



**Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Química**

**Identificación de los compuestos fenólicos mayoritarios en
extractos etanólicos de *Nymphoides fallax* y evaluación del efecto
antiproliferativo y antimigratorio en líneas celulares PC-3 y MCF-7**

Tesis

Que como parte de los requisitos para
obtener el Grado de

Maestro en Ciencias Químico Biológicas

Presenta

IBQ. Carlos Hiram López López

Dirigido por:

Dra. Jesica Esther Escobar Cabrera

Co-Director:

Dra. Tatiana Lobato de Magalhães

Querétaro, Qro. a 14 de noviembre de 2024

La presente obra está bajo la licencia:
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/deed.es>



CC BY-NC-ND 4.0 DEED

Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0 Internacional

Usted es libre de:

Compartir — copiar y redistribuir el material en cualquier medio o formato

La licenciante no puede revocar estas libertades en tanto usted siga los términos de la licencia

Bajo los siguientes términos:



Atribución — Usted debe dar [crédito de manera adecuada](#), brindar un enlace a la licencia, e [indicar si se han realizado cambios](#). Puede hacerlo en cualquier forma razonable, pero no de forma tal que sugiera que usted o su uso tienen el apoyo de la licenciante.



NoComercial — Usted no puede hacer uso del material con [propósitos comerciales](#).



SinDerivadas — Si [remezcla, transforma o crea a partir](#) del material, no podrá distribuir el material modificado.

No hay restricciones adicionales — No puede aplicar términos legales ni [medidas tecnológicas](#) que restrinjan legalmente a otras a hacer cualquier uso permitido por la licencia.

Avisos:

No tiene que cumplir con la licencia para elementos del material en el dominio público o cuando su uso esté permitido por una [excepción o limitación](#) aplicable.

No se dan garantías. La licencia podría no darle todos los permisos que necesita para el uso que tenga previsto. Por ejemplo, otros derechos como [publicidad, privacidad, o derechos morales](#) pueden limitar la forma en que utilice el material.



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Química
Maestría en Ciencias Químico Biológicas

Identificación de los compuestos fenólicos mayoritarios en extractos etanólicos de *Nymphoides fallax* y evaluación del efecto antiproliferativo y antimigratorio en líneas celulares PC-3 y MCF-7

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de

Maestro en Ciencias Químico Biológicas

Presenta

IBQ. Carlos Hiram López López

Dirigido por:

Dra. Jesica Esther Escobar Cabrera

Co-Dirigido por:

Dra. Tatiana Lobato de Magalhães

Dra. Jesica Esther Escobar Cabrera
Presidente

Dra. Tatiana Lobato de Magalhães
Codirector

Dr. Eloy Rodríguez De León
Vocal

Dra. Laura Cristina Berumen Segura
Suplente

Dra. María Guadalupe García Alcocer
Suplente

Centro Universitario, Querétaro, Qro.
Fecha de aprobación por el Consejo Universitario, 29 de mayo de 2025
México

ÍNDICE

	Página
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
1. INTRODUCCIÓN	4
2. ANTECEDENTES	6
2.1 Fitomedicamentos	6
2.1.1 Metabolitos secundarios	7
2.1.2 Compuestos fenólicos	8
2.1.3 Flavonoides	9
2.1.4 Flavonoides en el tratamiento contra el cáncer	10
2.2 Cáncer	12
2.2.1 Cáncer de próstata	13
2.2.2 Cáncer de mama	14
2.2.3 Tratamientos para el cáncer	15
2.2.3.1 Tratamiento contra el cáncer con caclitaxel	16
2.2.4 Terapia combinatoria con extractos naturales contra el cáncer	16
2.3 Género <i>Nymphoides</i>	17
2.3.1 Potencial bioactivo del género <i>Nymphoides</i>	18
2.4 <i>Nymphoides fallax</i>	22
3. JUSTIFICACIÓN	24
4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	25
5. HIPÓTESIS	25
6. OBJETIVOS	26
6.1 Objetivo general	26
6.2 Objetivos específicos	26
7. MATERIALES Y MÉTODOS	27
7.1 Colecta de <i>Nymphoides fallax</i>	27
7.2 Extracción etanólica de <i>Nymphoides fallax</i>	27

