



**Universidad Autónoma de
Zacatecas**



“Francisco García Salinas”

Unidad Académica de Ciencias Químicas

Maestría en Ciencia y Tecnología Química

T E S I S

“Evaluación del efecto citotóxico y antitumoral del extracto de *Tagetes erecta* L. en modelos experimentales de carcinoma pulmonar de Lewis *in vitro* e *in vivo*”.

Para obtener el título de

Maestría en Ciencia y Tecnología Química

PRESENTA:

L.B.T. Alma Sarahi Cuellar González

DIRECTOR:

Dr. en C. Alberto Rafael Cervantes Villagrana

CO-DIRECTORA:

Dra. en C. Marisol Galván Valencia

ASESOR EXTERNO:

Dr. en C. Rodolfo Daniel Cervantes Villagrana

Zacatecas, Zac, enero de 2023

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma de Zacatecas por haber contribuido a mi formación a nivel posgrado. A CONACYT (CVU: 1084353) por el apoyo económico otorgado. A la Unidad Académica de Ciencias Químicas, así como a los docentes de la Maestría en Ciencia y Tecnología Química. Al Dr. Alberto Cervantes, mi director de tesis, a la Dra. Marisol Galván, codirectora de tesis y al Dr. Daniel Cervantes por sus asesorías y comentarios. A los evaluadores del proyecto, Dra. Blanca Lazalde, Dr. Guillermo Quiñones y Dra. Susana Godina, por ayudarme a mejorar con sus comentarios. A mis compañeros por su apoyo incondicional. Al equipo de trabajo que integra los Laboratorios de Inmunotoxicología y Terapéutica experimental y al Laboratorio de Neuropatología y Productos Naturales, al bioterio Claude Bernard, al M.C. Salvador García Cruz. Al taxónomo L.B. Hugo Noé Araiza Arvilla y al Dr. José Luis Moreno Duque, ambos de la Universidad Autónoma de Aguascalientes.

Contenido

1.- INTRODUCCIÓN.	10
2.- MARCO TEÓRICO.	12
2.1 CÁNCER DE PULMÓN.....	12
2.1.1 CÁNCER DE PULMÓN DE CÉLULAS NO PEQUEÑAS (CPCNP).....	14
2.1.2 EL CÁNCER DE PULMÓN DE CÉLULAS PEQUEÑAS (CPCP).....	14
2.2.- FARMACOLOGÍA ANTITUMORAL PARA CÁNCER DE PULMÓN DE CÉLULAS PEQUEÑAS.15	
2.3.- MEDICINA TRADICIONAL.....	16
2.4.- <i>Tagetes erecta</i>	17
2.4.1 MORFOLOGÍA Y CICLO DE VIDA.	17
2.4.2 USOS TRADICIONALES.	18
2.4.3 COMPONENTES BIOACTIVOS.	18
3.- ANTECEDENTES.	18
3.1 COMPUESTOS ACTIVOS REPORTADOS DE <i>TAGETES ERECTA</i>	18
3.2.- EFECTOS CITOTÓXICOS.	19
3.3.- MODELOS CANCERÍGENOS <i>IN VIVO</i>	20
3.4.- MECANISMOS DE CITOTOXICIDAD.....	21
4.-PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.	21
5.- JUSTIFICACIÓN.....	22
7.- HIPÓTESIS	23
8.- OBJETIVOS.	23
8.1 OBJETIVO GENERAL.....	23
8.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	23
9.- MATERIAL Y MÉTODOS.....	24
9.1- Extracción y fraccionamiento de plantas	24
9.1.1.- Extracto de flores	24
9.1.2.- Extracto de hojas.....	24
9.2.- Evaluación de la seguridad del extracto.....	24
9.2.1.- Bioensayo de toxicidad en <i>Artemia salina</i>	24
9.2.2.- Ensayo de citotoxicidad en línea celular no tumoral	25
9.3.- Evaluación citotóxica.....	25
9.3.1.- Líneas celulares y condiciones de cultivo	25
9.3.2- Ensayo de viabilidad celular.....	26

9.4- Ensayo de antiproliferación	26
9.5.- Evaluación tumoral <i>in vivo</i>	27
9.5.1.- Modelo animal	27
9.5.2.- Monitoreo del crecimiento tumoral.....	27
9.5.3.- Monitoreo de cambios en el peso corporal.	28
9.6.- Modelo <i>ex vivo</i>	28
9.6.1 Evaluación histopatológica de células mitóticas y áreas necróticas	28
9.7.- Caracterización fitoquímica	29
9.7.1.- Cromatografía de gases acoplado a masas (GS-MS).....	29
9.8- Análisis estadístico	29
10.- RESULTADOS.	30
10.1.- Identificación taxonómica de <i>Tagetes erecta</i>	30
10.2 Rendimiento de los extractos.	30
10.3.- Evaluación de la seguridad del extracto de TE.	31
10.3.1.- <i>Bioensayo en Artemia salina</i>	31
10.3.2.- Efecto citotóxico de TE en COS-1 (línea celular no tumoral).	31
10.4.- Evaluación del efecto citotóxico extracto de TE en líneas celulares tumorales.	32
10.4.1.- Evaluación del efecto citotóxico del extracto de flores y hojas de TE en LLC.	32
10.5.- Evaluación del efecto antiproliferativo del extracto de TE en LLC.	34
10.6.- Efecto de la administración del extracto de TE sobre la regresión tumoral en un modelo de inducción de carcinoma pulmonar de Lewis por xenoinjerto dorsal.	36
10.6.1.- Efecto de la administración de extracto de TE en la disminución del volumen tumoral.	36
10.6.2.- Cambios en el peso corporal.....	38
10.7- Evaluación histopatológica.	39
10.7.1. Efecto de la administración de extracto de TE sobre la proliferación tumoral.....	39
10.7.2.- Efecto de la administración de extracto de TE sobre la viabilidad tumoral.	41
10.8.- Caracterización fitoquímica del extracto de flores de TE.	44
11.- DISCUSIÓN	45
12.- CONCLUSIONES.	50
13.- PERSPECTIVAS.	50
14.- REFERENCIAS.	51
15.- ANEXOS.	60

Figura 1.- Tipos de cánceres más comunes en 2020 según GLOBOCAN (1).....	12
Figura 2.- Anatomía pulmonar y localización común de la mayoría de los tipos de cáncer de pulmón. (Imagen creada).....	13
Figura 3.- Histología característica del cáncer de pulmón (Modificado de eurocitology 2014). ...	14
Figura 4 Muestra prensada de Tagetes erecta usada para caracterización taxonómica.....	30
Figura 5.- Tumores representativos extraídos de ratones tratados y sin tratamiento.....	37
Figura 6.- Cortes de tumores teñidos con hematoxilina – eosina representativos extraídos de ratones tratados y sin tratamiento para la cuenta del número de mitosis.	40
Figura 7.- Cortes histológicos representativos de los diferentes tratamientos.	42
Figura 8.- Cromatograma del extracto de flores de Tagetes erecta.	44
Tabla 1.- Signos y síntomas del cáncer de pulmón de células pequeñas (15).....	14
Tabla 2.- Taxonomía de Tagetes erecta L. (24).....	17
Tabla 3.- Principales componentes fitoquímicos reportados en extractos de Tagetes erecta	19
Tabla 4 Rendimiento de los extractos de hojas y flores de TE.....	30
Tabla 5.- Compuestos encontrados en mayor proporción en el extracto de flores de TE.....	45
Gráfica 1.- Efectos tóxicos de los extractos de flores (F) y hojas (H) de Tagetes erecta en Artemia salina.-.....	31
Gráfica 2.- Efecto citotóxico del extracto hidroalcohólico de flores (F) y hojas (H) de Tagetes erecta en la línea celular no tumoral COS-1.	32
Gráfica 3.- Efecto citotóxico del extracto hidroalcohólico de flores (F) y hojas (H) de Tagetes erecta en la línea celular LLC.....	33
Gráfica 4.- Efecto citotóxico del extracto hidroalcohólico de flores (F) de Tagetes erecta y combinación del extracto con etopósido en la línea celular LLC.....	34
Gráfica 5.- El efecto antiproliferativo del extracto hidroalcohólico de flores (F) y hojas (H) de Tagetes erecta en la línea celular LLC.	35
Gráfica 6.- Efecto antiproliferativo del extracto de flores TE y combinación con etopósido en LLC.	36
Gráfica 7.- Crecimiento tumoral.	37
Gráfica 8.- Cambios en el peso corporal.	39
Gráfica 9.- Cuenta de mitosis en cortes histológicos tumorales.....	41
Gráfica 10.- Cuantificación del área necrótica en los cortes histológicos.	43

RESUMEN:

Introducción: El cáncer de pulmón es la enfermedad oncológica que presenta la mayor mortalidad a nivel mundial, cifras que han aumentado debido a la limitada disponibilidad de tratamientos terapéuticos eficaces. En los últimos años, la búsqueda de agentes antitumorales a partir de plantas empleadas en la medicina tradicional ha cobrado mayor importancia, al representar una amplia fuente de sustancias bioactivas. Una de estas especies, *Tagetes erecta*, es una planta de gran valor etnobotánico y cultural que, de acuerdo con recientes reportes, es capaz de inducir efectos citotóxicos sobre distintas líneas tumorales haciendo uso de sus extractos. Sin embargo, hay poca evidencia de la actividad antitumoral del extracto de *Tagetes erecta* en modelos experimentales de cáncer de pulmón.

Objetivo: Evaluar la actividad anticancerígena *in vitro* e *in vivo* del extracto de *Tagetes erecta* L. (TE) en un modelo de carcinoma pulmonar.

Metodología: Flores y hojas frescas de TE fueron maceradas con etanol hasta obtener extractos hidroalcohólicos sólidos y su caracterización fitoquímica se realizó mediante una cromatografía de gases acoplado a masas. Estos extractos fueron empleados en un bioensayo de toxicidad en *Artemia Salina*, evaluando distintas concentraciones (50 mg/ml, 5 mg/ml, 50 µg/ml, 5µg/ml, 50 ng/ml y 5 ng/ml) durante 24 horas. Además, se realizó un ensayo de citotoxicidad con colorante azul de tripán en las líneas celulares COS-1 (fibroblastos de riñón de mono) y LLC (carcinoma pulmonar de Lewis), evaluando también distintas concentraciones (5, 50 y 500 µg/ml) de ambos extractos durante 24 h. El efecto antiproliferativo se determinó mediante el ensayo de cristal violeta. El extracto con mayor citotoxicidad *in vitro* (EFTE) fue evaluado en el modelo animal de carcinoma pulmonar por xenoinjerto, donde se implantaron 1×10^6 células LLC en el dorso de ratones C57BL/6. A los 6 días post-implantación, se administraron por vía intraperitoneal los tratamientos correspondientes a cada grupo (Grupo 1: Sin tratamiento, Grupo 2: Etopósido 9 mg/Kg, Grupo 3: 400 mg/Kg/Día EFTE, Grupo 4: 9 mg/Kg de etopósido + 400 mg/Kg/ Día EFTE). Se midió el volumen tumoral durante 15 días en los ratones; posteriormente se realizó su

sacrificio y los tumores fueron removidos para su análisis histopatológico tras tinción con hematoxilina y eosina, llevando a cabo la evaluación microscópica de áreas necróticas y número de mitosis.

Resultados: Se obtuvieron rendimientos de 2.85% de extracto de hojas (EHTE) y 1.44% de extracto floral (EFTE). Los compuestos mayoritarios presentes en el extracto corresponden a 2,3-dihidro-benzofuran, ácido octadecanóico, ácido bencenacético, ácido oléico, ácido linoléico y ácido acético. Ningún extracto evidenció toxicidad en *Artemia salina*, ni en la línea celular no tumoral COS-1. Sin embargo, el extracto de flores generó el mayor efecto citotóxico en la línea celular LLC con un 60%, comparado con el extracto hojas (20 %). La combinación del extracto floral y etopósido disminuyó la proliferación celular en un 20% en la línea de carcinoma pulmonar de Lewis. En el modelo *in vivo*, la administración de extracto floral de TE redujo en 70% el volumen tumoral de los ratones implantados con células LLC, respecto al control. El análisis histopatológico mostró que la administración del extracto floral de TE disminuye la cuenta mitótica hasta 20 mitosis por campo y disminuye la viabilidad tumoral en un 45%, obteniéndose los mejores resultados cuando el extracto es combinado con etopósido.

Conclusión:

El extracto hidroalcohólico de flores y hojas de TE tienen efecto citotóxico en células de carcinoma de pulmón de Lewis. Además, muestran ser selectivos a líneas celulares cancerígenas. El presente estudio indica que el extracto de flores de TE inhibe la progresión tumoral y además incrementa su efectividad en combinación con etopósido. Los resultados contribuyen a la evidencia de que los compuestos bioactivos presentes en el extracto hidroalcohólico de TE poseen potencial terapéutico contra el cáncer de pulmón.

PALABRAS CLAVE:

Cáncer de pulmón, Tagetes erecta, Citotoxicidad, Extracto natural, Antitumoral.

ABSTRACT

Introduction: Lung cancer is the oncological disease with the highest mortality rate worldwide, numbers that have increased due to the limited availability of effective therapeutic treatments. In recent years, the search for antitumor agents from plants used in traditional medicine has become more important, as they represent a broad source of bioactive substances. One of these species, *Tagetes erecta*, is a plant of great ethnobotanical and cultural value that, according to recent reports, can induce cytotoxic effects on different tumor lines using its extracts. However, there is little evidence of the antitumor activity of *Tagetes erecta* extract in experimental models of lung cancer.

Aim of the study: To evaluate the *in vitro* and *in vivo* anticancer activity of *Tagetes erecta* extract (TE) in a lung carcinoma model.

Methodology: The fresh TE flowers and leaves were macerated with ethanol to obtain solid hydroalcoholic extracts and their phytochemical characterization was performed by mass coupled gas chromatography. These extracts were employed in a toxicity bioassay on *Artemia Salina*, evaluating different concentrations (50 mg/ml, 5 mg/ml, 50 µg/ml, 5µg/ml, 50 ng/ml and 5 ng/ml) for 24 hours. In addition, a cytotoxicity assay with trypan blue dye was performed on COS-1 (monkey kidney fibroblasts) and LLC (Lewis lung carcinoma) cell lines, evaluating also different concentrations (5, 50 and 500 µg/ml) of both extracts for 24 h. The antiproliferative effect was determined by crystal violet assay. The extract with the highest *in vitro* cytotoxicity (EFTE) was evaluated in the xenograft lung carcinoma animal model, where 1×10^6 LLC cells were implanted in the dorsum of C57BL/6 mice. At 6 days post-implantation, treatments corresponding to each group were administered intraperitoneally (Group 1: No treatment, Group 2: Etoposide 9 mg/kg, Group 3: 400 mg/kg/day EFTE, Group 4: 9 mg/kg etoposide + 400 mg/kg/day EFTE). Tumor volume was measured for 15 days in the mice; they were subsequently sacrificed, and the tumors were removed for histopathological analysis after staining with hematoxylin and eosin, carrying out microscopic evaluation of necrotic areas and number of mitoses.

Results: Yields of 2.85% of leaf extract (EHTE) and 1.44% of flower extract (EFTE) were obtained. The major compounds present in the extract were 2,3-dihydro-benzofuran, octadecanoic acid, benzenoacetic acid, oleic acid, linoleic acid, and acetic acid. None of the extracts showed toxicity in *Artemia salina*, nor in the non-tumor cell line COS-1. However, the flower extract generated the highest cytotoxic effect on the LLC cell line with 60%, compared to the leaf extract (20%). The combination of flower extract and etoposide decreased cell proliferation by 20% in the Lewis lung carcinoma cell line. In the in vivo model, the administration of TE flower extract reduced the tumor volume of mice implanted with LLC cells by 70% compared to the control. Histopathological analysis showed that the administration of TE flower extract decreased the mitotic count to at least 20 mitoses per field and decreased tumor viability by 45%, obtaining the best results when the extract was combined with etoposide.

Conclusion: The hydroalcoholic extract of TE flowers and leaves have a cytotoxic effect on Lewis lung carcinoma cells. In addition, they show to be selective to cancer cell lines. This study indicates that the TE flower extract inhibits tumor progression and increases its effectiveness in combination with etoposide. The results contribute to the evidence that the bioactive compounds present in the hydroalcoholic extract of TE have therapeutic potential against lung cancer.

KEY WORDS

Lung cancer, Tagetes erecta, Citotoxicity, Natural extract, Antitumor.

1.- INTRODUCCIÓN.

El cáncer es la principal causa de muerte a nivel mundial según las estimaciones realizadas en 2020 por GLOBOCAN (Global Cancer Observatory), que reporta un incidencia de 19.3 millones de casos nuevos, con una mortalidad de al menos 10 millones de decesos causados por esta patología (1). Existen diversas clasificaciones de cáncer, pudiendo desarrollarse en cualquier parte del cuerpo, aunque se puede destacar el cáncer de pulmón (CP) como la enfermedad oncológica más frecuente alrededor del mundo y la principal causa de mortalidad relacionada con neoplastias malignas (2). El CP ha evidenciado poseer mayor agresividad respecto a otros tipos de cáncer, por lo que actualmente es uno de los mayores retos en temas de salud pública, representando en México la segunda principal causa de muerte en varones y la cuarta en mujeres; se estima que el CP cobra la vida anualmente de más de 8 mil mexicanos, con una incidencia de aproximadamente 9 mil casos nuevos (3).

Aunque anteriormente los casos de CP se atribuían casi en su totalidad al tabaquismo, en las últimas décadas han surgido evidencias que demuestran que no es la única causa directa, a pesar de ser el factor de riesgo principal (4). Al menos el 25% de los casos de CP ocurre en pacientes no fumadores, patología atribuible a una etiología multifactorial dentro de la cual se han identificado: exposición ocupacional a agentes carcinogénicos, contaminación atmosférica, exposición a radiación y factores genéticos que predisponen el desarrollo de la enfermedad (5).

