



Benemérita Universidad Autónoma de
Puebla

Facultad de Ciencias Biológicas

“Efecto del extracto acuoso de
Kalanchoe pinnata en la expresión de la
desmetilasa FTO,
la metiltransferasa METTL3 y en la
migración de la línea tumoral de mama
HCC1937”

Tesis que para obtener el título de
Licenciado en Biología

Presenta
Uriel López Vázquez

Directora de Tesis

D.C. Marta Elena Hernández Caballero
D.C. Carlos Rogelio Alvizo Rodríguez

Febrero 2024

Carlos R. Alvizo R.



BUAP

Oficio No. FCBSAC/113/2024
Oficio de Modalidad de Titulación
Por Examen Profesional por Tesis

Mtro. Ricardo Valderrama Valdez
Director de Administración Escolar, BUAP
PRESENTE

At'n: Psic. Marcela Juárez Zenteno
Jefa del Departamento de Titulación

Por este medio, me permito hacer de su conocimiento que el alumno **URIEL LOPEZ VAZQUEZ** con matrícula **201541753** de la Licenciatura en Biología, presentará examen profesional el día **02 de febrero de 2024 a las 11:00 horas**, mismo que **será virtual**.

Informar a los miembros del sínodo evaluador:

NOMBRE	CARGO
DRA. MARIA EUGENIA PEREZ BONILLA	PRESIDENTE
DRA. MARTA ELENA HERNANDEZ CABALLERO	SECRETARIO
DRA. DOLORES LOPEZ MORALES	VOCAL

Nota: este documento tiene vigencia por 06 meses a partir de la fecha de su expedición.

Sin más por el momento y agradeciendo de antemano su atención y apoyo, quedo de usted.

Atentamente

“Pensar bien, para vivir mejor”

H. Puebla de Z., a 30 de enero de 2024

Dr. Salvador Galicia Isasmendi

Director

Oficio No. FCBSAC/113/2024
Oficio de Modalidad de Titulación
Por Examen Profesional por Tesis

Agradecimientos

Como una persona que no ha perdido su fe gracias a mi Dios por permitirme vivir, ver, sentir, caminar y adquirir conocimiento disfrutando de ello.

Gracias a mis padres José y Margarita por siempre brindarme cuidados y hacer que nunca faltara un plato sobre la mesa, gracias por su esfuerzo y apoyo para que tuviera una carrera universitaria. Gracias, hermanos por su apoyo, sobre todo a Marco Antonio y su apoyo que fue más que valioso. Javier, Inés, Alexis y Miguel, no podría dejar de estar agradecido con ustedes por su enorme apoyo y guía, durante momentos difíciles.

Dra. Elena muchas gracias por brindarme un lugar en su laboratorio, por su interés en mi formación profesional y su enorme paciencia, gracias también por mostrarme oportunidades que creía perdidas, estaré siempre agradecido.

Dr. Carlos gracias por tu apoyo experiencia y disponibilidad en el laboratorio y por hacer de él un ambiente agradable para trabajar.

Biomédico Jose Luis, gracias por tu introducción y servicio al laboratorio que tanto ha sido de ayuda.

Índice

Contenido

RESUMEN	5
INTRODUCCIÓN	7
<i>Cáncer</i>	7
<i>Cáncer de mama triple negativo</i>	8
<i>Metástasis</i>	9
<i>Regulación epigenética</i>	12
<i>Modificación m6A</i>	13
<i>Células HCC1937</i>	15
<i>Kalanchoe pinnata</i>	16
<i>Taxonomía</i>	17
<i>Morfología</i>	17
<i>Distribución y origen</i>	18
<i>Usos en medicina tradicional</i>	19
<i>Perfil fotoquímico de K. pinnata</i>	20
ANTECEDENTES	20
<i>Género Kalanchoe y el cáncer</i>	20
<i>K. pinnata y el cáncer</i>	21
<i>Algunos metabolitos secundarios de K. pinnata y su actividad anticancerígena</i>	22
Ácido gálico	22
Ácido cafeico	22
Bufadienólidos	22
JUSTIFICACIÓN	24
PLATEAMIENTO DEL PROBLEMA	24
HIPÓTESIS	24
OBJETIVO GENERAL	25
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
MATERIALES Y MÉTODOS	25
<i>Colecta y elaboración del extracto acuoso</i>	25
<i>Cultivo y mantenimiento de la línea celular HCC1937</i>	26

<i>Determinación de la CC50 y ensayo MTT</i>	26
<i>Ensayo de cicatrización de herida y tratamiento con K. pinnata</i>	27
<i>Extracción y cuantificación de ARN</i>	28
<i>RT-PCR y qPCR</i>	29
<i>Expresión génica:</i>	30
RESULTADOS	30
<i>Colecta de K. pinnata</i>	30
<i>Cultivo y mantenimiento de la línea celular HCC1937</i>	31
<i>CC50 y ensayo MTT</i>	32
<i>Ensayo de cicatrización de herida y tratamiento con K. pinnata</i>	33
<i>Extracción, purificación y cuantificación del ARN</i>	37
<i>Reacción de retro transcripción</i>	39
<i>Expresión génica</i>	40
<i>Expresión relativa de FTO</i>	42
<i>Expresión relativa de METTL3</i>	43
DISCUSIÓN:	43
Conclusiones.	48

RESUMEN

El cáncer como grupo de enfermedades es la segunda causa de muerte a nivel mundial, tan solo en el año 2020, se estima fallecieron alrededor de 10 millones de personas por algún tipo de cáncer. El cáncer de mama triple negativo representa del 10 al 20% de todos los casos registrados, es un cáncer agresivo y comúnmente de mal pronóstico, siendo una grave complicación el proceso de metástasis, el cual permite que células tumorales puedan colonizar e invadir distintas regiones del cuerpo, llegando a provocar hasta un 90% de mortalidad en pacientes diagnosticados. El proceso de metástasis es complejo e involucra distintos factores como la migración celular, angiogénesis, evasión de la apoptosis entre otros. Además, existen modificaciones en el ADN y ARN que participan activamente en el desarrollo del cáncer, modificaciones como la metilación, dentro de la cual, la más conocida es la metilación en el ADN. Sin embargo, este fenómeno regulatorio también se presenta en el ARN, principalmente en el ARNm precisamente en la sexta posición de la adenosina (N6 metiladenosina o m6A), la cual, al ser una modificación reversible, es llevada a cabo por un conjunto de proteínas que permiten, insertar la modificación como lo hace la enzima metiltransferasa METTL3, eliminarla, función que lleva a cabo la desmetilasa FTO y leerla como lo hacen las proteínas de la familia YTDH.

Actualmente la investigación para el uso de nuevos tratamientos es de vital importancia en la lucha contra el cáncer siendo los tratamientos de origen natural, como los extractos vegetales, una potencial alternativa en la investigación médica y de donde ya se han obtenido fármacos que ahora tiene un uso generalizado para tratar el cáncer como es el caso de la vincristina.

En este trabajo se cultivó la línea celular comercial HCC1937, obtenida originalmente de una paciente con cáncer metastásico triple negativo. Las células fueron tratadas con el extracto acuoso de *K. pinnata*, se realizó un ensayo *in vitro* de migración de cierre de herida y mediante un ensayo de qPCR se analizaron los niveles de expresión relativa de METTL3 y FTO, se compararon los grupos expuestos al extracto de *K. pinnata*, en el ensayo de cierre de herida, así como el grupo con ambos tratamientos respecto al control.

Se observó que el extracto de *K. pinnata* inhibió significativamente la migración *in vitro* de las células HCC1937 a partir de las 48 horas de tratamiento, siendo significativo a las 72 horas. Al analizar la expresión relativa de FTO después de exponer las células al extracto de *K. pinnata*, así como al grupo de ensayo de cierre de herida se observó un aumento significativo en su expresión, además al comparar el grupo expuesto con el extracto de *K. pinnata* y el grupo de ensayo de herida, la expresión fue significativa. Respecto a METTL3 el grupo expuesto al ensayo de herida mostró un aumento significativo de la expresión, sin embargo, en el grupo expuesto al extracto se observó una disminución significativa en la expresión, mientras que en el grupo expuesto al extracto y a la herida se observó una disminución significativa. Estos resultados muestran que el extracto de *K. pinnata*, inhibe la migración de la línea celular tumoral HCC1937 además de que provoca cambios en la expresión de los genes del metiloma FTO y METTL3, también se observó que la interacción del tratamiento con el ensayo de herida y el extracto de *K. pinnata*, muestra cambios estadísticamente significativos con respecto al resto, a partir de estos resultados

es posible sugerir al extracto de *K. pinnata* como un potencial agente anti metastásico además de un potencial modulador epigenético *in vitro*, sin embargo más estudios son necesarios.

INTRODUCCIÓN

Cáncer

Podemos definir al cáncer como un conjunto de enfermedades capaces de originarse en casi cualquier tejido u órgano del cuerpo, sucede cuando células anormales del cuerpo, crecen de forma descontrolada. Cuando estas células sobrepasan sus límites habituales e invaden partes adyacentes, propagándose a otros órganos del cuerpo, entonces podemos hablar del proceso de metástasis¹.

Los tipos de cáncer más comunes en hombres son el cáncer pulmonar, de próstata, colorrectal, hepático y estomacal, mientras que en mujeres lo son el cáncer de mama, colorrectal, pulmonar, cervical y tiroideo.

El cáncer tiene diversas causas tanto externas como el consumo de tabaco, contacto con productos químicos o radiación, así como factores internos como las mutaciones aleatorias, condiciones de inmunidad y hormonales propias de cada persona².

El cáncer es la segunda causa de muerte en todo el mundo, tan solo en 2020 cobró la vida de al menos 10 millones de personas¹, con una mayor incidencia en países desarrollados (Figura 1). En México el cáncer es la tercera causa de muerte dentro de la población, puesto que cada año se estiman 190,000 casos nuevos y aproximadamente 83,000 personas pierden la vida por esta patología. Se estima que por factores como la esperanza de vida y factores de riesgo dentro de 20 años el número de casos de cáncer en México aumente hasta un 70%¹.

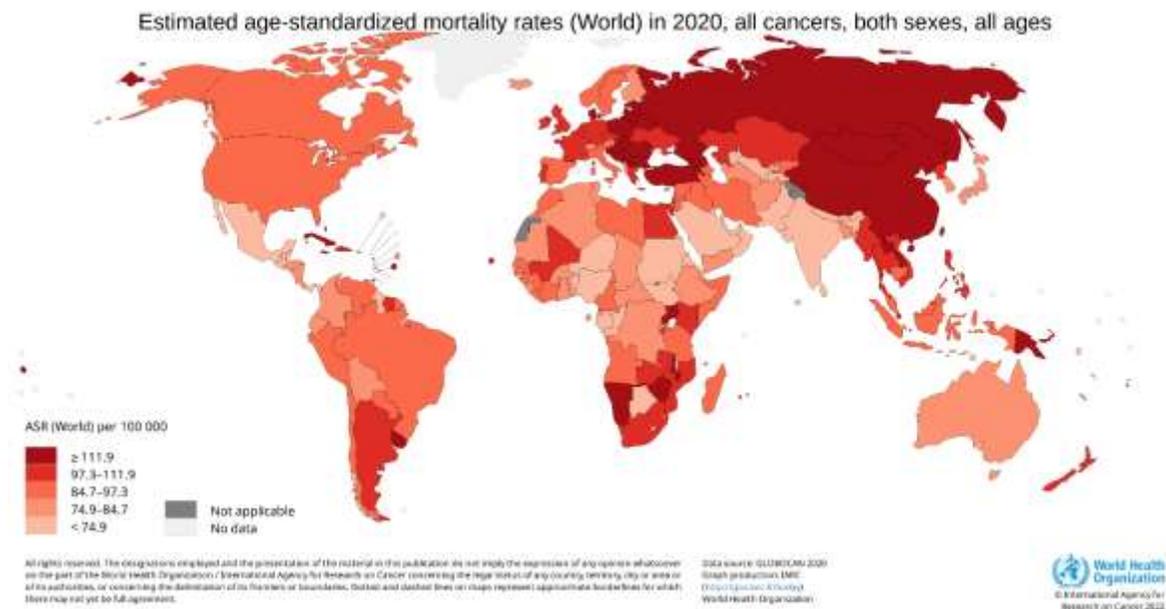


Figura 1. Mortalidad por cáncer en el mundo en el 2022¹.

Cáncer de mama triple negativo

El cáncer de mama triple negativo es un tipo de cáncer de mama que suele ser más agresivo, además de ser de difícil pronóstico y tratamiento, se denomina triple negativo ya que sus células no expresan receptores de estrógenos, de progesterona y del factor de crecimiento humano HER-2, es por eso que los tratamientos suelen ser complicados ya que, al no poseer estos receptores, la enfermedad no responderá a fármacos de terapia hormonal o que actúen de manera selectiva sobre la proteína (HER-2)³.

Se estima que por cada millón de casos de cáncer de mama que se registran cada año en todo el mundo aproximadamente 170,000 casos corresponden a cáncer de mama triple negativo, representando del 10 al 20 % del total⁴.

Una de las razones por las cuales el cáncer de mama triple negativo es tan complejo respecto a su desarrollo, así como su tratamiento es gracias a la heterogeneidad, es decir a la diversidad fenotípica que presentan las células respecto a un tumor primario, así como en sus células metastásicas⁵.

Debido a la heterogeneidad del ambiente tumoral se han propuesto incluso una clasificación de al menos 4 subtipos de cáncer de mama triple negativo, con base a la expresión de diferentes perfiles moleculares que difieren en su pronóstico, los cuales son el tipo receptor de andrógenos luminal (AR; LAR; por sus siglas en inglés), el mesenquimatoso (MES), inmunosuprimido de tipo basal (BLIS) y el inmuno activado de tipo basal (BLIAL). A pesar de sus diferencias respecto al perfil molecular y pronóstico todos los subtipos poseen atributos para desarrollar metástasis⁶.

Los tratamientos para combatir el cáncer de mama triple negativo son principalmente la cirugía y la radioterapia, pudiendo cambiar a inmunoterapia y al uso de distintos fármacos dependiendo del progreso de los tratamientos iniciales. Se ha reportado que el uso de tratamientos especializados para cada paciente podría mostrar resultados más favorables, tales como terapias con anticuerpos monoclonales, tratamientos con base en la microbiota intestinal, así como tratamientos basados en modulaciones epigenéticas⁷.

Incidencia de cáncer de mama en mujeres de 20 años y más por entidad federativa 2019

(Por cada 100 mil mujeres de 20 años y más)



Nota: Se utilizó la Clasificación Estadística Internacional de Enfermedades y Problemas Relacionados con la Salud (CIE-10), código C50. Excluye casos con edad no especificada.

Fuentes: SALUD, Dirección General de Epidemiología (DGE). (2021). Anuarios de Morbilidad 1984-2019. CONAPO (2018). Proyecciones de la Población de México y de las Entidades Federativas, 2016-2050.

Figura 2. Incidencia de cáncer de mama en México por estado y edad por cada 100 mil mujeres⁸.

Metástasis

La metástasis representa la más grave complicación por cáncer de mama, ya que se estima que la tasa de supervivencia a cinco años después del diagnóstico de metástasis es tan solo del 28%⁹.

Es un proceso complejo que permite que las células tumorales puedan colonizar sitios distantes del cuerpo, es una grave complicación y signo de un muy mal pronóstico, a pesar de que la metástasis como proceso es altamente ineficiente, ya que se estima que únicamente el 0.01% de las células tumorales circulantes tienen éxito al desarrollarse⁹ en personas diagnosticadas la tasa de mortalidad puede llegar hasta un 90%¹⁰.

La metástasis en su desarrollo depende de diversos procesos fisiológicos tales como la motilidad de las células tumorales hacia los tejidos adyacentes, además del proceso de intravasación, en el cual una célula tumoral penetra la pared de un vaso sanguíneo o linfático, así como su supervivencia dentro de él y la posterior extravasación, para poder colonizar órganos que le permitan invadir más regiones del cuerpo, además de estos procesos, la célula tumoral es capaz de adquirir capacidades que le permiten evadir respuestas inmunes¹¹.

Las gran mayoría de células que conforman a nuestro organismo están organizadas y adheridas en tejidos bien definidos mediante interacciones entre célula-célula y célula-matriz extracelular, manteniendo un orden físico además de una red de comunicación entre las propias células, estas adhesiones celulares funcionan gracias a un vasto grupo de moléculas conocidas como moléculas de adhesión celular (MAC)¹², las cuales también funcionan como receptores en la membrana celular, estas moléculas pueden clasificarse en 4 grandes familias, selectinas, integrinas cadherinas e inmunoglobulinas. Este grupo de moléculas son protagonistas en procesos como la migración celular, la cual está involucrada en diversos procesos fisiológicos como el desarrollo embrionario, respuestas inmunes, cicatrización de tejidos, así como regeneración de órganos, sin embargo, la migración celular también marca el inicio y progresión del cáncer ya que las células cancerosas cambian su fenotipo adquiriendo capacidad de motilidad, superando la matriz extracelular para posteriormente llegar a sitios distantes a través de medios vasculares o linfáticos y así invadir casi cualquier sitio en el organismo ¹³.