7.3	Identificación de compuestos fenólicos y flavonoides	28
7.4	Cultivos celulares	28
7.5	Ensayo de actividad citotóxica del extracto de <i>N. fallax</i>	29
7.6	Evaluación del efecto inhibitorio de la proliferación celular	29
7.7	Evaluación de migración: Ensayo herida	29
7.8	Tratamientos combinatorios con paclitaxel	30
7.9	Análisis estadístico	30
8.	RESULTADOS	31
8.1	Extracción etanólica de <i>N. fallax</i>	31
8.2	Análisis fitoquímico de los extractos de <i>N. fallax</i>	31
8.3	Actividad citotóxica de los extractos de <i>N. fallax</i> sobre fibroblastos	33
8.4	Efecto antiproliferativo de los extractos de <i>N. fallax</i> sobre líneas celulares de cáncer de próstata	34
8.5	Efecto antiproliferativo de los extractos de <i>N. fallax</i> sobre células de cáncer de mama	35
8.6	Efecto en la migración celular de los extractos de <i>N. fallax</i> sobre células de cáncer de próstata y mama	37
8.7	Tratamientos combinatorios de los extractos de <i>N. fallax</i> y paclitaxel sobre células de cáncer de próstata y mama	41
9.	DISCUSIÓN	47
10.	CONCLUSIÓN	51
11.	REFERENCIAS	52

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Principales vías de biosíntesis de metabolitos secundarios.	8
Figura 2. Estructura principal y familia de derivados de los flavonoides.	10
Figura 3. Incidencia de los principales tipos de cáncer a nivel mundial en 2022.	12
Figura 4. Cromatogramas de los extractos de <i>N. fallax</i> .	32
Figura 5. Actividad citotóxica de los extractos de <i>N. fallax</i> sobre fibroblastos murinos (3T3).	34
Figura 6. Actividad citotóxica de los extractos de <i>N. fallax</i> sobre células de CP (PC-3).	35
Figura 7. Actividad citotóxica de los extractos de <i>N. fallax</i> sobre células de CM (MCF-7).	36
Figura 8. Efecto de ENFC sobre la migración de células de cáncer de próstata (PC-3).	37
Figura 9. Efecto de ENFA sobre la migración de células de cáncer de próstata (PC-3).	38
Figura 10. Efecto de ENFC sobre la migración de células de cáncer de mama (MCF-7).	39
Figura 11. Efecto de ENFA sobre la migración de células de cáncer de mama (MCF-7).	40
Figura 12. Actividad antiproliferativa de los tratamientos combinatorios en células de CP (PC-3).	41

Figura 13. Actividad antiproliferativa de los tratamientos combinatorios en células de CM (MCF-7).	42
Figura 14. Efecto del tratamiento combinatorio de ENFC y PTX sobre la migración de células de CP (PC-3).	43
Figura 15. Efecto del tratamiento combinatorio de ENFA y PTX sobre la migración de células de CP (PC-3).	44
Figura 16. Efecto del tratamiento combinatorio de ENFC y PTX sobre la migración de células de CM (MCF-7).	45
Figura 17. Efecto del tratamiento combinatorio de ENFA y PTX sobre la migración de células de CM (MCF-7).	46

ÍNDICE DE IMAGENES

	Página
Imagen 1. <i>Nymphoides fallax</i> en estado silvestre	22

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Derivados glucosilados de flavonoides presentes en plantas del género <i>Nymphoides</i> .	21
Tabla 2. Resultados de las extracciones de <i>N. fallax</i> .	31
Tabla 3. Flavonoides y compuestos fenólicos presentes en los extractos de <i>N. fallax</i> .	33
Tabla 4. IC ₅₀ e IC ₂₅ de los extractos sobre la línea celular PC-3.	35
Tabla 5. IC ₅₀ e IC ₂₅ de los extractos sobre la línea celular MCF-7.	36
Tabla 1S. Sitios de colecta de <i>Nymphoides fallax</i> .	27
Tabla 2S. Gradiente de elución para el análisis de los flavonoides.	28

ACRÓNIMOS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
CP	Cáncer de próstata
CM	Cáncer de mama
CGA	Ácido clorogénico
ENFA	Extracto de partes aéreas de <i>N. fallax</i>
ENFC	Extracto de <i>N. fallax</i> completa
ENFR	Extracto de raíces de <i>N. fallax</i>
HPLC-DAD	Cromatografía líquida de alto rendimiento con detector de arreglo de diodos
IC	Concentración inhibitoria
msnm	Metros sobre el nivel del mar
OMS	Organización Mundial de la Salud
PSA	Antígeno específico prostático
PTX	Paclitaxel
ROS	Especies reactivas de oxígeno

