

SEP

POLIBOTÁNICA

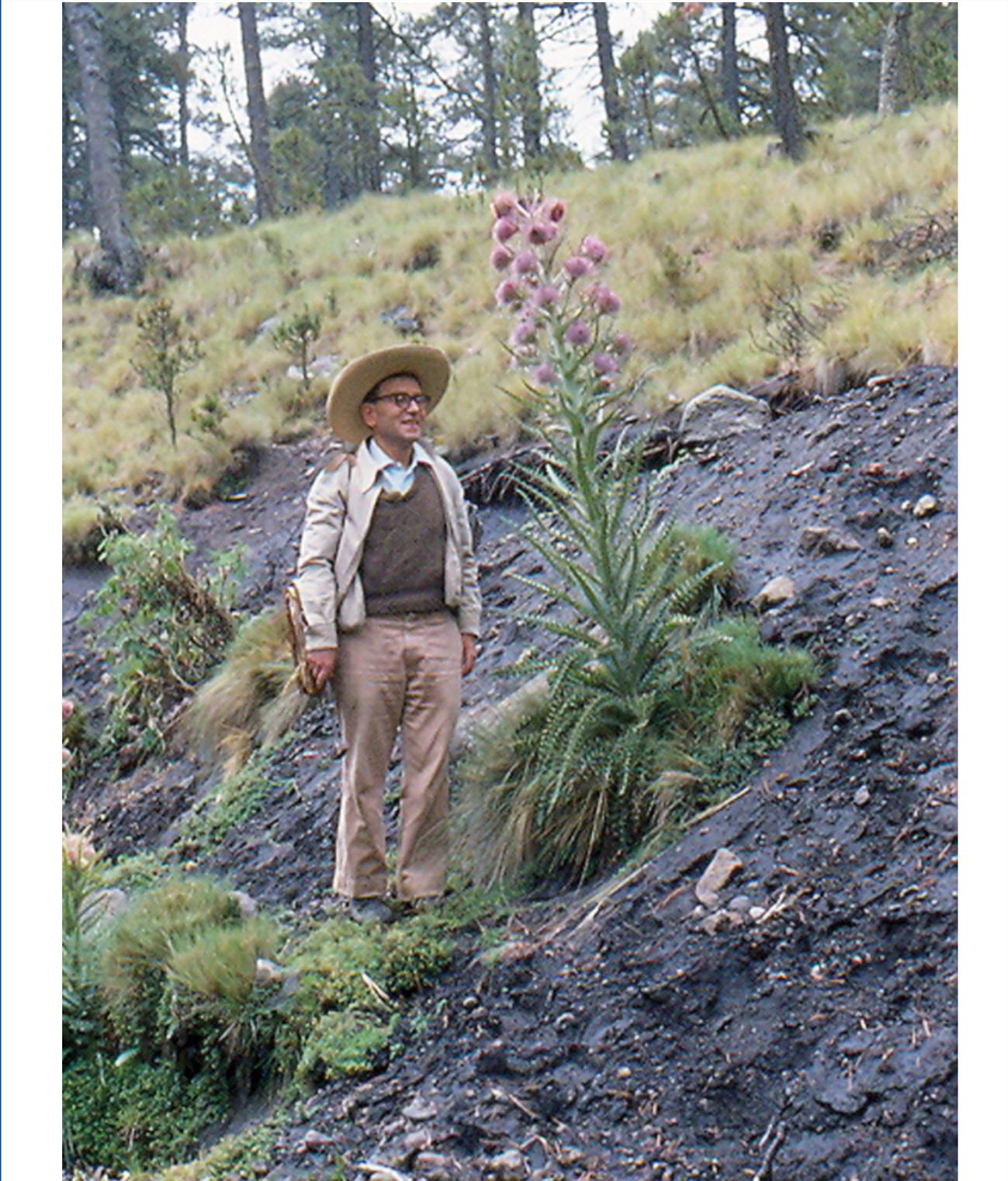
ISSN 1405-2768



Julio 2023

Núm. 56

POLIBOTÁNICA



Núm. 56



Julio 2023

PÁG.

CONTENIDO

- 1 Riqueza y distribución altitudinal de hepáticas epifitas del bosque mesófilo de montaña de Hidalgo, México
Richness and altitudinal distribution of epiphytic liverworts from the cloud forest of Hidalgo, Mexico
José Francisco Juárez López | Arturo Sánchez González | Maritza López Herrera | Dorismilda Martínez Cabrera
- 17 Descripción e ilustración del desarrollo morfogénico de los gametófitos y esporófitos jóvenes de *Asplenium blepharophorum* Bertol. (Aspleniaceae-Polypodiidae) en tres sustratos naturales
Description and illustration of the morphogenic development of the young gametophytes and sporophytes of Asplenium blepharophorum Bertol. (Aspleniaceae-Polypodiidae) in three natural substrates
Adriana Rojas Cano | María de la Luz Arreguín Sánchez | Rafael Fernández Nava | David Leonor Quiroz García
- 39 Análisis morfométrico de *Agave sensu stricto* (Asparagaceae: Agavoideae) en Veracruz y áreas adyacentes de Puebla, México
Morphometric analysis of Agave sensu stricto (Asparagaceae: Agavoideae) in Veracruz and adjacent areas of Puebla, Mexico
Carlos Rafael Arzaba Villalba | Miguel Cházaro Bazáñez | Mario Luna Cavazos | Edmundo García Moya
- 61 Variación clinal de caracteres fenotípicos y fisiológicos en *Pinus hartwegii* Lindl., para la Estación Forestal Experimental Zoquiapan, México
Clinical variation of phenotypic and physiological characters in Pinus hartwegii Lindl., for the Zoquiapan Experimental Forest Station, Mexico
Adrián López López | María Isabel Palacios Rangel | Cuauhtémoc Sáenz Romero | Villanueva Morales Antonio | Victoria Pacheco Almaraz
- 81 Composición, estructura y estado de la regeneración arbórea en un gradiente altitudinal en un bosque templado de Guadalupe y Calvo, Chihuahua
Composition, structure and status of tree regeneration in an altitudinal gradient in a temperate forest of Guadalupe y Calvo, Chihuahua
Samuel Alberto García García | Eduardo Alanís Rodríguez | Oscar Alberto Aguirre Calderón | Eduardo Javier Treviño Garza | Luis Gerardo Cuéllar Rodríguez | Alejandro Collantes Chávez Costa
- 101 Efectos del manejo forestal en la emisión de CO₂ de un suelo umbrisol en bosques de Durango, México
Effects of forest management on the soil CO₂ emission of an umbrisol in forests from Durango, Mexico
Erik Orlando Luna Robles | Israel Cantú Silva | Francisco Javier Hernández | Silvia Janeth Béjar Pulido
- 115 Influencia del conocimiento ecológico tradicional y la altitud en la estructura y diversidad arbórea de los cercos vivos del corredor biológico Chichinautzin, México
Influence of traditional ecological knowledge and altitudinal gradient on richness, structure and tree diversity of live fences in the Chichinautzin biological corridor, Mexico
Emir Basurto García | Hortensia Colín Bahena | Rafael Monroy Ortiz | Alejandro García Flores | Leonardo Beltrán Rodríguez
- 151 Efecto del medio de cultivo y escotoperiodo en la germinación de semillas y crecimiento *in vitro* de *Guarianthe skinneri* (Bateman) Dressler & W.E. Higgins (Orchidaceae)
Effect of culture media and skotoperiod on the germination of seeds and growth in vitro of Guarianthe skinneri (Bateman) Dressler & W.E. Higgins (Orchidaceae)
Fabiola Hernández Ramírez | Leobardo Iracheta Donjuan | Anne Damon | Sylvia Patricia Fernández Pavía | Karina Guillén Navarro
- 171 Plant regeneration from indirect somatic embryogenesis of *Agave salmiana* Otto ex Salm-Dyck subsp. *salmiana* using zygotic embryo obtained by in-casa pollination as explants
Regeneración de plantas por embriogénesis somática indirecta de Agave salmiana Otto ex Salm-Dyck subsp. salmiana usando embriones cigóticos obtenidos por polinización In-casa como explantes
Blanca Vianey Angeles Vázquez | Jorge Álvarez Cervantes | Xóchitl Tovar Jiménez | Benjamín Rodríguez Garay
- 183 Flavonoids, anthocyanins and total macronutrients in handmade products of blackberry (*Rubus* sp.) from Atecoxil, Veracruz, Mexico
Flavonoides, antocianinas y macronutrientes totales en productos artesanales de zarzamora (Rubus sp.) de Atecoxil, Veracruz, México
Vianey del Rocio Torres Pelayo
- 203 Composición química, actividad antioxidante, antiinflamatoria y antiproliferativa del extracto de callos derivado de *Acalypha californica* Benth
Chemical composition, antioxidant, antiinflammatory and antiproliferative activity of callus extract derived from Acalypha californica Benth
Lesyanny Hechavarría Pérez | Luisa Alondra Rascón Valenzuela | Armando Tejeda Mansir | José Alberto Pérez Burgos | Gloria Irma Ayala Astorga
- 225 Dinámica de la Etnobotánica médica de los pobladores de Córdoba, Argentina. Aportes de la Encuesta Nacional de Folklore (1921) a la comprensión de los cambios en el uso y percepción de plantas medicinales
Dynamics of the medical Ethnobotany of the inhabitants of Córdoba, Argentina. Contributions of the National Survey of Folklore (1921) to understanding changes in the use and perception of medicinal plants
Cecilia Trillo | Bárbara Arias Toledo
- 249 Ethnobotany of medicinal plants Used for healers of the Chol ethnic group from Tila, Chiapas, Mexico
Etnobotánica de plantas medicinales usadas por curanderos del grupo étnico Chol de Tila, Chiapas, México
José del Carmen Rejón Orantes | Sabina Andrea Sánchez-Cartela | Wilbert Gutiérrez-Sarmiento | Oscar Farrera-Sarmiento | Miguel Pérez de la Mora
- 265 Estudio de plantas medicinales utilizadas en San José Iturbide, Guanajuato, México
Study of medicinal plants used in San Jose Iturbide, Guanajuato, Mexico
Eduardo Alberto Lara Reimers | Carlos Omar Hernández Robledo | Pablo Preciado Rangel | Oscar Sariñana Aldaco
- 287 Percepción y significados del guaje rojo *Leucaena esculenta* (DC.) Benth. en la cultura ngiwa de Puebla, México
Perception and meanings of the red guaje Leucaena esculenta (DC.) Benth. in the ngiwa culture from Puebla, Mexico
Guadalupe García Maceda | Arturo Hernández Montes | María Carmen Ybarra Moncada | Rocio Guadalupe Casañas Pimentel
- 311 Intergenerational transmission of traditional ecological knowledge about medicinal plants in a riverine community of the Brazilian Amazon
Transmisión intergeneracional del conocimiento ecológico tradicional sobre las plantas medicinales en una comunidad ribereña de la Amazonía Brasileña
Rogério Lima Mota | Iani Dias Lauer-Leite | Jailson Santos de Novais

POLIBOTÁNICA

Núm. 56

ISSN electrónico: 2395-9525

Julio 2023



Portada

Jerzy Rzedowski Rotter (1926-2023). Considerado uno de los botánicos más influyentes de México. Incursionó en diversas disciplinas botánicas como taxonomía, florística, fitogeografía y ecología. Formó varios herbarios institucionales y recolectó muestras de la flora mexicana, logrando una colección que superó los 50,000 ejemplares. Trabajó en la Flora Fanerogámica del Valle de México y en la Flora del Bajío y Regiones Adyacentes; también escribió el libro *La Vegetación de México*, obra clásica de la literatura botánica mexicana. A lo largo de su carrera, se dedicó además a la enseñanza y formación de botánicos. Su obra incluye la publicación de 7 libros, 47 capítulos de libros, 128 artículos en revistas científicas y 31 fascículos de floras. Descubrió alrededor de 190 nuevas especies de plantas mexicanas y más de 85 especies de hongos, plantas y animales mexicanos recibieron su nombre en su honor.