El cáncer de pulmón se define como el crecimiento anormal, rápido y desordenado de células en tejidos bronquiales y pulmonares (2). Existen dos categorías para clasificar el cáncer de pulmón, las cuales se diferencian de acuerdo con su origen y el tipo de células:

- **Cáncer pulmonar de células pequeñas (CPCP):** representa el 20% de los casos de cáncer pulmonar. Esta forma de CP tiene una tasa de proliferación más alta, es muy agresiva y tiende a producir metástasis con mayor rapidez respecto al cáncer de pulmón de células no pequeñas.

- **Cáncer pulmonar de células no pequeñas (CPCNP):** representa el 80% de todos los casos de cáncer pulmonar.

Además de la problemática mencionada respecto a la patogenia del cáncer de pulmón, esta patología también conlleva elevados costos económicos para las instituciones del sector salud, con un gasto promedio por paciente de 100 mil pesos anualmente (3).

La mayoría de los medicamentos disponibles en la actualidad para el tratamiento del cáncer pulmonar tienen un potencial terapéutico limitado debido a su alta toxicidad, su ineficiencia para detener el progreso de la enfermedad, y sus altos costos. Teniendo esto en cuenta, es necesario desarrollar nuevos tratamientos que puedan solventar tales desventajas. Por lo tanto, la identificación y obtención de nuevos agentes anticancerígenos eficientes sigue siendo una desafiante tarea de gran importancia para el tratamiento de este cáncer (6), donde distintas alternativas, como la búsqueda de agentes anticancerígenos a partir de plantas han ganado impulso en los últimos años, con los productos naturales cobrando una mayor relevancia dentro del ámbito farmacéutico (5).

Las plantas convencionales son una fuente valiosa de nuevos agentes citotóxicos y juegan un papel crítico en la salud, debido principalmente a su amplia gama de efectos farmacológicos de baja toxicidad (4).

La cempasúchil (*Tagetes erecta*) además de su valor cultural, es comúnmente usada en medicina tradicional, se le han atribuido propiedades para tratar la bronquitis, dolor reumático, enfermedades respiratorias (6), como anticancerígeno y para tratar problemas gineco-obstétricos (7); además se ha reportado que sus pétalos son una fuente importante de luteína, con concentraciones mucho mayores de este pigmento en comparación a otras especies vegetales, que desempeñan un papel biológico enorme como agentes quimiopreventivos que incluyen la mejoría de la función inmune, inhibición de la autooxidación de lípidos celulares, etc. (4). Diversos estudios señalan a *Tagetes erecta* L. (TE) como una planta con potencial quimiopreventivo y anticancerígeno (4-7).

2.- MARCO TEÓRICO.

2.1 CÁNCER DE PULMÓN.

Las cifras mundiales de cáncer continúan en aumento debido al envejecimiento y el crecimiento de la población, durante el año 2020 se registraron alrededor de 19.3 millones de casos de cáncer y 10 millones de decesos por cáncer (8).

El cáncer de pulmón es el más común en hombres y comprende el 17% del total de nuevos casos de cáncer y el 23% del total de muertes por esta enfermedad (2); el CP es uno de los más comúnmente diagnosticados en etapas avanzadas e incurables. Para estos pacientes, la radioterapia y la quimioterapia son las únicas alternativas de tratamiento (9).

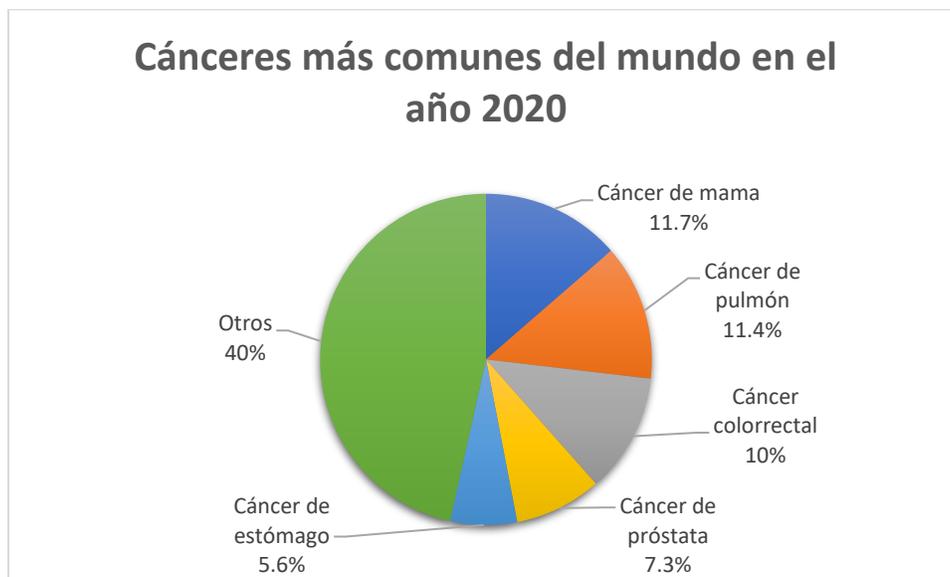


Figura 1.- Tipos de cánceres más comunes en 2020 según GLOBOCAN (1).

El principal factor de riesgo del cáncer de pulmón es el tabaquismo. Se estima que entre el 75% y el 80% de las muertes relacionadas con el cáncer de pulmón están relacionadas con este hábito (9).

Aproximadamente una tercera parte de los casos de CP entre pacientes no fumadores se puede atribuir al tabaquismo pasivo (9), sin embargo, la exposición a contaminantes como hidrocarburos aromáticos, cromo, níquel, asbesto y derivados de arsénico (10), además de la existencia de factores genéticos que predisponen al desarrollo de la enfermedad (11).

Una de las primeras pruebas utilizadas para evaluar a un paciente con sospecha de cáncer de pulmón es una radiografía de tórax. Los resultados pueden revelar una masa, agrandamiento de los ganglios linfáticos o colapso pulmonar. La tomografía computarizada de tórax también puede ayudar en la detección de anomalías físicas relacionadas con cáncer (9).

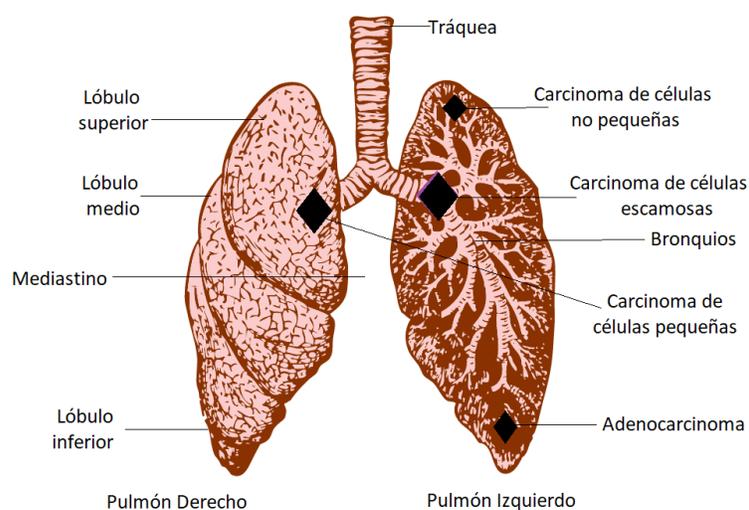


Figura 2.- Anatomía pulmonar y localización común de la mayoría de los tipos de cáncer de pulmón. (Imagen creada).

Existen dos tipos de cáncer de pulmón de acuerdo con su origen celular y a características morfológicas, de manera general, se pueden clasificar como cáncer de pulmón de células pequeñas (CPCP) y cáncer de pulmón de células no pequeñas (CPCNP) (2).

2.1.1 CÁNCER DE PULMÓN DE CÉLULAS NO PEQUEÑAS (CPCNP).

El cáncer de pulmón de células no pequeñas representa el 80% de los casos de carcinoma pulmonar (2), se divide a su vez en carcinomas de células grandes, adenocarcinomas y carcinomas de células escamosas(9).

2.1.2 EL CÁNCER DE PULMÓN DE CÉLULAS PEQUEÑAS (CPCP).

El carcinoma de pulmón de células pequeñas (CPCP) se define como "un tumor epitelial maligno formado por células pequeñas, con características como escaso citoplasma, cromatina nuclear granular, bordes celulares indefinidos, y nucléolos ausentes o poco visibles" (12).

Este tipo de cáncer representa casi el 20% de los cánceres de pulmón (13); el CPCP típico involucra solo células pequeñas y representa alrededor del 90% de los casos. El resto de los casos se clasifica como enfermedad combinada, en donde el tumor contiene componentes de células pequeñas y no pequeñas (12).

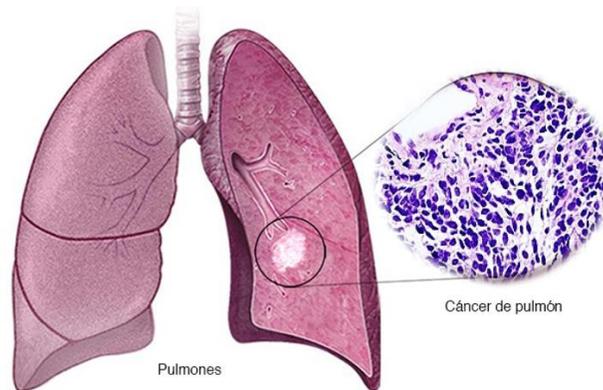


Figura 3.- Histología característica del cáncer de pulmón (Modificado de eurocitology 2014).

Tabla 1.- Signos y síntomas del cáncer de pulmón de células pequeñas (15).

Signos y sintomatología asociados con el crecimiento tumoral.
--

- | |
|---|
| <ul style="list-style-type: none">● Irritación y/o sensación de compresión en los bronquios.● Tos constante con o sin presencia de sangre. |
|---|

- Dificultad respiratoria general.

Signos y sintomatología asociados con la invasión tumoral.

- Ronquera y/o parálisis total/ parcial de las cuerdas vocales.
- Dificultad para tragar alimentos sólidos o líquidos.
- Dolor torácico.
- Síndrome de la vena cava superior.

2.2.- FARMACOLOGÍA ANTITUMORAL PARA CÁNCER DE PULMÓN DE CÉLULAS PEQUEÑAS.

Existen diferentes estrategias para el tratamiento del carcinoma pulmonar, entre los que se incluyen la radioterapia y quimioterapia. La selección del tratamiento depende directamente del estadio del cáncer y el estado de salud general del paciente. La detección temprana del CP suele ser difícil, debido a que, durante esta etapa los pacientes a menudo son asintomáticos y los síntomas que llegan a presentar son inespecíficos de la enfermedad, por lo que se llega al diagnóstico tardío y habitualmente es mediante hallazgos de anomalías en una radiografía torácica (16).

La identificación de mejores combinaciones farmacológicas ha sido el principal enfoque de múltiples investigaciones a lo largo de los últimos 30 años. El tratamiento a base de antraciclinas y su combinación con vincristina y ciclofosfamida, se convirtió en la terapia estándar durante la década de 1970, seguida de los tratamientos que contienen etopósido y los basados en cisplatino, convirtiéndose en el tratamiento de primera línea contra el CP durante la década de 1980, estos tratamientos siguen siendo usados en la actualidad. Sin embargo, con el tiempo han ido perdiendo su eficacia debido a fenómenos que inducen farmacoresistencia, lo que ha generado grandes retos entre la comunidad científica (12).

A raíz de la necesidad del desarrollo de nuevos agentes quimioterapéuticos, un foco de interés que ha tomado relevancia en los últimos años, ha sido el estudio de los productos naturales y otros remedios usados en la medicina tradicional, a los que, a lo largo del tiempo

se les han atribuido múltiples propiedades curativas, existe una gran cantidad de fármacos que se han sintetizado a partir de compuestos bioactivos presentes en plantas, los ejemplos más destacados son el etopósido cuyo origen fue encontrado en el Podófilo (*Podophyllum notatum* L.) (13) y el paclitaxel, que es un compuesto aislado y modificado de la corteza de un árbol comúnmente conocido como tejo del pacífico (*Taxus brevifolia* Nutt.) (14).

Este tipo de hallazgos, han sido un parteaguas para el estudio y aislamiento de compuestos derivados, en su mayor parte, de plantas usadas en medicina tradicional.

2.3.- MEDICINA TRADICIONAL.

La medicina tradicional, es un conglomerado de conocimientos ancestrales que han sido difundidos a través del tiempo mediante el aprendizaje, la observación y la experimentación (20). Con la llegada de la medicina alópata, los conocimientos ancestrales fueron desplazados, sin embargo, debido a la creciente demanda de medicamentos, éstos no han sido suficientes para atender los problemas de salud, además, de que la velocidad con la que se descubren y sintetizan los fármacos es lenta, por lo que un alto porcentaje de la población sigue haciendo uso auxiliar de plantas medicinales (21).

No fue hasta que la Organización Mundial de la Salud (OMS) lanzó un programa internacional de “Promoción de la medicina tradicional en los países en desarrollo” y a raíz de éste que surgieron grupos de investigación para el estudio de las plantas medicinales, esto marcó el surgimiento de la etnobotánica como un foco de interés científico relevante, que más adelante constituyó el fundamento y la primera etapa de investigación sobre los usos medicinales de las plantas (21).

En el área oncológica, los primeros fármacos fueron sintetizados a partir de especies vegetales a las que se les atribuyó tradicionalmente un efecto antitumoral, en México existen muchas plantas que gran parte de la población usa como remedio auxiliar en el tratamiento de sus padecimientos, la popularidad referente a estas plantas varía dependiendo de la zona y la abundancia en la que se encuentran naturalmente, ejemplos de esto son el orégano (*Origanum vulgare* L.) (22), ajeno (*Absinthium vulgare* Lam.) (23), la hierba del cáncer (*Cuphea aequipetala*) (24) y el cempasúchil (*Tagetes erecta* L.) (25).

2.4.- *Tagetes erecta*.

Tagetes erecta (TE) es una planta mesoamericana conocida en México como cempasúchil (26). Es cultivada principalmente para la celebración del del Día de Muertos, esta práctica tradicional ha favorecido su preservación en diferentes regiones de México (27).

Habita en climas cálidos, semicálidos, secos y templados (26), ha sido adaptada a distintos hábitats, es cultivada en huertos, milpas y zonas urbanas (27); en México se distribuye principalmente en los estados de Aguascalientes, Campeche, Colima, Ciudad de México, Guanajuato, Jalisco, Estado de México, Michoacán, Puebla, Querétaro, San Luis Potosí, Oaxaca, Veracruz y Zacatecas (7).

2.4.1 MORFOLOGÍA Y CICLO DE VIDA.

Es una especie anual, dicotiledónea que mide entre 60 cm y 1 m de altura. Sus tallos presentan ranuras y posee hojas opuestas con bordes aserrados (28). Se reproduce por medio de semillas y su periodo de floración es entre verano y otoño. TE fue descrita por primera vez por Carlos Linneo y publicado en *Species Plantarum* (**Tabla 2**).

Tabla 2.- Taxonomía de *Tagetes erecta* L. (24).

Reino	Plantae
Phylum o división	Tracheophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Asterales
Familia	Compositae
Género	Tagetes
Especie	Tagetes erecta
Nombre científico	<i>Tagetes erecta</i> L.

2.4.2 USOS TRADICIONALES.

Además de su valor cultural, se le atribuyen propiedades medicinales y tradicionalmente ha sido empleada como tratamiento para la bronquitis, dolor reumático, diabetes, problemas ginecobstétricos y también suele ser usada como auxiliar en el tratamiento del cáncer (7).

Además, diversos estudios han podido demostrar sus efectos antimicrobianos (29), antiparasitarios (30), larvicidas (31), antiinflamatorios (32) y antidiabéticos (36), también se le reconoce como agente hepatoprotector (32) y anticancerígeno (29).

2.4.3 COMPONENTES BIOACTIVOS.

El aceite esencial de cempasúchil contiene compuestos como el geraniol, linalol, limoneno, mentol, ocimeno, felandreno, α - y β -pineno, dipenteno, tagetonas y camferol. Las flores son ricas en carotenoides como la luteína, algunos de estos compuestos han sido reportados como agentes citotóxicos (35-40).

3.- ANTECEDENTES.

En años recientes el uso y estudio de productos realizados a base de plantas ha ido tomando relevancia, el género *Tagetes* ha llamado la atención por la numerosa cantidad de compuestos químicos que presenta, los cuales le confieren un espectro farmacológico amplio; son pocos los artículos reportados de *Tagetes erecta* L., quien es el representante más típico del género, sin embargo, los resultados existentes, la posicionan como prometedora en el tratamiento del cáncer.

3.1 COMPUESTOS ACTIVOS REPORTADOS DE *TAGETES ERECTA*.

Existen caracterizaciones de los compuestos activos encontrados en diferentes extractos de TE, identificados mediante técnicas como cromatografía de gases (GC), cromatografía de gases acoplado a masas (GC-MS) y resonancia magnética nuclear (RMN).

Algunos de los compuestos que se encuentran en *Tagetes erecta*, tienen propiedades relacionadas con el cáncer. En la **tabla 3** se muestran los compuestos mayoritarios presentes en diferentes extractos de TE.