RESUMEN

Los extractos de algunas especies del género *Nymphoides* han demostrado actividades antitumorales contra distintos tipos de cáncer, atribuidas principalmente a la presencia de compuestos aromáticos. Por otro lado, se ha descrito que, en condiciones de estrés abiótico, las plantas modifican los perfiles de expresión de metabolitos secundarios. Se analizaron extractos etanólicos de la planta completa, las partes aéreas y las raíces de *Nymphoides fallax* (especie endémica de México) mediante HPLC-DAD para identificar los principales compuestos fenólicos. Se evaluaron los efectos citotóxicos y antimigratorios del extracto en células PC-3 y MCF-7 mediante ensayos de tinción con azul tripano y ensayos migratorios de herida, respectivamente; así como el efecto combinatorio de los extractos con paclitaxel. El ácido clorogénico y los glucósidos de kaempferol se identificaron en los tres extractos, la quercetina y la rutina también se identificaron en el extracto completo y de partes aéreas, aunque en menor proporción. Los cromatogramas de todos los extractos hidrolizados mostraron una concentración considerable de ácido quínico y ácido cafeico. Los ensayos citotóxicos en 3T3 mostraron que los extractos de la planta completa y de las partes aéreas son citotóxicos a 500 µg/mL. El extracto de la planta completa presentó actividad antiproliferativa en células PC-3, con una IC₅₀ de 196.2 ± 14.2 µg/mL y en células MCF-7 la IC₅₀ obtenida fue de 142.4 ± 17.4 µg/mL; en el caso del extracto de partes aéreas, la IC₅₀ obtenida para las células PC-3 fue de 206.5 ± 17.4 µg/mL, mientras que para las células MCF-7 fue de 112.8 ± 14.57 µg/mL. Los extractos de la planta completa y de las partes aéreas presentaron actividad antimigratoria en ambas líneas celulares. No se observaron efectos sinérgicos en la citotoxicidad y migración celular en los tratamientos combinatorios con paclitaxel. Los extractos de *Nymphoides fallax* contienen compuestos orgánicos con actividad anticancerígena en células de cáncer de mama y de próstata.

Palabras clave: Anticancerígeno, Cáncer de mama, Cáncer de próstata, Compuestos Fenólicos, Flavonoides, *Nymphoides fallax*.

ABSTRACT

Extracts of some species of the genus *Nymphoides* have demonstrated antitumor activities against different types of cancer, mainly attributed to the presence of aromatic compounds. On the other hand, it has been described that, under abiotic stress conditions, plants modify the expression profiles of secondary metabolites. Ethanolic extracts of the whole plant, aerial parts and roots of *Nymphoides fallax* (endemic species of Mexico) were analyzed by HPLC-DAD to identify the main phenolic compounds. The cytotoxic and antimigratory effects of the extract on PC-3 and MCF-7 cells were evaluated by trypan blue staining and wound migratory assays, respectively; as well as the combinatorial effect of the extracts with paclitaxel. Chlorogenic acid and kaempferol glycosides were identified in all three extracts, quercetin and rutin were also identified in the whole extract and aerial parts, although in lower proportion. Chromatograms of all hydrolyzed extracts showed a considerable concentration of quinic acid and caffeic acid. Cytotoxic assays at 3T3 showed the whole plant and aerial parts extracts to be cytotoxic at 500 $\mu\text{g/mL}$. The whole plant extract presented antiproliferative activity in PC-3 cells, with an IC_{50} of $196.2 \pm 14.2 \mu\text{g/mL}$ and in MCF-7 cells the IC_{50} obtained was $142.4 \pm 17.4 \mu\text{g/mL}$; in the case of the extract of aerial parts, the IC_{50} obtained for PC-3 cells was $206.5 \pm 17.4 \mu\text{g/mL}$, while for MCF-7 cells it was $112.8 \pm 14.57 \mu\text{g/mL}$. Extracts of the whole plant and aerial parts exhibited antimigratory activity in both cell lines. No synergistic effects on cytotoxicity and cell migration were observed in the combinatorial treatments with paclitaxel. *Nymphoides fallax* extracts contain organic compounds with anticancer activity in breast and prostate cancer cells.

Keywords: Anticancer, Breast cancer, Prostate cancer, Phenolic Compounds, Flavonoids, *Nymphoides fallax*.

DECLARACION DE RESPONSABILIDAD DEL ESTUDIANTE

Declaro que los datos propios obtenidos en esta investigación titulada "Identificación de los compuestos fenólicos mayoritarios en extractos etanólicos de *Nymphoides fallax* y evaluación del efecto antiproliferativo y antimigratorio en líneas celulares PC-3 y MCF-7" fueron generados durante el desarrollo de mi trabajo de tesis de forma ética y que reporto detalles necesarios para que los resultados de esta tesis sean reproducibles en eventuales investigaciones futuras. Finalmente, este manuscrito de tesis es un trabajo original en el cual se declaró y dio reconocimiento a cualquier colaboración o cita textual presentadas en el documento.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Carlos Hiram López López', enclosed within a simple, hand-drawn oval border.

