liberación de LDH en los fibroblastos Detroit 548 ni a las 24 (Figura 6C) o 48 horas (Figura 6D) de incubación, indicando que no tiene efecto citotóxico sobre estas células. Como era de esperarse el control positivo de muerte celular (células incubadas con 2% de Tritón X-100) mostraron significativamente niveles más altos de liberación de LDH en comparación con las células control en ambas líneas celulares, Caco-2 y Detroit 548 en los dos periodos de incubación ($P \leq 0.005$; Figura 6). Los resultados de los ensayos de MTT y LDH indican que el extracto metanólico de *L. virginicum* tiene un efecto citotóxico significativo a una concentración de 1 mg/mL sobre las células Caco-2 a las 48 horas de exposición.

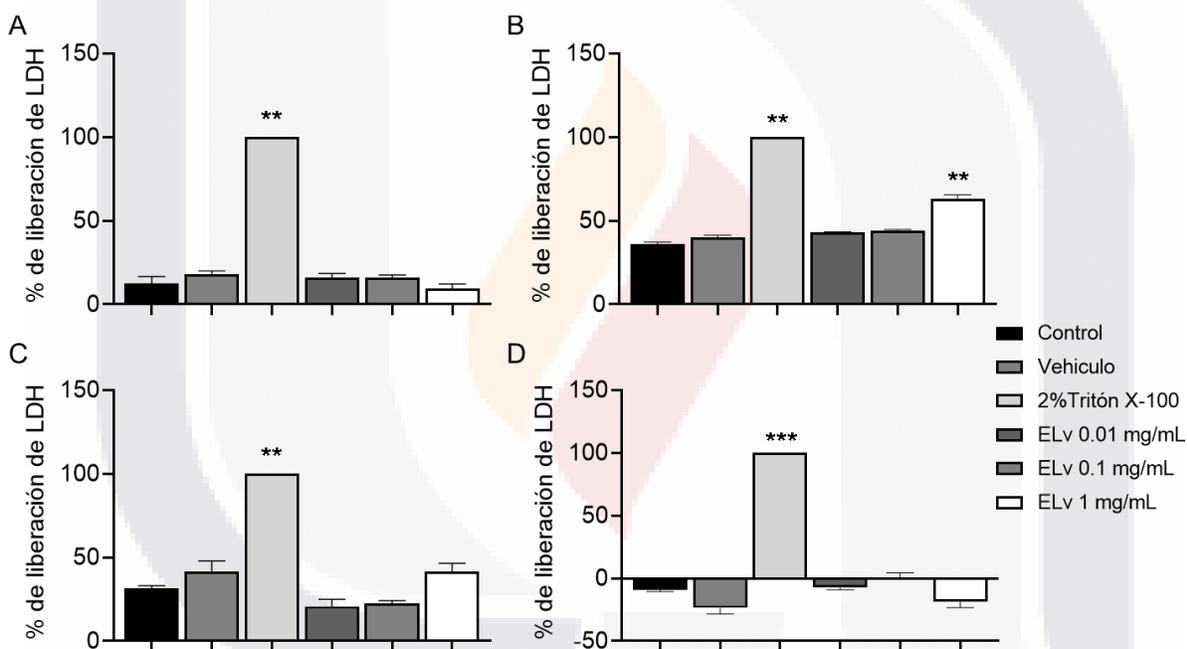


Figura 6. Efecto del extracto metanólico de *L. virginicum* a diferentes concentraciones sobre la liberación de LDH en las células Caco-2 incubadas durante 24 (A) y 48 horas (B), así como en la línea celular de fibroblastos humanos Detroit 548 en periodos de incubación de 24 horas (C) y 48 horas (D). Los datos son mostrados como el promedio \pm SEM de tres experimentos independientes ($n=3$) por triplicado. * $P \leq 0.05$ y ** $P \leq 0.005$ denota diferencias estadísticamente significativas cuando se compara tratamiento vs control; por una prueba ANOVA de una vía con una prueba post-hoc de Dunnett.

8.3 Efecto del extracto metanólico de *Lepidium virginicum* sobre la fragmentación de ADN

Para probar si el ELV indujo la disminución de viabilidad celular y la citotoxicidad por muerte apoptótica, las células Caco-2 se incubaron con 0.01, 0.1 y 1 mg/mL del ELV por 48 horas y después se determinó la fragmentación de ADN por ELISA. En la Figura 7A, se muestra que el ADN fragmentado a diferentes concentraciones del extracto se incrementa significativamente en células Caco-2 lisadas. Además, la Figura 7B muestra que al aumentar el tiempo de exposición con 1 mg/mL del ELV, los fragmentos de ADN marcados con BrdU aparecen primero en el lisado celular y su absorbancia fue aproximadamente 1.5 veces mayor que en el sobrenadante ($P \leq 0.05$) indicando que la fragmentación de ADN se produjo antes de la lisis de la membrana plasmática como sucede en una muerte celular por apoptosis.