La migración celular tumoral está constituida por diferentes procesos, a partir de cambios y mutaciones en su genoma las células cambian su morfología, también sufren de pérdida de polaridad epitelial que, conjugados con alteraciones en la expresión de las MAC, hacen que las células pierdan su capacidad de unión entre células y la matriz extracelular. Todo esto forma parte del proceso denominado como la transición-epitelio-mesénquima, el cual es un proceso ordinario en la remodelación de tejidos durante el desarrollo embrionario, mientras que en procesos patológicos como el cáncer provoca cambios en el fenotipo celular, siendo un mecanismo crítico para la adquisición de un fenotipo maligno en las células tumorales, ya que además de perder la adherencia entre células y matriz, también ocurren procesos como la expresión de enzimas que degradan la matriz extracelular, así como reorganización y cambios en la expresión de proteínas del citoesqueleto permitiendo que continúe el proceso de migración e invasión¹⁴.

Las células tumorales también tienen la capacidad de invadir zonas adyacentes de manera colectiva, este proceso suele ser común en cánceres epiteliales como cáncer de mama, de colon y de piel, suelen existir diferentes tipos de invasión colectiva, ya que durante el proceso pueden generar monocapas, como un tipo de invasión bidimensional, así como múltiples proyecciones que puedan llevar a cabo una invasión más organizada y tridimensional e incluso puede ocurrir un tipo de invasión en la cual un grupo relativamente grande de células tumorales se desprendan de la masa tumoral inicial, expresando además el fenotipo de invasión. Sin embargo, a pesar de que existen diferentes tipos de invasión colectiva, comparten en común tres características principales, las cuales son en primer lugar que, las uniones célula-célula durante la invasión se mantienen intactas, en segundo lugar, la fuerza de motilidad, ordenamiento y polaridad dependen del citoesqueleto y en tercer lugar, para que se dé la invasión colectiva se tiene que modificar la matriz extracelular¹⁴.

A pesar de que las células poseen cambios en su fenotipo que les permiten la motilidad y posteriormente la migración, el movimiento respecto a la distancia recorrida puede ser limitado. Sin embargo, existen medios que pueden aprovechar las células tumorales que les

permiten recorrer grandes distancias en el cuerpo, a pesar de que los vasos sanguíneos eran considerados la vía principal de las células tumorales, al penetrarlos mediante la ruptura del endotelio, existe cada vez más evidencia acerca de que los vasos linfáticos también tienen una participación importante como medio de transporte de las células tumorales, ya que a diferencia del tejido vascular, los vasos linfáticos carecen de una membrana basal así como de tejido muscular liso, por lo que la permeabilidad del tejido linfático se ve comprometido, además es posible que para las células tumorales exista una especie de quimiotaxis mediante la secreción de quimiocinas aunque actualmente se encuentra en debate. Con esto las células tumorales dispondrían de una “carretera” por la cual desplazarse a sitios más lejanos a la ubicación del tumor. No obstante, las células aún tienen que sufrir cambios durante el transporte en los tejidos vasculares ya que tanto las células del sistema inmune, así como las limitaciones físicas, representan un riesgo para la supervivencia de las células tumorales, por lo que cambios en su fenotipo y en la expresión de distintos receptores permitirán a la célula evadir la respuesta inmune. También es posible que factores como la disminución de plaquetas pudieran estar relacionados con la supervivencia de células tumorales dentro del tejido vascular¹⁵.

Uno de los pasos fundamentales para el desarrollo tumoral y metastásico es el proceso de angiogénesis, el cual consiste en la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de las células del endotelio, esto permite que el tumor tenga a su disponibilidad oxígeno, así como nutrientes para su desarrollo tanto como para el crecimiento tumoral que puede incrementar significativamente su tamaño (Figura 3), en algunos casos llegando a desplazar órganos debido al amplio espacio que ocupan en el cuerpo. El proceso de angiogénesis resulta determinante ya que un tumor sin esta capacidad únicamente podría alcanzar un tamaño de 3 mm³, ya que las células en este estado únicamente pueden alimentarse por difusión entre ellas¹⁶.

Para que un tumor pueda poseer un fenotipo angiogénico deben de ocurrir diversos procesos celulares, tales como la alza en la expresión de diversos oncogenes, algunos de los cuales pueden ser activados por estímulos del ambiente derivados del estrés celular, como condiciones de hipoxia, un bajo nivel de nutrientes y pH, así como la producción en general de factores angiogénicos por las propias células tumorales, los cuales son captados por las células endoteliales que, al encontrarse en etapas de desarrollo, tienen la capacidad de secretar proteasas con la propiedad de degradar la matriz extracelular, de esta manera ahora los factores angiogénicos secretados por las células cancerígenas pueden interactuar mejor y en una especie de quimiotaxis las células endoteliales crecen hacia la fuente del estímulo, sin un orden aparente ya que los vasos sanguíneos generados son bastante irregulares en tamaño y organización. Más tarde con los vasos sanguíneos estableciéndose, se renueva la matriz extracelular además de los complejos de unión intracelular¹⁶.

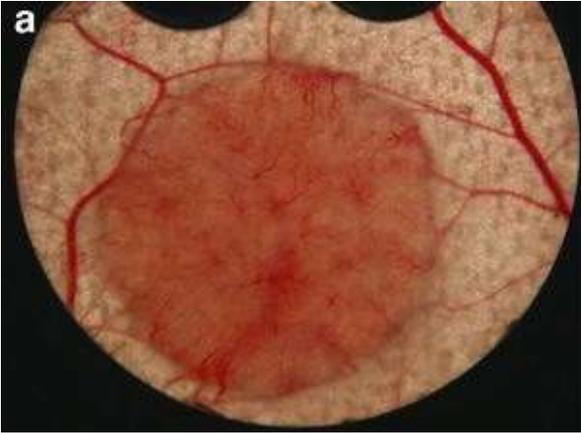


Figura 3. Tumor de hámster vascularizado¹⁶.

Regulación epigenética

En 1939 apareció la primera definición de epigenética gracias al científico británico Conrad Waddington quien la describió como “el estudio de todos los eventos que llevan al desenvolvimiento del programa genético del desarrollo,” siendo un proceso que media entre genotipo y fenotipo. Esta definición por Waddington trataba de cuestionar la idea del determinismo genético, la cual excluía a los cambios ambientales en la expresión de los genes que determinan nuestro fenotipo. Actualmente la perspectiva de la epigenética ha evolucionado gracias al desarrollo tecnológico, y al conocimiento sobre las funciones del ambiente extracelular, extranuclear y ambiental sobre la expresión génica, siendo procesos dinámicos e incluso reversibles. Actualmente una definición aceptada en la epigenética es “el estudio de los cambios en la función de los genes que son heredables por mitosis y/o meiosis, que no entrañan una modificación en la secuencia del DNA y que pueden ser reversibles”¹⁷.

Los diferentes mecanismos epigenéticos son capaces de afectar la regulación génica durante y después de la transcripción y la traducción por lo que al afectar estos procesos también influyen en diversos procesos fisiológicos, así como patológicos. Uno de los mecanismos epigenéticos más estudiados son las modificaciones en las histonas, y para entender su importancia hay que entender que la conformación de la cromatina es esencial para procesos de transcripción y traducción, estructuralmente, la cromatina se organiza en nucleosomas como la unidad básica fundamental, compuestos por una secuencia de 147 pares de bases de ADN además de un octámero de histonas con dos subunidades llamadas H2A, H2B, H3 y H4, estas proteínas pueden ser modificadas químicamente después de la traducción, por la adición de grupos metilo, acetilo y fosfato. Estas modificaciones covalentes pueden alterar el estado de la cromatina, así como la expresión génica, por lo que interfieren en diversos procesos celulares, y por lo tanto pueden participar en enfermedades cardiovasculares e incluso cáncer, ya que algunas, participando en diversos procesos celulares a través de las modificaciones demodificaciones de histonas pueden afectar la regulación de oncogenes, así como de genes supresores de tumores. Una modificación muy común en células tumorales es la desacetilación mediada por HDAC, que

además puede interactuar con otra modificación de histonas como la metilación en H3K27me3, la cual ha sido muy relacionada con el desarrollo de tumores en cáncer de mama, además estas modificaciones tienen la capacidad de heredarse afectando a varias generaciones¹⁸.

Además de las modificaciones en histonas los cambios epigenéticos involucran modificaciones sobre los ácidos nucleicos, como la metilación en el ADN, en donde secuencias de aproximadamente 1000 pb muy ricas en dinucleótidos CpG o también conocidas como "islas CpG", son reconocidas por enzimas ADN metiltransferasas que durante el proceso de replicación insertan grupos metilo en el carbono 5 de las citocinas¹⁹. Se ha determinado que la metilación del ADN y la metilación de histonas trabajan juntas para regular la transcripción ya que algunas metiltransferasas inhiben la expresión génica al interactuar con enzimas que regulan la modificación en histonas, mediante su unión con la proteína HDAC.

La metilación del ADN afecta la expresión de distintos por lo que también participa en el desarrollo de algunas enfermedades como trastornos nerviosos, así como distintos tipos de cáncer alterando la expresión de oncogenes, como es el caso de la sobreexpresión de UHRF1, proteína importante para la metilación del ADN ya que se une a H3 y recluta a la enzima metiltransferasa 1 para llevar a cabo la metilación durante la replicación, se ha observado que la sobreexpresión de esta proteína afecta la expresión de TXNIP, un gen supresor de tumores que se sobre expresa en células de cáncer de cuello uterino lo que promueve el desarrollo tumoral¹⁹.

Modificación m6A.

Sabemos que además de las modificaciones químicas en las histonas, como la acetilación, fosforilación y metilación, el ADN y ARN son susceptibles a sufrir modificaciones químicas capaces de producir cambios en funciones y procesos dentro y fuera de las células, sin la necesidad de modificar la secuencia de ADN, estas modificaciones químicas se han estudiado a lo largo de los años y actualmente se han identificado más de 100 distintas en ácidos nucleicos²⁰. La metiladenosina o m6A es una de las modificaciones más destacadas en el ARN por ser la más abundante en células eucariotas, además de que se estima ocurre en el 25% de las transcripciones a nivel de todo el genoma humano, incluidos los ARNm, ARNt, ARNs y ARNr entre otros, aunque se encuentra muy presente en ARNm, consiste en la adición de un átomo de carbono y tres átomos de hidrógeno, lo que conocemos como metilación y que se unen en la posición N6 de la adenosina, suele aparecer con una frecuencia de 1 por cada 2000 ribonucleótidos, comúnmente localizada en secuencias conservadas conocidas como RRACH (R-R es una purina adenina o guanina, A una adenina, C una citocina y H una adenina, citocina o un uracilo²¹. Pudiendo ser localizadas en las regiones no traducibles, cerca del codón de paro, así como dentro de exones largos²².

Esta modificación es regulada por tres tipos de proteínas según su función, metiltransferasas, desmetilasas y proteínas lectoras. Las proteínas encargadas de leer la modificación son principalmente las pertenecientes a la familia YTH, como YTHDF 1,2 y 3²¹.

Las proteínas que insertan esta modificación forman un complejo dimerico con METTL3 como la subunidad catalítica capaz de insertar la modificación m6A, debido a su capacidad de interactuar con el sustrato S-adenosilmetionina, (SAM) el cual actúa como el donante de los grupos metilo en la célula y está involucrado en distintos procesos celulares como donador de grupos metilo, además es un precursor del aminoácido metionina presente en gran variedad de alimentos que consumimos²³.

Además de METTL3 como subunidad catalítica se encuentra METTL14, que anteriormente se creía que poseía actividad catalítica, por evidencias en aislamiento de la proteína a partir de insectos, más adelante se concluyó que en organismos evolutivamente superiores habría perdido su capacidad catalítica. Otros estudios sugirieron que METTL14 actúa uniéndose a METTL3 siendo importante para poder adherirse al sustrato SAM, así como para poder reconocer al ARN e incluso activa a METTL3 mediante un efecto alostérico. A pesar de que la asociación METTL3 y METTL14 es una asociación estable en su estructura, así como en la participación mutua al insertar la modificación m6A, también deben asociarse con WTAP la cual funciona en conjunto para ayudar a la localización del ARN. Existen otras proteínas que actúan como cofactores como es el caso de RBM15 y VIRMA, cuya función reguladora interviene en la localización, así como la orientación del complejo metiltransferasa entre otras funciones, a pesar de que se ha hecho un gran avance en la función de las metiltransferasas, las bases moleculares de su funcionamiento aún son poco claras²³.

Al ser m6A una modificación reversible, además de las metiltransferasas capaces de incorporar el grupo metilo, también existen proteínas encargadas de borrar esta modificación, mejor conocidas como desmetilasas siendo FTO y ALKBH5 las desmetilasas presentes en los mamíferos. Ambas están involucradas en diversos procesos biológicos incluidos la reparación del ADN, esta familia de proteínas contiene un dominio de unión al hierro y a la alfa cetoglutarato, esenciales para su actividad catalítica, FTO (Fat Mass and Obesity-Associated) además de ser participe en la desmetilación de m6A también está altamente relacionado con un mayor riesgo de padecer obesidad, mediante su participación en la adipogénesis entre otras funciones descritas. FTO al igual que ALKBH5 “borra” la modificación mediante interferencia de iones de hierro además de que cataliza la hidrólisis de m6A, una vez que se ha eliminado, las proteínas lectoras son incapaces de unirse al ARN. Además de FTO y ALKBH5 se ha inferido que pueden existir más proteínas funcionando como cofactores en la hidrólisis de m6A²³.

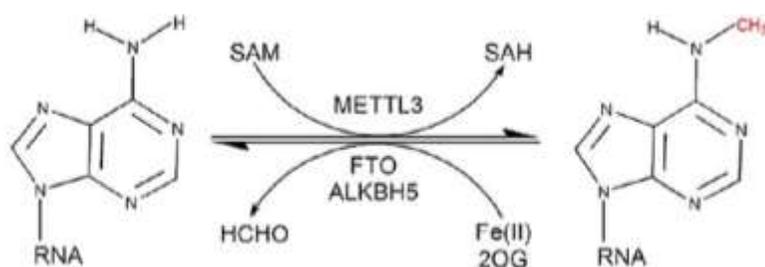


Figura 4. m6A es una modificación reversible²¹.

Respecto a las proteínas lectoras, éstas se han identificado y localizado en el citoplasma. YTHDF1, YTHDF2, YTHDF3 son las que han sido bien identificadas todas ellas con el dominio YTH el cual es un dominio de unión a ARN muy conservado evolutivamente, . A pesar de las múltiples proteínas lectoras con dominio YTDH hasta el momento se desconoce si tienen una función en especial cada una de ellas, aunque es probable que por su similitud estructural puedan tener funciones en común²⁴.

La modificación m6A está presente en diferentes procesos fisiológicos, así como patológicos²⁴. La modificación m6A conduce a la degradación del ARNm, reduciendo su estabilidad, además de que facilita la exportación del ARNm del núcleo al citoplasma, también en el caso de estar ausente las proteínas METTL3 o METTL4 hay un aumento de expresión del factor de pluripotencia Nanog, provocando que altere el proceso de diferenciación de células embrionarias. En el caso de ALKBH5 cuando se subexpresa en la célula, el nivel de ARNm citoplasmático aumenta significativamente, debido a que es exportado con mayor frecuencia, además se reduce la estabilidad del ARN provocando que los espermatozoides entren en apoptosis²².

La modificación de m6A tiene una importante implicación en el desarrollo de varios tipos de cáncer, ya que se sabe que las metiltransferasas, y desmetilasas, así como sus proteínas lectoras, se sobre expresan en tejidos cancerosos, en al menos 18 tipos de cáncer²².

Como ejemplo, se ha demostrado que las proteínas escritoras de m6A, METTL3 y METTL14 tienen potencial oncogénico en el glioblastoma, ya que influyen en la baja expresión de genes supresores de tumores como ADAM19, EPHA3 y KLF4, lo que conduce al aumento del crecimiento y el proceso de tumorigénesis de células madre de glioblastoma. En el caso de las proteínas lectoras YTDH se sabe que YTHDF1 y YTHDF3 promueven la traducción de los ARNm marcados, mientras que YTHDF1 se ha vinculado con la degradación del ARN al reclutar al complejo CCR4-NOT, el cual además de participar en ubiquitinación, es una desadenilasa que cataliza la eliminación de la cola poli-A en el ARNm, además de tener un importante papel en la gametogénesis²².

Células HCC1937

Es una línea celular humana de linfoblastos, que fueron aislados en 1995 de un carcinoma ductal primario, derivado de una paciente caucásica de 23 años, con cáncer de mama en estadio IIB, la línea celular tardó once meses y medio en establecerse²⁵.

Esta línea celular es negativa para la presencia de los receptores de estrógeno progesterona y para el factor de crecimiento epitelial (HER 2), es una línea celular ampliamente utilizada en estudios relacionados con el cáncer de mama.