Tabla 3.- Principales componentes fitoquímicos reportados en extractos de *Tagetes erecta*

Tipo de Extracto	Material vegetal	Compuestos	Referencia
Aceite esencial	Hoja	<ul style="list-style-type: none"> ◦ Limoneno ◦ (Z)-Tagetona ◦ (Z)-Ocimenona ◦ (E)-Ocimenona 	36
Metanólico	Flor	<ul style="list-style-type: none"> ◦ Ácido hexadecanoico ◦ 7-tetradecenal (Z) ◦ Nonaosana ◦ Tetra tetra contano ◦ Vitamina E ◦ Noroleano-12- Ene 	37
Aceite esencial	Flores	<ul style="list-style-type: none"> ◦ Limoneno ◦ (Z)-β-Ocimeno ◦ Terpinoleno ◦ (Z)-Ocimenona ◦ (E) – Ocimenona ◦ β-Cariofileno 	38
Acuoso	Hojas	<ul style="list-style-type: none"> ◦ Ácido hexadecanoico ◦ Ácido linoleico ◦ Ácido quínico ◦ Cumaran ◦ β-Sigmasterol 	39

3.2.- EFECTOS CITOTÓXICOS.

Existen reportes del efecto citotóxico de extractos de TE en diferentes líneas celulares tumorales, Oliveira y colaboradores evaluaron el aceite esencial de distintas plantas en 8 líneas celulares, donde se encontró que el aceite esencial de flores de TE tuvo efecto citotóxico en todas las líneas celulares evaluadas: B16F10 (melanoma murino), HT29

(carcinoma de colon humano), MCF-7 (adenocarcinoma de mama humano), HeLa (adenocarcinoma cervical humano), HepG2 (carcinoma de hígado hepatocelular humano), MO59J, U343 y U251 (glioblastoma humano) (25). Además, demostró un alto índice de selectividad hacia líneas celulares de melanoma, carcinoma de colon y adenocarcinoma cervical.

Por otra parte, se ha reportado que el extracto etanólico de la raíz de TE, tiene efecto citotóxico en las líneas celulares PC-3 (cáncer de próstata) y HeLa (adenocarcinoma cervical) (40), sin embargo, cuando se realizó un extracto etanólico de las flores de la planta y se evaluó en las líneas celulares H-460 (cáncer de pulmón) y Caco-2 (cáncer de colon) (41) no se reportó un efecto citotóxico significativo.

3.3.- MODELOS CANCERÍGENOS *IN VIVO*.

Durante el experimento realizado por Cui y colaboradores, se realizó una inducción química de cáncer gástrico en ratas wistar. Se encontró que la administración de aceite esencial de (400mg/Kg/día) de TE disminuye la apoptosis celular en los tejidos adyacentes a la formación del tumor, además de disminuir los niveles de estrés oxidativo y regular la respuesta antiinflamatoria, por lo que los autores concluyen que el uso de TE ejerce un efecto protector contra el cáncer gástrico y que puede ser útil para su tratamiento y prevención (42).

Por su parte el equipo de investigación de Barhoi y colaboradores, realizaron la evaluación *in vitro* e *in vivo* del extracto acuoso de hojas de *Tagetes erecta* (AETE), donde observaron que, de manera dependiente de la dosis, el extracto de TE indujo citotoxicidad en los cultivos celulares de HEP-2 (carcinoma epidermoide humano) y EAC (carcinoma de Ehrlich). Durante las evaluaciones *in vivo*, reportaron que la administración de AETE disminuyó el peso y volumen tumoral de manera dependiente de la dosis evitando la progresión tumoral, con resultados comparables a los de la mitomocina C, fármaco usado como referencia (43).

Cabe mencionar que en ninguno de los modelos *in vivo* fueron reportados signos de toxicidad en los ratones administrados con extracto de TE, por lo que se infiere que a las dosis evaluadas, el extracto de TE ejerce un efecto anticancerígeno sin producir daños en

otros órganos, por lo tanto, podría usarse para desarrollar un agente quimioterapéutico de administración segura en modelos preclínicos.

3.4.- MECANISMOS DE CITOTOXICIDAD.

Los extractos etanólicos y de acetato de etilo de TE inhiben la tirosinasa y elastasa en las líneas celulares H-460 (cáncer de pulmón) y Caco-2 (cáncer de colon); estas enzimas forman parte de funciones como el crecimiento y división celular, se sabe que están altamente activas en células cancerosas (41).

En otra investigación se tuvo como objetivo la determinación de los eventos moleculares involucrados en las propiedades anticancerígenas de la luteína extraída de pétalos de TE. Se evaluó en las líneas celulares HeLa (carcinoma cervical humano) y células MDCK como control. Los experimentos *in vitro* demostraron que la luteína inhibió la proliferación de células HeLa de manera dependiente de la dosis al inducir apoptosis. Las células HeLa tratadas con luteína también mostraron una mayor acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS), correlacionadas con una regulación negativa significativa de la expresión de proteínas antiapoptóticas (Bcl-2) y una regulación positiva de la expresión de proteínas proapoptóticas (Bax). Además, la luteína media la activación de la caspasa-3 y el desequilibrio entre la expresión de Bax y Bcl-2, lo que provoca una pérdida significativa del potencial de membrana mitocondrial de las células, provocando la muerte celular (44).

La evidencia anterior demuestra que el extracto de *Tagetes erecta* tiene efecto citotóxico en múltiples cánceres, sin embargo, hacen falta investigaciones más detalladas para dilucidar sus mecanismos de acción, además de diferentes modelos *in vivo* que permitan evidenciar el efecto antitumoral del extracto en diferentes tipos de cáncer, especialmente en aquellos de mayor mortalidad a nivel mundial, como es el cáncer de pulmón de células pequeñas.

4.-PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

En los últimos años se ha reportado un aumento significativo en los casos de cáncer a nivel mundial; el cáncer de pulmón continúa siendo la principal causa neoplásica de muerte en

el mundo y una de las enfermedades respiratorias que ocasionan mayor mortalidad (18). La mayoría de los tratamientos actualmente disponibles son costosos, invasivos y agresivos ya que dañan los tejidos sanos, además, los cánceres han ido desarrollando farmacorresistencia a los agentes antitumorales. Cada vez es más frecuente la reincidencia de cánceres y la administración de fármacos es ineficaz para salvar la vida del paciente, a pesar de las combinaciones para encontrar sinergismos farmacológicos. Por lo que, es una necesidad la búsqueda de nuevos compuestos activos y alternativas que ofrezcan menores efectos adversos, que sean de menor costo y con mayor especificidad contra los diferentes tipos de cáncer.

5.- JUSTIFICACIÓN.

El cáncer de pulmón de células pequeñas tiene una fuerte tendencia a regresar después de un lapso de remisión, generalmente esta reincidencia es más agresiva y los tratamientos administrados anteriormente pierden considerablemente su efectividad, debido a fenómenos como la farmacorresistencia, que limita la posibilidad de supervivencia del paciente, aunque se haga uso de terapias combinadas. A raíz de esto surge la necesidad de buscar nuevos agentes antineoplásicos, las plantas medicinales, carentes de validación científica se han convertido en un objetivo de interés científico para este propósito.

Numerosos estudios revelan el potencial terapéutico que ejercen distintos extractos naturales (5), *Tagetes erecta*, es una planta poco estudiada en la rama oncológica de su espectro farmacológico, sin embargo, existen evidencias históricas que la sugieren como auxiliar en el tratamiento de cáncer (43), además de estudios científicos que han revelado que esta planta posee efectos citotóxicos en líneas tumorales B16F10 (melanoma murino), HT29 (carcinoma de colon humano), MCF-7 (adenocarcinoma de mama humano), HeLa (adenocarcinoma cervical humano), HepG2 (carcinoma de hígado hepatocelular humano), MO59J, U343 y U251 (glioblastoma humano), PC-3 (cáncer de próstata humano), H-460 (cáncer de pulmón de células no pequeñas humano) y CaCo-2 (cáncer de colon humano) (25). Sin embargo, el extracto no ha sido evaluado en líneas celulares de carcinoma de pulmón de células pequeñas y al momento no han sido reportados *modelos in vivo* de

cáncer pulmonar; en el presente trabajo se estudió el efecto citotóxico del extracto hidroalcohólico de *Tagetes erecta* en células de carcinoma pulmonar de Lewis (LLC), además de evaluar el efecto antineoplásico en un modelo experimental de carcinoma pulmonar de Lewis en ratones de la cepa C57BL/6.

7.- HIPÓTESIS

El extracto hidroalcohólico de *Tagetes erecta* L. tienen efecto citotóxico en cultivo de células carcinoma pulmonar de Lewis y disminuyen el crecimiento tumoral en el modelo murino.

8.- OBJETIVOS.

8.1 OBJETIVO GENERAL.

- ❖ Evaluar la citotoxicidad del extracto de *Tagetes erecta* en cultivo de células de carcinoma pulmonar de Lewis *in vitro* y su efecto anti-tumoral en un modelo *in vivo*.

8.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

- 1) Obtener extractos hidroalcohólicos de flores y hojas de *Tagetes erecta*.
- 2) Evaluar la seguridad del extracto mediante el bioensayo de *Artemia salina* y una línea celular no tumoral.
- 3) Evaluar el efecto citotóxico *in vitro* de los extractos de *Tagetes erecta* en células de carcinoma de pulmonar de Lewis.
- 4) Evaluar el efecto antiproliferativo de los extractos de *Tagetes erecta*.
- 5) Evaluar el efecto antitumoral del extracto hidroalcohólico de *Tagetes erecta* con mayor efecto citotóxico en ratones de la cepa C57BL/6 implantados con células de carcinoma pulmonar de Lewis.
- 6) Evaluar las células mitóticas y áreas necróticas de los tumores extraídos de ratones tratados con el extracto de *Tagetes erecta* mediante técnicas histopatológicas.
- 7) Caracterizar mediante GS-MS el extracto que haya presentado mayor porcentaje de citotoxicidad en células LLC.

9.- MATERIAL Y MÉTODOS.

Los estudios experimentales fueron realizados en el Campus siglo XXI del Área de Ciencias de la Salud de la Universidad Autónoma de Zacatecas dentro de las instalaciones del laboratorio de Inmunotoxicología y Terapéutica experimental, Laboratorio de Neuropatología y extractos naturales y en el bioterio “*Claude Bernard*”.

9.1- Extracción y fraccionamiento de plantas

El material vegetal usado durante esta investigación fue cultivado en San Luis Potosí. Las plantas fueron caracterizadas por el taxónomo L.B. Hugo Noé Araiza Arvilla.

9.1.1.- Extracto de flores

Flores frescas de *Tagetes erecta* fueron licuadas con una mezcla de agua destilada y 40% de etanol. La mezcla se dejó macerar en un frasco a temperatura ambiente en oscuridad durante 5 días. Pasado este tiempo, el macerado se filtró, se colocó en un rotavapor hasta eliminar los restos de etanol del extracto y se liofilizó.

9.1.2.- Extracto de hojas

Hojas frescas de *Tagetes erecta* fueron licuadas con una mezcla de agua destilada y 25% de etanol. La mezcla se dejó macerar en un frasco a temperatura ambiente en oscuridad. Pasado este tiempo, el macerado se filtró, se colocó en un rotavapor hasta eliminar los restos de etanol del extracto, se añadió carbón activado, se filtró y se liofilizó.

El cálculo de los rendimientos se realizó mediante la siguiente formula:

$$\frac{\text{Peso final}}{\text{Peso inicial}} \times 100$$

Fórmula de Rendimiento

9.2.- Evaluación de la seguridad del extracto

9.2.1.- Bioensayo de toxicidad en *Artemia salina*

Se realizó el ensayo de toxicidad en *Artemia salina*. Este ensayo es útil para predecir actividades farmacológicas nocivas. Se utilizaron 250 mg de quistes de *Artemia salina*, incubados en 350 ml de agua con 34 g/L de salinidad, a temperatura ambiente con

iluminación. Los quistes fueron mantenidos en una suspensión con aireación ligera y continua durante 24 horas hasta su eclosión.

Los quistes eclosionados (nauplios) seleccionados para la prueba fueron sanos y sin malformaciones. Se usaron 10 nauplios por réplica, se usó solución salina 35 g/L como control negativo y estándar de quillaja como tóxico de referencia. Estos organismos son sensibles durante sus primeras 24- 36 horas de vida, tiempo durante el cual se agregaron una serie de concentraciones de extracto de flores y hojas TE (50 mg/ml, 5 mg/ml, 50 µg/ml, 5 µg/ml, 50 ng/ml y 5 ng/ml). Después se dejó correr el experimento durante 24 horas. para hacer un conteo de las Artemias muertas y vivas.

9.2.2.- Ensayo de citotoxicidad en línea celular no tumoral

Las células de fibroblastos de riñón de mono (COS-1, ATCC CRL-1650) fueron obtenidas de la organización American Type Culture Collection (ATCC) y expandidas en el Laboratorio de inmunotoxicología y terapéutica experimental de la Universidad Autónoma de Zacatecas.

Para evaluar la actividad citotóxica de los extractos de TE en una línea celular no tumoral (COS-1), se usó el ensayo de azul de tripán de la marca SIGMA-ALDRICH.

En una placa de 24 pozos se incubaron las células tratadas con 5 µg/ml, 50 µg/ml y 500 µg/ml durante 24 horas, posteriormente se tomaron 10 µl muestra y se mezclaron con 10 µl de azul de tripán, el resultante se colocó en una cámara de Neubauer para proceder a contar las células vivas y muertas bajo un microscopio óptico. El azul de tripán es un colorante que tiñe las células no viables con un tono azul, mientras que las células viables aparecen sin tinción y refringentes.

9.3.- Evaluación citotóxica

9.3.1.- Líneas celulares y condiciones de cultivo

Las células de carcinoma pulmonar de Lewis (LCC, ATCC CRL-1642) fueron obtenidas de la organización American Type Culture Collection (ATCC) y expandidas en el Laboratorio de inmunotoxicología y terapéutica experimental de la Universidad Autónoma de Zacatecas.

Se tomó y atemperó un vial que fue depositado en un tubo falcon con 4 ml de medio DMEM suplementado con 15% de suero new born y antibiótico (estreptomina-penicilina 100X), posteriormente se agitó por unos segundos y luego se centrifugó para tomar un volumen de 5 ml con medio DMEM suplementado y fue sembrado en un frasco de cultivo e incubado durante 48 horas a 37°C con 5% de CO₂.

Después de la adhesión de las células, se retiró el medio y se lavó con 2ml de PBS estéril. Luego se cambió la solución de lavado por tripsina (2ml/caja) y se incubó durante 5 minutos bajo las condiciones mencionadas anteriormente, para tomar la suspensión células con tripsina y se depositó en un frasco con 2ml de medio DMEM suplementado, posteriormente se agitó y centrifugó por 2 minutos a 1500 rpm para decantar el medio y cambiarlo por 3 ml de medio DMEM suplementado.

9.3.2- Ensayo de viabilidad celular

Para evaluar la actividad citotóxica de los extractos de TE LLC, se usó el ensayo de azul de tripán de la marca SIGMA-ALDRICH.

En una placa de 24 pozos se incubaron las células tratadas con con 5 µg/ml, 50 µg/ml y 500 µg/ml durante 24 horas, posteriormente se tomaron 10 µl muestra y se mezclaron con 10 µl de azul de tripán, el resultante se colocó en una cámara de Neubauer para proceder a contar las células vivas y muertas bajo un microscopio óptico.

El azul de tripán es un colorante que tiñe las células no viables con un tono azul, mientras que las células viables aparecen sin tinción y refringentes.

9.4- Ensayo de antiproliferación

Para evaluar la proliferación celular del carcinoma de Lewis, se usó el ensayo de cristal violeta de la marca SIGMA-ALDRICH. En una placa de 24 pozos se incubaron las células tratadas durante 24 horas, posteriormente se eliminó el medio de cultivo para separar las células no unidas, se lavó 3 veces la placa con PBS estéril, se fijó con metanol absoluto y se refrigeraron a 4°C por 20 minutos, después se añadieron 300 µl de solución de cristal violeta, se incubó durante 1 hora a 4 °C, posteriormente las células fueron lavadas con PBS estéril y se añadieron 300 µl de ácido acético como solución de solubilización, se añadieron

100 µl de cada pozo por triplicado en una placa de 96 pozos y se analizó en un lector de microplacas a una absorbancia de 600 nm.

9.5.- Evaluación tumoral *in vivo*

Todos los protocolos fueron adoptados por la norma de Producción, Cuidado y uso de animales de laboratorio NORMA Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999. Este proyecto de evaluación de extractos en modelos *in vivo* se desprende del proyecto aceptado (OF.NO.ACS/UAZ/023/2018).

9.5.1.- Modelo animal

Se usaron ratones C57BL /6 de ambos sexos, a partir de 45 días de edad con peso entre 25 y 30 g, mantenidos en condiciones de (22 ± 1) °C, en un ciclo de 12 horas de luz / 12 horas de oscuridad, con libre acceso a agua y comida. Fueron aclimatados durante una semana antes de su manejo.

Todos los ratones fueron implantados con células tumorales, 6 días posteriores a la implantación fueron utilizados 15 ratones, repartidos en los siguientes grupos experimentales:

- a) **Grupo control:** PBS estéril.
- b) **Control positivo:** administrados 3 veces a la semana con 9 mg/kg etopósido durante 15 días.
- c) **Grupo experimental:** administrados con 400mg/kg/día del extracto de flores de *Tagetes erecta*.
- d) **Grupo experimental de combinación de etopósido con extracto:** administrados con 9 mg/kg de etopósido 3 veces por semana y 400 mg/kg/ día de extracto.

9.5.2.- Monitoreo del crecimiento tumoral

Se realizó una implantación subcutánea de 1×10^6 células en el dorso del ratón utilizando una jeringa de 1ml ultradelgada. Se le dio seguimiento al volumen tumoral de todos los grupos experimentales a partir del día 5 posterior a la implantación con un vernier electrónico para calcular el volumen tumoral (V) mediante la fórmula de Attia y Weiss:

$$V = 0.4(\text{Diámetro largo} \times \text{Diámetro corto})$$

Fórmula de Volumen tumoral (Attia y Weiss) (42)

Los ratones portadores de tumores LLC se dividieron aleatoriamente entre los grupos experimentales anteriormente mencionados, fueron tratados y sacrificados después de 20 días de la implantación usando una cámara de CO₂, los tejidos tumorales se separaron en condiciones estériles.