Carlos Hiram López López

1. INTRODUCCIÓN

Las plantas acuáticas tienen muchas características biológicas únicas, juegan un papel fundamental en su ecosistema y muchas de ellas son apreciadas por su importancia agrícola, nutracéutica y medicinal. Se ha informado de que muchas especies de plantas de origen acuático tienen un importante uso en la medicina tradicional china (Zhang *et al.*, 2014), ya que son fuentes de una variedad de compuestos biológicamente activos con propiedades anticancerígenas, antimicrobianas, antifúngicas, antivirales y antiinflamatorias (Aasim *et al.*, 2019). En México, aproximadamente el 20% de las plantas acuáticas de las tierras altas del centro presentan potencial bioactivo (Lobato-de Magalhães y Martínez, 2018). La familia *Menyanthaceae* de plantas acuáticas y de humedales cuenta con seis géneros y unas 60 especies en todo el mundo (Tippery y Les, 2011). Según los informes etnobotánicos, algunas hierbas acuáticas del género *Nymphoides* se utilizan tradicionalmente para el tratamiento de heridas, mordeduras de serpiente, ictericia, disentería, convulsiones, etc. (Aasim *et al.*, 2019; Jain *et al.*, 2007). Recientemente, se han realizado estudios que demuestran la actividad antiproliferativa de *N. indica* en células HeLa, así como la presencia de alcaloides, flavonoides, taninos y xantonas en sus extractos (Manosroi *et al.*, 2012). Actualmente, la especie endémica de México *Nymphoides fallax* (*N. fallax*) ha sido caracterizada parcialmente por Bohm BA *et al.* en un artículo de 1986 en el que se identifica la presencia de algunos flavonoides y sus derivados glicosilados (Al-Sa'idy y Hamid, 2023).

Los extractos de *N. fallax* podrían contener concentraciones significativas de compuestos aromáticos y otras moléculas bioactivas; estos compuestos, en particular los flavonoides, han despertado el interés farmacológico debido a sus propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, vasodilatadoras, antineoplásicas, etcétera (Panche *et al.*, 2016). Los flavonoides han ido ganando interés como potenciales agentes terapéuticos frente a una amplia variedad de enfermedades, particularmente presentan características que los han hecho atractivos para la investigación anticancerígena (García-Perdomo *et al.*, 2018). El cáncer de próstata (CP) es uno de los padecimientos más frecuentes a nivel mundial, ubicándose como el cáncer principal en hombres; en el caso de las mujeres, el cáncer de mayor incidencia corresponde al cáncer de mama (CM). Existen diversas formas

de tratar estos padecimientos entre los que destacan la cirugía, radioterapia y quimioterapia, sin embargo, suelen presentar diversos efectos secundarios y llegan a ser muy agresivos para el paciente (Ghafouri-Fard *et al.*, 2021). Es por esto que se pretende evaluar la actividad antiproliferativa y antimigratoria del extracto de *N. fallax* para proponer terapias complementarias a tratamientos comúnmente utilizados en cáncer de próstata y de mama.

2. ANTECEDENTES

2.1 Fitomedicamentos

Las plantas son importantes fuentes de medicamentos y actualmente alrededor del 25% de las recetas farmacéuticas en Estados Unidos contienen al menos un ingrediente de origen vegetal. En el siglo pasado se formularon unos 121 productos farmacéuticos basados en los conocimientos tradicionales obtenidos de diversas fuentes. Los medicamentos derivados de plantas se introdujeron en la medicina moderna, gracias al uso de material vegetal como remedio autóctono en el folclore o en los sistemas tradicionales de medicina (Sun *et al.*, 2002). Un estudio de la OMS estimó que el 80% de la población mundial depende de la medicina derivada de plantas, como primera línea de atención sanitaria primaria para el alivio humano, ya que no suelen presentar efectos secundarios (Pathania *et al.*, 2015).

México, como muchos países tropicales y subtropicales, posee una gran diversidad vegetal; su amplio territorio, la variedad de suelos y los diferentes climas facilitan el crecimiento de distintas especies de plantas y proveen un ambiente propicio para el cultivo y producción de material vegetal útil. Particularmente, México cuenta con una de las mayores riquezas y endemismos de plantas acuáticas (Murphy *et al.*, 2019). Además de lo anterior, estos países suelen contar con un amplio conocimiento médico tradicional en el que destaca, por su frecuencia, el uso de la herbolaria (Jacobo-Salcedo *et al.*, 2011).

Los fitomedicamentos difieren sustancialmente de los medicamentos químico-farmacéuticos en sus ingredientes. Mientras que el contenido de un medicamento químico-farmacéutico está integrado por compuestos químicos puros y bien definidos, la mayoría de los fitomedicamentos presentan extractos vegetales con numerosos compuestos. Aunque los medicamentos quimioterapéuticos con posibles efectos secundarios, pueden suprimir varios tipos de tumores, la naturaleza, la principal fuente de diversos productos naturales, siempre ha sido inspiradora para descubrir vías de curación hacia las dolencias humanas. Varios metabolitos secundarios de plantas (fitoquímicos) y sus derivados semisintéticos han sido aprobados y utilizados como medicamentos contra el cáncer o adyuvantes de medicamentos químicos; taxol, vinblastina, vincristina, camptotecina y etopósido son los

medicamentos naturales más eficaces que se recetan ampliamente para el tratamiento de diversos tipos de cáncer (Changxing *et al.*, 2020).