Kalanchoe pinnata

Conocida como hoja de aire o siempreviva, es una planta perenne suculenta originaria de la isla de Madagascar, el nombre del género *Kalanchoe* proviene del chino *Kalan Chauhuy* o (卡兰乔体) que puede significar “la que cae y crece”, siendo una referencia de su propagación asexual a partir de sus propágulos, mientras que el nombre de la especie *pinnata* proviene del latín antiguo *pinnatus*, que significa emplumado, probablemente haciendo referencia a su llamativa coloración floral²⁶.



Figura 5. *K. pinnata* en vida silvestre.

Esta planta puede llegar a medir dos metros de altura y está distribuida ampliamente en el mundo, hasta los 2700 metros sobre el nivel del mar siendo una planta de fácil propagación y alta capacidad de supervivencia, por lo cual es muy comúnmente usada como planta de ornato en muchos hogares mexicanos²⁷.

Taxonomía

Tabla 1. Orden taxonómico de *K. pinnata*²⁸.

Reino	Plantae
Filo	Tracheophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Saxifragales
Familia	Crassulaceae
Genero	Kalanchoe Adans
Especie	<i>Kalanchoe pinnata</i>

Morfología

Posee un tallo carnoso, largo, cilíndrico y poco ramificado, sus hojas suculentas son opuestas entre sí, además de ser hojas simples y presentar bordes aserrados de coloración rojiza, presenta bulbillos marginales que al caer al suelo generaran una nueva planta sus flores tienen pedicelos de aproximadamente un centímetro. Se caracteriza por un cáliz tubular verde con llamativos tonos rojizos, una corola tubular de hasta cinco centímetros de largo, generalmente cubierta por el cáliz, presenta 8 estambres que salen de la base del tubo de la corola. Presenta raíces difusas y poco profundas²⁸.



Figura 6. Propágulos de *K. pinnata*²⁷.

Distribución y origen

Originaria de la isla de Madagascar esta planta ha sido capaz de propagarse en cinco continentes, principalmente en el hemisferio sur y en regiones templadas, en México y otros 87 países está catalogada como una especie exótica invasora ya que es capaz de reproducirse y establecerse en diferentes hábitats y ecosistemas naturales representando una amenaza para la diversidad nativa, así como su economía e incluso salud pública³⁰.



Figura 7. Distribución Global de *K. pinnata*, cada punto amarillo corresponde a poblaciones de la especie registradas.

En México su distribución está registrada desde Querétaro e Hidalgo hacia todo el sureste mexicano, puede habitar el bosque mesófilo y la selva baja caducifolia. Suele ser muy reconocida en estados como Veracruz y Puebla, en los cuales además de encontrarse integrada en ecosistemas es bastante común a orilla de caminos, sitios rocosos, entre tierras de labor, así como en zonas perturbadas, donde es comúnmente una planta de sucesión secundaria, adaptándose muy bien tanto a zonas húmedas como semiáridas³¹.

Usos en medicina tradicional.

Los primeros registros escritos sobre aplicaciones médicas con plantas datan del año 2600 A.C., siendo la civilización mesopotámica muy importante en la práctica con plantas medicinales pues comprendían el uso de hasta mil plantas con usos distintos, información que paso a través de los años y que fue explorada y comprendida por otras civilizaciones antiguas. Actualmente muchos de los usos medicinales de plantas se obtienen mediante conocimiento empírico, que pasa de generación en generación, la planta *K. pinnata*, no es la excepción ya que al ser una planta de amplia distribución sus usos han sido explorados de acuerdo con los usos tradicionales reportados. Los usos medicinales de *K. pinnata* predominan en las zonas templadas entre ambos trópicos, principalmente como analgésico general y auxiliar contra lesiones en la piel. Principalmente el uso se le atribuye a la hoja de la planta³².

Dentro de los usos medicinales destacan el tratamiento de lesiones en la piel. Particularmente en los municipios mexicanos de Cosamaloapan, Minatitlán, Tierra Blanca, Tlacotalpan, donde el clima húmedo y caluroso es bastante común, los habitantes suelen padecer infecciones cutáneas por la picadura de insectos. Por lo que suelen utilizar el jugo de las hojas para tratar infecciones de la piel³³.

Uso que coincide con el que le dan en Sudamérica particularmente algunas comunidades cercanas a la selva Amazonas en donde una comunidad cercana al río putumayo, conocidos como los Siona, quienes consideran a *K. pinnata* como la medicina de los forúnculos, esto porque es muy común su uso, para cualquier tipo de lesión en la piel, como heridas por insectos y úlceras³⁴.

Similar a lo que ocurre en el sur del país donde en los estados de Chiapas, Veracruz y Yucatán aplican las hojas maceradas en conjunto con pétalos de la planta rosa de castilla (*Rosa Galicia L. var*) como un auxiliar contra quemaduras dérmicas³².

Respecto a enfermedades gastrointestinales en los estados mexicanos de Puebla y Veracruz es común su uso en comunidades indígenas como un antipirético natural, similar al uso que se le da en algunas provincias de Perú donde al dejar remojar la hoja de la planta durante toda la noche, beberán el agua para calmar acidez estomacal. Además de que se tiene

registrado su uso como analgésico natural, algunas tribus de Perú mezclan las hojas con destilado de caña de azúcar para calmar el dolor de cabeza³⁴.

Perfil fotoquímico de *K. pinnata*

Entre los tipos de metabolitos secundarios que se han identificado en *K. pinnata* se encuentran principalmente 3 familias, los flavonoides, esteroides y ácidos orgánicos, compuestos activos que individualmente han mostrado tener actividad antibacterial, antitumoral, así como actividad repelente contra insectos³⁵.

Entre los compuestos esteroides se encuentra la familia de bufadienólidos, se encuentran tanto en plantas como animales, estos últimos secretan bufadienólidos de sus glándulas, como defensa contra depredadores por su naturaleza tóxica, como los sapos de la familia *Rhinella*, así como en una especie de artrópodo *Photinus ignitus* y el reptil *Rhabdophis tigrinus*

Respecto a los compuestos flavonoides están distribuidos ampliamente en el reino vegetal principalmente en las plantas vasculares, en las cuales cumplen distintas funciones como protección contra los rayos UV y contra infecciones de hongos o bacterias.

Estructuralmente se caracterizan por poseer dos anillos aromáticos de benceno, los cuales están unidos por un puente de tres átomos de carbono, de igual manera es posible la adición de un tercer anillo, nombrándose así anillos A, B y C. generalmente pueden encontrarse en tejidos vegetales en conjunto con azúcares en forma de glucósidos³⁵.

ANTECEDENTES

Género *Kalanchoe* y el cáncer

El género *Kalanchoe* comprende al menos 150 especies, muchas de ellas se encuentran ampliamente distribuidas en todo el mundo, razón por la cual sus usos tradicionales y medicinales ha sido ampliamente estudiados, los cuales han llevado a su experimentación médica contra varias enfermedades como el cáncer, en las que se destacan especies como la *Kalanchoe daigremontiana*, a partir de la obtención del extracto acuoso de la hoja.

En 2015 Yi-Jen Hsieh et. al., demostraron en estudios *in vitro* que el extracto acuoso a partir de hoja de *Kalanchoe tubiflora* presentó actividad anticancerígena al interrumpir el ciclo celular además de aumentar la expresión de proteínas relacionadas con la senescencia celular en la línea de cáncer de pulmón A549, de igual manera realizó experimentos *in vivo* con ratones desnudos en los cuales realizaron xenoinjertos con la línea celular A549, mostrando una inhibición en el crecimiento tumoral por el extracto acuoso de *K. tubiflora*³⁵.

Respecto a la especie *Kalanchoe tomentosa* gracias a un estudio del 2016, se demostró que a partir del extracto etanólico de las hojas frescas de *K. tomentosa*, en el cual mediante pruebas de cromatografía se identificaron metabolitos secundarios, principalmente flavonoides como Kaempferol así como glucósidos Kaempferol 3-O- α -ramnosida, presentaron

actividad citotóxica en la línea celular de leucemia p-388, siendo considerados por el autor como altamente antitumorales³⁷.

En el año 2018 se estudió el efecto del extracto de acetato de etilo de *Kalanchoe flamma*, primero evaluando su actividad citotóxica mediante un ensayo MTT, posteriormente su efecto en el mecanismo de muerte celular sobre tres líneas celulares de cáncer de próstata, además se demostró que el extracto de acetato de etilo de *K. flamma* induce apoptosis por la vía intrínseca produciendo translocación de la fosfatidilserina en la membrana celular, así como una producción excesiva de especies reactivas de oxígeno (ROS), así como activación de caspasa -3 y -9 y liberación de citocromo C a nivel mitocondrial³⁷.

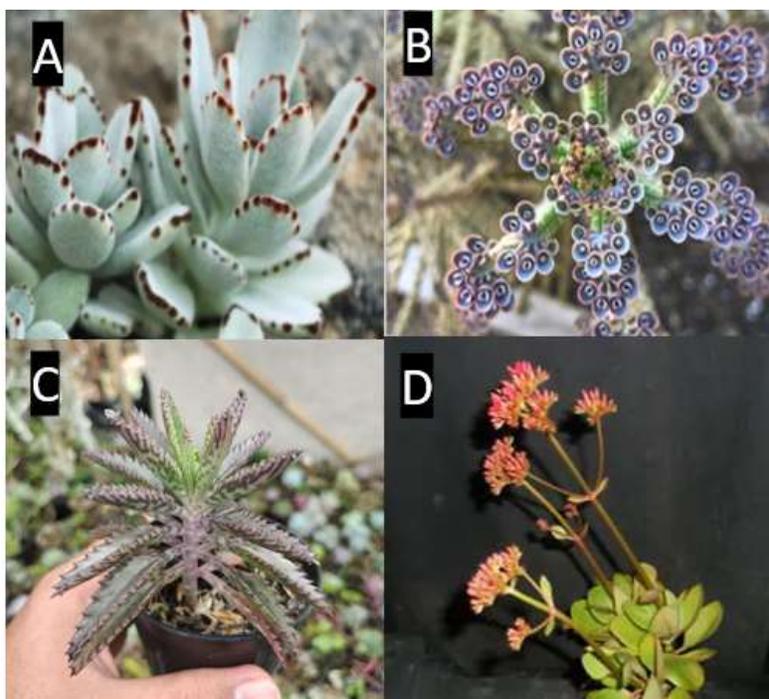


Figura 8. Especies pertenecientes al género *Kalanchoe*, se muestra en A *K. tomentosa*, en B *K. tubiflora*, en C *K. daigremontiana* y en D *K. flamma*⁶⁰.

***K. pinnata* y el cáncer.**

Los extractos vegetales son un importante recurso en la investigación biomédica pues comprenden una mezcla muy compleja de metabolitos secundarios que son responsables de un espectro de efectos farmacológicos, así como de propiedades biológicas³⁸.

K. pinnata al ser una planta con bastantes usos medicinales tradicionales no ha sido ignorada por la comunidad científica, debido a los posibles usos farmacológicos de sus extractos. Ya que se ha demostrado que *K. pinnata* tiene efectos antiinflamatorios, antibacterianos, analgésicos e incluso antitumorales³⁹.

En el año 2012 un estudio demostró que el extracto de hoja de *K. pinnata* tuvo efectos anticancerígenos en la línea celular HeLa proveniente de cáncer cérvico uterino, al inhibir la

expresión de los oncogenes C-Fos y C-Jun, además de inducir la apoptosis promoviendo la sobre expresión de la proteína apoptótica Bax³⁵.

Algunos metabolitos secundarios de *K. pinnata* y su actividad anticancerígena.

Acido gálico

Los múltiples metabolitos secundarios de *K. pinnata* también han sido reportados por su actividad anticancerígena como es el caso del ácido gálico, el cual es un ácido orgánico también conocido como ácido 3,4,5-trihidroxibenzoico, presenta nula toxicidad en humanos, así como en ratones, siendo frecuentemente encontrado en hojas de té y corteza de roble, incluido *K. pinnata*. Mirvish et al. estudiaron el efecto del ácido gálico en la dieta de ratones con adenomas de pulmón, el cual mostró una considerable disminución en su tamaño. Inoue et. al., estudiaron el efecto del ácido gálico en la línea celular de leucemia HL-60RG, sus resultados mostraron la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), además de la activación de la proteína calmodulina, siendo ROS y la calmodulina constituyente del proceso de apoptosis, así como su participación en la regulación de la expresión de proteínas cinasas, involucradas en los procesos de estrés oxidativo. Además de la línea celular HL-60RG, el efecto anticancerígeno del ácido gálico también ha sido investigado en líneas celulares de cáncer de mama, próstata, estomago, hígado, colon, mama, esófago y endometrial⁴⁰.

Acido cafeico

Es un compuesto fenólico natural, muy descrito en las plantas de café, está presente en casi todas las plantas, ya que el ácido cafeico participa activamente en la biosíntesis de la lignina, una de las principales moléculas estructurales de la pared celular de las plantas. En el año 2015 se estudiaron a 1090 pacientes con cáncer de mama primario invasivo, se evaluó la influencia de componentes como el ácido cafeico en un consumo moderado y bajo de tazas de café, el consumo moderado de café se relacionó con tumores primarios más pequeños en comparación con el grupo de bajo consumo, además en modelos *in vitro* se evaluaron los efectos celulares del ácido cafeico en las líneas celulares de cáncer de mama MDA-MB-231 y MCF-7, mostrando un efecto de anti proliferación en ambas líneas celulares, además de una reducción de receptores a factores de crecimiento como ER y IGFIR⁴⁰.

Bufadienólidos

Son un grupo de compuestos orgánicos pertenecientes a la familia de los esteroides, la primera vez que fueron descritos fue en la especie *Scilla marítima*, una planta altamente venenosa que habita cerca al mar mediterráneo, sin embargo a pesar de haber sido descubierta en una planta el nombre proviene del prefijo “bufo” haciendo referencia al género de anfibios anuros que comprende al menos 17 especies, esto debido a que algunos sapos pertenecientes a este género, poseen este compuesto orgánico en el veneno que secretan a través de la piel, como defensa contra depredadores, los bufadienólidos, están presentes además en algunas especies del género *Kalanchoe* como *K. daigremontiana*, *K. tubiflora*, así como en *K. pinnata*. Debido a su naturaleza química como esteroides, estos

tienen la capacidad de atravesar la membrana celular fácilmente, así como de distribuirse en tejidos corporales, siendo una importante característica para sus efectos biológicos⁴¹.

Se ha descrito que los bufadienólidos poseen efectos antiinflamatorios, antivirales, así como actividad anticancerígena, también se demostró que al menos 8 tipos de bufadienólidos aislados de *Kalanchoe gracilis* poseen actividad anticancerígena en estudios *in vitro* en varias líneas celulares, como de pulmón, ovario y próstata. Además, a partir del extracto etanólico de *Kalanchoe tubiflora* se demostró que poseen efectos citotóxicos contra al menos 4 líneas celulares tumorales, A549, Cal-27, A2058 y HL-60⁴¹.

Participación en procesos epigenéticos.

Las modificaciones epigenéticas son también el resultado de diversos factores ambientales, modificaciones que sabemos pueden alterar procesos fisiológicos e incluso conducir a distintos fenotipos de enfermedades⁴².

Se han realizado estudios en los que se exponen líneas celulares a metabolitos secundarios como el ácido gálico, en esos estudios se ha observado que tiene un efecto sobre procesos epigenéticos. En el 2017 Weng et. al., estudiaron el efecto del extracto de un té tradicional llamado “oolong” tratado con el hongo *Aspergillus sojae* para aumentar significativamente la concentración de ácido gálico. Los investigadores expusieron las líneas celulares H1299, A549 de cáncer de pulmón y DOK proveniente de queratinocitos orales al extracto, al concluir el tratamiento de 240 horas, midieron la modificación de la ADN 5-metilcitocina (5mC) y encontraron diferencias significativas en las tres líneas celulares después del tratamiento respecto al control, además de medir la presencia de 5mC también midieron la presencia citoplasmática de proteínas metiltransferasas como la DNMT3B que aumentó significativamente a largo plazo, de igual manera se observó una disminución significativa de DNMT1 en el núcleo y el citoplasma, los autores concluyeron que el ácido gálico tiene un notable efecto en la modificación 5mC y en la presencia de ambas metiltransferasas⁴³.

En el cáncer de mama la modificación sobre el ARN m6A, es protagonista, ya que en el caso de METTL3 este gen se encuentra expresado de manera significativa en tejidos mamarios a diferencia de otros tejidos. Sin embargo, en estudios recientes se comprobó que el silenciamiento de METTL3, se inducía a bajos niveles de metilación de m6A, influyendo en reducir la proliferación celular, además de acelerar la apoptosis⁴⁴.

En estudios *in vitro* se ha demostrado que FTO, uno de los borradores de la m6A, en la línea celular MCF-7 se encuentra sobre- expresado, se le ha relacionado con promover la invasión y la migración celular. Mientras que en la línea celular MDA-MB-231, se ha reportado que ejerce una función promoviendo el crecimiento tumoral, así como la metástasis, ya que inhibe la expresión del gen BNIP3, gen relacionado con el proceso de apoptosis⁴⁴.