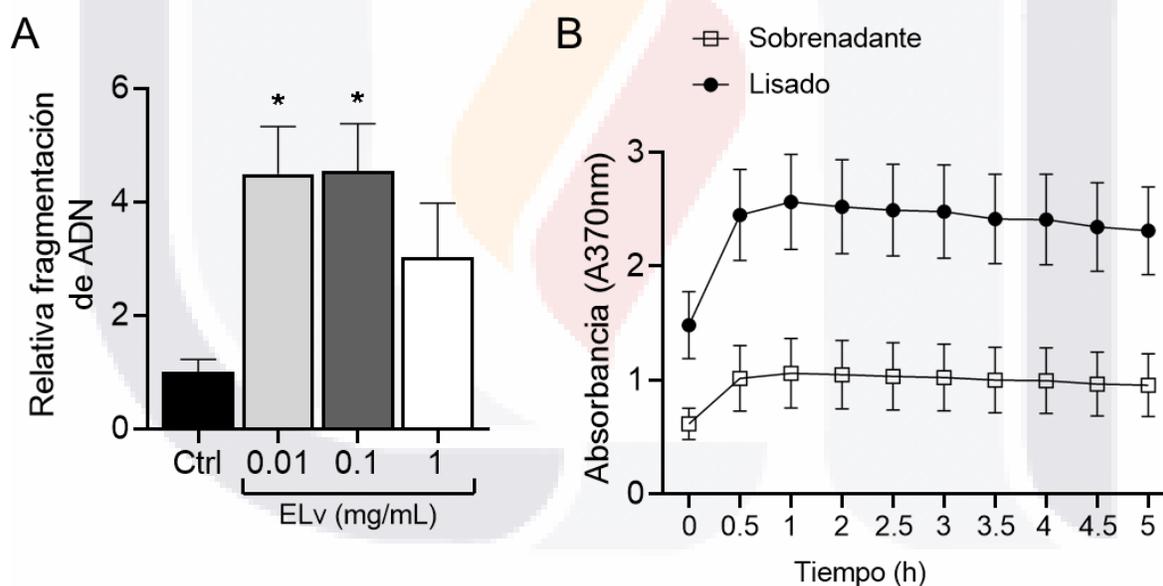


Figura 7. El extracto metanólico de *Lepidium virginicum* induce fragmentación de ADN y apoptosis en células Caco-2. **(A)** Células Caco-2 fueron tratadas con ELV (0.01, 0.1 y 1 mg/mL) y 48 horas después las células fueron lisadas para cuantificar el ADN fragmentado usando el kit de ELISA. **(B)** Cinética de la muerte celular apoptótica inducida por el extracto metanólico de *L. virginicum* en células Caco-2. Se incubaron células marcadas con BrdU en presencia de 1 mg/mL del extracto, durante 48hrs horas a +37°C. Después de los tiempos indicados, se retiraron 100 μ l/pocillo de sobrenadante y 100 μ l/pozo de lisado y se analizaron mediante ELISA.

8.4 Efecto del extracto metanólico de *L. virginicum* sobre la expresión de genes reguladores de apoptosis en la línea celular Caco-2.

La observación de la muerte apoptótica inducida por ELv planteó la posibilidad de que se requiriera la activación de la cascada de caspasas. Así que, se examinó la expresión de ARNm de caspasa 3 en células Caco-2 tratadas con 1 mg/ mL de ELv. Los resultados mostraron que ELv aumenta significativamente la expresión de caspasa 3 en las células Caco-2 incubadas con el ELv en comparación con las células tratadas únicamente con el medio de cultivo (control) o el vehículo (Figura 8A), siendo aproximadamente 5.4 veces mayor la expresión de caspasa 3 en las células tratadas con ELv que las células control ($P < 0.0001$).

Además, se evaluaron los niveles de ARNm de genes relacionados con la vía intrínseca de la apoptosis en células Caco-2 tratadas con 1 mg/mL del ELv, durante 48 h. La figura 8B muestra que ELv promovió un aumento 2.2 veces mayor del ARNm p53 en células Caco-2 tratadas con el ELv en comparación con las células control ($P < 0.000$), sugiriendo que p53 es un factor importante en la apoptosis inducida por ELv de células Caco-2. Además, el tratamiento de ELv mostró que el nivel de ARNm del gen anti-apoptótico Bcl-2 estaba regulado a la baja en las células Caco-2 tratadas con el ELv comparadas con las células control, aunque no fue estadísticamente significativo ($P = 0.12$; Figura 8C)

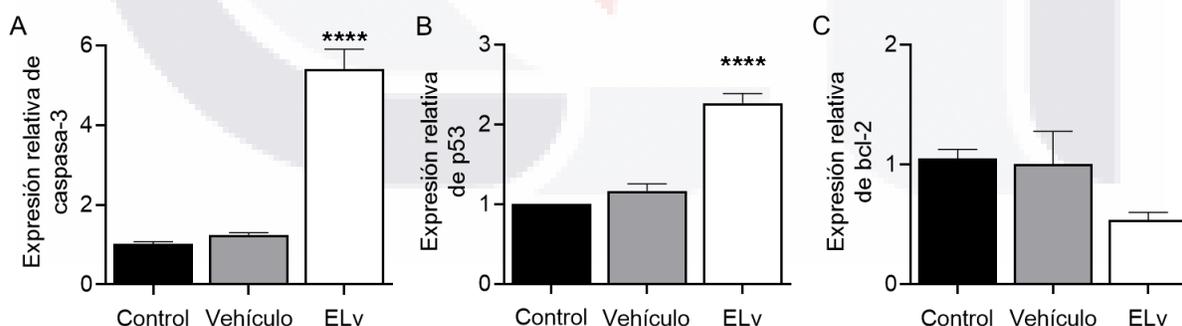


Figura 8. Efecto del extracto metanólico de *L. virginicum* (1 mg/ml) sobre la expresión génica de caspasa-3 (A), p53 (B) y Bcl-2 (C) en células Caco-2. Se realizaron tres experimentos independientes (n=3) por triplicado. Los datos se expresan como el promedio \pm S.E.M. **** $P \leq 0.0001$ denota diferencias estadísticamente significativas cuando se compara tratamiento vs control; por una prueba ANOVA de una vía con una prueba de Dunnett.