2.1.1 Metabolitos Secundarios

Todas las plantas producen compuestos químicos como parte de sus actividades metabólicas normales; éstos incluyen metabolitos primarios (como azúcares y grasas) que se encuentran en todas las plantas y que son esenciales en su desarrollo y metabolitos secundarios, presentes en menor concentración, que desempeñan diversas funciones del metabolismo secundario y que sólo se encuentran en un género o especie en particular. Son los metabolitos secundarios y los pigmentos los que pueden tener acciones terapéuticas en los seres humanos y los que pueden refinarse para producir fármacos. Estos fármacos vegetales son eficaces como fitomedicamentos en el cuerpo humano (Tiwari y Rana, 2015). Las plantas regulan al alza y a la baja sus rutas bioquímicas en respuesta a la mezcla local de herbívoros, polinizadores y microorganismos. El perfil químico de una planta varía con el tiempo y el lugar a medida que reacciona a las condiciones cambiantes. Las principales clases de fitoquímicos de utilidad terapéutica producidos por las plantas son los alcaloides, los compuestos fenólicos, los flavonoides, los terpenoides y los glucósidos (Bourgaud *et al.*, 2001).

Los metabolitos secundarios en plantas están clasificados dependiendo de su origen biosintético: desde los ácidos grasos y policétidos que provienen de la ruta del acetato, a los aminoácidos aromáticos, fenilpropanoides y alcaloides que derivan de la ruta del shikimato, y los terpenoides que provienen de la ruta del mevalonato y metileritritol fosfato. En la figura 1 se resumen las principales vías de biosíntesis de metabolitos secundarios.

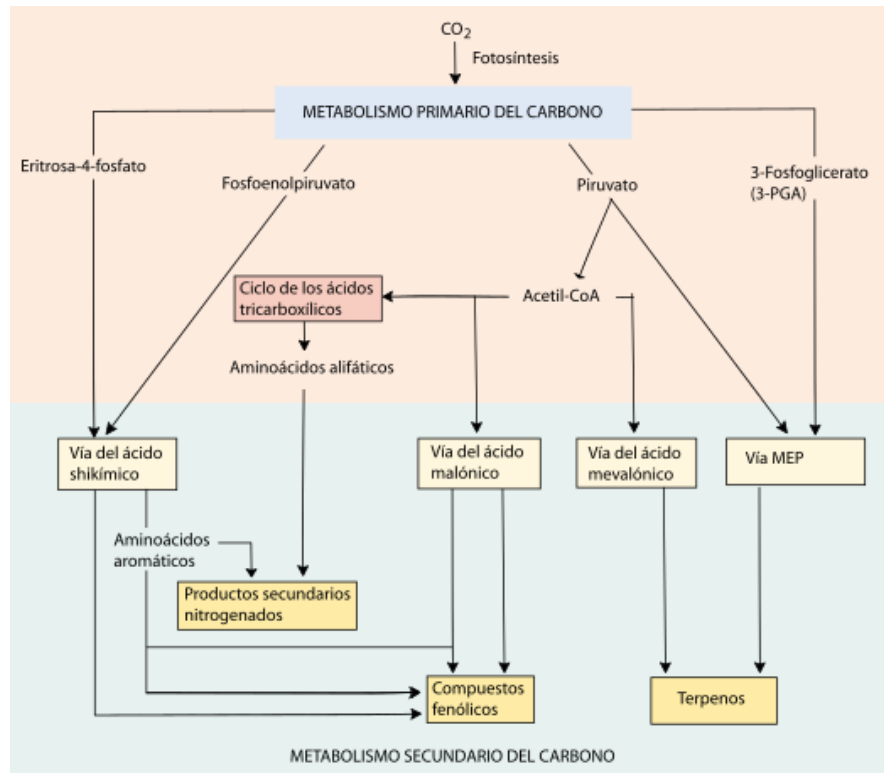


Figura 1. Principales vías de biosíntesis de metabolitos secundarios(Taiz y Zeiger, 2006).

2.1.2 Compuestos Fenólicos

Las plantas contienen compuestos químicos con gran capacidad antioxidante; por ejemplo, los compuestos polifenólicos tienen una estructura química que neutraliza los radicales libres y las especies reactivas del oxígeno (ROS). Los compuestos fenólicos son compuestos orgánicos que contienen al menos un grupo fenol, que es un anillo aromático unido a un grupo hidroxilo. Son uno de los principales metabolitos secundarios de las plantas y su presencia en el reino animal se debe a la ingestión de estas plantas. Estos compuestos son sintetizados a través de una de dos vías biosintéticas principales: la ruta del ácido shikímico o la vía del ácido malónico (Tiwari y Rana, 2015).