Jerzy Rzedowski Rotter (1926-2023). Considered one of the most influential botanists in Mexico. He ventured into several botanical disciplines such as taxonomy, floristics, phytogeography, and ecology. He formed several institutional herbaria, and collected samples of Mexican flora, achieving a collection that exceeded 50,000 numbers. He worked on the Phanerogamic Flora of the Valley of Mexico and the Flora of the Bajío and Adjacent Regions; he also wrote the book *The Vegetation of Mexico*, a classic work of Mexican botanical literature. Throughout his career, he was also dedicated to teaching and training botanists. His work includes the publication of 7 books, 47 book chapters, 128 articles in scientific journals, and 31 fascicles of floras. He discovered about 190 new species of Mexican plants and more than 85 species of Mexican fungi, plants, and animals were named in his honor.

por/by **Rafael Fernández Nava**



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

Director General: *Dr. Arturo Reyes Sandoval*

Secretario General: *Ing. Arq. Carlos Ruiz Cárdenas*

Secretario Académico: *Mtro. Mauricio Igor Jasso Zaranda*

Secretario de Innovación e Integración Social: *M. en C. Ricardo Monterrubio López*

Secretario de Investigación y Posgrado: *Dra. Laura Arreola Mendoza*

Secretario de Servicios Educativos: *Dra. Ana Lilia Coria Páez*

Secretario de Administración: *M. en C. Javier Tapia Santoyo*

Director de Educación Superior: *Dra. María Guadalupe Ramírez Sotelo*

ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Director:

Dr. Isaac Juan Luna Romero

Subdirectora Académica:

M. en C. Martha Patricia Cervantes Cervantes

Jefe de la Sección de Estudios de Posgrado e Investigación:

Dr. Gerardo Aparicio Ozores

Subdirector de Servicios Educativos e Integración Social:

Biól. Gonzalo Galindo Becerril

POLIBOTÁNICA, Año 28, No. 56, julio 2023, es una publicación semestral editada por el Instituto Politécnico Nacional, a través de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. Unidad Profesional Lázaro Cárdenas, Prolongación de Carpio y Plan de Ayala s/n, Col. Santo Tomas C.P. 11340 Delegación Miguel Hidalgo México, D.F. Teléfono 57296000 ext. 62331. <http://www.herbario.encb.ipn.mx/>, Editor responsable: Rafael Fernández Nava. Reserva de Derechos al Uso Exclusivo del Título No. 04-2015-011309001300-203. ISSN impreso: 1405-2768, ISSN digital: 2395-9525, ambos otorgados por el Instituto Nacional del Derecho de Autor. Responsable de la última actualización de este número, Unidad de informática de la ENCB del IPN, Rafael Fernández Nava, Unidad Profesional Lázaro Cárdenas, Prolongación de Carpio y Plan de Ayala s/n, Col. Santo Tomas CP 11340 Delegación Miguel Hidalgo México, D.F.

Las opiniones expresadas por los autores no necesariamente reflejan la postura del editor de la publicación.

Queda estrictamente prohibida la reproducción total o parcial de los contenidos e imágenes de la publicación sin previa autorización del Instituto Politécnico Nacional.

REVISTA BOTÁNICA INTERNACIONAL DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

EDITOR EN JEFE

Rafael Fernández Nava

EDITORA ASOCIADA

María de la Luz Arreguín Sánchez

COMITÉ EDITORIAL INTERNACIONAL

Christiane Anderson
University of Michigan
Ann Arbor, Michigan, US

Edith V. Gómez Sosa
Instituto de Botánica Darwinion
Buenos Aires, Argentina

Heike Vibrans
Colegio de Postgraduados
Estado de México, México

Jorge Llorente Bousquets
Universidad Nacional Autónoma de México
Ciudad de México, México

Graciela Calderón de Rzedowski
Instituto de Ecología del Bajío
Pátzcuaro, Mich., México

Delia Fernández González
Universidad de León
León, España

Theodore S. Cochrane
University of Wisconsin
Madison, Wisconsin, US

Jerzy Rzedowski Rotter
Instituto de Ecología del Bajío
Pátzcuaro, Mich., México

Hugo Cota Sánchez
University of Saskatchewan
Saskatoon, Saskatchewan, Canada

Luis Gerardo Zepeda Vallejo
Instituto Politécnico Nacional
Ciudad de México, México

Fernando Chiang Cabrera
Universidad Nacional Autónoma de México
Ciudad de México, México

Claude Sastre
Muséum National d'Histoire Naturelle
Paris, Francia

Thomas F. Daniel
California Academy of Sciences
San Francisco, California, US

Mauricio Velayos Rodríguez
Real Jardín Botánico
Madrid, España

Francisco de Asis Dos Santos
Universidad Estadual de Feira de Santana
Feira de Santana, Brasil

Noemi Waksman de Torres
Universidad Autónoma de Nuevo León
Monterrey, NL, México

Carlos Fabián Vargas Mendoza
Instituto Politécnico Nacional
Ciudad de México, México

Julieta Carranza Velázquez
Universidad de Costa Rica
San Pedro, Costa Rica

José Luis Godínez Ortega
Universidad Nacional Autónoma de México
Ciudad de México, México

Tom Wendt
University of Texas
Austin, Texas, US

José Manuel Rico Ordaz
Universidad de Oviedo
Oviedo, España

DISEÑO Y FORMACIÓN ELECTRÓNICA

Luz Elena Tejeda Hernández

OPEN JOURNAL SYSTEM Y TECNOLOGÍAS DE LA INFORMACIÓN

Pedro Aráoz Palomino

Toda correspondencia relacionada con la revista deberá ser dirigida a:

Dr. Rafael Fernández Nava
Editor en Jefe de

POLIBOTÁNICA

Departamento de Botánica
Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional
Apdo. Postal 17-564, CP 11410, Ciudad de México

Correo electrónico:
polibotanica@gmail.com
rfernand@ipn.mx

Dirección Web
http://www.polibotanica.mx

POLIBOTÁNICA es una revista indexada en:

CONAHCYT, índice de Revistas Mexicanas de Investigación Científica y Tecnológica del Consejo Nacional de Humanidades, Ciencia y Tecnología.

SciELO - Scientific Electronic Library Online.

Google Académico - Google Scholar.

DOAJ, Directorio de Revistas de Acceso Público.

Dialnet portal de difusión de la producción científica hispana.

REDIB Red Iberoamericana de Innovación y Conocimiento Científico.

LATINDEX, Sistema regional de información en línea para revistas científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal.

PERIODICA, Índice de Revistas Latinoamericanas en Ciencias.



**COMPOSICIÓN QUÍMICA, ACTIVIDAD
ANTIOXIDANTE, ANTIINFLAMATORIA Y
ANTIPROLIFERATIVA DEL EXTRACTO
DE CALLOS DERIVADO DE *Acalypha
californica* Bentham**

**CHEMICAL COMPOSITION,
ANTIOXIDANT, ANTIINFLAMMATORY
AND ANTIPROLIFERATIVE ACTIVITY
OF CALLUS EXTRACT DERIVED FROM
Acalypha californica Bentham**

Hechavarría-Pérez, Lesyanny; Luisa Alondra Rascón-Valenzuela; Armando Tejeda-Mansir; José Alberto Pérez-Burgos y Gloria Irma Ayala-Astorga

COMPOSICIÓN QUÍMICA, ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE,
ANTIINFLAMATORIA Y ANTIPROLIFERATIVA DEL EXTRACTO DE CALLOS
DERIVADO DE *Acalypha californica* Bentham

CHEMICAL COMPOSITION, ANTIOXIDANT, ANTIINFLAMMATORY AND
ANTIPROLIFERATIVE ACTIVITY OF CALLUS EXTRACT DERIVED FROM
Acalypha californica Bentham



Composición química, actividad antioxidante, antiinflamatoria y antiproliferativa del extracto de callos derivado de *Acalypha californica* Benth

Chemical composition, antioxidant, antiinflammatory and antiproliferative activity of callus extract derived from *Acalypha californica* Benth

Hechavarría-Pérez, Lesyanny;
Luisa Alondra Rascón-Valenzuela;
Armando Tejeda-Mansir;
José Alberto Pérez-Burgos
y Gloria Irma Ayala-Astorga

COMPOSICIÓN QUÍMICA,
ACTIVIDAD
ANTIOXIDANTE,
ANTIINFLAMATORIA Y
ANTIPROLIFERATIVA
DEL EXTRACTO DE
CALLOS DERIVADO DE
Acalypha californica
Benth

CHEMICAL
COMPOSITION,
ANTIOXIDANT,
ANTIINFLAMMATORY
AND ANTIPROLIFERATIVE
ACTIVITY OF CALLUS
EXTRACT DERIVED
FROM *Acalypha californica*
Benth

POLIBOTÁNICA

Instituto Politécnico Nacional

Núm. 56: 203-223. Julio 2023

DOI:
10.18387/polibotanica.56.11

Lesyanny Hechavarría-Pérez / a216230100@unison.mx
<https://orcid.org/0000-0003-1559-182X>

Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales. Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de la Universidad de Sonora, Blvd. Luis Donaldo Colosio s/n, Entre Reforma y Sahuaripa, Edificio 7G, Col. Centro, Hermosillo, Sonora C.P. 83000, México,

Luisa Alondra Rascón-Valenzuela / luisa.rascon@unison.mx
<https://orcid.org/0000-0002-6564-4283>

Laboratorio de Investigación en Productos Naturales. Departamento de Ciencias Químico Biológicas, División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad de Sonora, Encinas y Rosales Hermosillo, Sonora, México

Armando Tejeda-Mansir / armando.tejeda@unison.mx
<https://orcid.org/0000-0003-2225-467X>

Laboratorio de Biotecnología de Bioprocesos. Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de la Universidad de Sonora, Blvd. Luis Donaldo Colosio s/n, Entre Reforma y Sahuaripa, Edificio 7G, Col. Centro, Hermosillo, Sonora C.P. 83000, México

José Alberto Pérez-Burgos / alberto.perez@unison.mx
<https://orcid.org/0009-0009-5043-0782>

Laboratorio de Investigación en Productos Naturales. Departamento de Ciencias Químico Biológicas, División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad de Sonora, Encinas y Rosales Hermosillo, Sonora, México

Gloria Irma Ayala-Astorga / gloria.ayala@unison.mx
<https://orcid.org/0000-0002-8135-8535>

Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales. Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de la Universidad de Sonora, Blvd. Luis Donaldo Colosio s/n, Entre Reforma y Sahuaripa, Edificio 7G, Col. Centro, Hermosillo, Sonora C.P. 83000, México,

RESUMEN: *Acalypha californica* Benth es una planta utilizada por los grupos étnicos de Sonora para tratar el cáncer; sin embargo, es una planta que no es cultivada, de manera tal que la especie crece en hábitats expuestos a las actividades antropogénicas y la colecta indiscriminada, resultando en la disminución significativa de las poblaciones silvestres. Aunado a lo anterior las actividades biológicas relacionadas con los procesos antiproliferativos (antioxidante y antiinflamatoria) atribuidos a la especie no han sido evaluadas. Por lo que el objetivo del presente trabajo fue establecer las condiciones adecuadas para el crecimiento de callos de *A. californica*, así como caracterizar química y biológicamente el extracto etanólico de los callos generados. Primeramente, para producción de callos se utilizaron explantes a partir de hojas, pecíolos, yemas y segmentos nodales de *A. californica* los que fueron inoculados en Woody Plant Medium (WPM), suplementado con ácido indol butírico (AIB), bencil amino purina (BAP) o cinetina (CIN) en un intervalo de 0.5-2.0 mg/L. El extracto de los callos liofilizados fue generado por maceración con etanol al 70% y la

actividad antiproliferativa del mismo se midió mediante el ensayo MTT en las líneas celulares cancerosas humanas A549, HeLa y MCF-7. La actividad antioxidante se evaluó empleando los ensayos DPPH, FRAP y midiendo el contenido de fenoles y flavonoides totales (TPC y TFC). La actividad antiinflamatoria fue estimada a través de la capacidad inhibitoria del óxido nítrico en macrófagos RAW264.7 estimulados con LPS. Finalmente se generó un perfil químico de los compuestos presentes en el extracto etanólico de los callos utilizando espectrometría de masas. Resultando que las yemas fueron el explante más callogénico, con un 55.60 % de inducción en la concentración de 1.5 mg/L de AIB. En tanto que el extracto etanólico de callos de *A. californica* no mostró una actividad significativa sobre las líneas celulares probadas; sin embargo, presentó un gran contenido de TPC y TFC con valores de 2.6 ± 0.25 mmol GAE/g de extracto y 1.56 ± 0.25 mmol QE/g de extracto; así como una actividad antioxidante significativamente alta por el método de estabilización del radical DPPH (EC_{50} 44.85 ± 1.22 $\mu\text{g/mL}$) y FRAP (1.58 ± 0.15 mmol de Fe^{2+} /g de extracto). El extracto etanólico de los callos de *A. californica* inhibió en un 24% la producción de óxido nítrico con respecto a las células control. En el perfil químico del extracto etanólico de los callos se encontraron estructuras pertenecientes a los ácidos fenólicos y flavonoides principalmente. De esta manera se concluyó que para desarrollar callos efectivos de *A. californica* las yemas de la planta deben ser cultivadas en WPM+1.5 mg/L de AIB. Adicionalmente se concluye que los compuestos fenólicos son los responsables de la alta actividad antioxidante y antiinflamatoria presentada por el extracto etanólico de los callos obtenidos.