9 DISCUSIÓN

L. virginicum ha sido utilizada tradicionalmente para el tratamiento de diversas afecciones gastrointestinales, en la actualidad se ha demostrado que tiene una actividad antiinflamatoria (Brucato et al., 2014; Cruz Muñoz et al., 2020). En estudios previos se ha observado la presencia del glucosinolato, el cual está presente en otras crucíferas pertenecientes a la familia Brassicaceae, a este se le ha adjudicado como un potencial quimiopreventivo (Mandrigh & Caputo, 2020). En este estudio se realizó una técnica analítica basada en la separación, identificación y cuantificación de mezclas volátiles, la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC/MS) donde se identificaron tentativamente 28 compuestos fitoquímicos pertenecientes de diversa naturaleza como: Hidrocarburos aromáticos, esteres, cetonas, aldehídos, aminas y ácidos carboxílicos; los cuales presentan actividades biológicas reportadas previamente como son, actividad antifúngica, antimicrobiana, antioxidante, antiinflamatoria, antitumorales, entre otras (Arroyave Murillo et al., 2018; Bindu & Udayan, 2018; Kim et al., 2019; Olivera-Condori et al., 2013). De los 28 posibles compuestos identificados, tres se han reportado en la literatura que tienen posible efecto anticancerígeno. Tal es el caso del 2-metoxi-4-vinilfenol el cual inhibió la proliferación y metástasis en células del cáncer de páncreas (Panc-1), además de bloquear la metástasis por el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) (Kim et al., 2019). Para el DL-Prolina-5-oxometil éster se ha demostrado que tiene efectos antitumorales sobre células neoplásicas, inhibe la proliferación y estimula la diferenciación en varias líneas celulares de cáncer como de pulmón, colon y renal (Arroyave Murillo et al., 2018) y por último el (Z) -5,11,14,17-eicosatetraenoato de metilo participa como un agente antioxidante, antimicrobiano y anticancerígeno en el extracto de *Holothuria leucospilota* (Ceesay et al., 2019).

Para evaluar la toxicidad del extracto se realizaron 2 pruebas de citotoxicidad: el ensayo de MTT y el ensayo de la liberación de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH). Estas pruebas de citotoxicidad son importantes para evaluar la viabilidad y proliferación celular de las líneas celulares tratadas con el extracto metanólico de *L. virginicum*. El método de MTT es usado con mayor frecuencia, debido a que es una

metodología sencilla y económica. Se basa en la capacidad celular de convertir el MTT en formazán, lo que nos indica un porcentaje de viabilidad directamente proporcional a la cantidad de formazán presente (Tolosa et al., 2015). En el caso del ensayo de LDH, la liberación de esta enzima tras el daño en la membrana plasmática se mide con una reacción enzimática acoplada que da como resultado la conversión de la sal de tetrazolio en un formazán de color rojo por diaforasa, lo cual nos permitió calcular el porcentaje de citotoxicidad (Larramendy & Soloneski, 2018). En el presente estudio, tanto el ensayo de MTT como el de LDH, se observó que la concentración de 1 mg/mL del extracto metanólico de *L. virginicum* tuvo un efecto citotóxico significativo sobre las células Caco-2, mientras que en la línea celular no cancerosa de fibroblastos Detroit 548 no tuvo efectos citotóxicos en ninguna de las concentraciones probadas. Sorpresivamente, el ELV tuvo un efecto proliferativo en las células Detroit 548. En cuanto el efecto proliferativo del ELV sobre las células Detroit 548, también se observó este efecto en las células tratadas con el vehículo, indicando que el efecto proliferativo no fue debido al ELV sino más bien al vehículo donde se disolvió, el cual fue etanol al 20%. Al respecto, algunos estudios han demostrado que el etanol tiene efecto proliferativo sobre fibroblastos pulpaes humanos (FPH), además de que un estudio donde se obtuvo el extracto de manzana por diferentes disolventes como el metanol, etanol y acuoso, se observó que el extracto etanólico únicamente indujo la proliferación de la línea celular epitelial bronquial humana (NL20), por lo que este efecto proliferativo puede deberse a la naturaleza del disolvente (Bedoya Mejía et al., 2016; Bustos-Hipólito et al., 2012).

Los resultados de este estudio demuestran que el extracto metanólico de *Lepidium virginium* reduce la viabilidad celular de Caco-2 a través de un mecanismo de apoptosis, el cual es un programa de muerte celular que induce cambios morfológicos y respuestas bioquímicas que se caracteriza por la fragmentación de ADN (Saraste & Pulkki, 2000), ya que en la cinética de la muerte celular, la presencia de los fragmentos de ADN se encontró exclusivamente en el lisado celular y no en los sobrenadantes, indicando que la fragmentación del ADN ocurrió antes que la lisis de la membrana plasmática, como sucede en la apoptosis. Varios estudios han

demostrado que la fragmentación de ADN por apoptosis ocurre antes de la ruptura de la membrana plasmática. Por ejemplo, en células endoteliales tratadas con BaP1 donde la presencia de los fragmentos de ADN solo estuvo dentro de las células, lo que demostró que las membranas plasmáticas aún se encontraban intactas, confirmando la muerte por apoptosis y no necrosis (Díaz et al., 2005). En otro estudio realizado en células HT29 tratadas con nanopartículas de plata se observaron resultados similares donde la liberación del ADN marcado con BrdU se observó en primera instancia en la lisis celular lo que confirma la apoptosis celular (Gopinath et al., 2008). Además, numerosos estudios han demostrado que varios compuestos fitoquímicos inducen la muerte celular de varias líneas celulares de cáncer colorrectal mediante un mecanismo de apoptosis (Wong et al., 2021), soportando los resultados de este estudio.