Los compuestos fenólicos han demostrado tener un efecto protector frente a las enfermedades cardiovasculares y sus propiedades antioxidantes han sido probadas en estudios en animales y en humanos. Por ejemplo, el resveratrol del vino y las isoflavonas

de la soja son compuestos fenólicos que han recibido mucha atención debido a sus beneficios para la salud. Pueden impactar en la prevención del daño oxidativo, este desequilibrio puede resultar en la oxidación de componentes celulares críticos, como lípidos, proteínas y ácidos nucleicos, lo que puede contribuir al desarrollo de diversas enfermedades, incluyendo cáncer, enfermedades cardiovasculares, diabetes y trastornos neurodegenerativos. Los compuestos fenólicos pueden ayudar a combatir el daño oxidativo al neutralizar las especies reactivas de oxígeno (ROS) y proteger las células del estrés oxidativo. Estos compuestos pueden desempeñar un papel importante en la prevención de enfermedades asociadas con el daño oxidativo, y se han convertido en un área de interés creciente para la investigación en nutrición y salud (Martins *et al.*, 2016).

2.1.3 Flavonoides

Los flavonoides son la subclase de polifenoles más grande y abundante del mundo vegetal. Se distribuyen en las plantas vasculares de manera ubicua y la variedad de sus propiedades biológicas ha llamado poderosamente la atención de los investigadores, de modo que, hoy día, es el grupo de polifenoles más estudiado. Existen estudios epidemiológicos que sostienen que el consumo de fruta fresca y vegetales (fuentes importantes de flavonoides) tiene un efecto protector contra el cáncer, la enfermedad cardíaca, la enfermedad coronaria y la apoplejía, así como un efecto positivo para la salud en general y un aumento de la resistencia frente a diversas enfermedades crónicas (Panche *et al.*, 2016).

Los flavonoides son compuestos polifenólicos subdivididos en 6 grupos: isoflavonoides, flavanonas, flavanoles, flavonoles, flavonas y antocianidinas (Figura 2) que se encuentran en diversas plantas. Las frutas, las verduras, las bebidas derivadas de plantas como el té verde, el vino y los productos a base de cacao son las principales fuentes dietéticas de flavonoides (Kopustinskiene *et al.*, 2020).

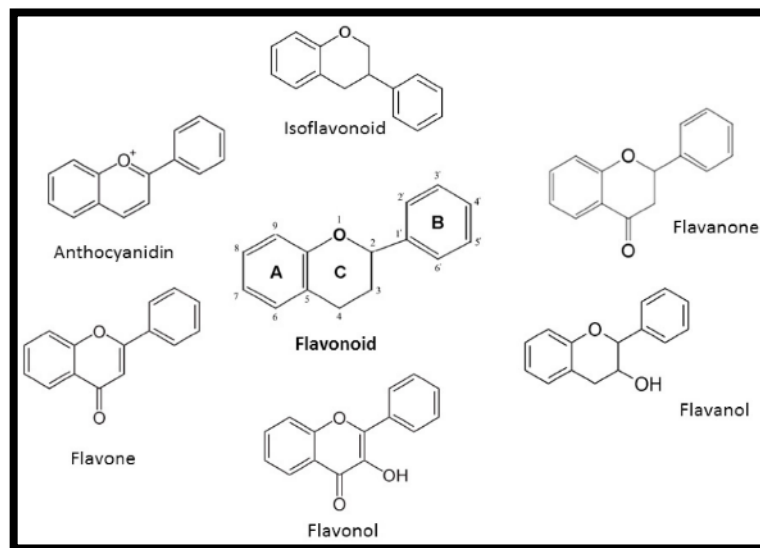


Figura 2. Estructura principal y familia de derivados de los flavonoides (Ballard y Maróstica, 2019).

Los compuestos fenólicos presentan un numeroso grupo ampliamente distribuido en la naturaleza. Existe un interés creciente en los compuestos fenólicos debido a su efecto contra algunas enfermedades, como ciertos cánceres y desórdenes cardíacos derivados de su poderosa actividad antioxidante. Los compuestos fenólicos poseen una estructura química especialmente adecuada para ejercer una acción antioxidante actuando como captadores de radicales libres neutralizando peligrosas especies reactivas de oxígeno y iones metálicos quelantes (Panche *et al.*, 2016).

2.1.4 Flavonoides en el Tratamiento contra el Cáncer

Se ha demostrado que los flavonoides poseen una amplia variedad de efectos anticancerígenos: modulan las actividades de las enzimas que eliminan las ROS, participan en la detención del ciclo celular, inducen la apoptosis y la autofagia, y suprimen la proliferación y la invasividad de las células cancerosas. Los flavonoides tienen una doble acción en relación con la homeostasis de las ROS: actúan como antioxidantes en condiciones normales y son potentes prooxidantes en las células cancerosas, desencadenando las vías apoptóticas y regulando a la baja las vías de señalización proinflamatorias (Kopustinskiene *et al.*, 2020).