Palabras clave: *Acalypha californica*, cáncer, compuestos fenólicos, cultivo de callos.

ABSTRACT: *Acalypha californica* Benthham is a plant used by the ethnic groups of Sonora to treat cancer; however, it is a plant that is not cultivated, in such a way that the species grows in habitats exposed to anthropogenic activities and indiscriminate collection, resulting in a significant decrease in wild populations. In addition to the above, the biological activities related to the antiproliferative processes (antioxidant and anti-inflammatory) attributed to the species have not been evaluated. Therefore, the objective of the present work was to establish the adequate conditions for the growth of *A. californica* calluses, as well as to characterize chemically and biologically the ethanolic extract of the generated calluses. First, for callus production, explants were used from leaves, petioles, buds, and nodal segments of *A. californica*, which were inoculated in Woody Plant Medium (WPM), supplemented with indole butyric acid (AIB), benzyl amino purine (BAP) or kinetin (CIN) in a range of 0.5-2.0 mg/L. The lyophilized callus extract was generated by maceration with 70% ethanol and its antiproliferative activity was measured by the MTT assay in the human cancer cell lines A549, HeLa and MCF-7. The antioxidant activity was evaluated using the DPPH and FRAP assays and by measuring the content of total phenols and flavonoids (TPC and TFC). The anti-inflammatory activity was estimated through the inhibitory capacity of nitric oxide in RAW264.7 macrophages stimulated with LPS. Finally, a chemical profile of the compounds presents in the ethanolic extract of the callus was generated using mass spectrometry. Resulting that the buds were the most callogenic explant, with a 55.60% induction in the concentration of 1.5 mg/L of AIB. While the ethanolic extract of *A. californica* calluses did not show significant activity on the cell lines tested; however, it presented a high content of TPC and TFC with values of 2.6 ± 0.25 mmol GAE/g of extract and 1.56 ± 0.25 mmol QE/g of extract; as well as a significantly high antioxidant activity by the DPPH radical stabilization method (EC_{50} 44.85 ± 1.22 $\mu\text{g/mL}$) and FRAP (1.58 ± 0.15 mmol of Fe^{2+} /g of extract). The ethanolic extract from *A. californica* calluses inhibited nitric oxide production by 24% compared to control cells. In the chemical profile of the ethanolic extract of the calluses, structures belonging to phenolic acids and flavonoids were found mainly. In this way, it was concluded that to develop effective calluses of *A. californica*, the buds of the plant must be cultivated in WPM+1.5 mg/L of AIB. Additionally, it is concluded that phenolic compounds are responsible for the high antioxidant and anti-inflammatory activity presented by the ethanolic extract of the calluses obtained.

Key words: *Acalypha californica*, cancer, phenolic compounds, callus culture.

INTRODUCCIÓN

El término cáncer comprende un conjunto de enfermedades que presentan un crecimiento celular descontrolado, así como la diseminación de células anormales hacia diversos tejidos del cuerpo (Siegel *et al.*, 2022; Thummadi *et al.*, 2022). Actualmente es un importante problema de salud pública, ya que se ha convertido en la segunda causa de muerte en el mundo (Kargozar *et al.*, 2022; Siegel *et al.*, 2022).

En 2021 los tumores malignos representaron el 8% de las defunciones en México y se ha registrado un aumento constante en la tasa de defunciones de 6.09 por cada 10 mil personas en 2010 a 7.06 en 2021 (INEGI, 2021). Respecto a la incidencia, el cáncer de mama y el cérvico uterino fueron los de mayor morbilidad en mujeres, en tanto que el cáncer de próstata, colon y pulmón afectaron principalmente a los hombres (GLOBOCAN, 2020).

Aunado a lo anterior el cáncer presenta una gran mortalidad, esto debido a que es un proceso multifactorial que obedece tanto a agentes exógenos como endógenos (Thummadi *et al.*, 2022). Dentro de los elementos más comúnmente asociados con el desarrollo de un proceso carcinogénico se encuentran el estrés oxidativo y el proceso inflamatorio crónico (Nitin Singh *et al.*, 2019).

El estrés oxidativo se refiere al desequilibrio entre la producción de agentes oxidantes, por medio del metabolismo celular, y su eliminación mediante antioxidantes (Crespo *et al.*, 2020). Este desequilibrio conlleva al daño de biomoléculas y células del organismo, ocasionando inestabilidad cromosómica, mutación genética y/o modulación de vías de señalización (Aggarwal *et al.*, 2019). Los principales agentes oxidantes son las especies reactivas de oxígeno (EROs); sin embargo, el organismo también produce óxido nítrico (NO), el cual a su vez produce especies reactivas de nitrógeno (ERNs), mismas que poseen la capacidad de aumentar el riesgo de mutagénesis (Korde Choudhari *et al.*, 2013). Un ambiente constante de estrés causa que las especies reactivas se produzcan durante un gran periodo de tiempo y que, a su vez, se genere un daño fisiológico en las células y tejido circundante que estimule un proceso de inflamación prolongado, el cual promueve el crecimiento, proliferación, supervivencia y metástasis de las células cancerosas (Todoric & Karin, 2019). De manera que para prevenir y resolver un proceso canceroso se requieren de terapias que no solo tengan actividad anticancerígena, sino que también exhiban propiedades antioxidantes y antiinflamatorias.

A causa de que las terapias convencionales contra el cáncer no son suficientes, suelen provocar toxicidad y numerosos efectos secundarios, se lleva a cabo una búsqueda continua de agentes quimioterapéuticos. Y en este esfuerzo han sido las plantas las que más han despertado el interés como fuente potencial de moléculas o fitofármacos bioactivos usando como principal herramienta de bioprospección la información de la etnofarmacopea (Kargozar *et al.*, 2022; Ochatt *et al.*, 2022; Purwianingsih *et al.*, 2016).

En los estados de Baja California y Sonora se distribuye *Acalypha californica* Benth. Esta planta es un arbusto semileñoso y perenne, utilizado ampliamente por los grupos étnicos para tratar el cáncer, por lo que se conoce comúnmente como "hierba del cáncer". En un estudio previo se demostró que el extracto metanólico de *A. californica* y sus fracciones de solventes poseían actividad antiproliferativa media en las líneas celulares murinas M12.A^k.C3.F6, RAW 264.7 y L929, así como en la línea celular cancerosa humana HeLa y que dicho efecto era debido a la activación de la apoptosis; adicionalmente se realizó un perfil químico de las sustancias contenidas en las fracciones con mayor actividad encontrando principalmente proantocianidinas y algunos ácidos fenólicos. Aunque dicho estudio fue el primero en brindar información sobre las actividades biológicas y la composición química de la planta, con excepción de la línea HeLa, no fue evaluada la actividad en otras líneas celulares cancerosas humanas (Rascón-Valenzuela *et al.*, 2015).

Debido a la recolección aleatoria por parte del herbolario local y a la destrucción de su hábitat por la actividad antropogénica, es necesario tomar medidas encaminadas a la permanencia de *A. californica*, entre las que se propone la búsqueda de métodos de propagación y técnicas de cultivo comercial para esta planta medicinal (Khan *et al.*, 2021; Pimentel *et al.*, 2010; Sampayo-Maldonado, 2018).

El cultivo *in vitro* es una técnica que explota la totipotencialidad de las células para inducir la división celular, morfogénesis y desarrollo de la planta a partir de un cultivo aséptico de diferentes tipos de explantes en un medio de cultivo, esto con la finalidad de obtener callos. El callo es una masa de células indiferenciadas, que se desarrolla en respuesta a agentes químicos o lesiones físicas (Babich *et al.*, 2021). Para obtenerlos se debe optimizar el medio de cultivo, realizando variaciones en la concentración de nutrientes, minerales, sustancias orgánicas y reguladores de crecimiento de las plantas (Alcántara *et al.*, 2019). Los reguladores de crecimiento son sustancias que inducen respuestas fisiológicas tales como el desarrollo de raíces, la inducción de callos o el brotamiento. Entre los reguladores de crecimiento más utilizados en el cultivo *in vitro* de plantas se encuentran la auxina ácido indolbutírico (AIB), hormona que regula el crecimiento de la planta, la citocinina 6-bencilaminopurina (BAP) que promueve la división y la diferenciación y la cinetina (CIN) que promueve la división celular. Dichos reguladores de crecimiento pueden actuar diferencialmente dependiendo de la especie de planta, las dosis usadas y las combinaciones de estas (De-Souza *et al.*, 2022; Ríos-Ramírez *et al.*, 2017).

Tomando en cuenta que *A. californica* es una planta utilizada ampliamente por las personas para el tratamiento empírico del cáncer lo cual la hace blanco de la recolección desregulada de biomasa silvestre, que no han sido probadas las actividades biológicas relacionadas con la carcinogénesis tales como la actividad antioxidante y antiinflamatoria, y que existe información limitada sobre su composición, el objetivo del presente estudio fue encontrar las condiciones de formación de callos para el cultivo *in vitro* de *A. californica*; así como también medir las actividades antioxidante, antiinflamatoria y antiproliferativa en líneas celulares cancerosas humanas y determinar su perfil químico. Todo lo anterior como un primer esfuerzo para caracterizar química y biológicamente las etapas del desarrollo de la planta *in vitro* y encontrar las condiciones en las cuales se produzcan las sustancias bioactivas que validen su uso etnofarmacológico.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Las partes aéreas de *A. californica* fueron recoletadas en septiembre del 2018 en el Cerro del Bachoco, en la ciudad de Hermosillo, Sonora, México (29°8'51.3'' N, 110°57'0''O, matorral semidesértico, temperatura promedio 32°C, humedad relativa media 56%). La planta fue identificada en el herbario de la Universidad de Sonora y se le asignó el número de registro 026567.

Inducción de callos

Para la inducción de los callos fueron elegidos tallos juveniles de *A. californica* obtenidos en la colecta, los cuales fueron lavados con agua corriente durante veinte minutos, luego con detergente mediante agitación manual por tres minutos. Para la asepsia las muestras fueron colocadas en alcohol al 70% (v/v) durante 60 segundos, seguido de un lavado en solución de hipoclorito de sodio al 12% con una gota de Tween 20 durante 15 minutos. Finalmente, los tallos fueron enjuagados con agua destilada estéril en tres ocasiones. Los explantes seleccionados para el estudio fueron hojas, pecíolos, yemas y segmentos nodales, mismos que fueron cortados en trozos de 0.5 – 1.0 cm con un bisturí estéril.

Para realizar el cultivo *in vitro* fue utilizado el medio para plantas leñosas Woody Plant Medium (WPM) suplementado con diversas concentraciones (0,0.5,1.0,1.5,2.0 mg/L) de ácido indolbutírico (AIB), 6-bencilaminopurina (BAP) o cinetina (CIN), siguiendo la metodología empleada por (Majumder & Rahman, 2016). El pH del medio de cultivo se ajustó a 5.7 antes de adicionar el agar y la sacarosa, después se vertieron 25 mL de medio en frascos de vidrio, todo en condiciones de esterilidad.

Posteriormente, el medio que se encontraba en los frascos fue inoculado con los diversos explantes y se mantuvieron con un fotoperíodo de 16 horas luz a 27 ± 1 °C de temperatura. El subcultivo se realizó en un medio de igual composición al que permitió la callogénesis. El medio sin reguladores de crecimiento vegetal fue utilizado como control.

Porcentaje de inducción de callos y morfología

Los datos sobre la inducción de callos (%) se registraron con la ayuda de la siguiente fórmula: Porcentaje de inducción de callos = $(N^{\circ}$ de explantes que produjeron callos/ N° de explantes) $\times 100$. En la inducción completa del callo para cada tratamiento se examinaron visualmente la textura y el color.