Por último, se investigó el posible mecanismo molecular por el cual el extracto metanólico de *L. virginicum* indujo apoptosis en las células Caco-2 mediante la evaluación de la expresión de algunos genes relacionados con la apoptosis. En comparación con las células control (no tratadas), el ARNm de la caspasa-3 aumentó significativamente después del tratamiento con ELV durante 48 horas. Varios estudios han demostrado que la caspasa-3 es una enzima ejecutora clave de la apoptosis e indispensable para la condensación de la cromatina y la fragmentación de ADN, y su activación puede ser dependiente o independiente de la liberación del citocromo c mitocondrial y de la caspasa 9 (Li & Yuan, 2008; Asadi et al., 2022). Asimismo, se observó un aumento significativo de la expresión génica de p53 en las células Caco-2 tratadas con el ELV en comparación con las células control. El gen p53 codifica una proteína supresora de tumores que conduce al arresto del crecimiento celular en la fase G1 e induce a la apoptosis tras el daño del ADN (Hussain & Harris, 2006). La sobreexpresión del gen p53 se ha implicado en las vías de señalización apoptótica tanto extrínseca como intrínseca (Aubrey et al., 2018). Por otro lado, el ELV indujo una disminución no significativa de la expresión génica de Bcl-2 en las células Caco-2 comparándolas con las células no tratadas. El propio Bcl-2 es un gen anti-apoptótico que previene o reduce la apoptosis (Droin & Green, 2004). En conjunto, todos estos resultados demuestran que el extracto

metanólico de *Lepidium virginicum* tiene un efecto citotóxico sobre la línea celular Caco-2 mediante un mecanismo de apoptosis posiblemente estimulado por p53.

10 CONCLUSIONES

- Se separaron e identificaron tentativamente 28 compuestos mediante GC-MS en *L. virginicum*, de los cuales 3 podrían ser los responsables de su actividad tóxica sobre las células de cáncer.
- El extracto metanólico de *Lepidium virginicum* no mostró un efecto tóxico sobre la línea celular Detroit 548 en ninguna de las concentraciones probadas.
- Se demostró que el extracto metanólico de *Lepidium virginicum* disminuye la viabilidad celular de la línea celular de cáncer colorrectal humana, Caco-2 induciendo la fragmentación de ADN y sobre regulando los niveles de expresión génica de caspasa 3 y p53 lo indica que fue a través de un mecanismo de apoptosis.
- El extracto metanólico de *Lepidium virginicum* podría ser una alternativa potencial para el tratamiento del cáncer colorrectal.

11 BIBLIOGRAFÍA

Ahumada, A., Ortega, A., Chito, D., & Benítez, R. (2016). Saponinas de quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.): un subproducto con alto potencial biológico. *Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas*, 45(3), 438–469. <https://doi.org/10.15446/rcciquifa.v45n3.62043>

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

Asadi, J., Zirak, R. G., Tajik, H., Hashemian, P., & Javid, H. (2022). The Role of Micro RNAs in Regulating PI3K/AKT Signaling Pathways in Glioblastoma. In Iranian Journal of Pathology (Vol. 17, Issue 2, pp. 122–136). Iranian Society of Pathology. <https://doi.org/10.30699/ijp.2022.539029.2726>

Arango Acosta, G. J. (2008). Alcaloides y compuestos nitrogenados. Universidad de Antioquia. pp. 7-14.

Arroyave Murillo, L. M., Gómez Barrera, M., & Hurtado Tobón, L. H. (2018). Determinación de la actividad antioxidante de *Malvaviscus arboreus* Cav. (malvavisco). *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 23(2). <http://www.revplantasmedicinales.sld.cu/index.php/pla/article/view/588/312>

Aubrey, Brandon J; Kelly, Gemma L; Janic, Ana; Herold, Marco J; Strasser, Andreas (2017). ¿Cómo induce p53 la apoptosis y cómo se relaciona con la supresión tumoral mediada por p53?. *Muerte y diferenciación celular*, (), -. doi:10.1038/cdd.2017.169

Ávalos García, Adolfo y Pérez-Urria Carril, Elena (2009) Metabolismo secundario de plantas. *REDUCA*, 2 (3). pp. 119-145. ISSN 1989-3620

Babaei, H., Forouzandeh, F., Maghsoumi-Norouzabad, L., Yousefimanesh, H. A., Ravanbakhsh, M., & Zare Javid, A. (2018). Effects of Chicory Leaf Extract on Serum Oxidative Stress Markers, Lipid Profile and Periodontal Status in Patients With Chronic Periodontitis. *Journal of the American College of Nutrition*, 37(6), 479–486. <https://doi.org/10.1080/07315724.2018.1437371>

Bedoya Mejía, M. A., Rodríguez Camacho, L. S., Jaramillo Gómez, L. M., & Moreno Abello, G. C. (2016). The Effect of Capsaicine in Human Pulp Fibroblasts, in the Production of PGE2 and Proinflammatory Cytokines is associated with Ethanol. *Universitas Odontológica*, 35(74). <https://doi.org/10.11144/javeriana.uo35-74.ecfp>

Berlin, E. A., Berlin, B., Lozoya, X., Breedlove, D. E., Meckes, M., Villarreal, M.-L., Tortoriello, J., Ricárdez, J. R., Maffi, L., de Guadalupe Rodríguez, M., Castille, D., & Laughlin, R. M. (1996). Los dolores abdominales. En *Medical Ethnobiology of the*