JUSTIFICACIÓN

El cáncer de mama triple negativo es una de las enfermedades con mayor mortalidad en mujeres en el mundo, siendo el proceso de metástasis la mayor complicación en el tratamiento y pronóstico de las pacientes. Existen evidencias científicas sobre la participación de procesos epigenéticos en el desarrollo de diversos tipos de cáncer, incluido el cáncer de mama triple negativo, estos procesos epigenéticos, tales como la modificación m6A, presente en el ARN, puede ser un blanco con potencial terapéutico.

Los metabolitos secundarios aislados a partir de extractos vegetales han sido objeto de estudio por sus propiedades, antiinflamatorias, antibacterianas, así como en el tratamiento de diversas enfermedades como el cáncer, algunos de estos metabolitos, están presentes en *K. pinnata*, planta que puede tener un gran potencial como un adyuvante contra el cáncer de mama, además de su amplia distribución, fácil acceso y bajo costo, por ello resulta relevante investigar la actividad del extracto de *K. pinnata in vitro* en la línea celular de cáncer de mama HCC1937, evaluando su efecto en la migración celular así como en la expresión de genes involucrados en procesos epigenéticos como METTL3 y FTO, involucrados en la adición y eliminación de la modificación del ARN m6A.

PLATEAMIENTO DEL PROBLEMA

El cáncer de mama es una de las principales causas de muerte en mujeres países desarrollados, su tratamiento sigue siendo un desafío para la investigación médica. A pesar de las diferentes opciones disponibles como la quimioterapia y la radioterapia, estos tratamientos a menudo tienen efectos secundarios negativos para la paciente y no siempre son efectivos, además del alto costo que representa para los pacientes e instituciones médicas, por lo tanto, es necesario explorar nuevas alternativas terapéuticas para mejorar los pronósticos y evadir los efectos secundarios. Los extractos de vegetales han emergido como una opción atractiva debido a sus propiedades antiinflamatorias, antioxidantes y anticancerígenas, de igual manera la especie *K. pinnata* ha sido reportada con propiedades medicinales tanto en medicina tradicional, así como por la comunidad científica. Sin embargo, aún se conoce poco sobre su efecto en el tratamiento contra el cáncer de mama en lo que se refiere a la regulación de los procesos como la expresión génica y migración celular.

HIPÓTESIS

El extracto acuoso de *K. pinnata* inhibirá la migración celular en la línea tumoral de mama HCC1937, además de que producirá cambios en la expresión de los componentes del metiloma METTL3 y FTO.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto del extracto acuoso de *K. pinnata* sobre la expresión de la desmetilasa FTO y la metiltransferasa METTL3 así como en la migración de la línea tumoral de mama HCC1937.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar el CC₅₀ del extracto acuoso de *K. pinnata* en la línea celular HCC1937
- Evaluar la capacidad migratoria de las células HCC1937 bajo el tratamiento con extracto acuoso de *K. pinnata*
- Determinar si el extracto acuoso de *K. pinnata* afecta la expresión de los genes FTO y METTL3

MATERIALES Y METODOS

Colecta y elaboración del extracto acuoso

Colecta de *K. pinnata*

Se buscó literatura acerca de poblaciones registradas de las especies *K. pinnata* en México, en la página del herbario de la ciudad de Nueva York, en donde se identificaron registros de poblaciones de la planta en el estado de Veracruz.



Figura 9. Registros de *K. pinnata* en México.

Una vez localizada una referencia geográfica de poblaciones de *K. pinnata* se realizó un sondeo local para obtener información actualizada de la presencia de poblaciones de *K. pinnata*, corroborado por productores de café de la región, por la presencia de la planta entre sus cultivos, así como en caminos rurales y a orillas de arroyos. Esto a 30 km de la ciudad de Xalapa Veracruz. Una vez en el lugar, se anotaron las siguientes coordenadas "19°18'56.5"N 96°57'28.3"W. y se realizó una comparación morfológica respecto a las colectas reportadas para asegurarnos que fuera el fenotipo correcto de la especie *K. pinnata*.

Una vez obtenidas las plantas se procedió a obtener las hojas, las cuales se procesaron para su secado y posterior preparación del extracto.

Cultivo y mantenimiento de la línea celular HCC1937

Las células fueron cultivadas y mantenidas en crecimiento en medio RPMI-1640 suplementado con suero bovino fetal (SFB) al 10%, además se agregó penicilina y estreptomycinina al 1% como antibiótico y antimicótico para prevenir una posible contaminación durante la manipulación del cultivo, el cual fue incubado a una temperatura de 37°C en un ambiente húmedo (95%) y 5% de CO₂. Una vez adheridas, las células se podrán apreciar formando una monocapa.

Determinación de la CC₅₀ y ensayo MTT

CC₅₀ es una medida cuantitativa que funciona para evaluar la toxicidad de un fármaco o compuesto. Se obtiene al disminuir la viabilidad celular en 50% a partir de la exposición de distintas concentraciones del compuesto.

Para llevar a cabo el ensayo de índice de concentración citotóxica del extracto acuoso de *K. Pinnata*, primeramente, fue pesado y alicuotado en tubos de 1.5 ml en una solución de PBS 1X estéril a una concentración de 10 mg/ml. Se consideró un control y cinco concentraciones diferentes partiendo de 15 en 15 hasta 105 µg/ml. Todas las concentraciones, así como el control se realizaron por triplicado

Se sembraron 10⁴ células en una microplaca de 96 pozos (Corning™®) en 200 µl de medio de cultivo suplementado al 5% de suero bovino fetal y 1% de penicilina/estreptomycinina. Las células se expusieron a las diferentes concentraciones durante 72 horas, el medio de cultivo fue renovado cada 24 horas en conjunto con el extracto a sus diferentes concentraciones.

Para determinar la viabilidad, proliferación y citotoxicidad celular se utilizó el reactivo comercial MTT, el cual se basa en que las células metabólicamente activas reducirán el reactivo por la acción de enzimas deshidrogenasas generando cristales de formazán de color purpura, el cual puede ser cuantificado a 570 nm en un lector de placas²⁵.

Una vez obtenidos los valores de absorbancia estos fueron graficados y se obtuvo el valor CC50 en 66 µg/ml.

Ensayo de cicatrización de herida y tratamiento con *K. pinnata*

El ensayo de cicatrización de herida es un método para evaluar la migración celular *in vitro*, el procedimiento implica que, en un cultivo celular en monocapa, se realice una “herida” o una línea en una superficie con células lo suficientemente confluentes para poder formar la herida. Se toman registros fotográficos en el momento en que se realiza la herida y en intervalos de tiempo para realizar una comparación y determinar la tasa de migración celular⁴⁵.

Las células se cuantifican antes de iniciar el experimento, en 1 ml de medio se toma una muestra de 20 µl y se procede a realizar un conteo celular ya que el número de células en una suspensión puede determinarse con ayuda de un microscopio óptico, colocando una muestra de células en una cámara de Neubauer, en la cual se conocen el área y la profundidad, así, el número de células que arroje el conteo puede relacionarse con el volumen total en el que se encuentran suspendidas⁴⁶.

Antes de cargar la cámara de Neubauer, se mezclaron los 20µl de la suspensión de células con 20µl de azul de tripano al .4% para poder diferenciar las células no viables ya que estas se verán azules al microscopio. Se realizó el conteo por duplicado, contando cada cuadrante de los 8 sin considerar células que se encontraran en los bordes izquierdos, para evitar confusión al identificar las células entre los límites de cada cuadrante, al terminar se realizó el siguiente cálculo para estimar el número total de células.

$$N = cc \div a \times Fd \times 10^4$$

Donde:

N= células totales en suspensión

cc = células contadas

a = cuadrantes

Fd = fator de dilución

Las células se sembraron en cajas de seis pozos, siguiendo las condiciones de cultivo previamente descritas, al alcanzar la confluencia del 80% se realiza una herida en la monocapa, marcando una línea con una punta estéril de 200 µl. Los restos celulares deben ser removidos y se toman fotografías con un microscopio invertido con cámara. Las células se incuban y posteriormente se toman fotografías en la misma zona cada 24 horas hasta las 72 horas. Los ensayos se realizaron por triplicado y se incluyó un control negativo sin

tratamiento. Las fotografías se analizaron con el software ImageJ, el cual analiza el porcentaje del área que ocupa la herida con respecto al área total.

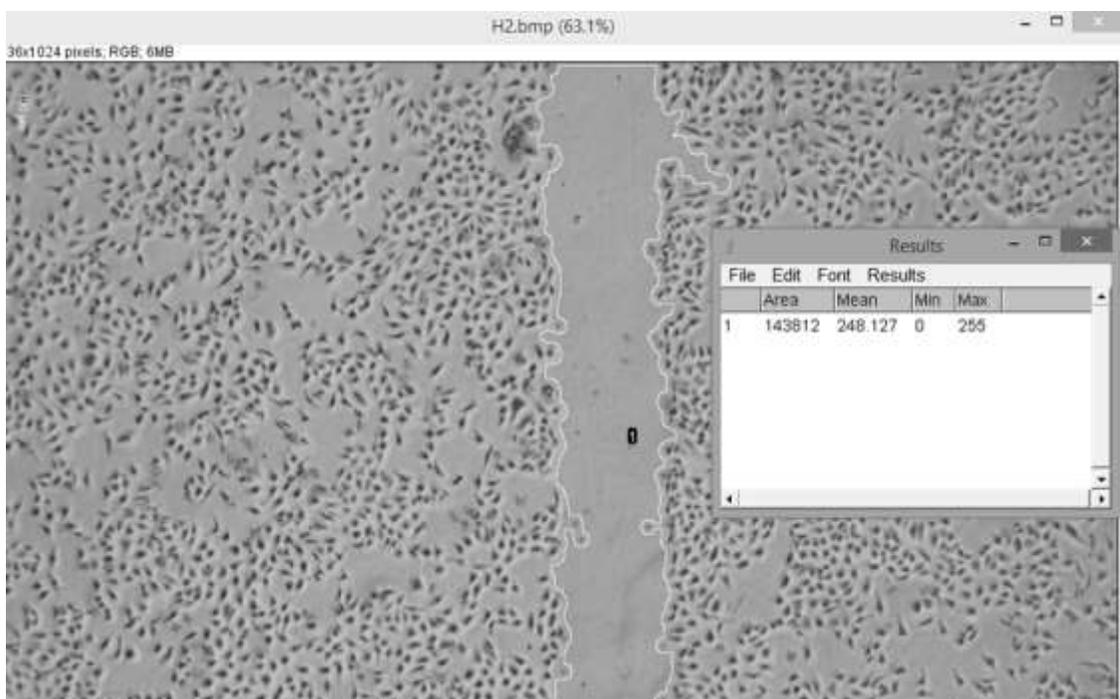


Figura 10. El software “ImagJ “delimita los bordes de la herida y mide su área.

Extracción y cuantificación de ARN

Las células fueron cosechadas, retirando el medio y realizando lavados con PBS, además agregando directamente el reactivo TRIzol a cada uno de los pozos y almacenando en tubos de 1.5ml.

A la mezcla de células con TRIzol se le agregaron 100 μ l de cloroformo, después de homogenizar fueron centrifugados a 12,000 G a 4°C durante 15 minutos, al terminar se extrajo el sobrenadante para colocarlo en nuevo tubo y agregar 500 μ l de isopropanol para precipitar el ARN, nuevamente se centrifugó a 12,000 g a 4°C, durante diez minutos, para obtener una pastilla. Se realizaron dos lavados con etanol al 75% y una vez más se centrifugo, ahora a 7500 g durante 5 minutos. Para finalizar, se extrajo todo el etanol y el ARN fue hidratado con agua libre de ARNsas y almacenado a -45°C. Repitiendo estos pasos para las tres réplicas.

El ARN debido a su estructura es una molécula frágil y muy susceptible a la degradación por enzimas como las ARNsas, por lo que es de vital importancia evaluar la calidad e integridad de ARN extraído, antes de cualquier análisis. Para corroborar esto visualmente se hizo electroforesis en geles de agarosa.

Los ácidos nucleicos poseen la propiedad de máxima absorbancia a los 260 nm, mientras que a los 280 nm es posible detectar proteínas, lo cual en una extracción fenólica como la realizada anteriormente sería un indicativo de contaminación, para descartar contaminación por fenol o proteínas que podría comprometer la eficiencia de la reacción de RT-PCR, se verificó la pureza utilizando un espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo®), el cual mide la relación entre los 260 y los 280 nm. Un indicativo de pureza para ARN es de ~ 2.0 en la relación 260/280 (Thermo®)

Además de obtener en los datos la relación 260/280, el espectrofotómetro también nos indica la cantidad de ARN en ng/ μ l.

RT-PCR y qPCR

Una vez que se comprobó la integridad y pureza del ARN extraído de los tratamientos, se utilizó el kit (Promega® E.U.A.) para llevar a cabo una reacción de transcripción inversa siguiendo las instrucciones del fabricante.

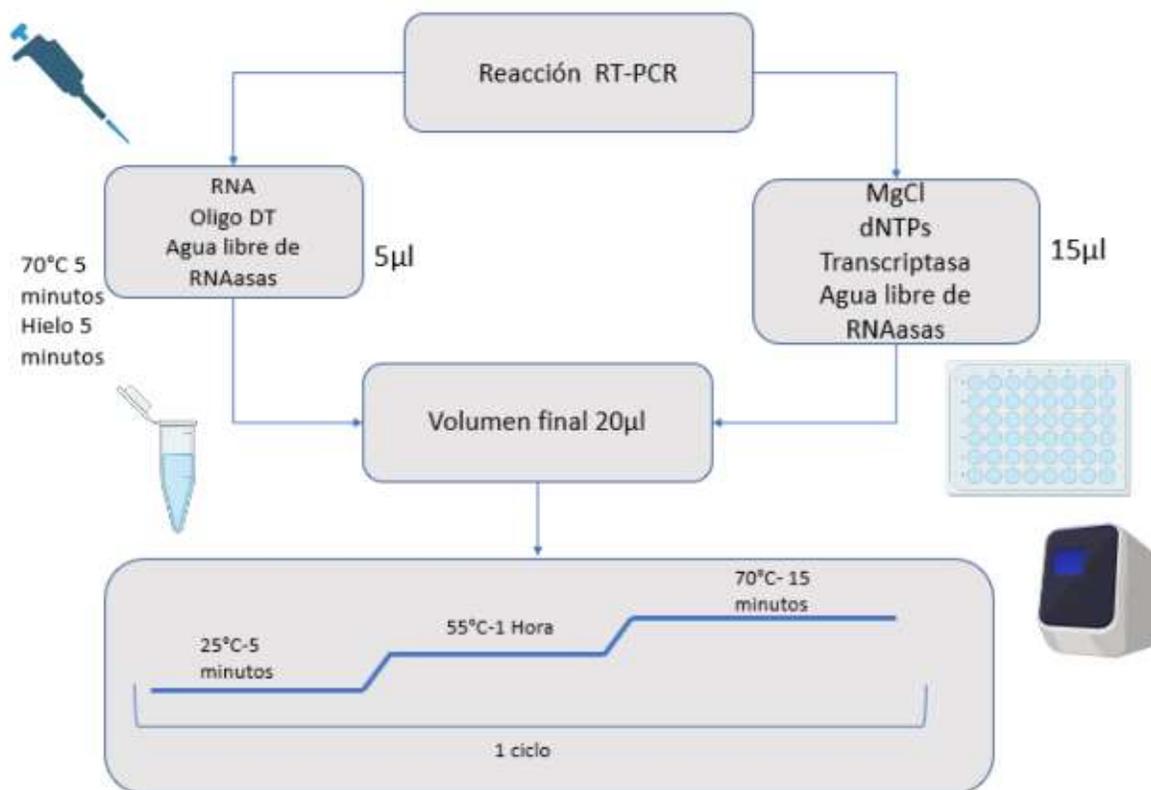


Figura 11. Proceso de la reacción RT-PCR.

Expresión génica:

Para evaluar la expresión de METTL3 y FTO respecto a los tratamientos primero se diseñaron los oligonucleótidos para realizar la amplificación de fragmentos de los genes de interés mediante qPCR. Gracias a la base de datos NCBI que nos permite acceder a un amplio catálogo de genes descritos podemos conocer la secuencia que codifica para FTO y METTL3, posteriormente se usó la opción “pick primers” para poder diseñar los oligonucleótidos y posteriormente solicitar su síntesis.



Figura 12. La base de datos NCBI nos permite acceder a genes reportados, así como diseñar oligonucleótidos para usar en reacciones de PCR.

RESULTADOS

Colecta de *K. pinnata*

Se colectaron aproximadamente 3.8 kg de hojas de la planta, las cuales fueron cortadas desde la yema axilar y se seleccionaron las mejores hojas, descartando hojas con aparentes daños por hongos e insectos, para terminar con un peso de 3.200 k, el mismo día de la colecta se lavaron con abundante agua para retirar tierra y material extraño y se secaron para evitar proliferación por hongos. Una vez descartada la humedad del lavado, las hojas se extendieron y se secaron con ayuda de una plancha calefactora (Thermo®) sobre un vaso de precipitado de 1000 ml, a una temperatura de 80°C.