Preparación del extracto etanólico de callos de *A. californica*

El extracto etanólico fue obtenido mediante maceración de los callos liofilizados (6 semanas de crecimiento, crecidos en WPM+1.5 mg/L de AIB) con etanol al 70% en proporción 1:10 durante diez días con agitación intermitente a temperatura ambiente. El solvente fue removido mediante evaporación bajo presión reducida a 40 °C en un evaporador rotatorio (IKA, RV 10 digital, Wilmington, NC, USA). El extracto concentrado fue guardado a 4 °C, protegido de la luz, para su uso en ensayos posteriores.

Cultivo celular

Para los ensayos de actividad antiproliferativa se utilizaron como modelos las líneas celulares cancerígenas humanas A549 (carcinoma pulmonar) (ATCC CRM-CCL-185), HeLa (adenocarcinoma cervicouterino) (ATCC: CCL-2), MCF-7 (adenocarcinoma mamario) (ATCC: HTB-22) y ARPE-19 (no cancerosa, epitelio pigmentado de la retina) (ATCC:CRL2302). En tanto que para el ensayo de actividad antiinflamatoria mediante la medición de óxido nítrico se utilizó como modelo la línea murina RAW 264.7 (macrófagos transformados por el virus de la leucemia de Abelson) (ATCC: TIB-71). Todas las líneas celulares fueron adquiridas de la American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, EUA). Cada línea se mantuvo en el medio de cultivo DMEM alto en glucosa suplementado con 1% (v/v) de solución de penicilina-estreptomicina (10000 unidades de penicilina y 10 mg de estreptomicina/mL), 0.75% (v/v) de solución de L-glutamina 200 mM, 1% (v/v) de solución de piruvato de sodio 100 mM y 5% de suero fetal bovino. Las células fueron cultivadas en frascos de cultivo celular de 25 cm² y fueron mantenidas a 37 °C en una incubadora con una atmósfera humidificada y con 5% de CO₂. Las células se utilizaron para los ensayos una vez que se obtuvo el 80% de confluencia. Para despegar las células del fondo del frasco se utilizó una solución de tripsina-EDTA (Rascón Valenzuela, 2015).

Actividad antiproliferativa

La actividad antiproliferativa se evaluó mediante el ensayo de reducción de MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio] Mossman, 1983, con algunas modificaciones. Las células (1×10^4 por pozo, 50 μ L) fueron colocadas en cada pozo de una placa de 96 pozos y se incubaron durante 24 h a 37 °C en una atmósfera del 5% de CO₂. Después se añadieron alícuotas de 50 μ L de medio (DMEM 5% FBS) con un intervalo 6.25 a 200 μ g/mL del extracto disuelto previamente en DMSO (concentración máxima de DMSO 0.5%) y las células estimuladas fueron incubadas durante 48 h. En las últimas 4 horas del período de incubación, el medio de cada pozo fue retirado y se realizó un enjuague con PBS 1X, posteriormente 100 μ L de medio fresco fueron añadidos a cada pocillo, así como 10 μ L de solución de MTT (5 mg/mL). El fármaco de amplio espectro doxorubicina fue utilizado como control y con fines

de comparación. La viabilidad celular se evaluó por la capacidad de las células metabólicamente activas para reducir la sal de tetrazolio a cristales de formazán, mismos que fueron disueltos con 100 μL de alcohol isopropílico ácido. La absorbancia de las muestras se midió con un lector de microplacas (Thermo Fisher Scientific Inc. Multiskan GO, Waltham, MA, USA), utilizando una longitud de onda de prueba de 570 nm y una longitud de onda de referencia de 630 nm. La absorbancia de las células tratadas únicamente con DMSO fue considerada como el 100% de proliferación. La actividad antiproliferativa del extracto fue reportada como valores de IC_{50} o en % de proliferación cuando no se haya podido inhibir el crecimiento del 50% de las células.

Actividad antioxidante

Contenido de fenoles totales (TPC)

El contenido fenólico total del extracto etanólico de los callos de *A. californica* se determinó utilizando el método de Folin-Ciocalteu adaptado a microplaca de 96 pozos (Sánchez-Rangel *et al.*, 2013). Brevemente, se pesaron 10 mg del extracto seco y se disolvieron en 1 mL de metanol. Posteriormente 30 μL de la solución de extracto se mezclaron con 30 μL del reactivo de Folin-Ciocalteu al 10%. Las mezclas fueron incubadas por dos minutos a 40 °C. Seguidamente fueron adicionados a cada pozo 240 μL de Na_2CO_3 7% (p/v) y las mezclas fueron incubadas por 20 minutos a 40 °C. La absorbancia de cada pozo fue medida a una longitud de onda de 760 nm utilizando un espectrofotómetro de microplacas (Thermo Fisher Scientific Inc. Multiskan GO, Waltham, MA, USA). El contenido fenólico total de las muestras se calculó a partir de la curva de calibración de ácido gálico (0-58 mM). Los resultados fueron expresados como mmoles de equivalentes de ácido gálico (GAE) por gramo de extracto.

Contenido de flavonoides totales (TFC)

Para determinar el contenido total de flavonoides se evaluó la formación de complejos con aluminio (Shraim *et al.*, 2021). En una microplaca de 96 pozos se colocaron 100 μL de agua desionizada, 10 μL de NaNO_2 5 % (p/v) y 25 μL de extracto etanólico de *A. californica* previamente disuelto en metanol (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$). La microplaca con las soluciones se incubó a temperatura ambiente, en oscuridad durante cinco minutos. Posteriormente, fueron añadidos 15 μL de solución de AlCl_3 al 10% (p/v) a cada uno de los pozos y seguidamente se incubaron a temperatura ambiente durante seis minutos; finalmente fueron adicionados 50 μL de solución de NaOH 1 M y 50 μL de agua desionizada. La absorbancia de las muestras fue medida a 510 nm en un espectrofotómetro UV-Visible para microplacas (Thermo Fisher Scientific Inc. Multiskan GO, Waltham, MA, USA). El contenido total de flavonoides de las muestras se calculó a partir de la curva de calibración de quercetina (0-3.3 mM). Los resultados se expresan como mmoles de equivalentes de quercetina (QE) por gramo de extracto.

Estabilización del radical DPPH

La actividad antioxidante por estabilización del radical DPPH (1,1- difenil- 2- picrilhidrazilo, 2,2- difenil- 1- (2,4,6- trinitrofenil) hidrazilo) se determinó según Molyneux 2004 con algunas modificaciones. Primero fueron disueltos 2.5 mg del radical en 100 mL de metanol, ajustándose la absorbancia a 0.700 ± 0.01 . En una microplaca de 96 pocillos se añadieron 200 μL del radical, y alícuotas de 20 μL de diferentes concentraciones del extracto (concentración final de 50-1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Finalmente, las mezclas fueron incubadas por 30 minutos protegidas de la luz. La absorbancia fue medida en un espectrofotómetro UV-Visible para microplacas (Thermo Fisher Scientific Inc. Multiskan GO, Waltham, MA, USA) empleando una longitud de onda de 515 nm. Se empleó un blanco reactivo y el flavonol quercetina como control positivo. Los porcentajes de inhibición fueron determinados mediante la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de inhibición} = \left(\frac{\text{Abs del blanco} - \text{Abs de la muestra}}{\text{Abs del blanco}} \right) * 100$$

Poder Antioxidante Reductor Férrico (FRAP)

Para evaluar la actividad antioxidante mediante el ensayo FRAP, inicialmente se prepararon varias soluciones: buffer de acetatos 300 mM (pH 3.6), ácido clorhídrico 40 mM, solución TPTZ (2,4,6-Tris (2-piridil)-S-triazina) 10 mM (en HCl 40 mM) y una solución de cloruro férrico 20 mM. La solución FRAP se obtuvo mediante la adición de buffer de acetatos, solución TPTZ y solución de cloruro férrico con una relación 10:1:1, respectivamente. Posteriormente se colocaron 270 μ L del reactivo FRAP en una microplaca de 96 pocillos y se le añadieron alícuotas de 20 μ L con diferentes concentraciones del extracto (100, 500 y 1000 μ g/mL). A continuación, se incubó la microplaca protegida de la luz durante 30 minutos. La absorbancia fue medida a una longitud de onda de 593 nm en un espectrofotómetro UV-Vis para microplacas (Thermo Fisher Scientific Inc. Multiskan GO, Waltham, MA, USA). Los resultados se expresaron como mmoles de Fe^{2+} /g de muestra mismos que fueron obtenidos mediante una curva de calibración de Fe_2SO_4 con un intervalo de concentraciones de 7.82 a 250 μ moles de Fe^{2+} .

Actividad antiinflamatoria

La medición de la actividad antiinflamatoria se llevó a cabo según (Schmölz *et al.*, 2017). Los macrófagos RAW 264.7 se cultivaron a una densidad de 500×10^3 células/mL de medio en una placa de 24 pozos, en una atmósfera con 5% CO_2 y 37 °C. Pasadas 24 horas, los cultivos fueron estimulados con concentraciones de 25-200 μ g/mL del extracto por dos horas (valores cercanos a la IC_{10}), luego se agregó 1 μ g/mL de LPS a cada pozo, y las células estimuladas fueron incubadas por 24 horas. Posteriormente 50 μ L de cada sobrenadante de los pozos fueron colocados en otra placa de 96 pozos y a cada uno se le adicionaron 50 μ L de reactivo de Griess, la mezcla se dejó reaccionar por 10 minutos y la absorbancia fue medida a 540 nm, utilizando un espectrómetro UV-Vis para microplacas (Thermo Fisher Scientific Inc. Multiskan GO, Waltham, MA, USA). Como control de activación se tomó la absorbancia de las células estimuladas con LPS (100% de producción de óxido nítrico) y como control de no activación la absorbancia de aquellas que no se estimularon con LPS (línea base de producción de óxido nítrico). El fármaco de amplio espectro dexametasona fue utilizado como control negativo y con fines de comparación.

Identificación de Compuestos Fenólicos por ESI-IT-MS-MS

La identificación de compuestos fenólicos presentes en el extracto etanólico de callos de *A. californica* se realizó introduciendo los extractos (10 μ g/mL p/v) mediante inyección directa a un espectrómetro de masas Varian 500-MS (Walnut Creek, CA, EE. UU.) equipado con una fuente de ionización por electrospray y un analizador de masas de trampa de iones, que fueron controlados por MS WorkStation software v.16 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EE. UU.). El espectrómetro de masas fue operado en modo negativo. Se utilizó nitrógeno como gas nebulizador y helio como gas de colisión para medición de masa precisa a un flujo de 1 mL/min. El equipo se operó a un voltaje -17 KV, y temperatura capilar de 350 °C. Los espectros de masas se adquirieron en modo de escaneo completo en el rango de 100–2000 *m/z*. La manipulación del extracto se llevó a cabo con protección de la luz. La identificación de los metabolitos se realizó por fragmentación de segundo orden (MS/MS). La confirmación se realizó comparando los iones fragmentados con los reportados en la literatura utilizando y bases de datos como el Mass Spectrometry Data Center (<https://chemdata.nist.gov/>) y el MassBank (<https://massbank.eu/MassBank/>).

Análisis estadístico

Para el cálculo de los valores de IC_{50} o EC_{50} se analizaron los porcentajes de proliferación o de inhibición de al menos tres experimentos, por triplicado, y fueron sometidos a un análisis de regresión lineal o no lineal dependiendo del comportamiento de los datos. Para el cálculo de la regresión no lineal los datos fueron log transformados, normalizados y analizados para generar una curva dosis-respuesta y calcular los valores correspondientes (IC_{50} o EC_{50}).

En todos los ensayos biológicos los resultados se presentan como la media de triplicados de tres experimentos paralelos \pm desviación estándar. Las diferencias significativas entre medias se evaluaron por análisis de varianza de una vía (ANOVA), después de comprobar que los datos eran normales (prueba de Shapiro-Wilk) y homocedásticos, seguido por una prueba de Tukey. Las diferencias se consideraron significativas cuando $p < 0.05$. Los resultados se analizaron por medio del programa estadístico JMP, versión para Windows 11.0.0 y Graphpad prism versión 8.0.