Highland Maya of Chiapas, Mexico: The Gastrointestinal Diseases (pp. 281–399). Princeton University Press. <http://www.jstor.org/stable/j.ctt13x1263.10>

- Bispo da Silva, Alessandra; Cerqueira Coelho, Paulo Lucas; Oliveira Amparo, Jessika Alves; Alves de Almeida Carneiro, Monique Marylin; Pereira Borges, Julita Maria; Souza, Cleide dos Santos; de Fátima Dias Costa, Maria; Mecha, Miriam; Rodriguez, Carmen Guaza; Amaral da Silva, Victor Diogenes; Costa, Silvia Lima (2017). The flavonoid rutin modulates microglial/macrophage activation to a CD150/CD206 M2 phenotype. *Chemico-Biological Interactions*, (), S0009279717303897–. doi: 10.1016/j.cbi.2017.07.004
- Bindu, T. K., & Udayan, P. S. (2018). GC-MS analysis of bioactive compounds in methanolic extract of tubers of *Pueraria tuberosa*. *International Journal of Environment, Agriculture and Biotechnology*, 3(4), 1493–1498. <https://doi.org/10.22161/ijeab/3.4.47>
- Botteri, E., Iodice, S., Bagnardi, V., Raimondi, S., Lowenfels, A. B. y Maisonneuve, P. (2008). El tabaquismo y el cáncer colorrectal. *JAMA*, 300(23), 2765. doi:10.1001/jama.2008.839
- Brucato, M. G., Lindorf, H., Trujillo, I., & Oropeza, M. (2014). Morphoanatomy comparative study of leaf *Lepidium virginicum* L., Brassicaceae (cress) grown both in vivo and in vitro. *Acta Botánica Venezolánica*, 37, 31–42.
- Bustos-Hipólito, E., Legorreta-Siañez, A. V., Luisa, A., Garfias², J., Rodrigo González-González, L., Jesús Arenas-Huertero, F., García-Gil De Muñoz, F., & Buenrostro-Zagal, J. F. (2012). Effect of the extraction solvent on the bioactivity and antioxidant capacity of apple peel extracts.
- Calzada, F., Barbosa, E., & Cedillo-Rivera, R. (2003). Antiamoebic activity of benzyl glucosinolate from *Lepidium virginicum*. *Phytotherapy Research*, 17(6), 618–619. <https://doi.org/10.1002/ptr.1210>.
- Ceesay, A., Nor Shamsudin, M., Aliyu-Paiko, M., Ismail, I. S., Nazarudin, M. F., & Mohamed Alipiah, N. (2019). Extraction and Characterization of Organ Components of the Malaysian Sea Cucumber *Holothuria leucospilota* Yielded

- Bioactives Exhibiting Diverse Properties. *BioMed research international*, 2019, 2640684. <https://doi.org/10.1155/2019/2640684>
- Chetroui, D., Pop, C.S., Diaconu, S.L. y Beuran, M. (2021). Epidemiología del cáncer colorrectal y factores de riesgo. *Revista rumana de medicina militar*.
- Choudhari, A. S., Mandave, P. C., Deshpande, M., Ranjekar, P., & Prakash, O. (2020). Phytochemicals in cancer treatment: From preclinical studies to clinical practice. In *Frontiers in Pharmacology* (Vol. 10). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.01614>
- Cruz-Muñoz, J. R., Barrios-García, T., Valdez-Morales, E. E., Durán-Vazquez, M. F., Méndez-Rodríguez, K. B., Barajas-Espinosa, A., Ochoa-Cortes, F., Martínez-Saldaña, M. C., Gómez-Aguirre, Y. A., & Alba, R. G. (2022). Ethanolic extract from *Lepidium virginicum* L. ameliorates DNBS-induced colitis in rats. *Journal of ethnopharmacology*, 289, 115056. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2022.115056>.
- de León-Rendón, J. L., Jiménez-Bobadilla, B., López-Pérez, R. Y., Gracida-Mancilla, N. I., Alarcón-Bernés, L., & Villanueva Herrero, J. A. (2019). Ulcerative colitis: Epidemiology, clinical features and associated factors with surgical treatment in a tertiary hospital in Mexico. *Cirugia y Cirujanos (English Edition)*, 87(4), 450–458. <https://doi.org/10.24875/CIRU.18000737>.
- Díaz, C., Valverde, L., Brenes, O., Rucavado, A., & Gutiérrez, J. M. (2005). Characterization of events associated with apoptosis/anoikis induced by snake venom metalloproteinase BaP1 on human endothelial cells. *Journal of Cellular Biochemistry*, 94(3), 520–528. <https://doi.org/10.1002/jcb.20322>.
- Drain, N. M., & Green, D. R. (2004). Role of Bcl-2 family members in immunity and disease. *Biochimica et biophysica acta*, 1644(2-3), 179–188. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2003.10.011>
- Dua, V. K., Verma, G., & Dash, A. P. (2009). In Vitro Antiprotozoal Activity of Some Xanthones Isolated from the Roots of *Andrographis paniculata*. *Phytother. Res*, 23, 126–128. <https://doi.org/10.1002/ptr>.