9.5.3.- Monitoreo de cambios en el peso corporal.

Los ratones fueron pesados diariamente a partir del día de la implantación hasta el día del sacrificio, se reportaron los cambios en el peso corporal de cada uno.

9.6.- Modelo *ex vivo*

Fueron tomadas biopsias de los tumores extirpados, para posteriormente fijarlas en una solución de formol al 10%, las muestras fueron sumergidas durante un periodo de 48 horas en la solución para después embeber el tejido en parafina. Una vez obtenido el bloque de parafina se procedió a realizar cortes en el micrótopo, los cortes obtenidos se extendieron y adhirieron a portaobjetos, luego fueron depositados sobre la superficie del líquido contenido en un recipiente denominado “baño de flotación”. En el procedimiento de tinción se agregó hematoxilina-eosina, en esta tinción los núcleos se tiñen con la hematoxilina y después la eosina se encarga de colorear al citoplasma. Los núcleos se colorean de morado, mientras el citoplasma y material extracelular se tiñen de diversos tonos rosados.

9.6.1 Evaluación histopatológica de células mitóticas y áreas necróticas

Para el análisis de células mitóticas fueron tomados en cuenta 100 campos en el total de las muestras por grupo, se usó un microscopio óptico con aumento de 40X. Mientras que, para el análisis de áreas necróticas, se usó un microscopio invertido. En ambos análisis, las muestras fueron fotografiadas y analizadas con el programa Image J.

9.7.- Caracterización fitoquímica

9.7.1.- Cromatografía de gases acoplado a masas (GS-MS)

El extracto de flores de *Tagetes erecta* (EFTE) fue analizado mediante cromatografía de gases acoplado a masas (GS-MS), usando un equipo Agilent technologies 5975C VL MSD. La columna de sílica usada fue Agilent 19091s-433E HP5MS (30m x 0.25mm, espesor de película de 0.25 μ m). El gas usado fue Helio, con un flujo constante de 2.0 ml/min. El volumen de inyección manual fue de 0.1 μ l (Relación de separación: 33:4:1). Las temperaturas del inyector y la fuente de iones se establecieron a 260 °C.

El espectro de masas fue tomado en intervalos de 2.5min, el rango de masas fue de 30 a 500 Da. La fragmentación fue comparada con la librería del equipo (Adams, 2005).

9.8- Análisis estadístico

Las comparaciones en el modelo experimental *in vitro* de citotoxicidad y de proliferación se realizaron mediante un Análisis de varianza (ANOVA) de una vía con un postest de Dunnett's.

La comparación del volumen tumoral y cambios en el peso corporal entre los grupos evaluados en el modelo animal fue realizada mediante ANOVA de 2 vías de medidas repetidas con un postest de Sidak's.

La comparación de las áreas necróticas y de las células mitóticas de los cortes tumorales fueron realizadas mediante un Análisis de varianza (ANOVA) de una vía y un postest de Dunnett's.

Los resultados fueron expresados como media \pm la desviación estándar, donde se consideró diferencia estadísticamente significativa cuando los valores de $p < 0.05$.

10.- RESULTADOS.

10.1.- Identificación taxonómica de *Tagetes erecta*.

El material vegetal usado en esta investigación fue identificado por el taxónomo LB. Hugo Noé Araiza Arvilla, encargado del Jardín Botánico Nezahualcóyotl de la Universidad Autónoma de Aguascalientes (**ver Anexo 1**).



Figura 4 Muestra prensada de Tagetes erecta usada para caracterización taxonómica.

De acuerdo con la descripción taxonómica, se trata de la especie *Tagetes erecta*, perteneciente al género *Tagetes* de la familia Astereaceae.

10.2 Rendimiento de los extractos.

Se obtuvieron 2.96 g de extracto liofilizado obtenido de 103.7 g de hojas de TE y 6.30 g de extracto liofilizado de 435.54 g de flores de TE. Los rendimientos se muestran en la siguiente tabla:

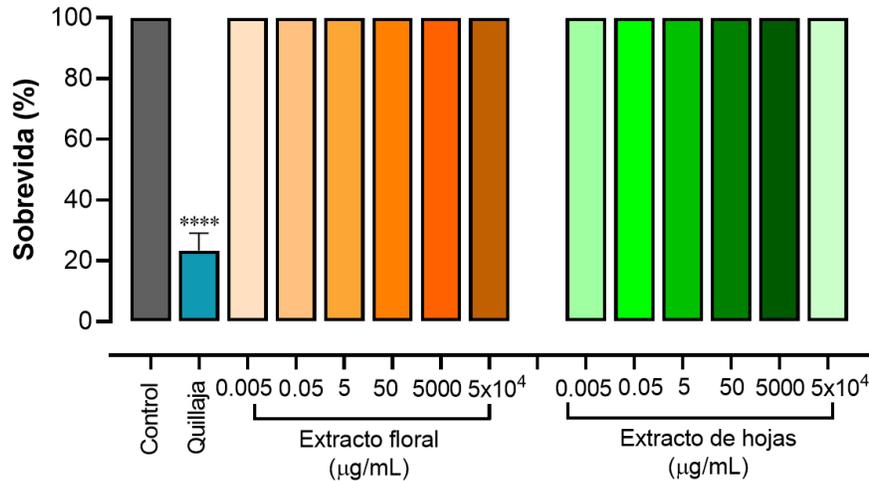
Tabla 4 Rendimiento de los extractos de hojas y flores de TE.

Extracto	Rendimiento
Hojas	2.85%

Flores	1.44%
--------	-------

10.3.- Evaluación de la seguridad del extracto de TE.

10.3.1.- Bioensayo en *Artemia salina*.



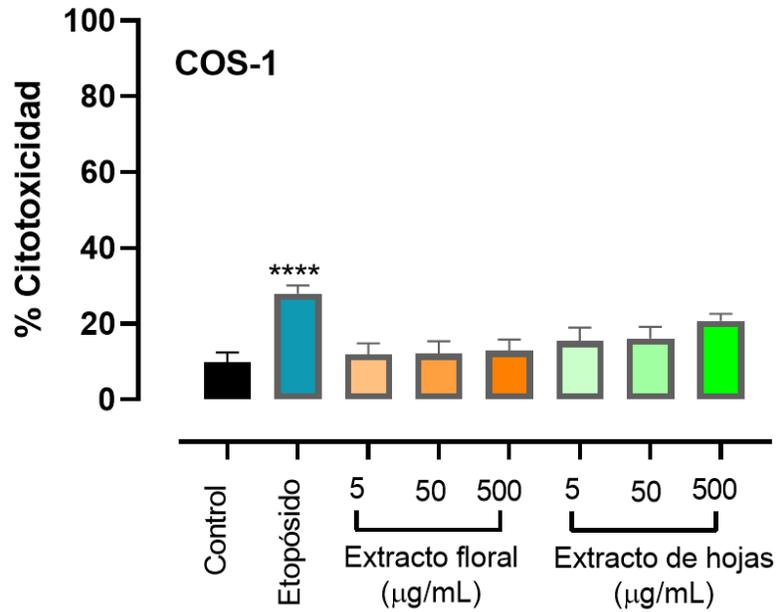
Gráfica 1.- Efectos tóxicos de los extractos de flores (F) y hojas (H) de *Tagetes erecta* en *Artemia salina*.-

Se usaron concentraciones de 50 mg/ml, 5 mg/ml, 50 µg/ml, 5 µg/ml, 50 ng/ml y 5 ng/ml de extracto hidroalcohólico de flores (F) y hojas (H), con 10 nauplios de *Artemia salina* por tubo y se calculó el porcentaje de sobrevivencia. Usando como control solución salina 35 g/L y como control de toxicidad estándar de quillaja. Se usó un análisis de varianza de una vía con un posttest de Dunnett's. Los resultados se consideran estadísticamente significativos cuando $p < 0.05$, las significancias señaladas fueron comparadas con el grupo control $p = 0.05^*$, $p = 0.01^{**}$, $p = 0.001^{***}$, $p = 0.0001^{****}$. Las barras de error indican la desviación estándar de 3 experimentos independientes.

Los extractos evaluados en este experimento no mostraron efecto tóxico, pues se obtuvo el 100 % de sobrevivencia en todas las concentraciones evaluadas, lo que indica que ninguno de los extractos tiene un efecto tóxico en organismos sanos.

10.3.2.- Efecto citotóxico de TE en COS-1 (línea celular no tumoral).

Se evaluaron los extractos de TE en la línea celular COS-1 (fibroblastos de riñón de mono), con el fin de verificar si el extracto tiene efecto citotóxico en células no tumorales.



Gráfica 2.- Efecto citotóxico del extracto hidroalcohólico de flores (F) y hojas (H) de *Tagetes erecta* en la línea celular no tumoral COS-1.

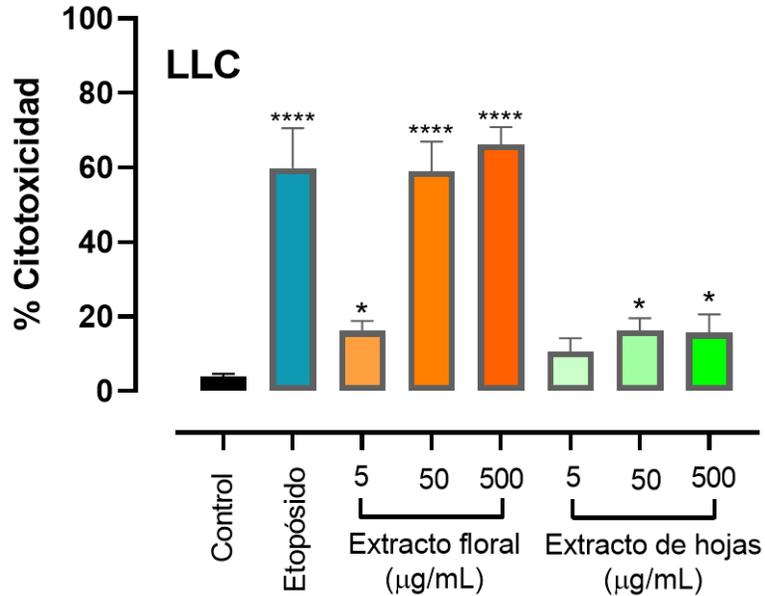
Como control se usó DMEM suplementado, como control positivo se usó etopósido 50mM. Se evaluaron diferentes concentraciones de extractos de TE después de 24 horas de tratamiento usando el método de azul de tripán. Se usó un análisis de varianza de una vía con un postest de Dunnett's, los resultados se consideran estadísticamente significativos cuando $p < 0.05$, las significancias señaladas fueron comparadas con el grupo control $p = 0.05^*$, $p = 0.01^{**}$, $p = 0.001^{***}$, $p = 0.0001^{****}$. Las barras de error indican la desviación estándar de 3 experimentos independientes por triplicado. Los resultados están expresados como porcentaje de citotoxicidad.

Después de 24 horas de tratamiento con las concentraciones evaluadas de extracto de flores y hojas de TE, no se observa efecto citotóxico, lo que indica que el extracto tiene una menor toxicidad en células no tumorales.

10.4.- Evaluación del efecto citotóxico extracto de TE en líneas celulares tumorales.

10.4.1.- Evaluación del efecto citotóxico del extracto de flores y hojas de TE en LLC.

Se evaluó la viabilidad celular en la línea LLC mediante el método de azul de tripán. Se evaluaron ambos extractos con la finalidad de compararlos y seleccionar el que obtuviera mayor efecto citotóxico.



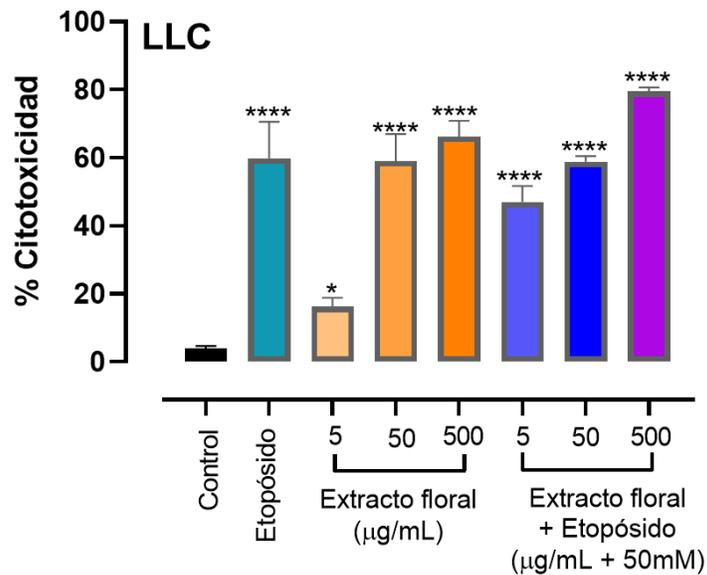
Gráfica 3.- Efecto citotóxico del extracto hidroalcohólico de flores (F) y hojas (H) de *Tagetes erecta* en la línea celular LLC.

Como control se usó DMEM suplementado, como control positivo se usó etopósido 50mM. Se evaluaron diferentes concentraciones del extracto de TE después de 24 horas de tratamiento usando el método de azul de tripán. Se usó un análisis de varianza de una vía con un posttest de Dunnett's, los resultados se consideran estadísticamente significativos cuando $p < 0.05$, las significancias señaladas fueron comparadas con el grupo control $p = 0.05^*$, $p = 0.01^{**}$, $p = 0.001^{***}$, $p = 0.0001^{****}$. Las barras de error indican la desviación estándar de 3 experimentos independientes por triplicado. Los resultados están expresados como porcentaje de citotoxicidad.

El extracto con mayor efecto citotóxico en LLC fue el floral con respecto al de hojas. El efecto citotóxico del extracto de flores se presenta a partir de la concentración de 5 µg/ml, incrementando de manera dependiente de la dosis. A una concentración de 50 µg/ml muestra un efecto comparable con el etopósido (60 % de mortalidad), sin embargo, la concentración de 500 µg/ml mantiene un efecto similar al inducido con 50 µg/ml.

El extracto de hojas a concentraciones de 50 µg/ml y 500 µg/ml genera el 20 % de citotoxicidad. Por lo que su uso fue descartado para evaluaciones posteriores en esta línea celular.

Además, se combinó la concentración de etopósido usada como control positivo (50 mM) y las concentraciones evaluadas de extracto de flores, con la finalidad de observar el comportamiento del extracto en combinación con etopósido.



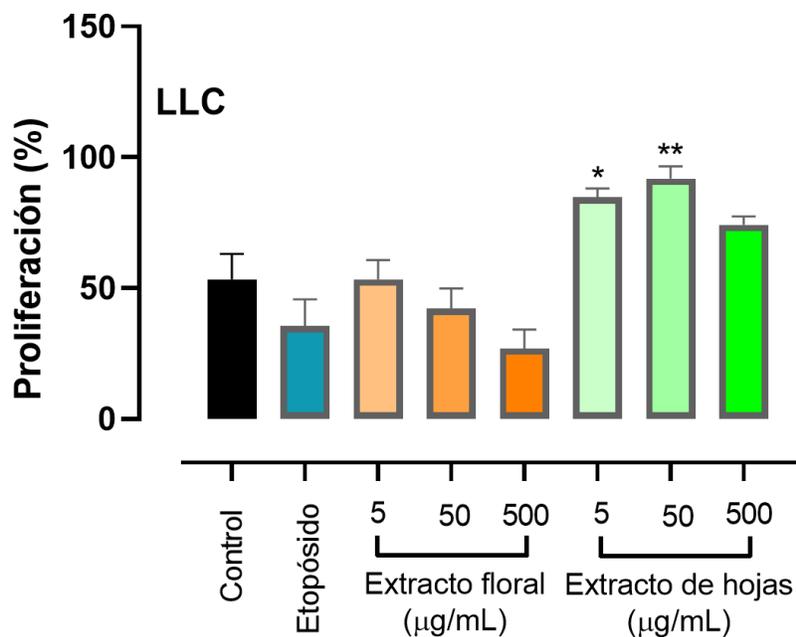
Gráfica 4.- Efecto citotóxico del extracto hidroalcohólico de flores (F) de *Tagetes erecta* y combinación del extracto con etopósido en la línea celular LLC.

Como control se usó DMEM suplementado, como control positivo se usó etopósido 50mM. Se evaluaron diferentes concentraciones de extractos de TE después de 24 horas de tratamiento usando el método de azul de tripán. Se usó un análisis de varianza de una vía con un postest de Dunnett's, los resultados se consideran estadísticamente significativos cuando $p < 0.05$, las significancias señaladas fueron comparadas con el grupo control $p = 0.05^*$, $p = 0.01^{**}$, $p = 0.001^{***}$, $p = 0.0001^{****}$. Las barras de error indican la desviación estándar de 3 experimentos independientes por triplicado. Los resultados están expresados como porcentaje de citotoxicidad.

Se encontró un efecto aditivo al usar etopósido 50 mM con 500 µg/ml de extracto, el efecto citotóxico aumenta en aproximadamente el 20 %, comparado con el uso exclusivo de etopósido llegando a un 80 % de citotoxicidad. A partir de estos datos, se contempló la integración de un grupo experimental donde se evaluará la combinación del etopósido con el extracto durante el modelo *in vivo*.

10.5.- Evaluación del efecto antiproliferativo del extracto de TE en LLC.

En la **gráfica 6**, se observa que el extracto floral no mostró disminución significativa en la proliferación celular, sin embargo, se puede observar una tendencia a disminuir la proliferación a partir de la concentración de 500 µg/ml. El extracto de hojas ejerce un aumento significativo en la proliferación celular respecto al control sin tratamiento.