RESULTADOS

Inducción de callos

Para establecer el cultivo *in vitro* de una planta la inducción de callos es un paso vital, esto se puede realizar a partir de un explante con un grado de diferenciación variable de sus tejidos, debido a un proceso de desdiferenciación y división celular, modulado por el tipo de explante, medio de cultivo, tipo y concentración de regulador de crecimiento entre otros factores (Prakasha & Umesha, 2018).

Con la finalidad de encontrar las mejores condiciones y el mejor explante para el cultivo de los callos de *A. californica*, pecíolos, yemas, hojas y segmentos nodales fueron inoculados en el medio Woody Plant Medium (WPM) especial para plantas leñosas, así como diferentes concentraciones de los reguladores de crecimiento vegetal 6-bencilaminopurina (BAP), cinetina (CIN) o ácido indol butírico (AIB) (Tabla 1).

Tabla 1. Efecto de diferentes concentraciones (mg/L) de AIB, BAP o CIN en el porcentaje de inducción de callo y el crecimiento promedio (cm) en hojas, pecíolos, yemas y segmentos nodales que produjeron callos, durante seis semanas de incubación*.

Tratamientos	Hojas		Pecíolos		Yemas		Segmentos nodales	
	% I	CP (cm)	% I	CP (cm)	% I	CP (cm)	% I	CP (cm)
Control	0	0	0	0	0	0	0	0
AIB								
0.5	22.20 bc	0.55 \pm 0.10 b	33.30 ab	0.56 \pm 0.30 b	16.30 c	0.50 \pm 0.01 b	15.60 c	0.56 \pm 0.10 b
1.0	9.00 c	0.58 \pm 0.20 b	34.10 ab	0.50 \pm 0.30 b	29.10 bc	0.53 \pm 0.10 b	14.90 c	0.55 \pm 0.10 b
1.5	33.30 a	1.90 \pm 0.15 a	51.90 a	2.96 \pm 0.20 a	55.60 a	0.56 \pm 0.10 b	39.00 a	1.85 \pm 0.40 a
2.0	12.30 c	0.58 \pm 0.20 b	18.50 bc	0.60 \pm 0.10 a	37.00 b	0.90 \pm 0.45 b	14.90 c	0.58 \pm 0.20 b
BAP								
0.5	10.30 c	0.50 \pm 0.23 b	8.30 c	0.50 \pm 0.16 b	33.30 b	0.51 \pm 0.10 b	23.30 b	0.65 \pm 0.10 b
1.0	29.60 a	3.20 \pm 0.41 a	44.60 a	0.86 \pm 0.20 b	49.90 a	2.00 \pm 0.20 a	44.30 a	0.80 \pm 0.30 b
1.5	13.30 c	0.60 \pm 0.27 b	15.30 bc	0.64 \pm 0.10 b	20.70 c	0.80 \pm 0.10 b	12.90 c	0.57 \pm 0.10 b
2.0	14.90 c	0.56 \pm 0.10 b	16.90 bc	0.59 \pm 0.20 b	18.50 c	0.50 \pm 0.01 b	10.00 c	0.50 \pm 0.16 b
CIN								
0.5	11.10 c	0.55 \pm 0.30 b	7.00 c	0.50 \pm 0.13 b	5.00c	0.57 \pm 0.10 b	6.00 c	0.80 \pm 0.13 b
1.0	8.60 c	0.60 \pm 0.13 b	9.00 c	0.56 \pm 0.20 b	7.30 c	0.50 \pm 0.05 b	11.30 c	0.50 \pm 0.12 b
1.5	10.30 c	0.53 \pm 0.20 b	5.60 c	0.51 \pm 0.10 b	10.00 a	0.56 \pm 0.10 b	8.00 c	0.73 \pm 0.20 b
2.0	14.90 c	0.48 \pm 0.10 b	7.30 c	0.54 \pm 0.30 b	6.00 c	0.52 \pm 0.20 b	10.30 c	0.51 \pm 0.04 b

*Los valores corresponden a la media de tres réplicas con tres explantes por réplica. %I=Porcentaje de inducción, CP=Crecimiento promedio. ^{a-c} Medias de grupos con letras iguales no difieren significativamente entre sí de acuerdo a la prueba de Tukey ($p < 0.05$).

Como se muestra en la tabla 1 los mayores porcentajes de inducción de callos se obtuvieron empleando 1.0 mg/L de BAP y 1.5 mg/L de AIB. Adicionalmente se puede observar que el explante más callogénico fue la yema a la concentración de 1.5 mg/L de AIB con un 55.60 % de inducción. Por otro lado, el mayor crecimiento promedio de callos se observó en hojas con un valor promedio de 3.20 cm en la concentración de 1.0 mg/L de BAP (Fig. 1).

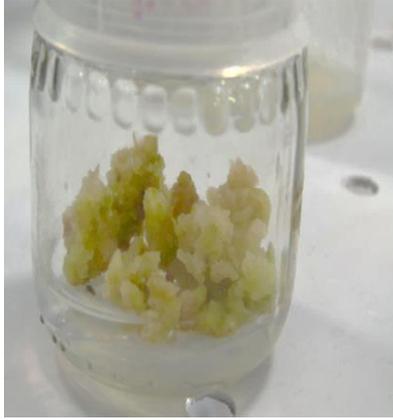


Fig. 1. Desarrollo de callo de *A. californica* a partir de un explante de hoja después de cuatro semanas de incubación en medio WPM+1 mg/L de BAP.

El tratamiento control que consistía solo en medio WPM sin suplementación de los reguladores de crecimiento no presentó desarrollo de callo, lo que indica que es necesaria la aplicación de fitoreguladores en el cultivo de tejidos de *A. californica*, resultados similares reportaron Sagharyan *et al.*, (2020). Sin embargo, resalta el hecho de que CIN no mostró un buen desempeño en la calogénesis, ya que a la concentración más alta (2 mg/L), tan solo se obtuvo un 14% en la inducción de callos a partir de hojas.

Con la finalidad de evaluar si los callos obtenidos podían generar organogénesis indirecta una parte de los callos provenientes de los diferentes explantes y suplementados en un inicio con AIB (1.5 mg/L) o BAP (1 mg/L) fueron subcultivados utilizando WPM+1.5 mg/L de AIB y su diferenciación fue monitorizada durante seis semanas. En la figura 2 se puede observar que los callos de todos los explantes fueron capaces de generar brotes; sin embargo, aquellos provenientes del medio inicial suplementado con AIB a 1.5 mg/L tuvieron un mayor crecimiento, destacando por su tamaño los obtenidos de pecíolos; adicionalmente pudo evidenciarse que únicamente los callos obtenidos de los pecíolos mostraron rizogénesis.

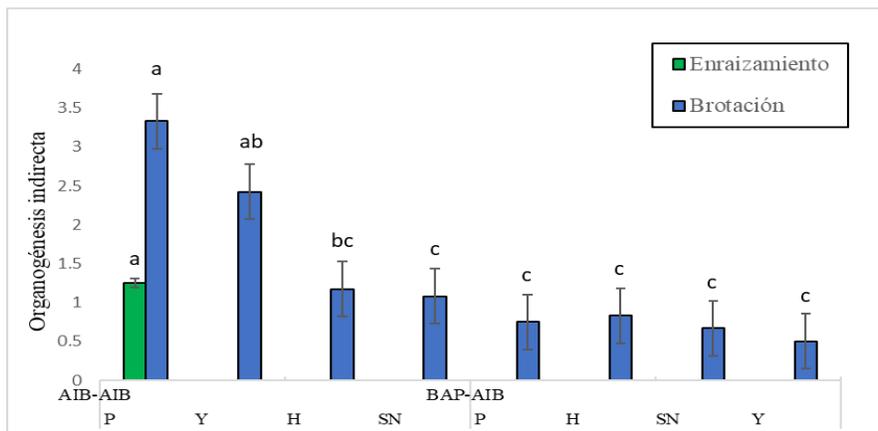


Fig. 2. Organogénesis indirecta tras subcultivo en medio WPM suplementado con 1.5 mg/L de AIB: P: pecíolo, Y: yemas, H: hojas, SN: segmentos nodales. ^{a-c} Medias de grupos con letras iguales no difieren significativamente entre sí de acuerdo a la prueba de Tukey ($p < 0.05$).

Evaluación de la proliferación celular

Una vez que se determinó que la mejor condición de calogénesis era el cultivo de los explantes en WPM+1.5 mg/L de AIB, los callos con seis semanas de crecimiento fueron liofilizados. Con la finalidad de caracterizar las actividades biológicas relacionadas con el efecto anticancerígeno que le atribuyen las etnias a *A. californica*, se generó un extracto hidroalcohólico por medio de maceración, tomando en cuenta que en un estudio previo las sustancias polares del extracto fueron las responsables de sus propiedades bioactivas (Rascón *et al.*, 2015).

La primera de las actividades biológicas evaluadas fue la antiproliferativa, la cual se midió mediante el ensayo de reducción del MTT utilizando un intervalo de concentraciones de 6.25 – 200 µg/mL del extracto etanólico de los callos de *A. californica* como tratamiento en las líneas celulares cancerosas humanas A549, HeLa y MCF-7 (Tabla 2).

Como se observa en la tabla 2 los valores de IC₅₀ del extracto etanólico de los callos de *A. californica* no pudieron ser determinados para ninguna de las líneas celulares, debido a que a la concentración más alta empleada en el presente estudio el extracto no posee la capacidad de inhibir el 50% del crecimiento de las células con respecto a aquellas tratadas únicamente con DMSO (100% de proliferación).

Tabla 2. Actividad antiproliferativa del extracto etanólico de los callos de *A. californica* en líneas celulares humanas.

Tratamiento	Líneas celulares (IC ₅₀ *)		
	A549	HeLa	MCF-7
Extracto etanólico de callos de <i>A. californica</i>	ND	ND	ND
Doxorrubicina	0.977±0.009 ^a	0.788±0.007 ^b	0.870±0.010 ^a

Valores de IC₅₀ (µg/mL; media ± desviación estándar, n>3). Los valores en las filas con superíndice distinto (a-c) son significativamente diferentes ($p<0.05$). * Concentración inhibitoria del 50%. ND: No determinado, IC₅₀ > 200 µg/mL

La línea celular A549 resultó ser la más susceptible al efecto del extracto con una proliferación del 66.05% a la concentración de 200 µg/mL, en tanto que la línea MCF-7 mostró ser la más resistente. Los efectos del extracto etanólico de los callos de *A. californica* exhibieron un efecto dosis dependiente en las concentraciones de 50-200 µg/mL, en tanto que en las concentraciones de 6.25-25 µg/mL el crecimiento de las células tratadas fue similar a la del control por lo que estas últimas no se mostraron en la Tabla 3.

Actividad antioxidante

Con la finalidad de determinar la actividad antioxidante del extracto etanólico de los callos de *A. californica* se emplearon cuatro metodologías complementarias, la medición del contenido de fenoles totales (TCP), la concentración de flavonoides totales (TFC), la estabilización del radical DPPH (DPPH) y el poder de reducción del hierro férrico a ferroso (FRAP).

Tabla 3. Porcentaje de proliferación celular posterior a la aplicación de extracto etanólico de los callos *A. californica* a 200 ($\mu\text{g/mL}$).

Concentración ($\mu\text{g/mL}$)*	A549	HeLa	MCF-7
200	66.05 \pm 10.34 ^a	89.21 \pm 5.57 ^c	94.26 \pm 2.04 ^c
100	78.42 \pm 5.48 ^b	99.46 \pm 3.81 ^c	102.24 \pm 2.75 ^c
50	91.10 \pm 6.15 ^c	101.65 \pm 1.17 ^c	99.56 \pm 7.4 ^c
25	99.45 \pm 4.38 ^c	100.49 \pm 3.74 ^c	101.16 \pm 2.39 ^c

*Las concentraciones incluidas en los ensayos comprendieron el intervalo de 6.25 a 200 $\mu\text{g/mL}$; sin embargo, a partir de 25 $\mu\text{g/mL}$ no se encontraron diferencias con las células sin tratamiento. Los valores en las filas con superíndice distinto (a-c) son significativamente diferentes ($p < 0.05$)

El contenido total de flavonoides y contenido de fenoles totales se ve relacionado con la actividad antioxidante de los extractos debido a que los grupos hidróxilos y los anillos aromáticos que forman parte de la estructura de los mencionados compuestos facilitan la estabilización de los radicales libres y reducción de especies oxidantes. Los compuestos fenólicos y flavonoides presentan estructuras complejas y variadas de manera tal que se debe de establecer una metodología que permita comparar los efectos de los diversos compuestos con uno de referencia, así que para el TPC se utilizó el estándar de ácido gálico y para TFC se empleó el estándar de quercetina. Un valor más alto obtenido en estos ensayos representa una mayor abundancia de compuestos con capacidad antioxidante.