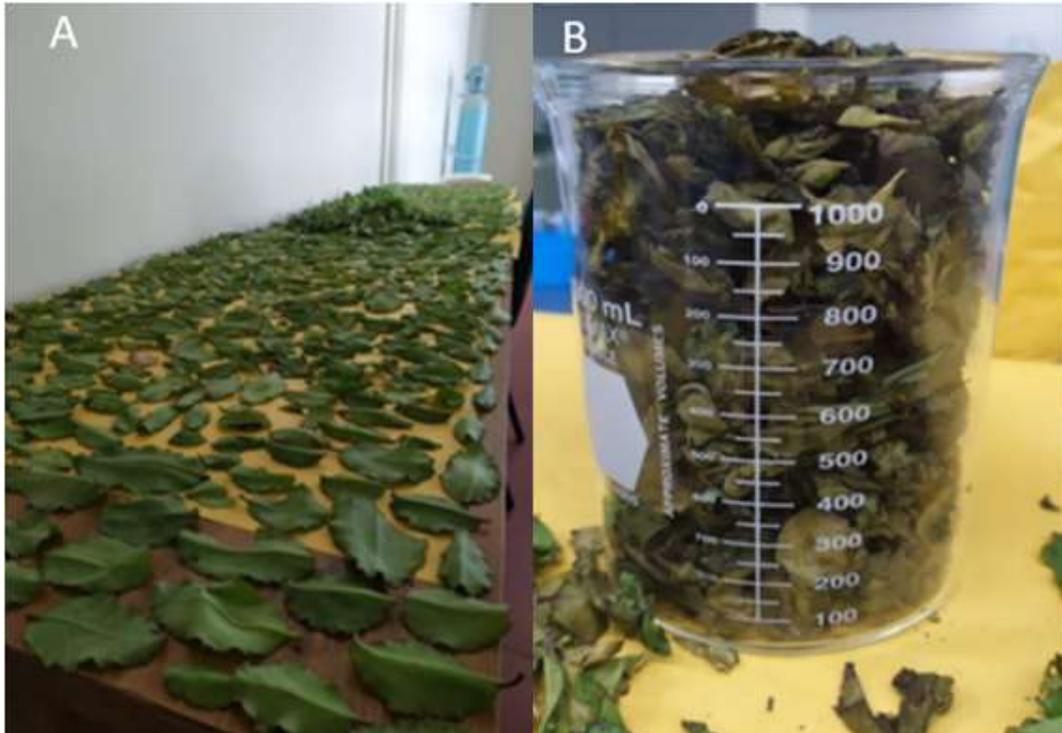


Figura 13. A. Hojas de *K. pinnata* lavadas y extendidas. B. Hojas deshidratadas en vaso de precipitado

Posteriormente las hojas secas se sometieron a trituración hasta obtener partículas finas, con ayuda de un mortero para facilitar la extracción acuosa que fue realizada por infusión de las hojas trituradas en agua a ebullición durante una hora, para posteriormente pasar el líquido resultante a través de un papel filtro para obtener el extracto sólido. Al terminar se guardó el stock, para después pesar y dividir en tubos de 1.5 ml con 10 mg cada uno.

Cultivo y mantenimiento de la línea celular HCC1937

Las células fueron sembradas en un frasco de cultivo de 25cm² utilizando 5 ml de medio de cultivo RPMI-1640 con 1% de penicilina/estreptomicina suplementada con SFB al 10%. A las 24 horas el cultivo fue monitoreado para descartar contaminación y el medio fue cambiado para eliminar restos de células que no lograron adherirse.

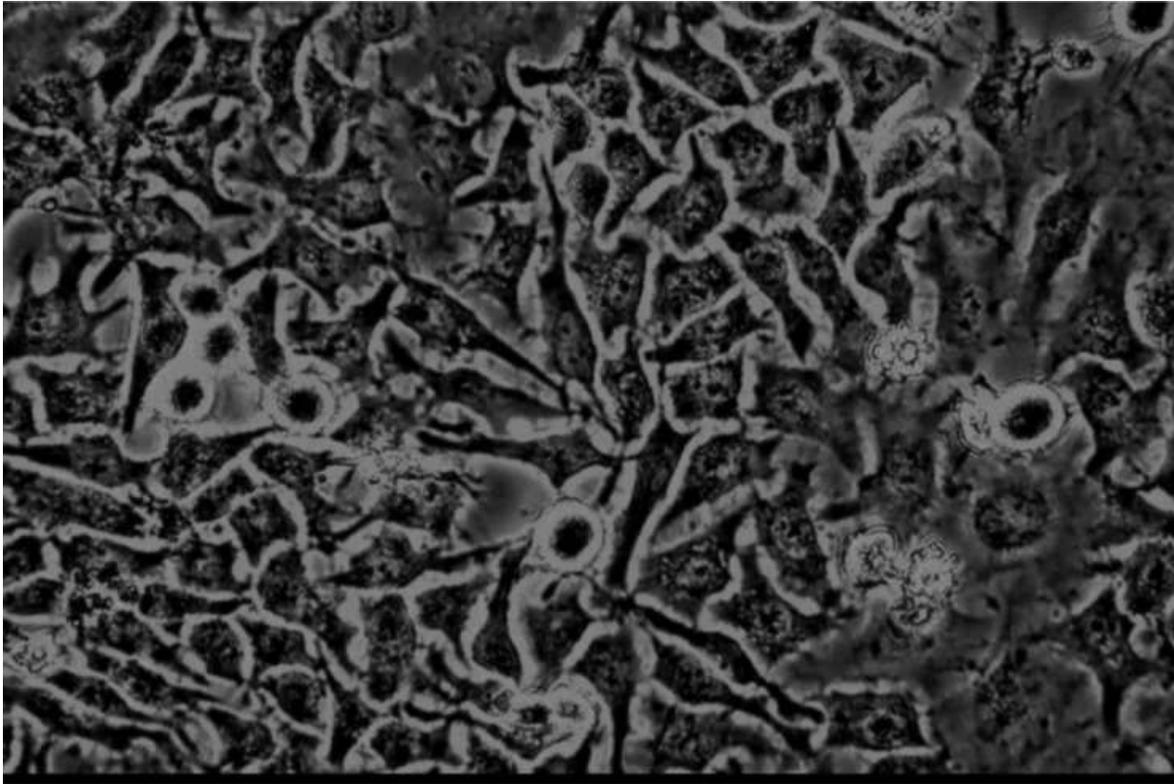


Figura 14. Células HCC1937 en alta confluencia a 40X.

CC50 y ensayo MTT

Una vez que se sembraron las células en la microplaca de 96 pozos se prepararon 7 concentraciones de 15, 30, 45, 60 y 75, 90 y 105 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de extracto acuoso en 200 μl de medio de cultivo, cada concentración y el control se realizaron por triplicado. El medio fue renovado Cada 24 horas y el cultivo monitoreado en el microscopio, después de 72 horas el medio fue retirado y se agregó a cada pozo el reactivo MTT a 0.5mg/ml en 100 μl de medio para después ser incubado durante 4 horas a 37 °C, 5% Co_2 y 95% humedad, al terminar la incubación se apreció la formación de cristales de formazán de color purpura en la base de los pozos, posteriormente el medio de cultivo fue retirado y se agregaron 100 μl de isopropanol y con ayuda de una micropipeta los cristales de formazán fueron disueltos pipeteando varias veces , durante el proceso se evitó sobre exponer a la luz la microplaca, cubriéndola con papel aluminio, una vez disueltos por completo los cristales de formazán, la microplaca fue introducida al lector de placas Smart Reader 96 (Accuris®) seleccionando el filtro de 570 nm para obtener la absorbancia de cada pozo, una vez hecho esto, se calculó la media de cada concentración y se calculó el porcentaje de viabilidad, dado que existe una relación directa entre absorbancia y viabilidad celular el cálculo se realiza considerando la absorbancia de las células control mediante la siguiente formula:

$$Vc = \frac{Am}{Ac} \times 100$$

Donde:

VC: es el porcentaje viabilidad celular:

Am: absorbancia del grupo control

AC: absorbancia muestra

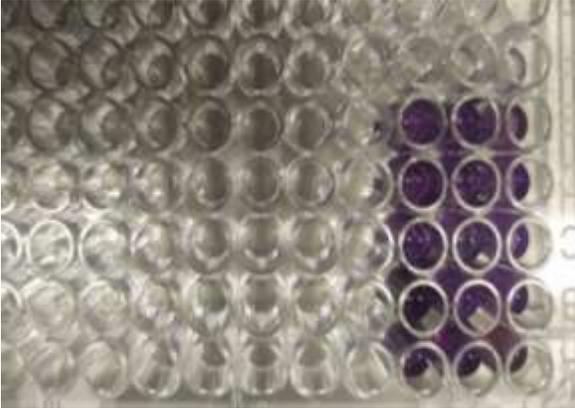


Figura 15. Presencia de cristales de formazán en una placa de 96 pozos.

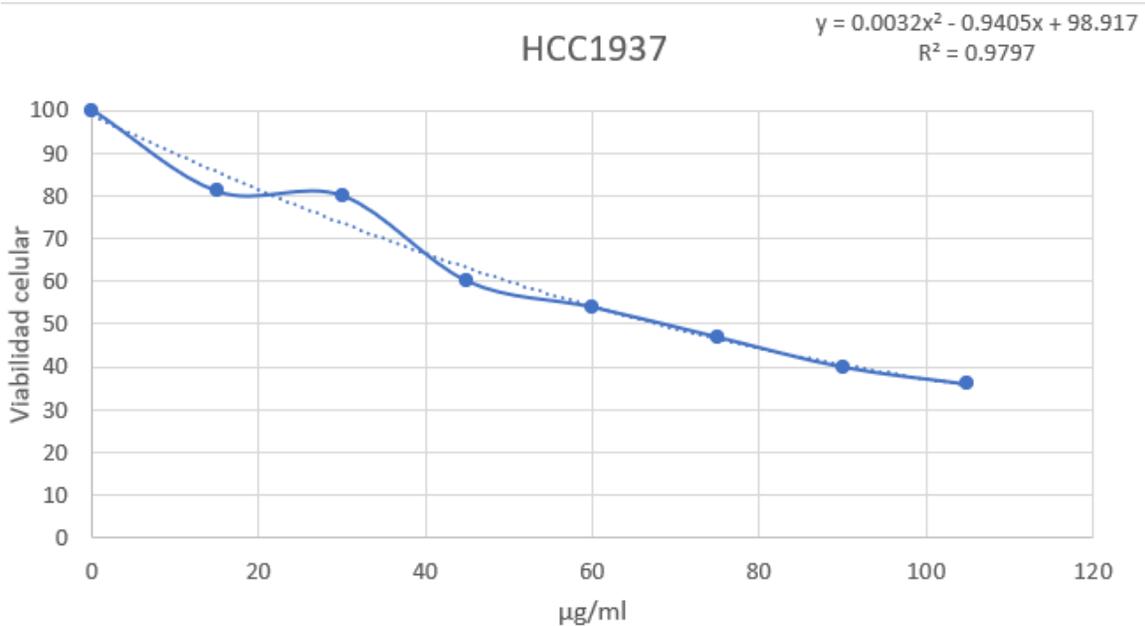


Figura 16. Efecto de las concentraciones de *K. pinnata* sobre la viabilidad celular de las células HCC1937, se definió el CC50 en 66 µg/ml.

Ensayo de cicatrización de herida y tratamiento con *K. pinnata*

Las células HCC1937 se tripsinizaron del frasco de 25cm² en la campana de flujo laminar absorbiendo totalmente el medio de cultivo, para enseguida realizar lavados con buffer PBS a 37 °C, para evitar dañar a las células, una vez retirado el buffer PBS, se agregaron 600 µl de tripsina al 0.25% a 37 °C. Las células se introdujeron en la incubadora durante cinco minutos. Pasado el tiempo con ayuda de una pipeta se terminaron de desprender y se observó al microscopio invertido para asegurarse de desprenderlas en su totalidad.

Posteriormente las células fueron vertidas en un tubo de 1.5 ml para centrifugarlas durante 2 minutos a 135 g, al terminar se absorbió el sobrenadante y se agregó 1 ml de medio de cultivo RPMI-1640 con 1% de antibiótico y suplementado con suero bovino fetal al 10%.

Terminado el conteo se sembraron 10⁵ células por pozo en una caja de 6 pozos, se agregaron 125 µl de la suspensión de células y por cada pozo se adicionaron 1375 µl de medio RPMI-1640 con antibiótico al 1 % y suero bovino fetal al 5% para contar con un volumen total de 1.5 ml, la caja fue rotulada e incubada a 37 °C y a 5% de CO₂. A las 24 horas se monitoreo el cultivo y se cambió el medio descartando células que no se hubieran adherido al sustrato. A las 48 horas las células se encontraban a un 80% de confluencia por lo que se inició el experimento.

Se extrajo el medio en todos los pozos y de inmediato se realizaron dos heridas horizontales y una vertical con una punta de pipeta de 200 µl la cual fue cambiada por cada trazo para evitar arrastrar células sobre la herida, una vez realizado de inmediato se agregó el medio de cultivo en condiciones normales a tres pozos y el medio de cultivo con una concentración de 75 µg/ml de extracto acuoso para los 3 pozos restantes.

Se tomaron fotografías de cada pozo a 4X y 10X con ayuda de un microscopio invertido equipado con una cámara HD considerando las 00:00 al realizar las heridas en el experimento, para ubicar el lugar exacto de la fotografía se realizaron heridas en la caja de cultivo en forma de cruz, dibujando la misma figura en la bitácora por cada pozo, para tener el punto exacto de la toma de fotografía cada 24 horas.

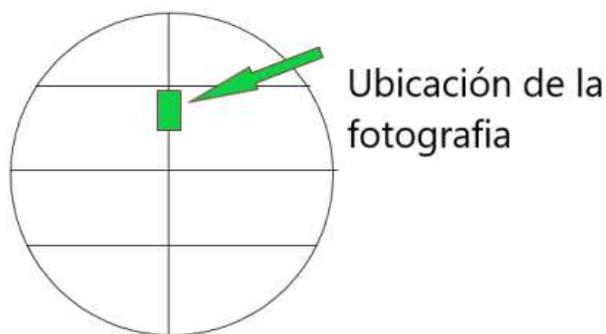
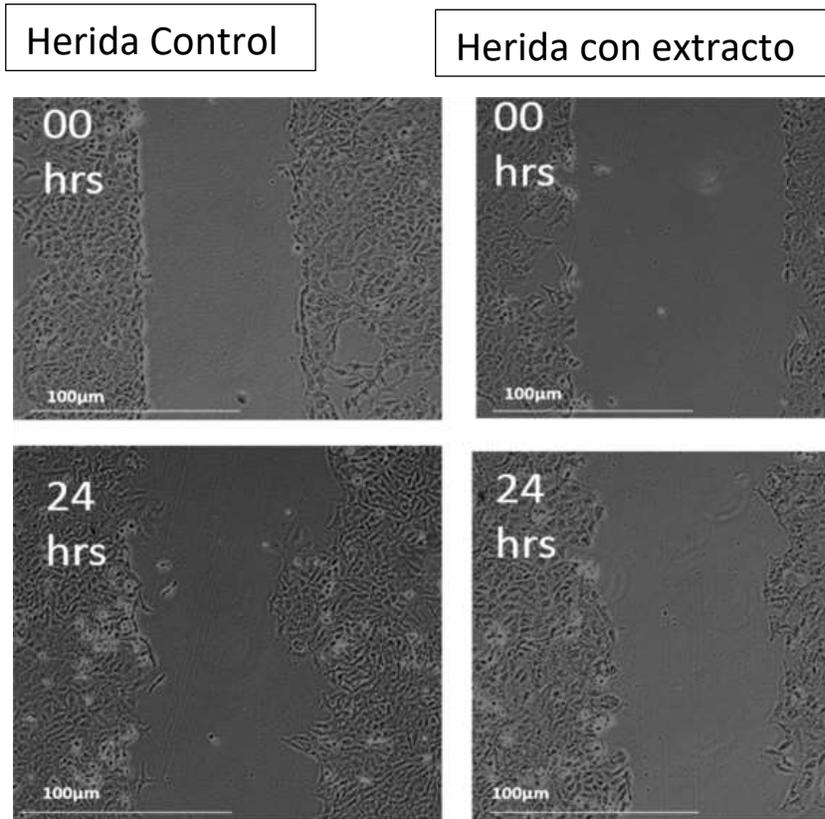


Figura 17: Ejemplo de heridas y ubicación de la fotografía en un pozo de la caja de cultivo, sin escala cada 24 horas se cambió el medio de cultivo para el grupo control y para el tratamiento con el extracto de *K. pinnata* en las mismas concentraciones, también se

fotografío en los mismos sitios de todos los pozos hasta las 72 horas cuando se dio por terminado el experimento.