Los flavonoides pueden eliminar directamente las ROS y quelar iones metálicos debido a su capacidad para estabilizar los radicales libres, por la presencia de grupos hidroxilo fenólicos. Los efectos antioxidantes indirectos de los flavonoides están relacionados con la activación de enzimas antioxidantes, la supresión de enzimas prooxidantes y la estimulación de la producción de enzimas antioxidantes y enzimas de desintoxicación de fase II. Tanto las actividades antioxidantes como las prooxidantes están implicadas en los efectos anticancerígenos de los flavonoides (Oliveira-Marques *et al.*, 2009).

En las células cancerosas se produce una sobreexpresión de genes oncogénicos (por ejemplo, c-Myc), que conduce a la proliferación celular y a la supresión de p53, y se activan proteínas antiapoptóticas de la familia Bcl-2, mientras que las proteínas proapoptóticas y las caspasas podrían estar reguladas a la baja. Los flavonoides podrían dirigirse a la cascada de señalización apoptótica estimulando las vías de muerte celular (Abotaleb *et al.*, 2018; Chirumbolo *et al.*, 2018).

2.2 Cáncer

El cáncer es una enfermedad que se produce cuando algunas células del cuerpo se vuelven anormales y se multiplican sin control, invadiendo y dañando los tejidos y órganos cercanos o lejanos. El cáncer puede afectar a casi cualquier parte del cuerpo humano, por lo que existen más de 200 tipos diferentes de cáncer. Si la propagación no se controla, puede provocar la muerte. De acuerdo con el GCO (Bray *et al.*, 2024) en 2022 el cáncer de mama (CM) fue el tipo de cáncer de mayor incidencia en mujeres en el mundo; mientras que, para los hombres, ese lugar corresponde al cáncer de próstata (CP) (Ferlay *et al.*, 2021) (Figura 3).

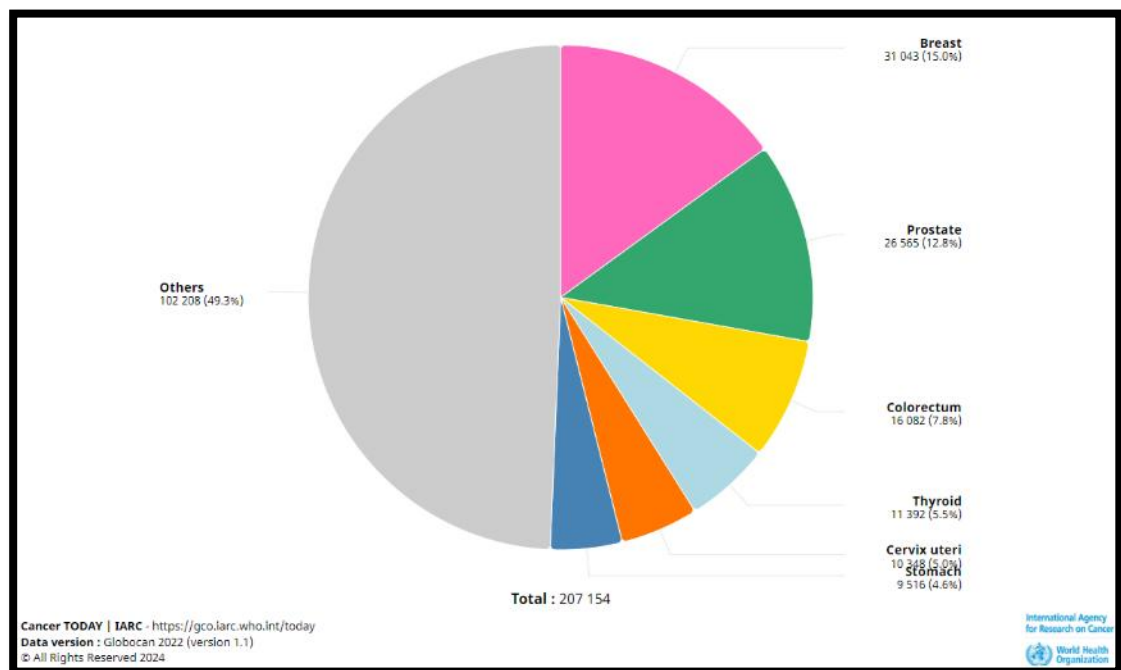


Figura 3. Incidencia de los principales tipos de cáncer a nivel mundial en 2022
(Fuente: National Cancer Institute, 2022).

Algunos de los factores que pueden causar el cáncer son las mutaciones genéticas (a veces causadas por agentes químicos, la radiación o por errores durante la replicación), los agentes infecciosos, el tabaco, el alcohol, la obesidad y la falta de actividad física. El cáncer se produce por una serie de mutaciones sucesivas en los genes, de modo que estas mutaciones modifican las funciones celulares (Hassanpour y Dehghani, 2017). Los cambios genéticos que causan cáncer se producen por estos motivos:

- Errores que ocurren cuando las células se multiplican.