En la tabla 4 se observa como el extracto etanólico de los callos de *A. californica* posee un alto contenido de fenoles totales con un valor de 2.6 \pm 0.25 μmol de GAE/g de extracto seco, esto de acuerdo con la clasificación propuesta por (Subedi *et al.*, 2014) quienes establecen que un valor igual o superior a 0.6 mmol GAE/g de extracto representa una alta concentración de compuestos fenólicos. Por otra parte, el contenido de flavonoides totales determinado para el extracto también puede ser considerado muy alto ya que presentó 1.56 \pm 0.25 mmol QE/g de extracto, cuando el valor de corte para extractos con alto contenido se encuentra en 0.33 mmol QE/g de extracto (Subedi *et al.*, 2014).

Para evaluar el potencial antirradicalario del extracto se empleó el ensayo de estabilización de radical DPPH. Una mayor cantidad de antioxidantes en un extracto es responsable de la disminución de la absorbancia de la solución de DPPH, para comparar la actividad de eliminación de radicales por los extractos etanólicos se utilizaron los valores de EC₅₀ (Concentración Eficaz media), y cuanto menor sea su valor, mayor es la capacidad de estabilizar los radicales libres. Un estándar del flavonol, quercetina, se utilizó como control positivo con un valor de EC₅₀ de 1.71 \pm 0.40 $\mu\text{g/mL}$. Para determinar si los valores de EC₅₀ obtenidos son significativos, se tomó como base la clasificación propuesta por (Bi *et al.*, 2016), quien propone los siguientes valores de corte: Actividad antioxidante fuerte con EC₅₀ < 100 $\mu\text{g/mL}$, intermedia EC₅₀ 100-500 $\mu\text{g/mL}$ y débil EC₅₀ > 500 $\mu\text{g/mL}$. De manera tal que el extracto etanólico de los callos de *A. californica* exhibió una actividad antirradicalaria muy fuerte con un valor de EC₅₀ de 44.85 \pm 1.22 $\mu\text{g/mL}$ (Tabla 4).

Debido a que existen diversos mecanismos oxidativos, el ensayo FRAP fue incluido con la finalidad de evaluar la capacidad del extracto de callos de *A. californica* para reducir el ion férrico a ferroso. Mediante un cribado de más de 20 extractos de plantas con actividad antioxidante Gohari *et al.* (2011) determinaron que valores de 0.16 mmol de Fe²⁺/g de extracto

representan una fuerte actividad reductora en el ensayo FRAP por lo que el poder reductor del hierro férrico para el extracto etanólico de los callos de *A. californica* puede ser considerado fuerte ya en los experimentos realizados en el presente estudio se obtuvo un valor de 1.58 ± 0.15 mmol de Fe^{2+} /g de extracto (tabla 4).

Tabla 4. Contenido de fenoles y flavonoides totales en el extracto etanólico de callos de *A. californica*.

Muestra	TPC ^a	TFC ^b	DPPH ^c	FRAP ^d
Extracto etanólico de callos de <i>A. californica</i>	2.6 ± 0.25	1.56 ± 0.25	44.85 ± 1.22	1.58 ± 0.15
Quercetina			1.71 ± 0.14	33.27 ± 0.82

^ammol de equivalentes de ácido gálico, representado como la media \pm SE; ^bmmol de equivalentes de quercetina, representado como la media \pm SE; ^cEC₅₀, representado como la media \pm SE en $\mu\text{g}/\text{mL}$, ^dmmol de Fe^{2+} , representado como la media \pm SE

Actividad antiinflamatoria

En general, se reconoce que el efecto inhibitor de la producción de óxido nítrico (NO) es un índice importante para evaluar la eficacia de los agentes antiinflamatorios. Así que con la finalidad de determinar dicha actividad del extracto etanólico de los callos de *A. californica* se utilizó un sistema basado en células RAW 264.7 activadas con LPS para la producción del NO. Los macrófagos activados fueron tratados con un intervalo de concentraciones del extracto etanólico de los callos de *A. californica* de 25-200 $\mu\text{g}/\text{mL}$, el cual no disminuye la proliferación de las células RAW264.7. En la figura 3 se muestra como todas las concentraciones probadas causaron disminuciones estadísticamente significativas en la producción de NO, siendo la concentración de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ la que mostró una mayor efectividad reduciendo aproximadamente un 23% del NO producido con respecto al control de células sin tratamiento.

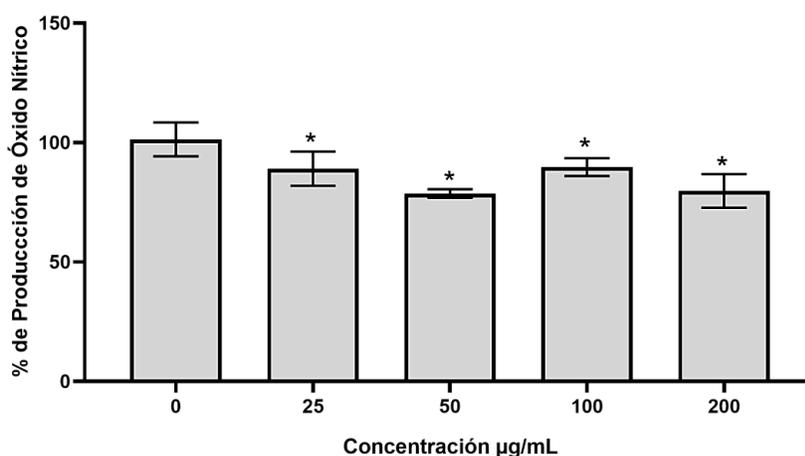


Fig. 3. Efecto en la producción de NO: Efectos del extracto etanólico de callos de *A. californica* sobre la producción de óxido nítrico (NO) en células RAW 264.7 estimuladas con LPS 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, en un intervalo de concentraciones de 25 a 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$, *Significancia estadística en comparación con las células control (DMSO), $p < 0.05$ (Prueba de Tukey).

Identificación de Compuestos Fenólicos por ESI-IT-MS-MS

Con la finalidad de elucidar los compuestos presentes en el extracto etanólico de los callos de *A. californica* se utilizó espectrometría de masas en modo de ionización negativo, el cual es el método más pertinente para la identificación de compuestos fenólicos. De esta manera el análisis de los espectros de masas denotó la presencia de 15 compuestos fenólicos, de los cuales 10 son pertenecientes a los ácidos fenólicos y cinco son flavonoides (Tabla 4). Dentro del grupo de los flavonoides se identificó una isoflavona, la genisteína; un flavanol, el kaempferol; un flavano, la [epi]catequina; un flavanonol, la taxifolina; y una flavona, la miricetina-3-*O*-pentósido.

Tabla 5. Identificación de compuestos presentes en el extracto etanólico de callos de *A. californica* mediante FIA-ESI-IT-MS.

Sustancia	Ion precursor [M-H] (<i>m/z</i>)	Iones productos ESI-MS ⁿ (<i>m/z</i>)
Aldehído protocatéquico	137	109 (100)
Ácido protocatéquico	153	109 (100), 137 (29)
Ácido cumárico	163	109 (24), 135 (100)
Ácido gálico	169	125 (100)
Ácido cafeico	179	135 (73), 161 (62)
Ácido quínico	191	83 (18), 93 (63), 109 (33), 111 (26), 127 (100), 137 (14), 171 (67)
Genisteína	269	183 (72), 243 (32)
Kaempferol	285	113 (36), 159 (39), 227 (41), 266 (100)
[Epi]catequina	289	205 (13), 227 (91), 245 (81), 271 (100)
Ácido carboxílico de la brevifolina	291	203 (34), 247 (69)
Ácido elágico	301	185 (22), 229 (35), 257 (41)
Taxifolina	303	153 (12), 234 (92), 275 (58)
Ácido metil-elágico	315	185 (30), 273 (15), 300 (90)
Ácido elágico-pentosa	433	300 (100), 301 (86)
Miricetina 3- <i>O</i> -pentosa	449	279 (100), 317 (72)

DISCUSIÓN

Las plantas han sido por miles de años una fuente valiosa de compuestos bioactivos, tanto es así que el 80% de la población utiliza algún tipo de planta medicinal para el cuidado de su salud (Ávila, 2017). Al respecto *Acalypha californica* es una de las hierbas más utilizadas empíricamente para el tratamiento del cáncer en el Noroeste de México; sin embargo, es una planta que no es cultivada, de manera tal que la especie crece en hábitats expuestos a las actividades antropogénicas y la colecta indiscriminada, resultando en la disminución significativa de las poblaciones silvestres. Bajo esta premisa el presente estudio tuvo como primer objetivo encontrar las mejores condiciones de cultivo *in vitro* para generar callos de *A. californica* con la finalidad de disminuir la presión de las poblaciones silvestres y dar un primer paso en el desarrollo de fuentes de compuestos bioactivos para la obtención de materias primas utilizadas en la elaboración de fitofármacos.

Las principales variables estudiadas en la generación de los callos fueron los diferentes explantes, los cuales podían provenir de hojas, pecíolos, yemas y segmentos nodales; así como la concentración (0.5-2 mg/L) y tipos de reguladores de crecimiento (AIB, BAP y CIN). Resultando que el explante más callogénico fueron las yemas y las concentraciones más efectivas fueron 1.0 mg/L (49.9% de inducción) de BAP y 1.5 mg/L de AIB (55% de inducción); en cambio la suplementación con CIN produjo una pobre callogénesis (14% el valor más alto).

El hecho de que las yemas en combinación con los reguladores utilizados hayan sido el explante más callógeno se debe a las características genéticas propias de *A. californica* y el mecanismo de acción de los fitorreguladores. Algunos autores atribuyen las diferencias en la respuesta de distintos explantes a las características anatómicas y las variaciones en el contenido hormonal endógeno de los mismos pues es justo a nivel de factores de transcripción que actúan las auxinas y citocininas, de manera que en algunas plantas las hojas y los segmentos nodales pueden resultar más callogénicos (Espinosa *et al.*, 2012).

Como se mostró en la tabla 1 la concentración de auxinas y citocininas no siempre tienen un efecto dosis dependiente, ya que podemos observar los mejores porcentajes de inducción de callos de *A. californica* son obtenidos por concentraciones intermedias de AIB o BAP. Al respecto, ha sido evidenciado que una concentración intermedia de auxina y citocininas promueve la inducción de callos, en tanto que una alta concentración de los mismos es propicia para el desarrollo de raíces; sin embargo, el mecanismo molecular del proceso aún no se encuentra claro. Algunos autores plantean que, dependiendo de la planta y sus características genéticas, las auxinas y citocininas pueden causar cambios a nivel de factores de transcripción (vía ARF para las auxinas y vía ARR para las citocininas) que juegan un papel central en la reentrada de las células al ciclo celular (Ikeuchi *et al.*, 2013; Patel *et al.*, 2022).

Contrario a lo presentado en esta investigación CIN sirve para propiciar la callogénesis en especies tales como *Medicago sativa* (alfalfa) y *Azadirachta indica* (Neem) (Farjaminezhad & Garoosi, 2019; Wan *et al.*, 1988). Aunque, a diferencia del presente estudio, en dichas investigaciones CIN siempre fue combinada con una auxina, lo que puede explicar el hecho de que por sí sola no logró una inducción y crecimiento de los callos de *A. californica*. Lo anterior puede deberse a que la auxina AIB regula el crecimiento de la planta y desdiferenciación, la citocinina BAP promueve tanto la división, como diferenciación de las células; en tanto la cinetina CIN solo promueve la división celular. Estos resultados concuerdan con los de (Majumder & Rahman, 2016), quienes encontraron que el mayor porcentaje de inducción de callo en *A. indica* se obtenía en presencia de una combinación de auxinas y citocininas, siendo AIB el más efectivo.