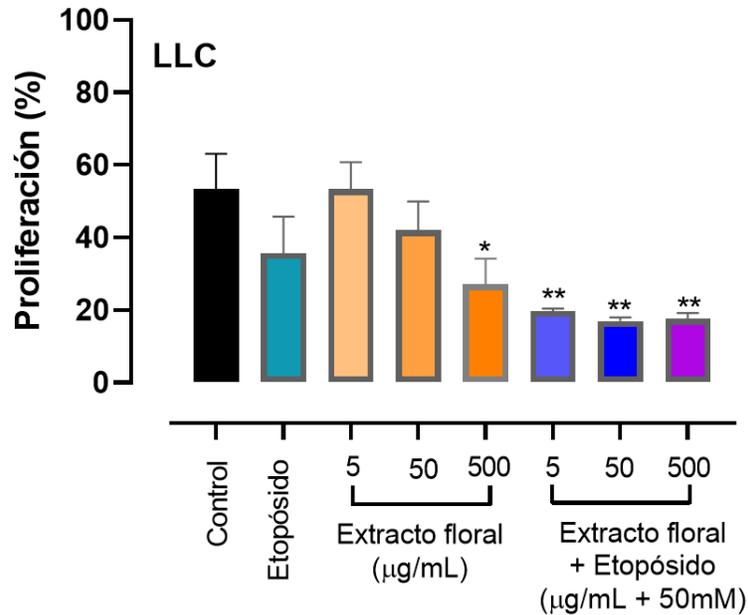


Gráfica 5.- El efecto antiproliferativo del extracto hidroalcohólico de flores (F) y hojas (H) de Tagetes erecta en la línea celular LLC.

Como control se usó DMEM suplementado, como control positivo se usó etopósido 50mM. Se evaluaron diferentes concentraciones de extractos de TE después de 24 horas de tratamiento usando el método de cristal violeta. Se usó un análisis de varianza de una vía con un postest de Dunnett's, los resultados se consideran estadísticamente significativos cuando $p < 0.05$, las significancias señaladas fueron comparadas con el grupo control $p = 0.05^*$, $p = 0.01^{**}$, $p = 0.001^{***}$, $p = 0.0001^{****}$. Las barras de error indican la desviación estándar de 3 experimentos independientes por triplicado. Los resultados están expresados como porcentaje de proliferación celular.

Debido a la tendencia que presentan tanto el etopósido como la concentración más alta de extracto floral de TE, se evaluó la combinación del fármaco de referencia y el extracto floral.

Al combinar el extracto con etopósido 50mM, disminuye la proliferación celular al 20%.



Gráfica 6.- Efecto antiproliferativo del extracto de flores TE y combinación con etopósido en LLC.

Como control se usó DMEM suplementado, como control positivo se usó etopósido 50mM. Se evaluaron diferentes concentraciones del extracto de TE después de 24 horas de tratamiento usando el método de cristal violeta. Se usó un análisis de varianza de una vía con un postest de Dunnett's, los resultados se consideran estadísticamente significativos cuando $p < 0.05$, las significancias señaladas fueron comparadas con el grupo control $p = 0.05^*$, $p = 0.01^{**}$, $p = 0.001^{***}$, $p = 0.0001^{****}$. Las barras de error indican la desviación estándar de 3 experimentos independientes por triplicado. Los resultados están expresados como porcentaje de proliferación celular.

10.6.- Efecto de la administración del extracto de TE sobre la regresión tumoral en un modelo de inducción de carcinoma pulmonar de Lewis por xenoinjerto dorsal.

10.6.1.- Efecto de la administración de extracto de TE en la disminución del volumen tumoral.

En la figura 5 se muestran los tumores representativos extraídos de cada grupo experimental. La disminución del volumen tumoral de cada tratamiento se muestra en la gráfica 8.

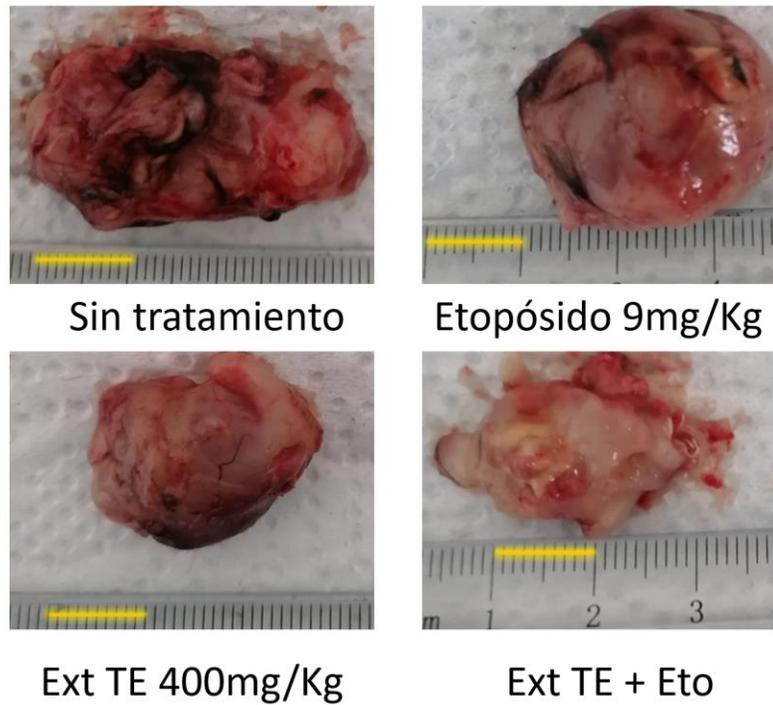
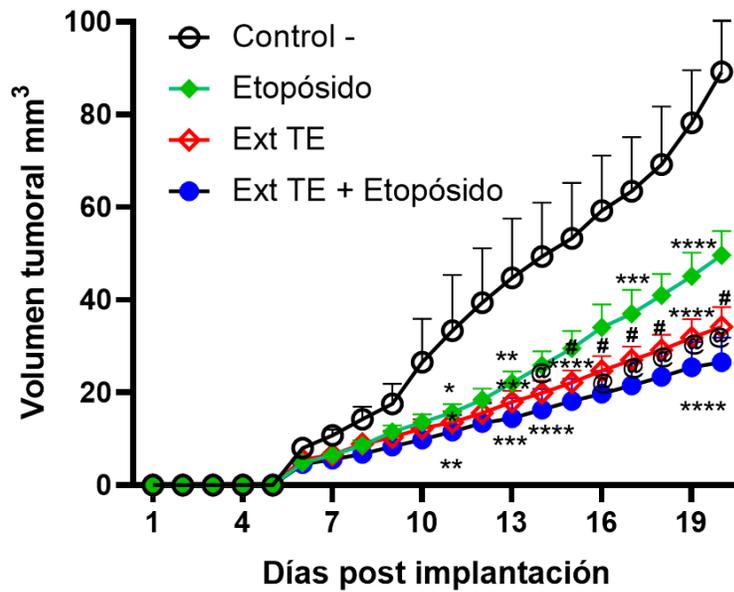


Figura 5.- Tumores representativos extraídos de ratones tratados y sin tratamiento.



Gráfica 7.- Crecimiento tumoral.

Se implantaron células tumorales en el dorso de los ratones, cuando el tumor fue visible (5 días), se separaron en los grupos experimentales y se midió el crecimiento. Se calculó el volumen tumoral en mm³ con la fórmula de Attia-Weiss, se graficó el número de veces que se incrementó el tamaño tumoral con respecto al primer día de tratamiento. Se usó ANOVA de dos vías, con post test de Sidak's los resultados se consideran estadísticamente significativos cuando p<0.05, las

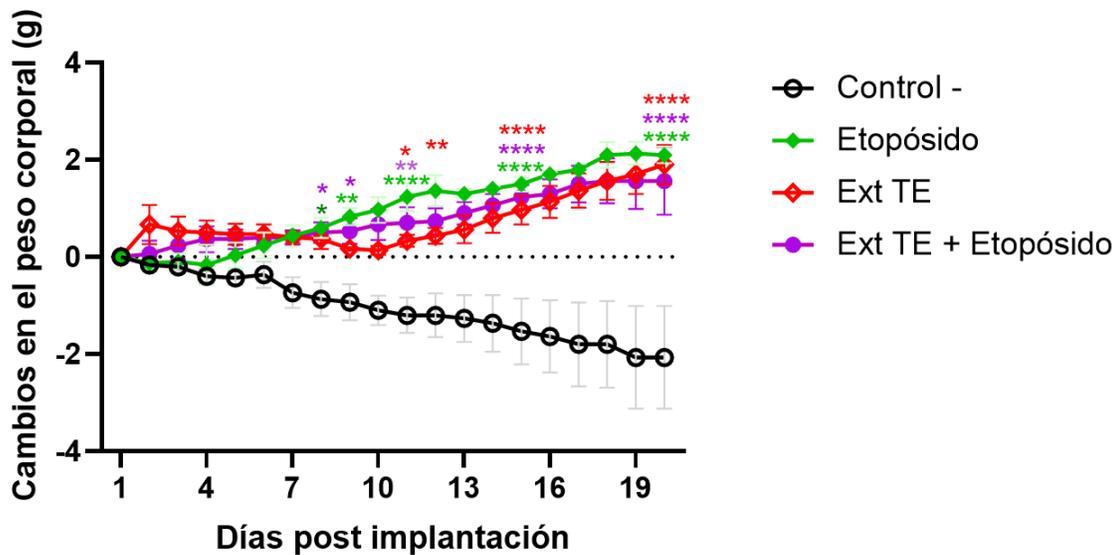
significancias señaladas (*) fueron comparadas con el grupo control $p= 0.05^*$, $p=0.01^{**}$, $p=0.001^{***}$, $p=0.0001^{****}$. Las significancias entre el grupo experimental de etopósido y extracto están representadas por (#) $p= 0.05 \#$, $p=0.01 \##$, $p=0.001 \###$, $p=0.0001 \####$. Las diferencias entre el grupo experimental de etopósido y extracto + etopósido están representadas por (@) $p= 0.05@$, $p=0.01@@$, $p=0.001@@@$, $p=0.0001@@@@$. Las barras de error indican la desviación estándar de una $n=15$ divididos en los cuatro grupos de experimentación. Los resultados se expresan en mm^3 .

Los tumores fueron visibles a partir del día 6 post implantación, como se observa en la gráfica 8, fueron creciendo conforme pasaron los días. A partir del día 11 post implantación (día 6 de tratamiento) se comienzan a ver diferencias significativas en los grupos tratados, cuya significancia respecto al grupo control, aumenta conforme transcurren los días de tratamiento.

Al final del tratamiento (día 20 post implantación) se observa que en los grupos tratados hubo una disminución del volumen tumoral, se puede observar que existen diferencias significativas entre el grupo tratado con etopósido y el grupo tratado con extracto de TE, esto indica que la administración del extracto de TE tiene una capacidad mayor para retardar el crecimiento tumoral respecto al etopósido. Además, el grupo de combinación (Ext TE + Etopósido), también tuvo resultados similares a los del extracto, incluso se puede observar una ligera tendencia a disminuir el volumen tumoral respecto al grupo tratado con TE, lo que indica que los compuestos presentes en el extracto incrementan el efecto antitumoral inducido por etopósido.

10.6.2.- Cambios en el peso corporal.

Se dio seguimiento a los cambios en el peso corporal de los animales, con el fin de observar la integridad y salud de estos, fueron pesados diariamente desde el día de la implantación, hasta el día del sacrificio. Se obtuvo la siguiente gráfica, donde se observa una drástica disminución en el peso del grupo control, mientras que en los grupos tratados no solo se mantuvo el peso durante los primeros días, sino que incrementó a lo largo del experimento.



Gráfica 8.- Cambios en el peso corporal.

Se registraron los cambios en el peso desde el día 1 post implantación. Se graficó el cambio de peso con respecto al primer día de tratamiento, expresado en gramos. Se usó ANOVA de dos vías, con post test de Sidak's, los resultados se consideran estadísticamente significativos cuando $p < 0.05$, las significancias señaladas (*) fueron comparadas con el grupo control $p = 0.05^*$, $p = 0.01^{**}$, $p = 0.001^{***}$, $p = 0.0001^{****}$. Las barras de error indican la desviación estándar de una $n = 15$ divididos en los cuatro grupos de experimentación. Los resultados están expresados en gramos.

Los resultados fueron significativos a partir del día 8 post implantación, y la ganancia de peso es evidente a partir del día 10 en los grupos con tratamiento a excepción del grupo control.

10.7- Evaluación histopatológica.

De los cortes histológicos teñidos en laminillas, se realizó la cuenta del número de células en mitosis para analizar el efecto de los tratamientos en la proliferación celular de los tumores y la cuantificación de áreas necróticas para poder evaluar el efecto de los tratamientos en la viabilidad tumoral, que se refiere a las células activas y en desarrollo que pueden dañar el tejido sano.

10.7.1. Efecto de la administración de extracto de TE sobre la proliferación tumoral.

La cuenta de mitosis tiene una relación directamente proporcional a la proliferación tumoral. En la siguiente ilustración se puede observar señalado con flechas amarillas las

mitosis encontradas en campos representativos de los tumores extraídos de ratones tratados y sin tratamiento.

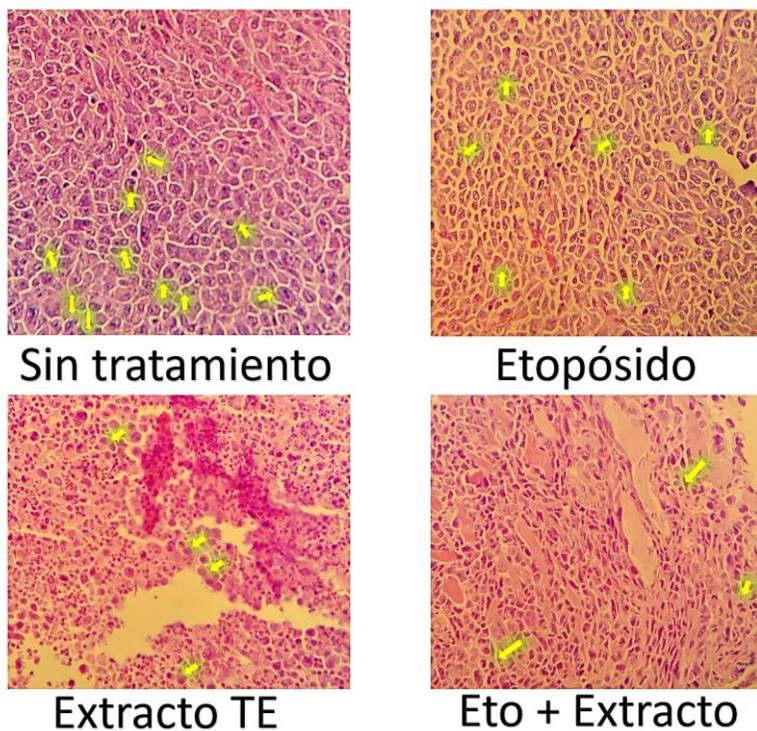
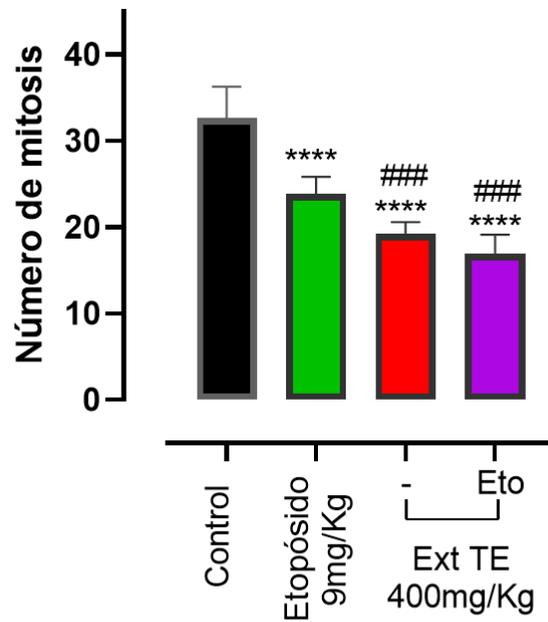


Figura 6.- Cortes de tumores teñidos con hematoxilina – eosina representativos extraídos de ratones tratados y sin tratamiento para la cuenta del número de mitosis.

Todos los cortes tumorales en microtomo con espesor de 4 μ m, teñidos con hematoxilina - eosina fueron observados en un microscopio óptico con un aumento de 40X. Cada flecha señala que se está llevando a cabo una mitosis. Se tomaron en cuenta 100 campos por muestra.



Gráfica 9.- Cuenta de mitosis en cortes histológicos tumorales.

En los cortes en microtomo con espesor de 4µm, teñidos con hematoxilina-eosina, se contó el número de mitosis observadas en 100 campos en un aumento de 40X. El análisis estadístico se realizó por medio de ANOVA de una vía con post test de Dunnett's, los resultados se consideran estadísticamente significativos cuando $p < 0.05$, las significancias señaladas (*) fueron comparadas con el grupo control las significancias señaladas (*) fueron comparadas con el grupo control $p = 0.05^*$, $p = 0.01^{**}$, $p = 0.001^{***}$, $p = 0.0001^{****}$. Las significancias señaladas (#) fueron comparadas con el grupo experimental de etoposido $p = 0.05 \#$, $p = 0.01 \##$, $p = 0.001 \###$, $p = 0.0001 \####$. Las barras de error indican la desviación estándar de una $n = 15$ divididos en los cuatro grupos de experimentación. Los resultados están expresados en número de mitosis.

En los tumores extraídos de ratones tratados, disminuyó de manera significativa el número de mitosis en los campos respecto al grupo control, así mismo, se observa que en los grupos tratados con extracto de TE disminuye la proliferación celular de manera significativa en comparación al etoposido.

10.7.2.- Efecto de la administración de extracto de TE sobre la viabilidad tumoral.

Los cortes histológicos teñidos, fueron observados en un microscopio invertido, donde se tomaron fotografías de 50 campos por muestra, estas imágenes fueron analizadas con el programa Image J para poder cuantificar las áreas necróticas de los tumores.