- Dziedzic, S. Z., & Hudson, B. J. F. (1984). Phenolic Acids and Related Compounds as Antioxidants for Edible Oils. *Food Chemistry* 23(1), 45-51. [https://doi.org/10.1016/0308-8146\(84\)90017-7](https://doi.org/10.1016/0308-8146(84)90017-7).
- Ekor, M. (2014). The growing use of herbal medicines: Issues relating to adverse reactions and challenges in monitoring safety. *Frontiers in Neurology: Vol. 4 JAN*. <https://doi.org/10.3389/fphar.2013.00177>.
- Espinoza Olaya, J. K., & Rojas de Astudillo, L. (2014). Determinación cuantitativa de alcaloides en doce plantas medicinales y su actividad expectorante. Universidad técnica de machala.
- Fedirko, V., Tramacere, I., Bagnardi, V., Rota, M., Scotti, L., Islami, F., Negri, E., Straif, K., Romieu, I., La Vecchia, C., Boffetta, P., & Jenab, M. (2011). Alcohol drinking and colorectal cancer risk: an overall and dose-response meta-analysis of published studies. *Annals of oncology: official journal of the European Society for Medical Oncology*, 22(9), 1958–1972. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdq653>.
- Ferguson, L. R., Zhu, S. T., & Harris, P. J. (2005). Antioxidant and antigenotoxic effects of plant cell wall hydroxycinnamic acids in cultured HT-29 cells. *Molecular Nutrition and Food Research*, 49(6), 585–593. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200500014>.
- García Regalado, G. (2015). Plantas medicinales de Aguascalientes. (Segunda edición). Universidad Autónoma de Aguascalientes.
- Giglia, M. D., & Chu, D. I. (2016). Familial Colorectal Cancer: Understanding the Alphabet Soup. *Clinics in colon and rectal surgery*, 29(3), 185–195. <https://doi.org/10.1055/s-0036-1584290>.
- González-García, A., Hernández-Salas, C., Martínez-Ortiz, R. M., & Tavizón-García, J. A. (2020). Uso de plantas medicinales en la prevención de enfermedades en Jalpa, Zacatecas. *Revista de Ciencias de La Salud*, 12–28. <https://doi.org/10.35429/johs.2020.22.7.18.25>.

- Gopinath, P., Gogoi, S. K., Chattopadhyay, A., & Ghosh, S. S. (2008). Implications of silver nanoparticle induced cell apoptosis for in vitro gene therapy. *Nanotechnology*, 19(7). <https://doi.org/10.1088/0957-4484/19/7/075104>.
- Goyal, S., Gupta, N., Chatterjee, S., & Nimesh, S. (2017). Natural Plant Extracts as Potential Therapeutic Agents for the Treatment of Cancer. *Current topics in medicinal chemistry*, 17(2), 96–106. <https://doi.org/10.2174/1568026616666160530154407>.
- Guren M. G. (2019). The global challenge of colorectal cancer. *The lancet. Gastroenterology & hepatology*, 4(12), 894–895. [https://doi.org/10.1016/S2468-1253\(19\)30329-2](https://doi.org/10.1016/S2468-1253(19)30329-2).
- Guzmán Gutiérrez, S. L., Reyes Chilpa, R., & Bonilla Jaime, H. (2014). Medicinal plants for the treatment of "nervios", anxiety, and depression in Mexican Traditional Medicine. En *Revista Brasileira de Farmacognosia* (Vol. 24, Issue 5, pp. 591–608). Sociedade Brasileira de Farmacognosia. <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2014.10.007>.
- Habli, Zeina; Toumieh, Georgio; Fatfat, Maamoun; Rahal, Omar; Gali-Muhtasib, Hala (2017). Alcaloides citotóxicos emergentes en la batalla contra el cáncer: visión general de los mecanismos moleculares. *Moléculas*, 22(2), 250–. doi:10.3390/moléculas22020250
- Hong S. N. (2018). Genetic and epigenetic alterations of colorectal cancer. *Intestinal research*, 16(3), 327–337. <https://doi.org/10.5217/ir.2018.16.3.327>.
- Huerta, C. (1997). La herbolaria: mito o realidad. *Biodiversistas*, 12(3), 1–7.
- Hussain, S. P., & Harris, C. C. (2006). p53 biological network: at the crossroads of the cellular-stress response pathway and molecular carcinogenesis. *Journal of Nippon Medical School = Nippon Ika Daigaku zasshi*, 73(2), 54–64. <https://doi.org/10.1272/jnms.73.54>
- Jacobo-Herrera, N. J., Jacobo-Herrera, F. E., Zentella-Dehesa, A., Andrade-Cetto, A., Heinrich, M., & Pérez-Plasencia, C. (2017). Medicinal plants used in Mexican