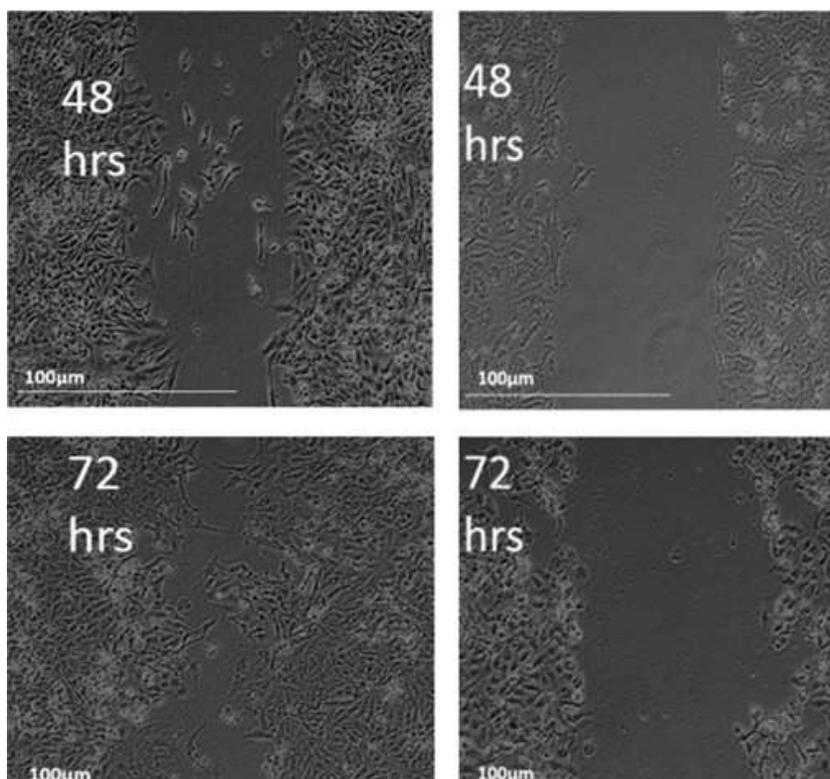
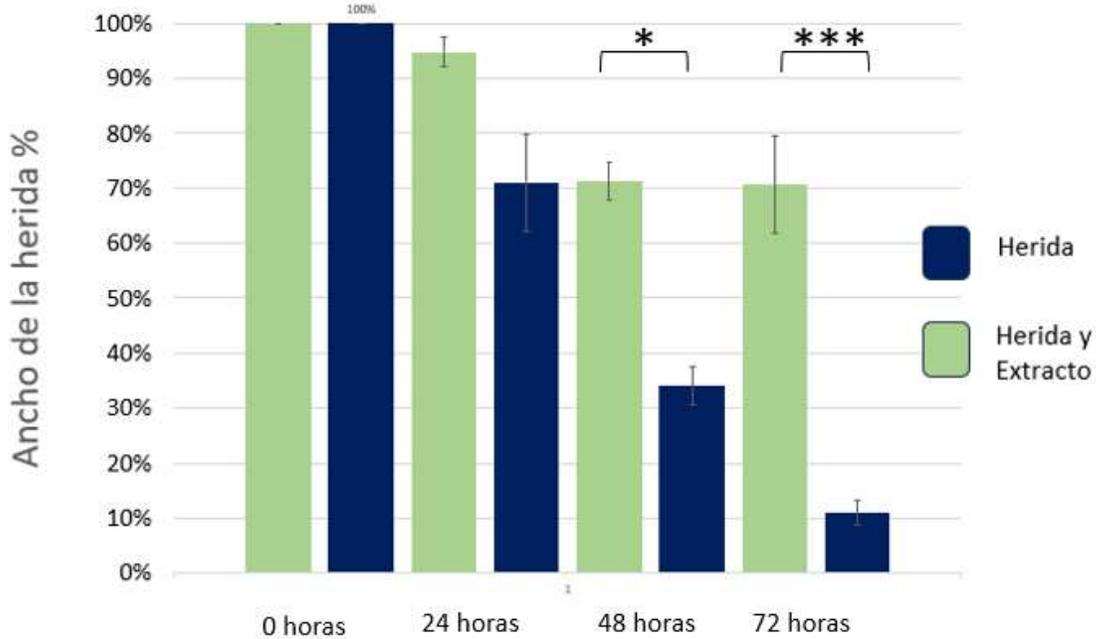


Figura 18. Efecto del extracto de *K. pinnata* sobre la migración de HCC1937 mediante el ensayo de cierre de herida.

Para analizar los resultados se utilizó la herramienta “Wound Assay” del software “ImageJ” el cual mide un área determinada, por lo que identifica los bordes de la herida realizada. Todas las mediciones de las fotografías a las 0 horas fueron reconocidas como el 100% del área de cada grupo, se calculó el porcentaje del ancho del área de la herida para todas las réplicas. El extracto acuoso de *K. pinnata* inhibió la migración in vitro de las células HCC1937, a partir de las 48 horas.

Figura 19. Efecto del extracto acuoso de *K. pinnata* en la migración, los datos se presentan como la media de tres réplicas a partir del porcentaje del área del ancho de la herida respecto al control, a las 48 horas tuvo un valor de $P < 0.05$ (*) y a las 72 un valor de $P < 0.001$ (***)).

Efecto del extracto acuoso de *K. pinnata* en la migración de las células HCC1937



Extracción, purificación y cuantificación del ARN

A las 72 horas de tratamiento posterior al ensayo de migración, se procedió a cosechar las células, comenzando por retirar el medio, de todos los pozos, de inmediato se agregó por pozo 1ml de PBS para realizar un enjuague y agregar 700 μ l de TRIzol (Invitrogen®) por grupo, despegando cualquier resto celular para posteriormente almacenar en tubos de 1.5 ml en el ultracongelador.

Para la extracción de ARN se preparó y limpió todo el material a utilizar, se comenzó por descongelar los tubos con las células en TRIzol, para agregar 140 μ l de cloroformo, y agitar fuertemente durante 15 segundos, después los tubos fueron centrifugados a 12,000 Gs durante 15 minutos, los tubos se sacaron de la centrifuga y al identificar la separación de fases entre orgánica y acuosa se tomó la fase acuosa en el sobrenadante para pasarla a un nuevo tubo y agregar 500 μ l de isopropanol, agitar suavemente e incubar durante diez minutos, al pasar el tiempo nuevamente se centrifugó a 12,000 Gs durante diez minutos, entonces se ubicó la pastilla de ARN al fondo del tubo y se realizaron dos lavados con etanol al 95% y centrifugando a 7,500 Gs durante cinco minutos, se retiró todo el etanol restante y se dejó secando el tubo con el ARN durante 6 minutos, al finalizar el ARN fue hidratado con agua libre de ARNsas, y se realizaron alícuotas para su cuantificación y almacenado en el ultracongelador, esto fue realizado por grupos de tratamiento por lo que cada replica fue extraída en un solo tubo de TRIzol.

Para comprobar la integridad del ARN total extraído se preparó un gel de agarosa al 1.5%, los ARN fueron cargados en los pozos del gel, mezclando previamente sobre Parafilm 5 μ l

de ARN y 1 μ l de buffer de carga, se agregó buffer TBE de corrimiento hasta cubrir por completo el gel en la cámara de electroforesis, después se programó la fuente de poder durante 40 minutos a 90 voltios.

Al terminar el tiempo de corrimiento las muestras se visualizaron en un transiluminador (Daigger, USA®) a 365 nm para corroborar la integridad del ARN total observando la presencia de las bandas 28s, 18s y 5s.

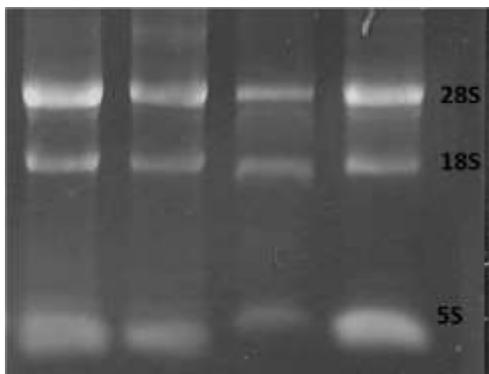


Figura 20. ARN en gel de agarosa las dos bandas intensas corresponden a las subunidades 28 y 18s, además de la tercera banda 5s son indicadores de un ARN integro.

Después de comprobar la integridad del ARN, se procedió a cuantificar las muestras de ARN a partir del ARN disuelto en 1 μ l, se realizó mediante espectrofotetría en un nanodrop 200 (Thermo USA®), además de la cuantificación en nanogramos/ μ l el equipo también nos brindó los datos de absorbancia entre los 260/280 nm y los 260/230 nm, para corroborar la pureza del ARN extraído y así descartar cualquier contaminación por fenoles y presencia de proteínas que hayan quedado durante la técnica de extracción.

Tabla 2. Relación de muestras de ARN y peso por microlitro.

Grupo	260/280	260/230	ng/ μ l
Control	1.93	2.11	3334.35
Herida	1.99	2.24	2775.87
Extracto	2.00	2.23	2280.24
Herida y Extracto	1.98	2.13	2602.16

Reacción de retro-transcripción.

Para realizar la reacción de retrotranscripción se utilizó el kit de Promega® (USA) para sintetizar cDNA a partir de 1 µg de ARN, se prepararon las siguientes soluciones en tubos de 0.2 ml.

Volumen total 5 µl.

Tabla 3. Volúmenes para la reacción de retro transcripción.

Grupo experimental	ARN	Agua libre de ARNsas	Oligo DT
Control	0.299 µl	3.7 µl	1 µl
Herida	0.360 µl	3.6 µl	1 µl
Extracto	0.438 µl	3.5 µl	1 µl
Extracto y Herida	0.384 µl	3.6 µl	1 µl

Una vez se prepararon los tubos con los reactivos, fueron llevados al termociclador, durante 5 minutos a 70° grados, al terminar fueron colocados en hielo otros cinco minutos.

Mientras transcurría el tiempo de incubación, se preparó con segundo tubo, con las siguientes especificaciones del fabricante, en 4 tubos diferentes para cada grupo experimental.

Volumen total 5 µl.

Tabla 4. Concentraciones B, reacción retrotranscripción.

Reactivo	Volumen
Agua libre de ARNasa	7.8 µl
Buffer 5X	4 µl
MgCl ₂	1.2 µl
dNTPs	1 µl
Transcriptasa inversa	1 µl

Una vez que se obtuvieron ambos tubos preparados se mezclaron en un único tubo por cada grupo, fueron homogeneizados y centrifugados y llevados al termociclador en un ciclo de 25°C durante 5 minutos, 58°C por 60 minutos y 70° durante 15 minutos, al terminar el ciclo los tubos fueron almacenados en el ultracongelador.

Expresión génica.

Para el ensayo de qPCR previamente se diseñaron los oligonucleótidos de los genes METTL3 y FTO, los cuales fueron diseñados en la base de datos NCBI, tomando la secuencia del ARNm y seleccionando parámetros de los amplicones en un tamaño cercano a 100 pares de bases.

Tabla 5. Relación de secuencias de oligonucleótidos.

Gen	Forward	Reverse	Longitud del producto de PCR
METTL3	GCTCTATCCAGGCCCAACAAG	TGGAGACAATGCTGCCTCTG	116 pb
FTO	TGGCTCAACTGGAAGCACTG	CAGTGAGCGAGGCAAGGATG	132 pb
HPRT1	ACACTGGCAAAAACAATGCAGA	ATATCCAACACTTCGTGGGGT	110 pb

Los oligonucleótidos fueron hidratados de acuerdo con las instrucciones del fabricante para obtener una concentración stock de 100 µM, posteriormente se hicieron alícuotas para mezclar reverse y forward a una concentración de trabajo de 10 µM, al terminar fueron almacenados en el ultracongelador hasta su uso.

Para evaluar la expresión de los genes METTL3 y FTO respecto a los tratamientos *con K. pinnata* así con el tratamiento con la herida, se llevó a cabo una reacción de qPCR en un termociclador Step One de Applied Biosystems®, se utilizó el kit SYBR Green (Thermo®), con las siguientes concentraciones y condiciones.

Tabla 6. Concentraciones qPCR.

Reactivo	Volumen
Master Mix	12.5 µl
Oligos F/R	1.5 µl (.3 µm)
cDNA	1 µl
Agua libre de nucleasas	15 µl



Figura 21: Condiciones de temperatura para la reacción de qPCR.

Expresión relativa de FTO

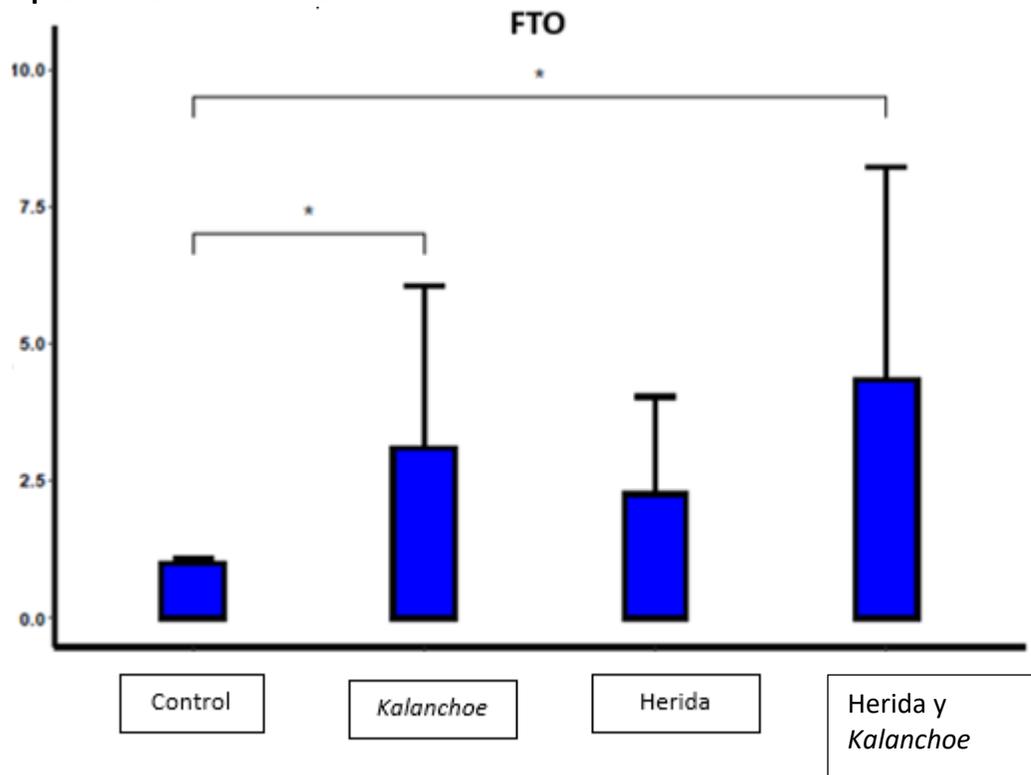


Figura 22. A partir del ensayo de qPCR se muestran las gráficas de cajas y bigotes, donde se aprecian los valores de la media, así como mínimos y máximos. El extracto de *K. pinnata* así como la herida en el ensayo de migración afectan significativamente la expresión relativa de la desmetilasa FTO en las células HCC1937. **A** se muestra una comparación entre los grupos sin extracto y con extracto con un valor de $P < 0.01$, **B** el grupo sin extracto y Herida con un valor < 0.01 , y en **C** se muestra el grupo sin extracto y herida y extracto con un valor de $P < 0.01$.

Expresión relativa de METTL3.

Expresión relativa de METTL3.