Una vez obtenidos los callos y con la finalidad de continuar con la búsqueda de las mejores condiciones para callos eficientes de *A. californica*, una parte de los callos previamente cultivados en medio suplementado con 1.5 mg/L de AIB o 1.0 mg/L de BAP (los más callogénicos) fueron subcultivados en WPM +1.5 mg/L de AIB y su crecimiento y diferenciación se registró durante seis semanas de incubación. Como se puede apreciar en la figura 2 los callos obtenidos previamente en la concentración de 1.0 mg/L de BAP no desarrollaron raíces y sus brotes fueron de menor tamaño. Numerosas investigaciones en las cuales se estudió la diferenciación de plantas medicinales, como *Ugni molinae*, *Salvia officinalis* L, *Mentha piperita* L. han comprobado que AIB es un regulador de crecimiento que estimula la formación de raíces en plantas leñosas, por lo que el hecho de que no hayan sido generadas raíces y que se obtuvieron brotes más pequeños a partir de los callos inicialmente obtenidos por la suplementación con BAP nos permitió concluir que las mejores condiciones para el crecimiento de callos de *A. californica* es a partir de un explante de yemas inoculado en medio WPM suplementado con 1.5 mg/L de AIB. (Islam & Alam, 2018; Jafari *et al.*, 2017; Rodríguez Beraud *et al.*, 2014).

A. californica es una planta a la cual los grupos étnicos de Sonora y Baja California le atribuyen actividad anticancerígena, dicha propiedad fue evidenciada en un estudio realizado por Rascón *et al.* (2015) en donde la fracción polar del extracto metanólico de *A. californica* mostró actividad antiproliferativa moderada en las líneas celulares cancerosas murinas M12.A^k.C3.F6 (IC₅₀=59.90±1.05 µg/mL) y RAW 264.7 (IC₅₀=58.93±1.26 µg/mL), así como en la línea celular cancerosa humana HeLa (IC₅₀=50.11±1.13 µg/mL); adicionalmente el extracto exhibió actividad diferencial al afectar en menor medida a las células no cancerosas murinas L929 (IC₅₀=100.00±1.09 µg/mL), dicho efecto fue atribuido al contenido de proantocianidinas; sin

embargo el estudio mostró ciertas limitaciones ya que solo se evaluó una línea celular humana y actividades relacionadas con el proceso de carcinogénesis no fueron evaluadas. Así que como un primer esfuerzo para caracterizar tanto química como biológicamente las etapas de desarrollo de *A. californica* en cultivo *in vitro*, las actividades antiproliferativas en líneas cancerosas humanas, la actividad antioxidante *in vitro* y la actividad antiinflamatoria en células del extracto etanólico de los callos de *A. californica* fueron evaluadas; así mismo un perfil químico del mencionado extracto fue realizado utilizando espectrometría de masas.

Para evaluar la actividad antiproliferativa del extracto etanólico de los callos de *A. californica* fueron utilizadas las líneas celulares cancerosas humanas A549, HeLa y MCF-7 utilizando un intervalo de concentraciones de 6.25 a 200 $\mu\text{g/mL}$. Como se puede apreciar la mayor disminución para la proliferación celular (34%) fue obtenida para la línea A549 a una dosis de 200 $\mu\text{g/mL}$; sin embargo, dicho efecto no se considera activo ya que de acuerdo con el NCI para que un extracto sea considerado con propiedad antiproliferativa debe de tener un valor de IC_{50} menor que 30 $\mu\text{g/mL}$. Que el extracto etanólico de los callos no haya tenido un efecto significativo puede deberse a que los compuestos responsables de la actividad antiproliferativa son metabolitos secundarios específicamente proantocianidinas, los cuales poseen una función ecológica en el organismo, en cambio los callos son una masa de células no diferenciadas las cuales aún no producen este tipo de compuestos. La biosíntesis de metabolitos secundarios en el cultivo de tejidos vegetales suele ser baja en los estadios tempranos de desarrollo de la planta, por lo que generalmente la adición de moléculas precursoras al medio de cultivo aumenta la formación del compuesto de interés. Por este motivo, se recomienda realizar dos medios, uno que permita un buen crecimiento celular para permitir el desarrollo de la planta y otro que optimice la producción de metabolitos secundarios una vez formada (Efferth, 2019).

El cáncer es un proceso multifactorial el cual posee una asociación significativa con los procesos oxidantes e inflamatorios. Lo anterior debido a que las especies oxidantes generan mutaciones y daños a las células y tejidos, mismos que disparan un proceso de inflamación crónico que a su vez promueve la diferenciación de células iniciadas a células cancerosas (Moloney & Cotter, 2018). Por esta razón las terapias contra el cáncer deben de considerar múltiples aristas entre ellas la actividad antioxidante y antiinflamatoria de las mismas.

La actividad antioxidante del extracto etanólico de los callos de *A. californica* fue evaluada utilizando cuatro metodologías complementarias. Primeramente, el contenido de compuestos fenólicos totales y de flavonoides fue evaluado utilizando como sustancias de referencia el ácido gálico y el flavanol quercetina, respectivamente. El extracto etanólico de los callos de *A. californica* mostró un alto contenido de fenoles totales (2.6 ± 0.25 GAE/g de extracto) y también de flavonoides totales (1.56 ± 0.25 QE/g de extracto), de acuerdo con las escalas establecidas por (Subedi *et al.*, 2014) y (Bi *et al.*, 2016). Tomando en cuenta que los compuestos fenólicos y uno de sus grupos, los flavonoides, son considerados metabolitos secundarios, sorprenden los altos niveles obtenidos en los extractos de callos, incluso algunos autores sugieren que la formación de tejidos especializados es un requisito previo para la producción de metabolitos secundarios, especialmente compuestos fenólicos (de Queiroz Braga *et al.*, 2015). Sin embargo, la producción de compuestos fenólicos y flavonoides ya ha sido reportado. En un estudio donde se generaron callos de *Ageratina pichichensis* se demostró que estos poseían TCP y TFC muy parecidos a los de las plantas silvestres, esto debido a que a partir de los 20 días los callos empiezan a inducir estrés en el cultivo a causa del consumo de compuestos del sustrato, provocando una síntesis de metabolitos secundarios (Motolinia-Alcántara *et al.*, 2023).

El extracto de callos de *A. californica* presentó una actividad antioxidante especialmente fuerte mediante el ensayo DPPH, según Yuniarti *et al.*, 2020, logrando estabilizar la mitad de la concentración del radical DPPH con una concentración de 44.85 $\mu\text{g/mL}$. Dicha actividad antirradicalaria puede ser explicada debido al alto contenido de compuestos fenólicos y flavonoides del extracto de los callos, ya que la estructura química de estos compuestos los

capacitan para estabilizar y desactivar radicales libres antes de que ataquen a las biomoléculas de la célula. En sistemas vivos la actividad antirradicalaria se encuentra asociada a la prevención de múltiples desordenes crónicos tales como la diabetes, arteroesclerosis, envejecimiento y cáncer (Santamaría-Gómez *et al.*, 2018; Zhang *et al.*, 2022).

Los procesos oxidativos no se encuentran asociados únicamente con la actividad de los radicales libres, sino que también se pueden ejercer efectos oxidantes por medio de la oxidación de moléculas por los metales de transición presentes en el cuerpo. Razón por la cual al evaluar la actividad antioxidante de los callos de *A. californica* resultó importante medirla por medio del método FRAP, el cual se fundamenta en la capacidad que tienen los extractos para reducir el hierro en estado férrico (Fe^{3+}) a su estado ferroso (Fe^{2+}); al respecto, de acuerdo con los valores establecidos en la literatura, el extracto de los callos mostró un fuerte poder reductor del hierro con 1.58 ± 0.15 mmol de Fe^{2+}/g de extracto. Dicha actividad se ve relacionada estrechamente con el contenido de compuestos fenólicos del extracto (Vega-Ruiz *et al.*, 2021).

En este contexto, vale la pena reconocer que las enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo se tratan tradicionalmente con miembros del género *Acalypha* tales como *A. wilkesiana* var. *macafeana*, *A. indica* Linn. y *A. fruticosa* (Din *et al.*, 2013; Mullick *et al.*, 2013; Rajkumar *et al.*, 2010).

Como se muestra en la Figura 3, la producción de NO, disminuyó ligeramente en los macrófagos RAW 264.7 estimulados con LPS tratados con la concentración de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de extracto etanólico de los callos (24%), en tanto que a concentraciones mayores el efecto inhibitorio fue menor. Este comportamiento puede deberse a la clase de compuestos fenólicos contenidos en los callos, ya que solo ciertos tipos de compuestos fenólicos tales como los flavonoides se ven asociados a la actividad antiinflamatoria; además ha sido documentado que, si bien los compuestos fenólicos pueden tener efectos antiinflamatorios en ciertas concentraciones, a concentraciones mayores pueden presentar un efecto pro-oxidante y pro-inflamatorio (Rahman *et al.*, 2022).

En el estudio biodirigido realizado por (Rascón-Valenzuela *et al.*, 2015) sobre la actividad antiproliferativa del extracto metanólico de *A. californica* se estudió la composición de la fracción residual de dicho extracto por espectrometría de masas, encontrando que la mayoría de los compuestos eran pertenecientes a la familia de las proantocianidinas. Contrariamente al generar el perfil químico del extracto etanólico de los callos de *A. californica* mediante espectrometría de masas fueron encontradas estructuras de ácidos fenólicos y flavonoides principalmente.

Lo anterior puede deberse a que si bien en los callos se genera estrés por los nutrientes propiciando las condiciones para la síntesis de compuestos fenólicos tales como los ácidos fenólicos y flavonoides, dicho estrés no provoca la síntesis de las proantocianidinas encontradas en los extractos de las plantas silvestres ya que estas se ven mayormente favorecidas por el enfrentamiento contra patógenos, la presencia de metales pesados y altas radiaciones UV, es decir, condiciones propias de un organismo en un ecosistema (Yu *et al.*, 2022).

En tanto los ácidos fenólicos y los flavonoides de los callos pueden obedecer mayormente a atender procesos de oxidación metabólica dentro de las células en crecimiento (Liu *et al.*, 2015). A su vez, la presencia de los ácidos fenólicos y los flavonoides en el extracto etanólico de los callos fundamenta la actividad antioxidante y antiinflamatoria encontrada en el presente estudio.

CONCLUSIONES

La realización de la presente investigación permitió establecer las mejores condiciones para la generación de callos de *A. californica*, siendo estas la utilización de yemas para los explantes y el medio WPM suplementado con 1.5 mg/L de AIB. Aunado a lo anterior se puede concluir que los callos generados son capaces de producir ácidos fenólicos y flavonoides los cuales son responsables de la alta actividad antioxidante y anti-inflamatoria exhibida por el extracto etanólico de los callos. En este nivel de desarrollo, los callos no poseen actividad antiproliferativa significativa en líneas celulares cancerosas; sin embargo, el hecho de que presente actividad antiinflamatoria y antioxidante puede ayudar a prevenir el desarrollo de los procesos cancerosos, ya que tanto la inflamación como la oxidación juegan un fuerte papel en la generación de estos. De manera que la información generada representa un primer paso en el desarrollo de cultivos *in vitro* de *A. californica*, así como un soporte científico a las propiedades atribuidas por las etnias.