- traditional medicine for the treatment of colorectal cancer. *Journal of Ethnopharmacology*, 179, 391–402. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2015.12.042>.
- Jang, J. W., Yang, J. C., Jung, S. Y., Lee, H. J., Yun, J. E., Chang, C., Hwang, H. S., Chang, K. S., Oh, S. H., & Lee, Y. M. (2014). The distribution of vascular plants in Banronsan (Mt.) at Jeongseon Gangwon-do, Korea. *Journal of Asia-Pacific Biodiversity*, 7(1), e30–e39. <https://doi.org/10.1016/j.japb.2014.03.007>.
- Kabera, J. (2014). Plant Secondary Metabolites: Biosynthesis, Classification, Function and Pharmacological Classification, Function and Pharmacological Properties. <https://www.researchgate.net/publication/277776550>.
- Kang, S., Na, Y., Joung, S. Y., Lee, S. I., Oh, S. C., & Min, B. W. (2018). The significance of microsatellite instability in colorectal cancer after controlling for clinicopathological factors. *Medicine*, 97(9), e0019. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000010019>.
- Keum, N., & Giovannucci, E. (2019). Global burden of colorectal cancer: emerging trends, risk factors and prevention strategies. *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology*, 16(12), 713–732. <https://doi.org/10.1038/s41575-019-0189-8>.
- Kim, D. H., Han, S. I., Go, B., Oh, U. H., Kim, C. S., Jung, Y. H., Lee, J., & Kim, J. H. (2019). 2-Methoxy-4-vinylphenol attenuates migration of human pancreatic cancer cells via blockade of FAK and AKT signaling. *Anticancer Research*, 39(12), 6685–6691. <https://doi.org/10.21873/anticanres.13883>.
- Kozubek, A., & Tyman, J. H. P. (1999). Resorcinolic lipids, the natural non-isoprenoid phenolic amphiphiles and their biological activity. *Chemical Reviews*, 99(1). <https://doi.org/10.1021/cr970464o>
- Kuipers, E., Grady, W., Lieberman, D., Seufferlein, T., Sung, J., Boelens, P., Cornelis, J., Velde, V., & Watanabe, T. (2015). Colorectal cancer. *Nature Reviews Disease Primers*, ePub ahead of print. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2015.65>.
- Kumaraguruparan, R., Karunakaran, D., Balachandran, C., Manohar, B. M., & Nagini, S. (2006). Of humans and canines: A comparative evaluation of heat

shock and apoptosis-associated proteins in mammary tumors. *Clinica Chimica Acta*, 365(1–2), 168–176. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2005.08.018>.

Larramendy, M. L., & Soloneski, S. (2018). Genotoxicity - A Predictable Risk to Our Actual World. En *Genotoxicity - A Predictable Risk to Our Actual World*. InTech. <https://doi.org/10.5772/intechopen.69556>.

Lea, T. (2015). Caco-2 cell line. En *The Impact of Food Bioactives on Health: In Vitro and Ex Vivo Models* (pp. 103–111). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-16104-4_10.

Lenka, Sangram K; Boutaoui, Nadia; Paulose, Bibin; Vongpaseuth, Kham; Normanly, Jennifer; Roberts, Susan C; Walker, Elsbeth L (2012). Identificación y análisis de expresión de ESTs sensibles al metil jasmonato en células de cultivo productoras de paclitaxel *Taxus cuspidata* suspension. *BMC Genomics*, 13(1), 148–. doi:10.1186/1471-2164-13-148

Li, J., & Yuan, J. (2008). Caspases in apoptosis and beyond. *Oncogene*, 27(48), 6194–6206. <https://doi.org/10.1038/onc.2008.297>.

Li, Z., Pang, Z., Chen, J., Wang, T., Gao, C., Guo, L., Xu, J., & Cheng, Y. (2021). Linking Plant Secondary Metabolites and Plant Microbiomes: A Review. *Frontiers in Plant Science* (Vol. 12). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.621276>.

Liang, P. S., Chen, T. Y., & Giovannucci, E. (2009). Cigarette smoking and colorectal cancer incidence and mortality: systematic review and meta-analysis. *International journal of cancer*, 124(10), 2406–2415. <https://doi.org/10.1002/ijc.24191>.

Lippi, G., Mattiuzzi, C., & Cervellin, G. (2016). Meat consumption and cancer risk: a critical review of published meta-analyses. *Critical reviews in oncology/hematology*, 97, 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2015.11.008>

Liu, C.-L., Wang, J.-M., Chu, C.-Y., Cheng, M.-T., & Tseng, T.-H. (2002). In vivo protective effect of protocatechuic acid on tert-butyl hydroperoxide-induced rat hepatotoxicity. www.elsevier.com/locate/foodchemtox.

- Lopes, M. B., Araújo, L. Q., Passos, M. T., Nishida, S. K., Kirsztajn, G. M., Cendoroglo, M. S., & Sesso, R. C. (2013). Estimation of glomerular filtration rate from serum creatinine and cystatin C in octogenarians and nonagenarians. <http://www.biomedcentral.com/1471-2369/14/265>.
- López Cruz, L. X. (2022). Programas Nacionales Estratégicos. <https://Conacyt.Mx/Pronaces/>.
- Mandrich, L., & Caputo, E. (2020). Brassicaceae-derived anticancer agents: Towards a green approach to beat cancer. En *Nutrients* (Vol. 12, Issue 3). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/nu12030868>.
- Manzanero-Medina, G. I., Vásquez-Dávila, M. A., Lustre-Sánchez, H., & Pérez-Herrera, A. (2020). Ethnobotany of food plants (quelites) sold in two traditional markets of Oaxaca, Mexico. *South African Journal of Botany*, 130, 215–223. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2020.01.002>.
- Mares Guerrero, A., & Ocampo, A. G. (2020). Flora útil del área natural protegida Sierra del Laurel, Aguascalientes, México. *Revista Etnobiología*, 18, 3–23.
- Martínez Imamura, E. J., Guerrero Alba, R., Gómez Aguirre, Y. A., & Blancas Zugarazo, S. S. (2021). Evaluación de la actividad antiinflamatoria y citotóxica in vitro de *Lepidium virginicum* L. (Brassicaceae).
- Martínez Lombardo, Ma. C., & Cano Ortiz, A. (2009). Medicinal plants with alkaloids in the Province of Jaén. *Boletín Del Instituto de Estudios Giennenses*, 200, 125–163.
- Morano, F., & Sclafani, F. (2018). Duration of first-line treatment for metastatic colorectal cancer: Translating the available evidence into general recommendations for routine practice. *Critical reviews in oncology/hematology*, 131, 53–65. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2018.08.006>.
- Olivera-Condori, M., Flores-Arizaca, J., Vásquez-Zavaleta, T., & Ocsa-Borda, E. (2013). Propiedades fisicoquímicas y bioactivas in vitro del aceite esencial de *Mansoa alliacea* (LAM.) A. Gentry. *El Ceprosimad*, 2(1), 96–102.