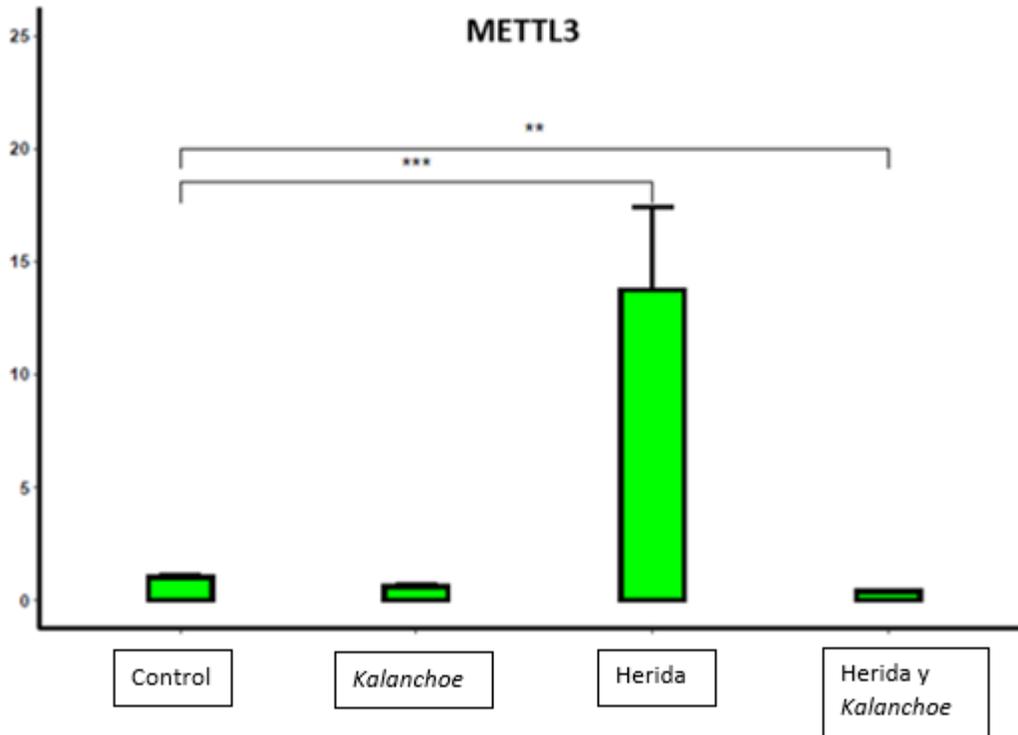


Figura 23. A partir del ensayo de qPCR se muestran las gráficas de barra donde se aprecian los valores de la media, así como la desviación estándar. El extracto de *K. pinnata*, así como la herida en el ensayo de migración afectan significativamente la expresión relativa de la metiltransferasa METTL3 en las células HCC1937. **A** Se observa el grupo sin extracto y herida con un valor de $P < 0.01$, **B** se observa el grupo sin extracto y con extracto con un valor de $P < 0.01$ y en **C**. se observa el grupo sin extracto y extracto y herida con un valor de $P < 0.001$.

DISCUSIÓN:

Las plantas poseen efectos curativos sobre enfermedades en humanos y animales, esto es gracias a que las plantas sintetizan un complejo grupo de metabolitos secundarios los cuales no son estrictamente necesarios para el desarrollo y crecimiento de la planta, sin embargo, los utilizan en procesos fisiológicos, así como de estrés, defensa y adaptación. No obstante, la síntesis de estos metabolitos secundarios se ve fuertemente afectada por las condiciones ambientales como la temperatura, la altitud, la iluminación, así como la disponibilidad de agua y nutrientes en el suelo, factores que pueden cambiar drásticamente dependiendo de la región donde la planta crezca, pudiendo existir un efecto farmacológico distinto dependiendo de su ubicación geográfica. Se han hecho estudios en los que analizan distintas plantas consideradas medicinales en las que, a partir de la identificación de compuestos en hojas, raíces y tallos, en los que se muestra que los principales factores

ambientales como, la temperatura, la intensidad de luz, los cambios en las concentraciones de dióxido de carbono, ozono así como la humedad y estrés por sequía influyen en las concentraciones de fenoles, ácido gálico, carotenoides, flavonoides, saponinas ácido cafeico entre otros, se ven afectadas por estas condiciones ambientales⁴⁷.

La planta *K. pinnata* posee una amplia distribución mundial principalmente al sur de la línea ecuatorial y hasta los 2800 metros de altura³¹. En México principalmente en el centro sur del país, abarcando todo el eje Neovolcánico hasta la cordillera centroamericana en la que existe una gran diversidad de factores físico-ambientales, tales como al menos 20 tipos de suelo diferentes y al menos 15 subtipos de clima (Sureste, 2018), condiciones que pueden afectar directamente a la síntesis de diferentes metabolitos secundarios presentes en *K. pinnata*, en el presente trabajo se realizó una única colecta en invierno, localizando una abundante población de *K. pinnata*, entre un monocultivo de *Coffea arabica*, en el estado de Veracruz, aproximadamente a 1200 metros sobre el nivel del mar, predominando un clima húmedo.

Los compuestos orgánicos y metabolitos secundarios encontrados en plantas y frutas no son un área nueva en la investigación médica, se estima que al menos el 20% de las plantas conocidas han sido estudiadas para conocer al menos algún uso farmacológico, para buscar tratar enfermedades como el cáncer⁴⁸, por lo que a lo largo de los años las técnicas para extraer estos compuestos, ha ido cambiando y estandarizándose para tener una mayor eficiencia al extraer los principios activos de las plantas, en algunos experimentos cuando se tienen bien identificados los compuestos activos se eligen a conveniencia los métodos para extracción de estos compuestos, incluso se determina el método de extracción dependiendo de la naturaleza polar del soluto, se elige el solvente adecuado ya que un solvente de polaridad similar al soluto lo disolverá más eficientemente, tales como hexano, cloroformo, acetona metanol o agua⁴⁸. En el presente trabajo se utilizó únicamente un extracto total acuoso, que según algunos reportes puede tener una baja eficiencia al diluir moléculas esteroides o no polares, sin embargo existen moléculas como los bufadienólidos los cuales son en general liposolubles, que pueden ser parcialmente polares lo que les permitiría ser disueltas en un solvente acuoso que, a pesar de que algunos reportes indican de una baja eficiencia en algunos solventes acuosos por disolverlos, a diferencia de un solvente acuoso podría ser eficiente al extraer compuestos como ácidos orgánicos, flavonoides, así como algunos alcaloides⁴⁹. El extracto acuoso de plantas del género *Kalanchoe* ha sido estudiado en líneas celulares de cáncer en la línea celular HeLa, MCF-7, A549, HepG2, entre otras donde estudian el efecto del extracto acuoso de *K. pinnata*, demostrando su efecto citotóxico y su capacidad de inducir apoptosis, sugiriendo que los extractos a partir de *K. pinnata* pueden tener potencial como tratamiento contra el cáncer⁵⁰.

La migración celular es un proceso involucrado en diferentes eventos fisiológicos como el desarrollo embrionario, respuesta inmune, reparación de heridas, así como en patologías como el cáncer, siendo un paso fundamental en la metástasis, proceso que representa un pronóstico adverso por la dispersión de las células tumorales y el aumento de mortalidad, por lo que existe un gran interés en su estudio tanto clínico como *in vitro*¹⁵ El ensayo de

herida es un ensayo relativamente barato que permite observar la migración celular de células en monocapa en 2D, a diferencia de otros ensayos. Vang et al. señalaron en el 2018 que una desventaja del ensayo de cierre de herida son las variaciones que existen cuando el investigador realiza manualmente el trazo de la herida, estas variaciones pueden verse reflejadas en el ancho de la herida, e incluso en pequeñas diferencias en la profundidad del raspado que interfieran en el proceso de migración celular de manera irregular en cada replica. Respecto a la desventaja con la técnica manual del raspado, estas pueden ser controladas hasta cierto punto por el investigador, nuestro ensayo fue realizado después de practicar y estandarizar el procedimiento para asegurar un trazo limpio, uniforme y utilizando la misma fuerza manual, además de asegurar un trazo recto, el cual fue apoyado con una regla de acrílico previamente esterilizada. Además, las mediciones proporcionan los datos de las áreas y estas son consideradas en replicas independientes como el 100% del área en la hora cero.

El índice de concentración citotóxica o CC_{50} es una medida muy utilizada en biomedicina, se explica como la dosis respuesta a la exposición de fármacos o compuestos, la cual gracias a una curva de dosis respuesta podemos obtener la cantidad o concentración que se necesita de un fármaco para inhibir la viabilidad celular en un 50% y así evaluar la toxicidad del compuesto antes de realizar un experimento⁵¹.

Vang et. al., reportaron en su artículo lo complicado de poder determinar que el área que se cubre durante el cierre de la herida pueda ser considerado como migración y no como proliferación. A pesar de que es un cuestionamiento muy válido si existen maneras en las que se puede considerar que la migración está provocando el cierre de herida, tales como trabajar el ensayo en bajas condiciones de suero, en nuestro caso las células se trabajaron al 5% de SBF⁵². Además de la toma de fotografías en intervalos de tiempo para poder observar el comportamiento del cierre de herida y ser analizadas en el software. La duración del ensayo contempló 72 horas, entre las cuales se fotografiaron, cada 24, sin embargo, en futuros experimentos si debe considerarse aumentar el número de fotografías respecto al transcurso del tiempo, para obtener un mayor número de datos e incluso el uso de microscopia en tiempo real que permitiría no solo identificar la motilidad celular también cambios morfológicos durante la dinámica de migración y así obtener mayores argumentos para discriminar la migración de la proliferación celular. A pesar de que el uso de más técnicas, y equipos puede aumentar la fiabilidad del ensayo siempre se deben de considerar las limitaciones y disponibilidad de recursos de cada laboratorio e investigador.

En el año 2016 Huang et al. estudiaron los efectos de la migración celular de la Bufalina (B0261) un bufadienólido obtenido de manera comercial sobre la línea celular tumoral H460. Mediante un ensayo de cierre de herida con una punta de pipeta de 200 de μ l, exponiendo diferentes concentraciones de 2.5, 5, y 10 nM del compuesto, sus resultados mostraron que la Bufalina (B0261) inhibe significativamente la migración celular a partir de las 48 horas, además del ensayo de migración evaluaron los niveles de expresión de SOS-1 y MMP-2, proteínas que han sido relacionada con el aumento de migración de células tumorales y actividad metastásica⁵³, además realizaron un western blot que reveló cambios significativos en la presencia de SOS-1, así como un aumento en la expresión de MMP-2

cuando las células fueron expuestas a una concentración de 10nM después de 48 horas de tratamiento.

Nuestros resultados concuerdan que se inhibe significativamente la migración celular a partir de las 48 h. (**figura 18**), podemos inferir que el extracto acuoso de *K. pinnata* del cual se ha reportado que dentro del espectro de metabolitos secundarios se encuentran los bufadienolidos, podrían estar teniendo un efecto en la expresión de proteínas involucradas en la migración celular como SOS-1 y MMP-2, ocasionando una inhibición muy significativa de la migración celular a partir de las 48 horas de tratamiento.

Se debe considerar que el extracto acuoso de *K. pinnata* utilizado en nuestros experimentos es un extracto total, donde no están definidos los metabolitos presentes, así como sus concentraciones, únicamente por la literatura disponible por lo que además de los bufadienólidos que pudiera haber capturado el extracto acuoso, aún se encuentra un amplio espectro de compuestos que pudieran haber mostrado efecto sobre los mecanismos de migración.

Sabemos que las modificaciones epigenéticas pueden estar directamente relacionadas con la aparición, desarrollo y progresión del cáncer²¹, por lo que el estudio de modificaciones como m6A, además de las proteínas que la insertan, borran y leen, se han convertido en un blanco para la investigación biomédica, estas investigaciones se han abordado desde los antecedentes de la medicina tradicional como el uso de plantas medicinales para su posible uso como agentes terapéuticos.

En el 2017 Zhang et al. reportaron mediante análisis de espectroscopia de fluorescencia que al menos tres tipos de flavonoides, quercetina, naringenina y apigenina, son capaces de interactuar y unirse con FTO, mediante interacciones hidrofóbicas⁵⁴.

Es importante mencionar que estos tres tipos de flavonoides se han reportado presentes en *K. pinnata*⁵⁵ por lo que podemos inferir que estos metabolitos presentes en el extracto acuoso de *K. pinnata*, ejerce un efecto sobre la dinámica de la proteína desmetilasa FTO, sin embargo, las bases moleculares de la interacción de estos flavonoides con la proteína FTO son aún desconocidas y se requieren más estudios.

En el año 2021 Xu et al. estudiaron el efecto de la quercetina en dos líneas celulares, SiHa de cáncer de cuello uterino y HeLa de cáncer cervical en la expresión de la proteína metiltransferasa METTL3, sus resultados mostraron que se encontraba sub expresada cuando las células fueron tratadas con quercetina⁵⁶. Entonces podemos inferir que la quercetina podría tener un efecto sobre la expresión de FTO y METTL3, proteínas clave del metiloma y en consecuencia interferir en la frecuencia de la metilación de m6A.

En nuestros experimentos la expresión relativa de METTL3 y FTO fue significativa con un valor de $P < 0.001$ (**figura 22**), cuando los tratamientos presentaron la interacción del compuesto de *K. pinnata* y el ensayo de la herida para analizar la migración. Se sabe que los estímulos mecánicos pueden alterar la expresión génica, para inducir una respuesta fisiológica en el organismo, sin embargo la dinámica molecular de estos estímulos aún carece de información concreta, se sabe por ejemplo que estímulos mecánicos pueden

alterar la localización intracelular de ciertos factores de transcripción como MRFT y YAP desde el citoplasma hacia el núcleo celular, pudiendo alterar la expresión de distintos genes⁵⁷. A pesar de que actualmente no hay evidencia de que los estímulos mecánicos pudieran estar afectando la expresión de los componentes del metiloma METTL3 y FTO, observamos en esta investigación como a partir del ensayo de migración y del tratamiento con el extracto con *K. pinnata* la expresión de METTL3 se ve significativamente sub expresada, además de la sobre expresión significativa de la metilasa FTO en el grupo herida y extracto respecto al control (**figura 22 y 23**). Estos cambios en la expresión podrían estar afectando a la colocación de la modificación m6A en el ARNm.

En el año 2020 Xu et al. estudiaron la relación de la desmetilasa FTO y el cáncer de mama en células SKBR3 y MDA-MB453, ambas líneas celulares positivas para el factor de crecimiento epidérmico HER2, en las cuales demostraron que FTO se encontraba significativamente expresado respecto a la línea celular MCF10, la cual se tomó como referencia a células no tumorales. Además al ser FTO un “borrador” de m6A, se encontró también que esta modificación se encontraba en mayores niveles en SKBR3 y MDA-MB453 respecto a la línea celular no tumoral, los autores concluyeron que FTO puede tener una importante participación clínica en el desarrollo de cáncer de mama⁵⁸. Respecto a nuestro trabajo la desmetilasa FTO se encuentra sub expresada en las células negativas para HER2 HCC1937 respecto al gen endógeno HPRT1, sin embargo a partir de los tratamientos a los que fueron sometidos las células HCC1937, la expresión de FTO cambio significativamente, aumentando su expresión en el grupo de herida (**figura 22 y 23**), extracto y especialmente con el grupo herida y extracto, siendo una combinación de ambos tratamientos lo que potencia la expresión de FTO, podemos inferir que compuestos presentes en *K. pinnata*, estarían interactuando con FTO, como los autores Alharbi et al. publicaron en el año 2015, en su estudio de bioinformática en el que demostraron que algunos metabolitos secundarios como Kaempferol y principalmente quercetina pueden tener alta afinidad por FTO, por lo que podrían estar interactuando para afectar la expresión de la desmetilasa FTO⁵⁹. Es posible que esa afinidad por FTO y en conjunto con estímulos mecánicos, afecten la localización de factores de transcripción para regular a FTO, en el grupo de estudio extracto y herida en el cual FTO se sobre expresó significativamente. En nuestro grupo experimental de la herida observamos una clara sobreexpresión de FTO en comparación al grupo control (**figura 22**), lo que sugiere que FTO puede ser afectado por el estímulo mecánico en las células HCC1937.

En el año 2020 Xu et al, llevaron a cabo ensayos de migración en células SKBR3 y MDA-MB453, y ambas con “knockdown” de FTO, sus resultados mostraron que en los grupos con FTO inhibido, las células reducen significativamente la migración e invasión celular⁵⁸. Lo que podría explicar la relación que existe entre los estímulos mecánicos de las heridas y los cambios en la expresión de la desmetilasa FTO.⁵⁸.

Conclusiones.

En el presente estudio mostramos evidencia *in vitro* acerca del efecto del extracto acuoso de *K. pinnata* sobre la migración celular, el cual mostró inhibirla significativamente a partir de las 48 horas de tratamiento. Además, observamos que el extracto de *K. pinnata* provoca cambios en la expresión de la metiltransferasa METTL3 y la desmetilasa FTO, proteínas clave en la modificación epigenética más abundante en eucariotas m⁶A, la cual al estar involucrada en diversos procesos fisiológicos y patológicos es considerada un blanco en la investigación contra el cáncer.

Nuestro trabajo destaca la importancia de explorar alternativas en tratamientos que funcionen como adyuvantes a través de regular procesos epigenéticos en el cáncer de mama triple negativo, además de brindar una perspectiva a futuro en la investigación con extractos vegetales.

Es necesario considerar que factores como las condiciones geográficas y ambientales pueden generar variaciones respecto a las demás poblaciones registradas de *K. pinnata* localizadas en otras entidades, por lo que es muy probable de acuerdo a la literatura que la mezcla de metabolitos secundarios pueda poseer diferentes niveles de concentración aun siendo la misma especie, siendo probable que el efecto sobre la migración y la expresión de METTL3 y FTO pueda mostrar un efecto distinto al reportado en el presente trabajo, por lo que podría considerarse en futuros trabajos diversificar la colecta de *K. pinnata* para llevar a cabo ensayos de migración y de expresión de componentes del metiloma.

En futuros trabajos el uso de extractos con diferentes solventes podría brindar una visión más amplia del efecto de los componentes de *K. pinnata* en la migración celular y la expresión de los componentes del metiloma.