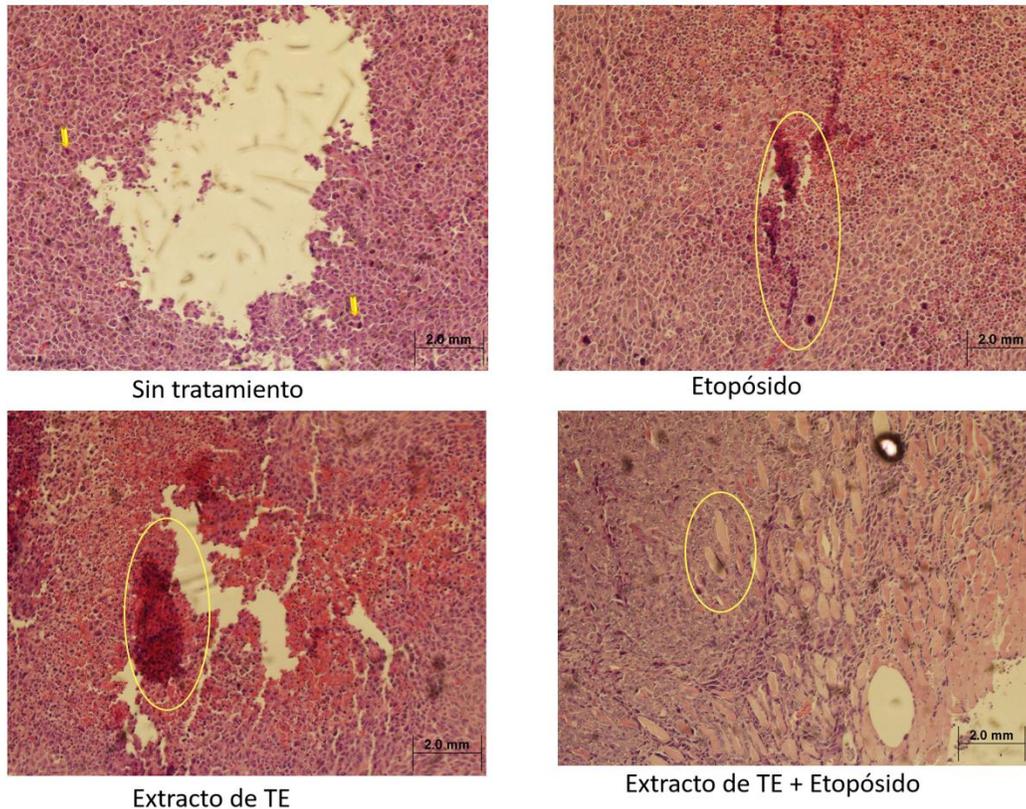


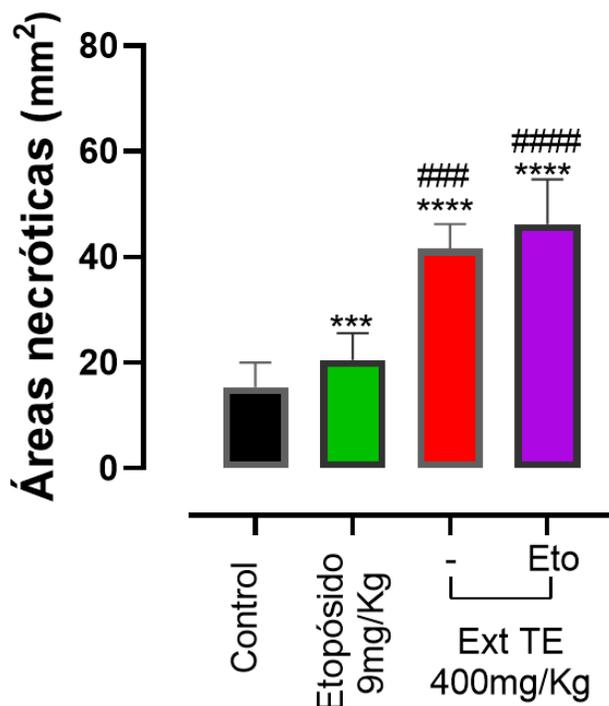
Figura 7.- Cortes histológicos representativos de los diferentes tratamientos.

Se analizaron los cortes tumorales en microtomo con espesor de 4 μ m, teñidos con hematoxilina – eosina, de ratones tratados y sin tratamiento. Las imágenes se obtuvieron de un microscopio invertido con un aumento de 40X. Las áreas necróticas fueron cuantificadas en el programa Image J. Fueron analizados 50 campos por muestra.

En la **figura 7** se señalan las áreas necróticas más representativas de cada grupo tratado. La tinción de hematoxilina – eosina tiñe de tonalidades rojizas el citoplasma, mientras que los núcleos permanecen teñidos con tonalidades moradas. En la imagen del corte extraído de un ratón sin tratamiento, se pueden observar una gran cantidad de núcleos, las flechas amarillas señalan células en división. Mientras que en los grupos tratados se observan tonalidades más rojizas, esto debido a que, al momento de morir, las células liberan líquido citoplasmático teñido de rojo al medio.

La imagen del extracto + etopósido, no se observan tonalidades rojizas, sin embargo, lo que se identifica en la imagen como área necrótica son los llamados focos de licuefacción, característicos de la necrosis licuefactiva, donde el tejido se transforma en una especie de

masa viscosa líquida o en círculos donde las células afectadas fueron digeridas completamente por enzimas. Los resultados fueron cuantificados mediante el programa Image J y se muestran en la siguiente gráfica:



Gráfica 10.- Cuantificación del área necrótica en los cortes histológicos.

En los cortes tumorales en microtomo con espesor de 4µm, teñidos con hematoxilina-eosina, se analizaron 50 campos por muestra en un microscopio invertido 40X, usando el programa Image J, para cuantificar las áreas de necrosis en los tumores. Se analizó por medio de ANOVA de una vía con post test de Dunnett's, los resultados se consideran estadísticamente significativos cuando $p < 0.05$, las significancias señaladas (*) fueron comparadas con el grupo control las significancias señaladas (#) fueron comparadas con el grupo experimental de etoposido $p = 0.05$ #, $p = 0.01$ ##, $p = 0.001$ ###, $p = 0.0001$ ####. Las barras de error indican la desviación estándar de una $n = 15$ divididos en los cuatro grupos de experimentación. Los resultados están expresados en número de mitosis. Las barras de error indican la desviación estándar de una $n = 15$ repartidos entre los cuatro grupos experimentales. El resultado está representado como mm^2 .

Las áreas necróticas de los tumores aumentaron significativamente en los grupos evaluados, los grupos tratados con extracto tuvieron un aumento superior a 40 mm^2 , en comparación al etoposido, que obtuvo 20 mm^2 de áreas necróticas, hay diferencias significativas entre los grupos tratados con extracto, por lo que inferimos que la viabilidad

tumoral de los ratones que recibieron tratamiento con *Tagetes erecta* es menor en comparación a los ratones tratados únicamente con etopósido.

10.8.- Caracterización fitoquímica del extracto de flores de TE.

Para identificar los compuestos químicos presentes en el extracto floral de TE, se realizó una cromatografía de gases acoplado a masas (GS-MS).

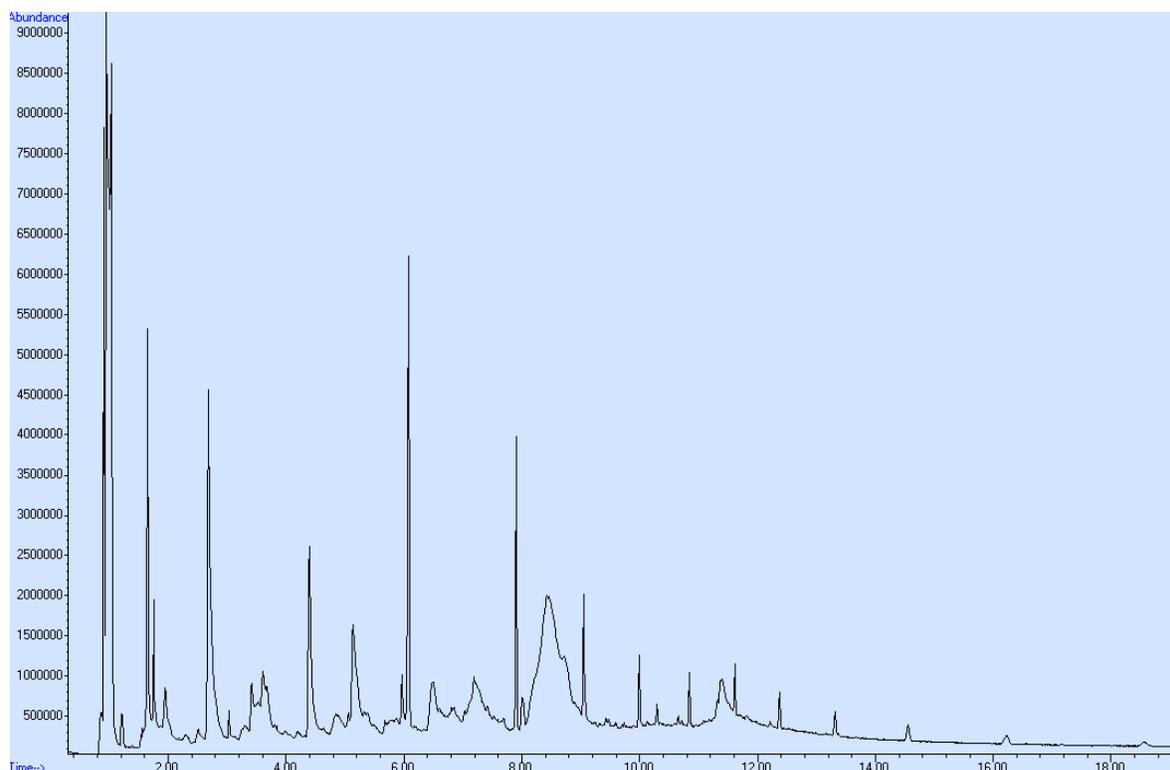


Figura 8.- Cromatograma del extracto de flores de Tagetes erecta.

El cromatograma que dio un total de 102 picos, sin embargo, para la realización de la tabla 6, únicamente fueron tomados en cuenta los compuestos encontrados en mayor proporción dentro del extracto (> 5 %) y aquellos que tuvieran una similitud igual o superior al 90 % en comparación con los compuestos de la librería del equipo (Adams, 2005). Los compuestos con mayor presencia en el extracto son 2,3- Dihidro-benzofuran, Ácido octadecanóico, Ácido benzenacético, Ácido oléico, Ácido linoléico y Ácido acético.

Tabla 5.- Compuestos encontrados en mayor proporción en el extracto de flores de TE

Pico	Tiempo de retención	%Área	Compuesto	Efecto	Referencia
96	12.94	21.13	2,3- Dihidro-benzofuran (cumarán)	Propiedades anticancerígenas reportadas	46
95	12.218	15.32	Ácido octadecanóico		
60	8.004	12.1	Ácido bencenacético	Sus derivados muestran inhibición del crecimiento celular en 6 líneas celulares tumorales diferentes además de actividad antiproliferativa.	47
81	10.349	11.23	Ácido oléico	Inhibidor de la telomerasa	48
102	12.89	11.2	Ácido linoléico	Anticarcinogénico	49
3	0.949	9.49	Ácido acético	Función preventiva contra el cáncer	50
61	8.431	6.96	Metil β-D- galactopiranosida		
18	2.683	6.61	Ácido n – butírico	Tratamiento de cáncer colorrectal	51
62	8.717	6.34	Metil β 1- arabinopiranosida		
100	12.67	5.79	Ácido n-hexadecanóico	Inhibe la proliferación y metástasis en cáncer de próstata	52

11.- DISCUSIÓN

En los últimos años se ha reportado un incremento en los casos de cáncer de pulmón, uno de los más agresivos debido a que tiene la capacidad de reincidir tras un lapso de remisión. En el presente proyecto se evaluaron inicialmente dos extractos de TE en carcinoma pulmonar de Lewis, donde nuestros resultados mostraron que el extracto hidroalcohólico de flores (EFTE) mostró mayor eficacia en esta línea tumoral. Sin embargo, estudios realizados por Oliveira y colaboradores (25), donde evaluaron el aceite esencial de TE en 5

líneas celulares tumorales, se obtuvo mayor efecto citotóxico en adenocarcinomas y melanomas, cuyo origen celular corresponde a un fenotipo carcinogénico similar a las células LLC utilizadas en nuestros modelos experimentales. Además, Oliveira y colaboradores, evaluaron una línea celular no tumoral V79 (fibroblastos de pulmón de hámster) como control de citotoxicidad, los resultados no mostraron daño celular. Por otra parte, Gansukh y colaboradores (44) demostraron que el extracto de TE evaluado en la línea celular no tumoral MDCK (Hígado canino Madin – Darby) no generó efecto citotóxico. Estos datos coinciden con el resultado obtenido por nuestro grupo de investigación en la línea celular no tumoral COS-1, estos datos sugieren que los componentes presentes en los extractos de TE son selectivos contra células cancerígenas.

Durante nuestra investigación se observó que la combinación de etopósido con extracto de TE disminuyó la proliferación celular en LLC, hay evidencia que en eventos carcinogénicos las vías de señalización que controlan la proliferación se encuentran afectadas (59). Las evaluaciones realizadas por Vallisuta y colaboradores (41) muestran que la administración de extracto etanólico de TE inhibe la telomerasa en la línea celular H-460 (cáncer de pulmón), la actividad de esta enzima está estrechamente asociada con la proliferación celular (59).

Se evaluaron, además, una serie de concentraciones de ambos extractos en el organismo *Artemia salina* y no fueron observados indicios de toxicidad en los nauplios incluso añadiendo concentraciones altas de extracto. No existen reportes que evalúen algún extracto de TE en *Artemia salina*, pero es importante mencionar que existe un modelo murino de toxicidad reportado por Cui y colaboradores (42) en el que administraron por vía oral una dosis de 400 mg/kg de aceite esencial de TE en ratas y no fueron observados signos de toxicidad. Por lo que en conjunto podemos deducir que la administración del extracto de TE es seguro en modelos preclínicos.

Actualmente existen dos reportes de modelos murinos de cáncer en el que se administran extractos de TE. Cui y colaboradores (42) evaluaron la administración de aceite esencial de TE en un modelo agudo de cáncer gástrico inducido químicamente y encontraron que el

extracto revierte el daño inducido por el cáncer y evita la metástasis en otros órganos por lo que concluyen que la administración del aceite esencial de TE puede ser usado para la prevención y tratamiento del cáncer gástrico (42). Además, Barhoi y colaboradores (43) realizaron un modelo similar al de esta investigación (Xenoinjerto de células tumorales), en el que implantaron células de carcinoma de Ehrlich (EAC) en ratones albinos y evaluaron el extracto acuoso de hojas de TE. Se reportó que la administración de TE mantiene y aumenta el peso de los ratones (43), al igual que en nuestro modelo, además se reportó una disminución del tamaño de los tumores extraídos, lo que coincide con los resultados de esta investigación, donde en los grupos administrados con extracto de TE disminuye el volumen tumoral, por lo tanto, el tratamiento con TE retarda el crecimiento y desarrollo de los tumores.

En los tumores extraídos de ratones administrados con extracto de TE, disminuyó la cuenta de mitosis, lo que está estrechamente asociado con una disminución en la proliferación celular y explica la disminución en el volumen tumoral (55). En los cortes extraídos de ratones tratados con TE, se logra ver un aumento significativo de las áreas necróticas o áreas de tumor no viables. Las áreas de tumor viables se refieren al área de células en desarrollo que pueden dañar e invadir el tejido sano (56). La proliferación de células en tumores sólidos genera gradientes de concentración de nutrientes, oxígeno y catabolitos. Estas condiciones, combinadas con las interacciones celulares, afectan los perfiles de expresión de genes y proteínas, así como la distribución y penetración de fármacos, lo que resulta en una respuesta deficiente al tratamiento (57). Por lo que, al existir un decremento en la viabilidad tumoral, disminuye también la capacidad de invasión de los tumores y su resistencia al tratamiento.

Encontramos que los grupos tratados con *Tagetes erecta* disminuyen la viabilidad y proliferación celular, llegando a obtener diferencias significativas incluso contra el etopósido. Otro hallazgo que destacar es que la combinación de etopósido con TE, presenta mejores resultados, por lo que se infiere que la administración simultánea de estos tratamientos tiene efectos aditivos. Estos datos son de relevancia clínica, ya que en algunos casos la administración de productos naturales puede llegar a inhibir el efecto del fármaco,

debido a que alguno o algunos de los compuestos presentes pueden competir por el sitio de acción, se ha reportado que los remedios naturales podrían afectar la disposición de los productos farmacéuticos convencionales a través de la inhibición de las enzimas del citocromo P-450 (58).

Con el fin de caracterizar fitoquímicamente el extracto y poder comparar los compuestos presentes con los reportados en extractos obtenidos por otros grupos de investigación, se realizó una cromatografía de gases acoplado a masas, donde encontramos que, a pesar de ser diferentes métodos de extracción, la descripción fitoquímica del extracto realizado por Barhoi y colaboradores (38) tiene compuestos presentes en el extracto usado para esta investigación, estos compuestos son el ácido hexadecanoico, ácido linoleico y 2,3-dihidrobenzofuran (Cumarán). Muchos de los compuestos mayoritarios tienen actividades relacionadas con el tratamiento del cáncer, han sido compuestos que de manera aislada tienen diversos efectos, desde preventivos como es el caso del ácido acético, capaz de inhibir la generación de oxalacetato (50), hasta la descripción de mecanismos como la inhibición de enzimas altamente activas en células cancerígenas, como el ácido oleico que tiene la propiedad de inhibir la telomerasa, cuyo papel es crucial en la inmortalización celular del cáncer (48). El extracto de raíces de TE es capaz de inhibir enzimas como la elastasa y tirosinasa en células de cáncer de próstata y pulmón (41), se sabe que estas enzimas son responsables de la transducción de señales de adhesión y migración en células tumorales.