Olvera Bautista, J. F. (2008). Efecto in vitro de los extractos de tres plantas utilizadas en la medicina tradicional mexicana contra *Entamoeba histolytica*. Universidad Nacional Autónoma de México, tesis para obtener grado de Biólogo.

ONU. (2022). Objetivos de desarrollo sostenible. <https://www.un.org/sustainabledevelopment/es/objetivos-de-desarrollo-sostenible/>.

Ortega-Cala, L. L., Monroy-Ortiz, C., Monroy-Martínez, R., Colín-Bahena, H., Flores-Franco, G., Luna-Cavazos, M., & Monroy-Ortiz, R. (2019). Medicinal plants used for diseases of the digestive system in Tetela del Volcan, State of Morelos, Mexico. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 18(2), 106–129. <https://doi.org/10.37360/BLACPMA.19.18.2.9>.

Pacheco-Hernández, Y., Santamaría-Juárez, J. D., Hernández-Silva, N., Cruz-Durán, R., Mosso-González, C., & Villa-Ruano, N. (2021). Essential Oil of *Lepidium virginicum*: Protective Activity on Anthracnose Disease and Preservation Effect on the Nutraceutical Content of Tamarillo Fruit (*Solanum betaceum*). *Chemistry & biodiversity*, 18(3), e2000941. <https://doi.org/10.1002/cbdv.202000941>.

Palma Tenango, M., Miguel-Chávez, R., & soto-hernandez, M. (2017). Aromatic and Medicinal Plants in Mexico. <https://doi.org/10.5772/66507>.

Park, J., Shin, H. T., An, J. bin, Jung, S. Y., & Kim, S. J. (2021). The vascular plants of Mt. Anam (Cheorwon-gun, Gangwon-do) area adjacent to the Korean demilitarized zone. *Journal of Asia-Pacific Biodiversity*, 14(2), 242–247. <https://doi.org/10.1016/j.japb.2021.02.007>.

Peña, M., Guzmán, A., Martínez, R., Mesas, C., Prados, J., Porres, J. M., & Melguizo, C. (2022). Preventive effects of Brassicaceae family for colon cancer prevention: A focus on in vitro studies. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, 151, 113145. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2022.113145>.

- Rawla, P., Sunkara, T., & Barsouk, A. (2019). Epidemiology of colorectal cancer: incidence, mortality, survival, and risk factors. *Przeegląd gastroenterologiczny*, 14(2), 89–103. <https://doi.org/10.5114/pg.2018.81072>.
- Ross, A. B., Kamal-Eldin, A., Lundin, E. A., Zhang, J.-X., Ran Hallmans, G., & Åman, P. (2003). Cereal Alkylresorcinols Are Absorbed by Humans. <https://academic.oup.com/jn/article-abstract/133/7/2222/4688332>.
- Saraste, A., & Pulkki, K. (2000). Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. *Cardiovascular research*, 45(3), 528–537. [https://doi.org/10.1016/s0008-6363\(99\)00384-3](https://doi.org/10.1016/s0008-6363(99)00384-3)
- Siegel, R. L., Miller, K. D., & Jemal, A. (2020). Cancer statistics, 2020. *CA: a cancer journal for clinicians*, 70(1), 7–30. <https://doi.org/10.3322/caac.21590>.
- Sun, H., Chow, E. C. Y., Liu, S., Du, Y., & Pang, K. S. (2008). The Caco-2 cell monolayer: Usefulness and limitations. En *Expert Opinion on Drug Metabolism and Toxicology* (Vol. 4, Issue 4, pp. 395–411). <https://doi.org/10.1517/17425255.4.4.395>.
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: a cancer journal for clinicians*, 71(3), 209–249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>.
- Tian, R., Yang, W., Xue, Q., Gao, L., Huo, J., Ren, D., & Chen, X. (2016). Rutin ameliorates diabetic neuropathy by lowering plasma glucose and decreasing oxidative stress via Nrf2 signaling pathway in rats. *European Journal of Pharmacology*, 771, 84–92. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2015.12.021>.
- Tolosa, L., Donato, M. T., & Gómez-Lechón, M. J. (2015). General cytotoxicity assessment by means of the MTT assay. En *Methods in Molecular Biology* (Vol. 1250, pp. 333–348). Humana Press Inc. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2074-7_26.
- Weathers, Pamela J.; Elfawal, Mostafa A.; Towler, Melissa J.; Acquaaah-Mensah, George K.; Rich, Stephen M. (2014). *Farmacocinética de la artemisinina*

administrada por el consumo oral de hojas secas de *Artemisia annua* en ratones sanos vs. *Plasmodium chabaudi*-infectados. *Revista de etnofarmacología*, 153(3), 732–736. doi: 10.1016/j.jep.2014.03.037

Wong, T. L., Strandberg, K. R., Croley, C. R., Fraser, S. E., Nagulapalli Venkata, K. C., Fimognari, C., Sethi, G., & Bishayee, A. (2021). Pomegranate bioactive constituents target multiple oncogenic and oncosuppressive signaling for cancer prevention and intervention. *Seminars in cancer biology*, 73, 265–293. <https://doi.org/10.1016/j.semancer.2021.01.006>.