Es necesario profundizar respecto a los mecanismos moleculares que provocan cambios en la expresión de METTL3 y FTO a partir de estímulos mecánicos y los componentes presentes en el extracto acuoso de *K. pinnata*.

Bibliografía

1. World health organization (WHO). En: Yearbook of the United Nations 2005. UN; 2005. p. 1572–3.
2. Mathur G, Nain S, Kumar P. Cancer: An Overview. Acad J Canc Res [Internet]. Disponible en: [https://www.idosi.org/ajcr/8\(1\)15/1.pdf](https://www.idosi.org/ajcr/8(1)15/1.pdf)
3. Información y apoyo sobre el cáncer de mama [Internet]. Breastcancer.org. [citado el 2 de agosto de 2023]. Disponible en: <https://www.breastcancer.org/es>
4. Heredia Martínez BE, González Fernández H. Caracterización del cáncer de mama triple negativo. Finlay [Internet]. 2020 [citado el 2 de agosto de 2023];10(3):259–68. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2221-24342020000300259
5. Vilagran Fraguell M, Sentís Crivillé M, del Riego Ferrari J, Andreu Navarro FJ, Dalmau Portulàs E, Planas Roquerols J, et al. Carcinoma de mama triple negativo. Heterogeneidad inmunofenotípica y en el comportamiento farmacocinético. Radiología [Internet]. 2016 [citado el 2 de agosto de 2023];58(1):55–63. Disponible en: <https://www.elsevier.es/es-revista-radiologia-119-articulo-carcinoma-mama-triple-negativo-heterogeneidad-S0033833815001447>
6. Smrekar K, Belyakov A, Jin K. Crosstalk between triple negative breast cancer and microenvironment. Oncotarget [Internet]. 2023 [citado el 2 de agosto de 2023];14(1):284–93. Disponible en: <https://www.oncotarget.com/article/28397/text/>
7. Kumar H, Gupta NV, Jain R, Madhunapantula SV, Babu CS, Kesharwani SS, et al. A review of biological targets and therapeutic approaches in the management of triple-negative breast cancer. J Adv Res [Internet]. 2023; Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2090123223000565>
8. de Salud S. Dirección General de Epidemiología [Internet]. gob.mx. [citado el 2 de agosto de 2023]. Disponible en: <https://www.gob.mx/salud/acciones-y-programas/direccion-general-de-epidemiologia>
9. Inicio [Internet]. Cancer.org. [citado el 2 de agosto de 2023]. Disponible en: <https://www.cancer.org/es.html>
10. Watase C, Shiino S, Shimoi T, Noguchi E, Kaneda T, Yamamoto Y, et al. Breast cancer brain metastasis-overview of disease state, treatment options and future perspectives. Cancers (Basel) [Internet]. 2021 [citado el 2 de agosto de 2023];13(5). Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33802424/>

11. Macedo F, Ladeira K, Pinho F, Saraiva N, Bonito N, Pinto L, et al. Bone metastases: An overview. *Oncol Rev* [Internet]. 2017 [citado el 2 de agosto de 2023];11(1):321. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28584570/>
12. Macías Abraham C. Moléculas de adhesión: Importancia en la respuesta inmune e inflamatoria. *Rev Cuba Hematol Immunol Hemoter* [Internet]. 2006 [citado el 2 de agosto de 2023];22(2):0–0. Disponible en: https://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-02892006000200003
13. Lara-Reyes JA, Castillo-García ZH, Aranda-Abreu GE, Herrera-Covarrubias D, Sampieri-Ramírez CL, Aquino-Gálvez A, et al. Prolactin increases cell migration of MCF-7 cells without inducing an epithelium-mesenchyme transition. *Gac Mex Oncol* [Internet]. 2022 [citado el 2 de agosto de 2023];21(2):54–8. Disponible en: https://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S2565-005X2022000200054&script=sci_abstract
14. Arvelo F, Sojo F, Cotte C. Tumour progression and metastasis. *Ecancermedicalscience* [Internet]. 2016 [citado el 2 de agosto de 2023];10:617. Disponible en: <https://ecancer.org/en/journal/article/617-tumour-progression-and-metastasis>
15. Kramer N, Walzl A, Unger C, Rosner M, Krupitza G, Hengstschläger M, et al. In vitro cell migration and invasion assays. *Mutat Res* [Internet]. 2013 [citado el 2 de agosto de 2023];752(1):10–24. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22940039/>
16. Eichhorn ME, Kleespies A, Angele MK, Jauch K-W, Bruns CJ. Angiogenesis in cancer: molecular mechanisms, clinical impact. *Langenbecks Arch Surg* [Internet]. 2007 [citado el 2 de agosto de 2023];392(3):371–9. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17458577/>
17. Bedregal P, Shand B, Santos MJ, Ventura-Juncá P. Aportes de la epigenética en la comprensión del desarrollo del ser humano. *Rev Med Chil* [Internet]. 2010 [citado el 2 de agosto de 2023];138(3):366–72. Disponible en: https://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-98872010000300018
18. Kim U, Lee D-S. Epigenetic regulations in mammalian cells: Roles and profiling techniques. *Mol Cells* [Internet]. 2023 [citado el 2 de agosto de 2023];46(2):86–98. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.14348/molcells.2023.0013>
19. Rodríguez Dorantes M, Téllez Ascencio N, Cerbón MA, López M, Cervantes A. Metilación del ADN: un fenómeno epigenético de importancia médica. *Rev Invest Clin* [Internet]. 2004 [citado el 2 de agosto de 2023];56(1):56–71. Disponible en: https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-83762004000100010

20. Lesbirel S, Wilson SA. The m6A-methylase complex and mRNA export. *Biochim Biophys Acta Gene Regul Mech* [Internet]. 2019;1862(3):319–28. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1874939918302220>
21. Niu Y, Zhao X, Wu Y-S, Li M-M, Wang X-J, Yang Y-G. N6-methyl-adenosine (m6A) in RNA: an old modification with a novel epigenetic function. *Genomics Proteomics Bioinformatics* [Internet]. 2013 [citado el 2 de agosto de 2023];11(1):8–17. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23453015/>
22. Lan Q, Liu PY, Haase J, Bell JL, Hüttelmaier S, Liu T. The critical role of RNA m6A methylation in cancer. *Cancer Res* [Internet]. 2019 [citado el 2 de agosto de 2023];79(7):1285–92. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30894375/>
23. Mato JM, Martínez-Chantar ML. S-adenosilmetionina y el hígado. *Gastroenterol Hepatol Contin* [Internet]. 2005 [citado el 2 de agosto de 2023];4(6):279–82. Disponible en: <https://www.elsevier.es/es-revista-gastroenterologia-hepatologia-continuada-8-articulo-s-adenosilmetionina-el-higado-70000299>
24. Lasman L, Krupalnik V, Viukov S, Mor N, Aguilera-Castrejon A, Schneir D, et al. Context-dependent functional compensation between Ythdf m6A reader proteins. *Genes Dev* [Internet]. 2020 [citado el 2 de agosto de 2023];34(19–20):1373–91. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32943573/>
25. ATCC: The Global Bioresource Center [Internet]. *Atcc.org*. [citado el 2 de agosto de 2023]. Disponible en: <https://www.atcc.org/>
26. Herbário Prof. Jorge Pedro Pereira Carauta - HUNI [Internet]. *Unirio.br*. [citado el 2 de agosto de 2023]. Disponible en: <http://www.unirio.br/ccbs/ibio/herbariohuni>
27. Universidad Nacional de Colombia: Inicio [Internet]. *Edu.co*. [citado el 2 de agosto de 2023]. Disponible en: <http://catalogoplantasdecolombia.unal.edu.co/>
28. GBIF [Internet]. *Gbif.org*. [citado el 2 de agosto de 2023]. Disponible en: <https://www.gbif.org/es/>
29. Troiani HO, Prina AO, Muiño WA, Tamame MA, Beinticinco L. Botánica, morfología, taxonomía y fitogeografía. Editorial de la Universidad Nacional de La Pampa; 2017.
30. De Diputados C, Congreso De DH, Unión LA. LEY GENERAL DE VIDA SILVESTRE [Internet]. *Gob.mx*. [citado el 2 de agosto de 2023]. Disponible en: https://www.diputados.gob.mx/LeyesBiblio/pdf/146_200521.pdf

31. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad [Internet]. Gob.mx. [citado el 2 de agosto de 2023]. Disponible en: <https://www.gob.mx/conabio>
32. Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana [Internet]. Unam.mx. [citado el 2 de agosto de 2023]. Disponible en: <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/>
33. Sandoval Jiménez MC, Martínez y Pérez JL. El uso de *Kalanchoe pinnata* (Lam.) Pers. en el estado de Veracruz. 1994 [citado el 2 de agosto de 2023]; Disponible en: <https://cdigital.uv.mx/handle/123456789/5234>
34. Mosquera F. Hierba de bruja *Kalanchoe pinnata*. 2018 [citado el 2 de agosto de 2023]; Disponible en: https://www.academia.edu/36743389/Hierba_de_bruja_Kalanchoe_pinnata
35. Mahata S, Maru S, Shukla S, Pandey A, Muges G, Das BC, et al. Anticancer property of *Bryophyllum pinnata* (Lam.) Oken. leaf on human cervical cancer cells. *BMC Complement Altern Med* [Internet]. 2012;12(1). Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1186/1472-6882-12-15>
36. Hsieh Y-J, Huang H-S, Leu Y-L, Peng K-C, Chang C-J, Chang M-Y. Anticancer activity of *Kalanchoe tubiflora* extract against human lung cancer cells in vitro and in vivo: Anticancer Activity of *Kt*. *Environ Toxicol* [Internet]. 2016 [citado el 2 de agosto de 2023];31(11):1663–73. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26179408/>
37. Aisyah LS, Yun YF, Herlina T, Julaeha E, Zainuddin A, Nurfarida I, et al. Flavonoid compounds from the leaves of *Kalanchoe prolifera* and their cytotoxic activity against P-388 Murine leukemia cells. *Nat Prod Sci* [Internet]. 2017;23(2):139. Disponible en: <https://kimia.unjani.ac.id/wp-content/uploads/2018/10/Lilis-Siti-Aisyah-nps-23-139.pdf>
38. García Luján C, Martínez R. A, Ortega S. JL, Castro B. F. Componentes químicos y su relación con las actividades biológicas de algunos extractos vegetales. *Química Viva* [Internet]. 2010;9(2):86–96. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=86314868005>
39. Biswas SK, Chowdhury A, Das J, Zahid Hosen SM, Uddin R, Rahaman MS. Literature review on pharmacological potentials of *Kalanchoe pinnata* (Crassulaceae). *Afr J Pharm Pharmacol* [Internet]. 2011 [citado el 2 de agosto de 2023];5(10):1258–62. Disponible en: <https://academicjournals.org/journal/AJPP/article-abstract/843A78132930>

40. Hernández-Caballero ME, Sierra-Ramírez JA, Villalobos-Valencia R, Seseña-Méndez E. Potential of *Kalanchoe pinnata* as a cancer treatment adjuvant and an epigenetic regulator. *Molecules* [Internet]. 2022 [citado el 2 de agosto de 2023];27(19):6425. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36234962/>
41. Kolodziejczyk-Czepas J, Stochmal A. Bufadienolides of *Kalanchoe* species: an overview of chemical structure, biological activity and prospects for pharmacological use. *Phytochem Rev* [Internet]. 2017 [citado el 2 de agosto de 2023];16(6):1155–71. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29200987/>
42. Jirtle RL, Skinner MK. Environmental epigenomics and disease susceptibility. *Nat Rev Genet* [Internet]. 2007 [citado el 2 de agosto de 2023];8(4):253–62. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/nrg2045>
43. Weng Y-P, Hung P-F, Ku W-Y, Chang C-Y, Wu B-H, Wu M-H, et al. The inhibitory activity of gallic acid against DNA methylation: application of gallic acid on epigenetic therapy of human cancers. *Oncotarget* [Internet]. 2018 [citado el 2 de agosto de 2023];9(1):361–74. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.18632/oncotarget.23015>
44. Zheng F, Du F, Zhao J, Wang X, Si Y, Jin P, et al. The emerging role of RNA N6-methyladenosine methylation in breast cancer. *Biomark Res* [Internet]. 2021 [citado el 2 de agosto de 2023];9(1):39. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34044876/>
45. Rodriguez LG, Wu X, Guan J-L. Wound-healing assay. En: *Cell Migration*. New Jersey: Humana Press; 2004. p. 023–30.
46. Capes-Davis A, Freshney RI. *Freshney's culture of animal cells: A manual of basic technique and specialized applications* [Internet]. 8a ed. Hoboken, NJ: Wiley-Blackwell; 2021 [citado el 2 de agosto de 2023]. Disponible en: <https://www.wiley.com/en-gb/Freshney%27s+Culture+of+Animal+Cells%3A+A+Manual+of+Basic+Technique+and+Specialized+Applications%2C+8th+Edition-p-9781119513049>
47. Pant P, Pandey S, Dall'Acqua S. The influence of environmental conditions on secondary metabolites in medicinal plants: A literature review. *Chem Biodivers* [Internet]. 2021 [citado el 2 de agosto de 2023];18(11):e2100345. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34533273/>
48. Altemimi A, Lakhssassi N, Baharlouei A, Watson DG, Lightfoot DA. Phytochemicals: Extraction, isolation, and identification of bioactive compounds from plant extracts. *Plants* [Internet]. 2017 [citado el 2 de agosto de 2023];6(4). Disponible en: <http://dx.doi.org/10.3390/plants6040042>

49. Atanasov AG, Waltenberger B, Pferschy-Wenzig E-M, Linder T, Wawrosch C, Uhrin P, et al. Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review. *Biotechnol Adv* [Internet]. 2015 [citado el 2 de agosto de 2023];33(8):1582–614. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26281720/>
50. Arias-González I, García-Carrancá AM, Cornejo-Garrido J, Ordaz-Pichardo C. Cytotoxic effect of *Kalanchoe flammula* and induction of intrinsic mitochondrial apoptotic signaling in prostate cancer cells. *J Ethnopharmacol* [Internet]. 2018;222:133–47. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378874118301478>
51. Aykul S, Martinez-Hackert E. Determination of half-maximal inhibitory concentration using biosensor-based protein interaction analysis. *Anal Biochem* [Internet]. 2016 [citado el 2 de agosto de 2023];508:97–103. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27365221/>
52. Vang Mouritzen M, Jenssen H. Optimized scratch assay for in vitro testing of cell migration with an automated optical camera. *J Vis Exp* [Internet]. 2018 [citado el 2 de agosto de 2023];(138). Disponible en: <http://dx.doi.org/10.3791/57691>
53. Cheng M, Ye X, Dai J, Sun F. SOS1 promotes epithelial-mesenchymal transition of Epithelial Ovarian Cancer (EOC) cells through AKT independent NF- κ B signaling pathway. *Transl Oncol* [Internet]. 2021 [citado el 2 de agosto de 2023];14(9):101160. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34175715/>
54. Zhang L, Ren T, Wang Z, Wang R, Chang J. Comparative study of the binding of 3 flavonoids to the fat mass and obesity-associated protein by spectroscopy and molecular modeling. *J Mol Recognit* [Internet]. 2017 [citado el 2 de agosto de 2023];30(6). Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28058739/>
55. Stefanowicz-Hajduk J, Hering A, Gucwa M, Hałasa R, Soluch A, Kowalczyk M, et al. Biological activities of leaf extracts from selected *Kalanchoe* species and their relationship with bufadienolides content. *Pharm Biol* [Internet]. 2020 [citado el 2 de agosto de 2023];58(1):732–40. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1080/13880209.2020.1795208>
56. Xu W, Xie S, Chen X, Pan S, Qian H, Zhu X. Effects of quercetin on the efficacy of various chemotherapeutic drugs in cervical cancer cells. *Drug Des Devel Ther* [Internet]. 2021 [citado el 2 de agosto de 2023];15:577–88. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.2147/DDDT.S291865>
57. Kaneko-Kawano T, Suzuki K. Mechanical stress regulates gene expression via Rho/Rho-kinase signaling pathway. *J Phys Fit Sports Med* [Internet]. 2015;4(1):53–61. Disponible en: https://www.jstage.jst.go.jp/article/jpfs/4/1/4_53/_article

58. Xu Y, Ye S, Zhang N, Zheng S, Liu H, Zhou K, et al. The FTO/miR-181b-3p/ARL5B signaling pathway regulates cell migration and invasion in breast cancer. *Cancer Commun (Lond)* [Internet]. 2020;40(10):484–500. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1002/cac2.12075>

59. Alharbi KK, Syed R, Khan IA. Computational study on the interaction of flavonoids with fat mass and obesity associated protein. *J Environ Biol* [Internet]. 2015 [citado el 2 de agosto de 2023];36(2):419–24. Disponible en: <https://pub-med.ncbi.nlm.nih.gov/25895265/>

60. Gallo G. Kalanchoe [Internet]. Inecol.mx. [citado el 6 de agosto de 2023]. Disponible en: <https://www.inecol.mx/inecol/index.php/es/ct-menu-item-25/planta-del-mes/37-planta-del-mes/538-kalanchoe>