Además, algunos de estos compuestos se encuentran en otras especies vegetales que cuentan con actividades anticancerígenas, como es el caso del cumarón (2,3-Dihidrobenzofuran), que tiene actividad anticancerígena en tumores de próstata, renales, mama, laríngeo, pulmón, colon, leucemia y melanoma maligno (46), se sabe que derivados de algunos ácidos encontrados, tienen efectos inhibitorios en la proliferación celular y disminuye la metástasis en otros tipos de cáncer, el ácido palmítico fue estudiado por Zhu y colaboradores, pues encontraron que en cáncer de próstata el tratamiento con ácido palmítico indujo la detención de la fase G1 del ciclo celular, además, se encontró que puede inhibir la metástasis de células de cáncer de próstata (52).

Se ha demostrado que el ácido n- butírico, presente en nuestro extracto es capaz de inhibir la proliferación celular en cáncer colorrectal. Además, evaluaciones realizadas por Forte y colaboradores (47) evalúan derivados del ácido bencenacético en 6 líneas celulares tumorales, donde se encontró que ejerce efecto citotóxico. La suma de estos y más compuestos presentes en el extracto le confieren el efecto antitumoral observado, debido a que cada compuesto puede participar con mecanismos de acción diferentes contra las células tumorales. Cabe mencionar que existen compuestos presentes en el extracto, de los cuales no existen reportes de actividades relacionadas con el cáncer, como es el caso de los compuestos mayoritarios ácido octadecanóico, metil β -D- galactopiranosida, metil β -1- arabinopiranosida, por lo que se pretende en futuras investigaciones su aislamiento y estudio individual.

Las evaluaciones realizadas demuestran el potencial citotóxico y anticancerígeno que tiene el extracto de flores de *Tagetes erecta* contra el carcinoma pulmonar de Lewis.

12.- CONCLUSIONES.

Los extractos hidroalcohólicos de flores y hojas de TE tienen efecto citotóxico en células de carcinoma de pulmón de Lewis. Además, muestran ser selectivos a líneas celulares cancerígenas. El presente estudio indica que el extracto de flores de TE inhibe la progresión tumoral y además incrementa su efectividad en combinación con etopósido. Los resultados contribuyen a la evidencia de que los compuestos bioactivos presentes en el extracto hidroalcohólico de TE tienen potencial terapéutico contra el cáncer de pulmón.

13.- PERSPECTIVAS.

1. Evaluar el extracto de TE en distintas líneas celulares tumorales.
2. Evaluar la combinación del extracto de TE con otros antitumorales como paclitaxel, vincristina, topotecan y cisplatino utilizados en el tratamiento de carcinoma pulmonar a nivel clínico.
3. Evaluar por citometría de flujo el efecto del extracto de TE en el ciclo celular de la línea LLC.
4. Evaluar de forma independiente los compuestos mayoritarios presentes en el extracto en células de carcinoma de pulmonar de Lewis.
5. Describir los mecanismos de acción de los compuestos aislados encontrados en el extracto de TE.

14.- REFERENCIAS.

1. World Health Organization International Agency for Research on Cancer (IARC). GLOBOCAN 2012: estimated cancer incidence, mortality and prevalence worldwide in 2020; 2020 [cited 2021 Apr 23]. Available from: http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx.
2. Didkowska, J., Wojciechowska, U., Mańczuk, M., & Łobaszewski, J. (2016). Lung cancer epidemiology: contemporary and future challenges worldwide. In *Annals of Translational Medicine* (Vol. 4, Issue 8, pp. 150–150). AME Publishing Company. <https://doi.org/10.21037/atm.2016.03.11>
3. Rascón-Pacheco RA, González-León M, Arroyave-Loaiza MG, Borja-Aburto VH. Incidencia, mortalidad y costos de la atención por cáncer de pulmón en el Instituto Mexicano del Seguro Social. *Salud Publica Mex.* 7 de junio de 2019;61(3, may-jun):257-64. Disponible en: <https://saludpublica.mx/index.php/spm/article/view/9808>
4. Nancy Reynoso Noverón, Juan Alejandro Torres-Domínguez. (2017). Epidemiología del cáncer en México: Carga Global Y Proyecciones 2000-2020. *Revista Latinoamericana de Medicina Conductual*, 8:1, 9-16.
5. Ruíz-Godoy, L., Rizo Rios, P., Sánchez Cervantes, F., Osornio-Vargas, A., García-Cuellar, C., & Meneses García, A. (2007). Mortality due to lung cancer in Mexico. In *Lung Cancer* (Vol. 58, Issue 2, pp. 184–190). Elsevier BV. <https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2007.06.007>
6. Shafi G, Hasan TN, Syed NA, Al-Hazzani AA, Alshatwi AA, Jyothi A, Munshi A. Artemisia absinthium (AA): a novel potential complementary and alternative medicine for breast cancer. *Mol Biol Rep.* 2012 Jul;39(7):7373-9. doi: 10.1007/s11033-012-1569-0. Epub 2012 Feb 5. PMID: 22311047.
7. Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana. Biblioteca Nacional de la medicina tradicional Mexicana UNAM. [Online].; 2009 [cited 2021 Febrero. Available from:

<http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/apmtm/termino.php?l=3&t=tagetes-erecta>.

8. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin*. 2011 Mar-Apr;61(2):69-90. doi: 10.3322/caac.20107. Epub 2011 Feb 4. Erratum in: *CA Cancer J Clin*. 2011 Mar-Apr;61(2):134. PMID: 21296855.
9. Robert J. Cersosimo, Pharm.D., BCOP, Lung cancer: A review, *American Journal of Health-System Pharmacy*, Volume 59, Issue 7, 1 April 2002, Pages 611–642, <https://doi.org/10.1093/ajhp/59.7.611>
10. Subramanian J, Govindan R. Lung cancer in never smokers: a review. *J Clin Oncol*. 2007 Feb 10;25(5):561-70. doi: 10.1200/JCO.2006.06.8015. PMID: 17290066.
11. Bailey-Wilson JE, Amos CI, Pinney SM, Petersen GM, de Andrade M, Wiest JS, Fain P, Schwartz AG, You M, Franklin W, Klein C, Gazdar A, Rothschild H, Mandal D, Coons T, Slusser J, Lee J, Gaba C, Kupert E, Perez A, Zhou X, Zeng D, Liu Q, Zhang Q, Seminara D, Minna J, Anderson MW. A major lung cancer susceptibility locus maps to chromosome 6q23-25. *Am J Hum Genet*. 2004 Sep;75(3):460-74. doi: 10.1086/423857. Epub 2004 Jul 21. PMID: 15272417; PMCID: PMC1182024.
12. Jan P van Meerbeeck, Dean A Fennell, Dirk KM De Ruyscher, Small-cell lung cancer, *The Lancet*, Volume 378, Issue 9804, 2011, Pages 1741-1755, [/doi.org/10.1016/S0140-6736\(11\)60165-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(11)60165-7).
13. Mandrile, Eloy L., Bongiorno de Pfirter, Graciela 1984. (1984). Etopósido. Septiembre 2021, de SEDICI. Sitio web: <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/7382>
14. Weaver, B. A. (2014). How Taxol/paclitaxel kills cancer cells. In W. Bement (Ed.), *Molecular Biology of the Cell* (Vol. 25, Issue 18, pp. 2677–2681). American Society for Cell Biology (ASCB). <https://doi.org/10.1091/mbc.e14-04-0916>
15. Subramanian J, Govindan R. Lung cancer in never smokers: a review. *J Clin Oncol*. 2007 Feb 10;25(5):561-70. doi: 10.1200/JCO.2006.06.8015. PMID: 17290066.

16. Bailey-Wilson JE, Amos CI, Pinney SM, Petersen GM, de Andrade M, Wiest JS, Fain P, Schwartz AG, You M, Franklin W, Klein C, Gazdar A, Rothschild H, Mandal D, Coons T, Slusser J, Lee J, Gaba C, Kupert E, Perez A, Zhou X, Zeng D, Liu Q, Zhang Q, Seminara D, Minna J, Anderson MW. A major lung cancer susceptibility locus maps to chromosome 6q23-25. *Am J Hum Genet.* 2004 Sep;75(3):460-74. doi: 10.1086/423857. Epub 2004 Jul 21. PMID: 15272417; PMCID: PMC1182024.
17. Jan P van Meerbeeck, Dean A Fennell, Dirk KM De Ruyscher, Small-cell lung cancer, *The Lancet*, Volume 378, Issue 9804, 2011, Pages 1741-1755, /doi.org/10.1016/S0140-6736(11)60165-7.
18. Kalemkerian GP, Akerley W, Downey RJ, Ettinger DS, Fossella F, Gecula JC, Jahan T, Johnson BE, Kessinger A, Koczywas M, Langer CJ, Martins R, Niell HB, Pan CC, Ramnath N, Ready N, Robert F, Williams CC Jr. Small cell lung cancer. *J Natl Compr Canc Netw.* 2008 Mar;6(3):294-314. PMID: 18377848.
19. Rudin, C.M., Brambilla, E., Faivre-Finn, C. et al. Small-cell lung cancer. *Nat Rev Dis Primers* 7, 3 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41572-020-00235-0>
20. Kalemkerian, G. P., Loo, B. W., Akerley, W., Attia, A., Bassetti, M., Bumber, Y., Decker, R., Dobelbower, M. C., Dowlati, A., Downey, R. J., Florsheim, C., Ganti, A. K. P., Gecula, J. C., Gubens, M. A., Hann, C. L., Hayman, J. A., Heist, R. S., Koczywas, M., Merritt, R. E., ... Hughes, M. (2018). NCCN guidelines® insights: Small cell lung cancer, version 2.2018 featured updates to the NCCN guidelines. *JNCCN Journal of the National Comprehensive Cancer Network*, 16(10), 1171-1182. <https://doi.org/10.6004/jnccn.2018.0079>
21. de Cos Escuín, J. S. (2009). Lung Cancer in Spain. *Current Epidemiology, Survival, and Treatment. Archivos de Bronconeumología ((English Edition))*, 45(7), 341–348. [https://doi.org/10.1016/s1579-2129\(09\)72435-8](https://doi.org/10.1016/s1579-2129(09)72435-8)
22. Hirsch FR, Scagliotti GV, Mulshine JL, Kwon R, Curran WJ Jr, Wu YL, Paz-Ares L. Lung cancer: current therapies and new targeted treatments. *Lancet.* 2017 Jan

21;389(10066):299-311. doi: 10.1016/S0140-6736(16)30958-8. Epub 2016 Aug 27. PMID: 27574741.

23. Fagetti A. Fundamentos de la medicina tradicional mexicana. In Fagetti A. Saberes colectivos y diálogos de saberes en México. Puebla, México; 2011. p. 131-153.

24. Osuna, T. L., Tapia, P. M. E., & Aguilar, C. A. (2005). Plantas medicinales de la medicina tradicional mexicana para tratar afecciones gastrointestinales: Estudio etnobotánico, fitoquímico y farmacológico. Barcelona: Publicacions i Edicions de la Universitat de Barcelona.

25. Wang, W., Xu, H., Chen, H., Tai, K., Liu, F., & Gao, Y. (2016). In vitro antioxidant, anti-diabetic and antilipemic potentials of quercetagenin extracted from marigold (*Tagetes erecta* L.) inflorescence residues. *Journal of Food Science and Technology*, 53(6), 2614–2624. <https://doi.org/10.1007/s13197-016-2228-6>

26. Sultan MH, Zuwaiel AA, Moni SS, Alshahrani S, Alqahtani SS, Madkhali O, Elmobark ME. Bioactive Principles and Potentiality of Hot Methanolic Extract of the Leaves from *Artemisia absinthium* L "in vitro Cytotoxicity Against Human MCF-7 Breast Cancer Cells, Antibacterial Study and Wound Healing Activity". *Curr Pharm Biotechnol*. 2020;21(15):1711-1721. doi: 10.2174/1389201021666200928150519. PMID: 32988347.

27. Vidyadhar, K. M., & Sharma, H. K. (2019). Hepatoprotective Effect of *Tagetes Erecta* L. Extract on Carbon Tetrachloride Induced Hepatotoxicity in Rats. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*, 9(4-s), 269–272. <https://doi.org/10.22270/jddt.v9i4-s.3316>

28. Oliveira, P. F. de, Alves, J. M., Damasceno, J. L., Oliveira, R. A. M., Dias, H. J., Crotti, A. E. M., & Tavares, D. C. (2015). Cytotoxicity screening of essential oils in cancer cell lines. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 25(2), 183–188. <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2015.02.009>

29. Departamento de Botánica, Instituto de Biología (IBUNAM), *Tagetes erecta* L., ejemplar de: Herbario Nacional de México (MEXU), Plantas Vasculares. En Portal de Datos Abiertos UNAM (en línea), México, Universidad Nacional Autónoma de México. Disponible

en: <http://datosabiertos.unam.mx/IBUNAM:MEXU:1361446> Fecha de actualización: 22/04/2014, 11:54:43 a.m.

30. Hernández F. Historia Natural de la Nueva España. Obras completas de Francisco Hernández. UNAM. 2015.
31. Quintanilla Carvajal, Maria Ximena, Arenas Ocampo, Martha Lucía, Campos Mendiola, Roberto, Camacho Díaz, Brenda Hildeliza, & Jiménez Aparicio, Antonio Ruperto. (2015). Caracterización morfométrica de estructuras florales de *Tagetes erecta* L. y *Tagetes patula* L. (Asteraceae) utilizando análisis digital de imágenes y dimensión fractal. *Gayana. Botánica*, 72(1), 137-144. <https://dx.doi.org/10.4067/S0717-66432015000100016>
32. Padalia, H., & Chanda, S. (2015). Antimicrobial Efficacy of Different Solvent Extracts of *Tagetes erecta* L. Flower, Alone and in Combination with Antibiotics. *Applied Microbiology: Open Access*, 1(1). <https://doi.org/10.4172/2471-9315.1000106>
33. Rasoanaivo, P., Petitjean, A., Ratsimamanga-Urverg, S., & Rakoto-Ratsimamanga, A. (1992). Medicinal plants used to treat malaria in Madagascar. *Journal of Ethnopharmacology*, 37(2), 117–127. [https://doi.org/10.1016/0378-8741\(92\)90070-](https://doi.org/10.1016/0378-8741(92)90070-)
34. Marques, M. M. M., Morais, S. M., Vieira, Í. G. P., Vieira, M. G. S., Silva, A. Raquel. A., De Almeida, R. R., & Guedes, M. I. F. (2011). Larvicidal Activity of *Tagetes erecta* Against *Aedes aegypti*. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 27(2), 156–158. <https://doi.org/10.2987/10-6056.1>
35. Vogel GH., (2002); Drug Discovery and evaluation Pharmacological Assay. Analgesic, Anti-inflammatory and Anti-pyretic activity; 2; 670-671.
36. Raghuvver R., (2011); Antidiabetic potential effect of *Tagetes erecta* whole plant in streptozotocin induced diabetic rats; *J Pharm Res*; 3(3); 1407-9. 32. Giri RK, Anindya Bose and Subrat Kumar Mishra., (2011); Hepatoprotective Activity of *Tagetes erecta* against carbon tetrachloride- induced hepatic damage in rats; *Acta Poloniae Pharmaceutica n Drug Research*; 68(6); 999-1003. 33. Singh, G., Singh, O. P., De Lampasona, M. P., & Catalán, C. A. N. (2002). Studies on essential oils. Part 35: chemical and biocidal investigations

on *Tagetes erecta* leaf volatile oil. *Flavour and Fragrance Journal*, 1368(1), 62–65.
<https://doi.org/10.1002/ffj.1158>

37. R, D., and J. Kovilpillai. “Screening and evaluation of bioactive components of *Tagetes erecta* L. by gc and ms analysis”. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, Vol. 7, no. 7, May 2014, pp. 58-60.

38. Sefidkon, F., Salehyar, S., Mirza, M. and Dabiri, M. (2004), The essential oil of *Tagetes erecta* L. occurring in Iran. *Flavour Fragr. J.*, 19: 579-581. <https://doi.org/10.1002/ffj.1360>.

39. Barhoi, D., Upadhaya, P., Barbhuiya, S. N., Giri, A., & Giri, S. (2022). Extracts of *Tagetes erecta* exhibit potential cytotoxic and antitumor activity that could be employed as a promising therapeutic agent against cancer: A study involving in vitro and in vivo approach. In *Phytomedicine Plus* (Vol. 2, Issue 1, p. 100187). Elsevier BV. <https://doi.org/10.1016/j.phyplu.2021.100187> <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-684006/v1>

40. Gupta P, Gupta A, Agarwal K, Tomar P, Satija S. Antioxidant and cytotoxic potential of a new thienyl derivative from *Tagetes erecta* roots. *Pharm Biol.* 2012 Aug;50(8):1013-8. doi: 10.3109/13880209.2012.655378. PMID: 22775418.