LITERATURA CITADA

- Aggarwal, V., Tuli, H. S., Varol, A., Thakral, F., Yerer, M. B., Sak, K., Varol, M., Jain, A., Khan, M. A., & Sethi, G. (2019). Role of reactive oxygen species in cancer progression: Molecular mechanisms and recent advancements. In *Biomolecules* (Vol. 9, Issue 11). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/biom9110735>
- Ávila Martínez, C. J. (2017). La medicina tradicional en la pobreza. *Revista de Comunicación y Salud*. <http://revistadecomunicacionysalud.org/index.php/rcys/article/view/126>
- Avinash Prakasha & S Umeha. (2018). Effect of growth hormones in induction of callus, antioxidants, and antibacterial activity in *Nerium odorum*. *Journal of Applied Biology & Biotechnology*, 21–25. <https://doi.org/10.7324/jabb.2018.60404>
- Babich, O., Sukhikh, S., Pungin, A., Astahova, L., Chupakhin, E., Belova, D., Prosekov, A., & Ivanova, S. (2021). Evaluation of the conditions for the cultivation of callus cultures of *hyssopus officinalis* regarding the yield of polyphenolic compounds. *Plants*, 10(5). <https://doi.org/10.3390/plants10050915>
- Bi, W., He, C., Ma, Y., Shen, J., Zhang, L. H., Peng, Y., & Xiao, P. (2016). Investigation of free amino acid, total phenolics, antioxidant activity and purine alkaloids to assess the health properties of non-Camellia tea. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 6(2), 170–181. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2015.11.003>
- Crespo, G., Di Toro, L. A., Desiree, V., Perez Vicuña, J. L., Díaz, M. P., Souki, A., Cano, C., & Salazar, J. (2020). Oxidative stress and its role in cancer: a molecular perspective. *Ciencia e Innovación En Salud*. <https://doi.org/10.17081/innosa.97>
- de Queiroz Braga, K., Coimbra, M. C., Hortência, A., & Castro, F. (2015). In vitro germination, callus induction and phenolic compounds contents from *Pyrostegia venusta* (Ker Gawl.) Miers. *Acta Scientiarum. Biological Sciences Maringá*, 37(2), 151–158. <https://doi.org/10.4025/actascibiolsci.v37i2>
- De-Souza, R., Adams, C. R., De-Melo, R. C., Guidolin, A. F., Michel, A., & Coimbra, J. L. M. (2022). Growth regulators and their reflection on different hop genotypes cultivated under *in vitro* conditions. *Brazilian Journal of Biology*, 82. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.242596>
- Din, W. M., Chu, J., Clarke, G., Jin, K. T., Bradshaw, T. D., Fry, J. R., & Wiart, C. (2013). Antioxidant and Cytoprotective Effects of an Ethanol Extract of *Acalypha wilkesiana* var. *macafeana* from Malaysia.
- Efferth, T. (2019). Biotechnology Applications of Plant Callus Cultures. In *Engineering* (Vol. 5, Issue 1, pp. 50–59). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.eng.2018.11.006>
- Espinosa, A., Silva, J., Sariego, S., Cholo Masapanta, L., & Delgado, H. (2012). Effect of explant type and concentration of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid on callus formation in *Morus alba* L (Vol. 35, Issue 4).

- INEGI. (2021). Comunicado de prensa núm. 600. estadísticas de defunciones registradas 2021.: <https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/614743/sem53.pdf>
- Islam, A. T. M. R., & Alam, M. F. (2018). *In vitro* callus induction and indirect organogenesis of *Mentha piperita* (L.) - an aromatic medicinal plant. *GSC Biological and Pharmaceutical Sciences*, 4(3), 049–060. <https://doi.org/10.30574/gscbps.2018.4.3.0078>
- Jafari, S., Daneshvar, M. H., Salmi, M. S., & Jalal-Abadi, A. L. (2017). Indirect Organogenesis and Plant Regeneration in Common Sage (*Salvia officinalis* L.): An Important Medicinal Plant of Iran. *Modern Applied Science*, 11(5), 22. <https://doi.org/10.5539/mas.v11n5p22>
- Johan Steven Alcantara Cortes. (2019). Principales reguladores hormonales y sus interacciones en el crecimiento vegetal Main hormonal regulators and their interactions in plant growth. *NOVA*, 17(32), 109–129.
- Kargozar, S., Mollazadeh, S., Kermani, F., Webster, T. J., Nazarnezhad, S., Hamzehlou, S., & Bains, F. (2022). Hydroxyapatite Nanoparticles for Improved Cancer Theranostics. In *Journal of Functional Biomaterials* (Vol. 13, Issue 3). MDPI. <https://doi.org/10.3390/jfb13030100>
- Korde Choudhari, S., Chaudhary, M., Bagde, S., Gadgil, A. R., & Joshi, V. (2013). Nitric oxide and cancer: A review. In *World Journal of Surgical Oncology* (Vol. 11). <https://doi.org/10.1186/1477-7819-11-118>
- Liu, J., Osbourn, A., & Ma, P. (2015). MYB transcription factors as regulators of phenylpropanoid metabolism in plants. In *Molecular Plant* (Vol. 8, Issue 5, pp. 689–708). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2015.03.012>
- Majumder, S., & Rahman, M. M. (2016). Development of A Successful Protocol for In vitro Callus Induction and Indirect Plant Regeneration of *Acalypha indica* L. *American International Journal of Research in Formal, Applied & Natural Sciences AIJRFANS*, 16–223. <http://www.iasir.net>
- Motolinia-Alcántara, E. A., Franco-Vásquez, A. M., Nieto-Camacho, A., Arreguín-Espinosa, R., Rodríguez-Monroy, M., Cruz-Sosa, F., & Román-Guerrero, A. (2023). Phenolic Compounds from Wild Plant and In Vitro Cultures of *Ageratina pichichensis* and Evaluation of Their Antioxidant Activity. *Plants*, 12(5). <https://doi.org/10.3390/plants12051107>
- Mullick, A., Martin, J., & Sallnow, L. (2013). An introduction to advance care planning in practice. In *BMJ (Online)* (Vol. 347, Issue 7930). <https://doi.org/10.1136/bmj.f6064>
- Nitin Singh, Deepak Baby, Jagadish Prasad Rajguru, Pankaj B Patil, Savita S Thakkannavar, & Veena Bhojaraj Pujari. (2019). Inflammation and Cancer. *Ann Afr Med*, 18(3), 121–126. https://doi.org/10.4103/aam.aam_56_18
- Ochatt, S., Alan, A. R., Bhattacharya, A., Hano, C., Kiselev, K. v., Marconi, P. L., Otoni, W. C., Park, S. Y., Tang, K. X., & Weathers, P. J. (2022). Secondary metabolites: a boon from plants, the best chemist in nature: preface from the editors. In *Plant Cell, Tissue, and Organ Culture* (Vol. 149, Issues 1–2). Springer Science and Business Media B.V. <https://doi.org/10.1007/s11240-022-02289-2>
- Patel, P., Patel, V., Modi, A., Kumar, S., & Shukla, Y. M. (2022). Phyto-factories of anti-cancer compounds: a tissue culture perspective. In *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences* (Vol. 11, Issue 1). Springer Science and Business Media Deutschland GmbH. <https://doi.org/10.1186/s43088-022-00203-5>
- Pimentel Victório, C., Borges Henriques, A., Tavares, E. S., Esquibel, M. A., Luiz, C., & Lage, S. (2010). *Standardized production of Phyllanthus tenellus Roxb. by plant tissue culture 1 Produção padronizada de Phyllanthus tenellus Roxb. por cultura de tecidos vegetais*. 2, 272–278. www.ccarevista.ufc.br
- Purwianingsih, W., Febri, S., & Kusdianti, K. (2016). Formation flavonoid secondary metabolites in callus culture of *Chrysanthemum cinerariifolium* as alternative provision medicine. *AIP Conference Proceedings*, 1708. <https://doi.org/10.1063/1.4941150>

- Rajkumar, V., Guha, G., & Ashok Kumar, R. (2010). Therapeutic potential of *Acalypha fruticosa*. *Food and Chemical Toxicology*, 48(6), 1709–1713. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2010.03.050>
- Rascón Valenzuela, L. A. (2015). Caracterización química y biológica de los compuestos con actividad antiproliferativa del extracto metanólico de *Asclepias subulata* (Decne., 1844). Universidad de Sonora.
- Rascón-Valenzuela, L., Jiménez-Estrada, M., Velázquez-Contreras, C., Garibay-Escobar, A., Vilegas, W., Campaner, L., Coqueiro, A., & Robles-Zepeda, R. E. (2015). Chemical composition and antiproliferative activity of *Acalypha californica*. *Industrial Crops and Products*, 69, 48–54. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.02.004>
- Ríos-Ramírez, S. C., Enríquez-Del Valle, J. R., Rodríguez-Ortiz, G., & Ruíz-Luna, J. (2017). Concentración de bencilaminopurina y ácido indolacético en la proliferación in vitro de brotes adventicios de *agave angustifolia*. In *Ciencia e Investigacion Agraria* (Vol. 44, Issue 3, pp. 285–294). Pontificia Universidad Catolica de Chile, Facultad de Agronomia e Ingenieria Forestal. <https://doi.org/10.7764/rcia.v44i3.1810>
- Rodríguez Beraud, M. M., Iatsague Vidal, M. I., Chacón Fuentes, M. A., & Astorga Brevis, P. K. (2014). Inducción in vitro de callogénesis y organogénesis indirecta a partir de explantes de cotiledón, hipocótilo y hoja en *Ugni molinae*. *Bosque*, 35(1), 111–118. <https://doi.org/10.4067/S0717-92002014000100011>
- Sagharyan, M., Ganjeali, A., Cheniany, M., & Kouhi, S. M. M. (2020). Optimization of callus induction with enhancing production of phenolic compounds production and antioxidants activity in callus cultures of nepeta *binaloudensis jamzad* (Lamiaceae). *Iranian Journal of Biotechnology*, 18(4), 47–55. <https://doi.org/10.30498/IJB.2020.2621>
- Sánchez-Rangel, J. C., Benavides, J., Heredia, J. B., Cisneros-Zevallos, L., & Jacobo-Velázquez, D. A. (2013). The Folin-Ciocalteu assay revisited: Improvement of its specificity for total phenolic content determination. *Analytical Methods*, 5(21), 5990–5999. <https://doi.org/10.1039/c3ay41125g>
- Santamaría-Gómez, J. M., Piloni-Martini, J., Quintero-Lira, A., Bernardino-Nicator, A., & Güemes-Vera, N. (2018). Compuestos fenólicos y actividad antioxidante antes y después del proceso de extrusión. resumen (Vol. 3).
- Schmölz, L., Wallert, M., Rozzino, N., Cignarella, A., Galli, F., Gleis, M., Werz, O., Koeberle, A., Birringer, M., & Lorkowski, S. (2017). Structure–Function Relationship Studies In Vitro Reveal Distinct and Specific Effects of Long-Chain Metabolites of Vitamin E. *Molecular Nutrition and Food Research*, 61(12). <https://doi.org/10.1002/mnfr.201700562>
- Shraim, A. M., Ahmed, T. A., Rahman, M. M., & Hijji, Y. M. (2021). Determination of total flavonoid content by aluminum chloride assay: A critical evaluation. *LWT*, 150. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111932>
- Siegel, R. L., Miller, K. D., Fuchs, H. E., & Jemal, A. (2022). Cancer statistics, 2022. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 72(1), 7–33. <https://doi.org/10.3322/caac.21708>
- Subedi, L., Timalsona, S., Duwadi, P., Thapa, R., Paudel, A., & Parajuli, K. (2014). Antioxidant activity and phenol and flavonoid contents of eight medicinal plants from Western Nepal. *J Tradit Chin Med*, 34(5), 584–590. <http://www.journaltcm.com>
- Thummadi, N. B., Mallikarjuna, T., Vindal, V., & Manimaran, P. (2022). Prioritizing the candidate genes related to cervical cancer using the moment of inertia tensor. *Proteins: Structure, Function and Bioinformatics*, 90(2), 363–371. <https://doi.org/10.1002/prot.26226>
- Todoric, J., & Karin, M. (2019). The Fire within: Cell-Autonomous Mechanisms in Inflammation-Driven Cancer. In *Cancer Cell* (Vol. 35, Issue 5, pp. 714–720). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2019.04.001>
- Vega-Ruiz, Y. C., Hayano-Kanashiro, C., Gámez-Meza, N., & Medina-Juárez, L. A. (2021). Determination of chemical constituents and antioxidant activities of leaves and stems from *Jatropha cinerea* (Ortega) Müll. Arg. and *Jatropha cordata* (Ortega) Müll. Arg. *Plants*, 10(2), 1–13. <https://doi.org/10.3390/plants10020212>

Recibido:
27/febrero/2023

Aceptado:
30/junio/2023

- Yu, K., Song, Y., Lin, J., & Dixon, R. A. (2022). The complexities of proanthocyanidin biosynthesis and its regulation in plants. In *Plant Communications*. Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.xplc.2022.100498>
- Yuniarti, R., Nadia, S., Alamanda, A., Zubir, M., Syahputra, R. A., & Nizam, M. (2020). Characterization, Phytochemical Screenings and Antioxidant Activity Test of Kratom Leaf Ethanol Extract (*Mitragyna speciosa* Korth) Using DPPH Method. *Journal of Physics: Conference Series*, 1462(1). <https://doi.org/10.1088/1742-6596/1462/1/012026>
- Zhang, Y., Cai, P., Cheng, G., & Zhang, Y. (2022). A Brief Review of Phenolic Compounds Identified from Plants: Their Extraction, Analysis, and Biological Activity. In *Natural Product Communications* (Vol. 17, Issue 1). SAGE Publications Inc. <https://doi.org/10.1177/1934578X211069721>