41. Vallisuta, O., Nukoolkarn, V., Mitrevej, A., Sarisuta, N., Leelapornpisid, P., Phrutivorapongkul, A., & Sinchaipanid, N. (2013). In vitro studies on the cytotoxicity, and elastase and tyrosinase inhibitory activities of marigold (*Tagetes erecta* L.) flower extracts. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 7(1), 246–250. <https://doi.org/10.3892/etm.2013.1373>

42. Cui, G., Wei, F., Wei, M., Xie, L., Lin, Z., & Feng, X. (2021). Modulatory effect of *Tagetes erecta* flowers essential oils via Nrf2/HO-1/NF-κB/p65 axis mediated suppression of N-methyl-N′nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG) induced gastric cancer in rats. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 476(3), 1541–1554. <https://doi.org/10.1007/s11010-020-04005-0>

43. Meurer, M. C., Mees, M., Mariano, L. N. B., Boeing, T., Somensi, L. B., Mariott, M., da Silva, R. de C. M. V. de A. F., dos Santos, A. C., Longo, B., Santos França, T. C., Klein-Júnior,

- L. C., de Souza, P., de Andrade, S. F., & da Silva, L. M. (2019). Hydroalcoholic extract of *Tagetes erecta* L. flowers, rich in the carotenoid lutein, attenuates inflammatory cytokine secretion and improves the oxidative stress in an animal model of ulcerative colitis. *Nutrition Research*, 66, 95–106. <https://doi.org/10.1016/j.nutres.2019.03.005>
44. Gansukh E, Mya KK, Jung M, Keum YS, Kim DH, Saini RK. Lutein derived from marigold (*Tagetes erecta*) petals triggers ROS generation and activates Bax and caspase-3 mediated apoptosis of human cervical carcinoma (HeLa) cells. *Food Chem Toxicol*. 2019 May;127:11-18. doi: 10.1016/j.fct.2019.02.037. Epub 2019 Mar 1. PMID: 30826408.
45. Attia MA, Weiss DW (1966) Immunology of spontaneous mammary carcinomas in mice with acquired tumor resistance and enhancement in strain A mice infected with mammary tumor virus. *Cancer Res* 26: 1787.
46. Bhattarai N, Kumbhar AA, Pokharel YR, Yadav PN. Anticancer Potential of Coumarin and its Derivatives. *Mini Rev Med Chem*. 2021;21(19):2996-3029. Doi: 10.2174/1389557521666210405160323. PMID: 33820507.
47. Forte G, Fortuna CG, Salerno L, Modica MN, Siracusa MA, Cardile V, Romeo G, Bulbarelli A, Lonati E, Pittalà V. Antitumor properties of substituted (α E)- α -(1H-indol-3-ylmethylene)benzeneacetic acids or amides. *Bioorg Med Chem*. 2013 Sep 1;21(17):5233-45. doi: 10.1016/j.bmc.2013.06.030. Epub 2013 Jun 27. PMID: 23871443.
48. Mizushina, Y., Takeuchi, T., Sugawara, F., & Yoshida, H. (2012). Anti-Cancer Targeting Telomerase Inhibitors: β -Rubromycin and Oleic Acid. In *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry* (Vol. 12, Issue 11, pp. 1135–1143). Bentham Science Publishers Ltd. <https://doi.org/10.2174/138955712802762220>
49. den Hartigh LJ. Conjugated Linoleic Acid Effects on Cancer, Obesity, and Atherosclerosis: A Review of Pre-Clinical and Human Trials with Current Perspectives. *Nutrients*. 2019 Feb 11;11(2):370. doi: 10.3390/nu11020370. PMID: 30754681; PMCID: PMC6413010.

50. Shi, Y., An, S., Wan, Y., Yang, F., Liu, Q., 2019. How to best use acetic acid for the prevention of heart disease and cancer. *European Journal of Preventive Cardiology* 26, 437–438. doi:10.1177/2047487318784356
51. 48. Pouillart, P. R. (1998). Role of butyric acid and its derivatives in the treatment of colorectal cancer and hemoglobinopathies. In *Life Sciences* (Vol. 63, Issue 20, pp. 1739–1760). Elsevier BV. [https://doi.org/10.1016/s0024-3205\(98\)00279-3](https://doi.org/10.1016/s0024-3205(98)00279-3)
52. Zhu S, Jiao W, Xu Y, Hou L, Li H, Shao J, Zhang X, Wang R, Kong D. Palmitic acid inhibits prostate cancer cell proliferation and metastasis by suppressing the PI3K/Akt pathway. *Life Sci.* 2021 Dec 1;286:120046. doi: 10.1016/j.lfs.2021.120046. Epub 2021 Oct 12. PMID: 34653428.
53. Nikkon, F., Habib, M. R., Saud, Z. A., & Karim, M. R. (2011). *Tagetes erecta* Linn. and its mosquitocidal potency against *Culex quinquefasciatus*. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 1(3), 186–188. [https://doi.org/10.1016/s2221-1691\(11\)60024-5](https://doi.org/10.1016/s2221-1691(11)60024-5)
54. Balusamy SR, Perumalsamy H, Huq MA, Balasubramanian B. Anti-proliferative activity of *Origanum vulgare* inhibited lipogenesis and induced mitochondrial mediated apoptosis in human stomach cancer cell lines. *Biomed Pharmacother.* 2018 Dec;108:1835-1844. doi: 10.1016/j.biopha.2018.10.028. Epub 2018 Oct 19. PMID: 30372889.
55. García, J. S., Ruiz, A. P., Pérez, M. A. B., & Zarandona, U. I. (2018). Contaje de mitosis en imágenes histológicas mediante redes neuronales convolucionales. In *Proc. 35th Congreso anual Sociedad Española Ingeniería Biomédica (CASEIB)* (pp. 199-202).
56. Chang, S.-C., Lai, P.-H., Chen, W.-L., Weng, H.-H., Ho, J.-T., Wang, J.-S., Chang, C.-Y., Pan, H.-B., & Yang, C.-F. (2002). Diffusion-weighted MRI features of brain abscess and cystic or necrotic brain tumors. In *Clinical Imaging* (Vol. 26, Issue 4, pp. 227–236). Elsevier BV. [https://doi.org/10.1016/s0899-7071\(02\)00436-9](https://doi.org/10.1016/s0899-7071(02)00436-9)
57. Däster, S., Amatruda, N., Calabrese, D., Ivanek, R., Turrini, E., Drosler, R.A., Zajac, P., Fimognari, C., Spagnoli, G.C., Iezzi, G., Mele, V., Muraro, M.G., 2017. Induction of hypoxia

and necrosis in multicellular tumor spheroids is associated with resistance to chemotherapy treatment. *Oncotarget* 8, 1725–1736. doi:10.18632/oncotarget.13857

58. Strandell, J., Neil, A., & Carlin, G. (2004). An approach to the in vitro evaluation of potential for cytochrome P450 enzyme inhibition from herbals and other natural remedies. In *Phytomedicine* (Vol. 11, Issues 2–3, pp. 98–104). Elsevier BV. <https://doi.org/10.1078/0944-7113-00379>

59. Rozengurt E. Growth factors, cell proliferation and cancer: an overview. *Molecular Biology & Medicine*. 1983 jul;1(1):169-181. PMID: 6092824.

15.- ANEXOS.

1.- Caracterización taxonómica de *Tagetes erecta*.

Aguascalientes, Ags., Noviembre del 2021.

A quien corresponda:

Presente:

Me complace informarle que las muestras recolectadas por la alumna inscrita en la Maestría en Ciencia y Tecnología Química de la U. A. Z., **Alma Sarahi Cuellar González** para el proyecto "Evaluación del efecto citotóxico y antitumoral del extracto de *Tagetes erecta* L. en modelos experimentales de carcinoma pulmonar de Lewis *in vitro* e *in vivo*", fueron procesadas de acuerdo a los protocolos de prensado y herborizado, con los cuales se pudo establecer de manera adecuada la identidad taxonómica de dicha especie, *Tagetes erecta* también conocida como cempasúchil.

Dichos estudios orientados al quehacer de la ciencia seguramente abonaran a encontrar y a validar usos tradicionales en dicho taxon. Es por ello que expido la presente constancia en la Universidad Autónoma de Aguascalientes, sobre la correcta identidad de estas especies.



Hugo Noe Araiza Arvilla.
Responsable de Jardín Botánico de la UAA
Vocal del Norte de México de la A.M.J.B

2.- Participación en la edición número XIII de las Jornadas de ciencias químicas en la modalidad cartel de revisión bibliográfica, con el trabajo “El potencial citotóxico de *Tagetes erecta* L.”



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE
ZACATECAS
Francisco García Salinas

LA UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS QUÍMICAS
Y LA COORDINACIÓN DEL ÁREA DE CIENCIAS DE LA SALUD
OTORGAN LA PRESENTE

CONSTANCIA

ALMA SARAHI CUELLAR GONZÁLEZ, MARISOL GALVÁN VALENCIA, ALBERTO RAFAEL CERVANTES VILLAGRANA

A:

Por su valiosa participación en la presentación del trabajo en modalidad Cartel:

“El potencial citotóxico de *Tagetes erecta* L. artículo de revisión”
durante las XIII Jornadas de Ciencias Químicas
“M. en C. Manuel de Jesús Macías Patiño”,
en el marco del Año Internacional de las Frutas y las Verduras.
del 19 al 21 de Mayo de 2021, con un valor curricular de 10 horas crédito
Zacatecas, Zac., 21 de Mayo de 2021


Dra. Argelia López Luna
Directora de la Unidad Académica de
Ciencias Químicas


Dr. Juan Armando Flores de la Torre
Coordinador del Área de
Ciencias de la Salud



3.- Durante el semestre se realizó un artículo de revisión titulado “Propiedades anticancerígenas encontradas en *Tagetes erecta* L.”

TÍTULO.- *Propiedades anticancerígenas encontradas en Tagetes erecta*

OBJETIVO.-

Realizar una búsqueda bibliográfica sobre artículos donde se reporten los efectos citotóxicos, antiproliferativos o antitumorales encontrados en extractos de Tagetes erecta L.

AUTORES.- Cuellar – González Alma S., Cervantes – Villagrana Daniel, Galván – Valencia Marisol, Cervantes – Villagrana Alberto R.

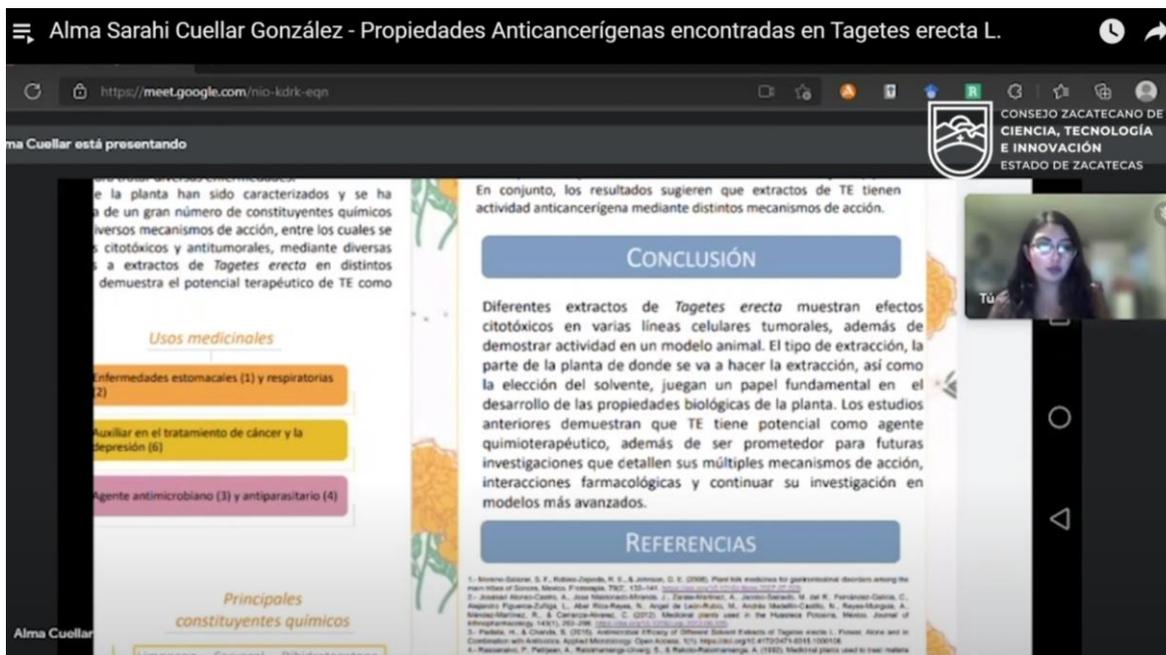
PALABRAS CLAVE.- *Tagetes erecta*, cáncer, antitumoral, citotoxicidad, etnobotánica, fitofarmacología, extracto natural, antiproliferatividad.

ABSTRACT.- *Tagetes erecta* es una planta originaria de Mesoamérica, que, como diversas especies del género es cultivada como una planta ornamental y ha sido estudiada por sus propiedades medicinales en base a sus usos etnobotánicos. Diferentes partes de la planta han sido usadas, de manera tradicional para tratar diversos problemas de salud. La composición fitoquímica de varios extractos hechos a base de raíces y partes aéreas han sido reportados y evaluados en distintos tipos celulares y modelos preclínicos. Se ha encontrado que los extractos exhiben efecto citotóxico en una gran variedad de líneas celulares tumorales, además de presentar propiedades anticancerígenas en un modelo in vivo. Algunos de estos trabajos se resumen de manera breve durante esta revisión.

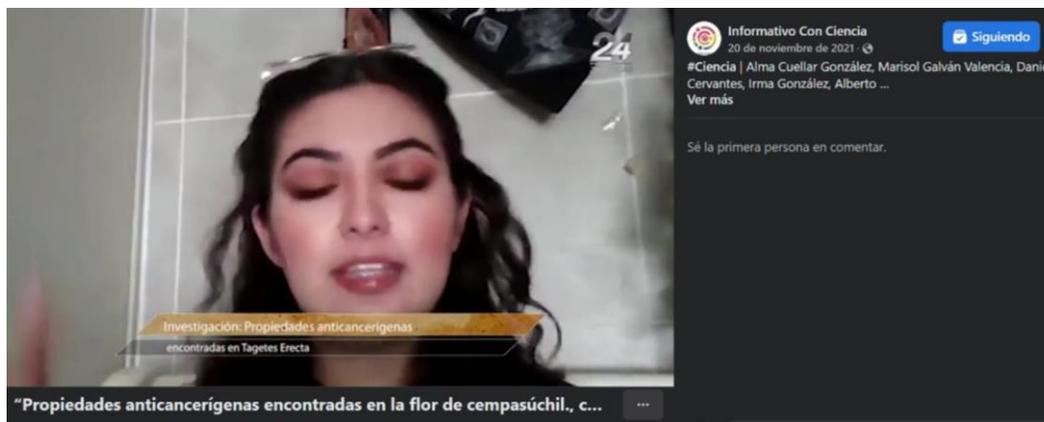
4.- Se obtuvo el primer lugar en la categoría de cartel de revisión durante el 9° congreso nacional de ciencias químico-biológicas por el trabajo titulado "Propiedades anticancerígenas encontradas en *Tagetes erecta*"



5.- Se expuso el tema del artículo de revisión durante la Jornada estatal de ciencia y tecnología 2021 de manera virtual.



6.- Entrevista para el programa de difusión científica Con Ciencia



7.- Participación en las Jornadas XIV de Ciencias Químicas con el cartel titulado “Evaluación del extracto de *Tagetes erecta* L. en células de carcinoma pulmonar de Lewis *in vitro*”



8.- Estancia de investigación virtual con el Dr. Daniel Cervantes en la cual se realizó el primero borrador del artículo de investigación



Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del
Instituto Politécnico Nacional
Farmacología

Ciudad de México, 30 de Julio de 2022

Dra. Ismaíla Leilani Escalante García
Responsable del programa de Ciencia y Tecnología Química
PRESENTE

Por medio del presente hago constar que la alumna Alma Sarahi Cuellar González de la Maestría en Ciencia y Tecnología Química, ha concluido satisfactoriamente con la realización de la estancia de investigación, cumpliendo con los objetivos planteados, según el cronograma de actividades propuesto.

Sin otro particular, me despido reiterando mis saludos.

ATENTAMENTE.

Dr. Rodolfo Daniel Cervantes-Villagrana
Investigador Asociado, SNI-1
Farmacología, Cinvestav-IPN

9.- Realización de un artículo de experimentación científica que será enviado a una revista indexada

Journal of Medicinal Food

Cytotoxic and antitumor effect of the hydroalcoholic extract of *Tagetes erecta* in lung cancer murine model

In vivo and in vitro evaluation.

Alma Sarahi Cuellar González, Marisol Galván Valencia, Rodolfo Daniel Cervantes-Villagrana, Alberto Cervantes- Villagrana*

Keywords: Cancer, cytotoxicity, cytotoxicity, *Tagetes erecta*, lung cancer, plant extract

Abstract

The plant *Tagetes erecta*, also known as Aztec margaoïd, is a Mesoamerican plant of great cultural value, which has been used in traditional medicine to treat various health problems, its ethnobotanical uses include the treatment of cancer. In this study, we evaluated anti-tumor effects of the hydroalcoholic extract of *Tagetes erecta* (TE) flowers in vivo and in vitro. Different concentrations of floral extract in Lewis lung cancer cells (LLC) and in non-tumor cells (COS-1) as a control for toxicity. During the cytotoxicity assays, we found that it exerts cytotoxic effects on LLC and this effect increased in a concentration-dependent manner. No cytotoxic effects were reported on the non-tumor cell line. In murine model, administration of the TE extract decreased in tumor volume and ex vivo evaluations showed increases in the number of metastases and decreased the necrotic areas in the excised tumors, parameters highly related to the tumor development. GS-MS characterization of floral extract reveals the presence of acetic acid, n-butyric acid, benzeneacetic acid, oleic acid, n-hexadecanoic acid, linoleic acid and coumaran as major compounds in the extract. This study indicates that the hydroalcoholic extract of TE flowers inhibits tumor progression and contributes to the evidence that some natural extracts are a therapeutic potential against lung cancer.

Introduction

more aggressive and having a higher mortality (1)

10.- Participación en em club de “Un acercamiento a las ciencias químico - biológicas” por parte de COZCyT como retribución social.



11.- Participación como ponente durante el 1er foro de divulgación de investigaciones biomédicas y en ciencia y tecnología química 2022 “Master Tesis”