- Daños en el ácido desoxirribonucleico (ADN) por sustancias perjudiciales en el medio ambiente, como el tabaco y los rayos UV.
- Se pasan por herencia de padres a hijos.

Los cambios genéticos que contribuyen al cáncer suelen afectar a tres tipos principales de genes: protooncogén, gen supresor tumoral y gen de reparación de ADN. Los protooncogenes participan en la formación y multiplicación normal de las células. Pero cuando hay ciertos cambios en estos genes o hay más actividad de la normal, podrían convertirse en genes que causan cáncer, llamados oncogenes; estas características hacen que las células se multipliquen y sobrevivan en casos en los que no deberían (Kontomanolis *et al.*, 2020). Los genes supresores tumorales también controlan la formación y multiplicación celular, ya que células con ciertos cambios en los genes supresores tumorales podrían multiplicarse sin control. Por su parte, los genes de reparación de ADN arreglan el ADN dañado y en células con mutaciones en estos genes tienden a presentar un mayor índice de mutaciones y cambios en los cromosomas; al no existir mecanismos para reparar estos fallos, se promueve la formación de tumores (Yoo y Shin, 2003). Los tumores pueden ser cancerosos (malignos) o no cancerosos (benignos); en el caso de los malignos, también se suelen presentar mecanismos involucrados en la invasión a otros tejidos en un proceso conocido como metástasis (Schottenfeld y Fraumeni-Jr, 2006).

2.2.1 Cáncer de Próstata

El cáncer de próstata es una enfermedad que se desarrolla en la glándula prostática, la cual forma parte del sistema reproductivo masculino. Esta glándula se encuentra ubicada debajo de la vejiga y rodea la uretra, siendo responsable de la producción de parte del líquido seminal. El cáncer de próstata es uno de los cánceres más comunes en los hombres, especialmente en aquellos mayores de 50 años. Aunque su causa exacta no se conoce completamente, se cree que factores como la edad, antecedentes familiares, y factores genéticos pueden aumentar el riesgo de padecer esta enfermedad (Ariza *et al.*, 2021).

El diagnóstico temprano es crucial para un tratamiento efectivo. Las pruebas de detección, como el examen de antígeno prostático específico (PSA) y el tacto rectal, son herramientas importantes para identificar el cáncer de próstata en sus etapas iniciales, cuando las opciones de tratamiento suelen ser más efectivas. Conocer el estadio ayuda al

médico a decidir cuál es el mejor tratamiento y puede ayudar a predecir el pronóstico de un paciente, es decir, la probabilidad de recuperación (García-Perdomo *et al.*, 2018).

El tratamiento del cáncer de próstata puede incluir opciones como la vigilancia activa, cirugía para extirpar la próstata (prostatectomía), radioterapia, terapia hormonal, quimioterapia, y en casos avanzados, terapias dirigidas o inmunoterapia. La elección del tratamiento depende del tamaño y la ubicación del tumor, así como de la salud general del paciente y sus preferencias personales (Ariza *et al.*, 2021).

2.2.2 Cáncer de Mama

El cáncer de mama es un tipo de cáncer que se origina en las células de la mama. Es una enfermedad común entre las mujeres, aunque también puede afectar a los hombres en casos más raros. Se caracteriza por el crecimiento descontrolado de células anormales en el tejido mamario, que puede comenzar en diferentes partes de la mama, incluyendo los conductos que llevan la leche al pezón (cáncer ductal) o los tejidos que producen leche (cáncer lobular). El cáncer de mama es el tumor maligno más diagnosticado en mujeres en el mundo, así como la primera causa de muerte por tumores malignos. La incidencia del cáncer de mama aumenta constantemente en todas las regiones del mundo (Smolarz *et al.*, 2022).

Las causas exactas del cáncer de mama no están completamente entendidas, pero se sabe que factores como antecedentes familiares, mutaciones genéticas hereditarias (como en los genes BRCA1 y BRCA2), edad avanzada, exposición a hormonas, y estilo de vida pueden aumentar el riesgo de desarrollar la enfermedad. El diagnóstico temprano es fundamental para el tratamiento exitoso del cáncer de mama. Las pruebas de detección, como la mamografía, pueden ayudar a detectar la enfermedad en sus etapas iniciales, cuando es más tratable (Smolarz *et al.*, 2022).

Los tratamientos utilizados varían en función del subtipo molecular, algunos ejemplos incluyen terapia hormonal, la quimioterapia, terapia anti-HER2 y la inmunoterapia. Para diagnosticar adecuadamente el cáncer de mama los resultados histopatológicos deben incluir el tipo histológico del tumor, el grado de malignidad, el grado de avance en la clasificación TNM, además de si hay expresion de los receptores esteroideos, del receptor HER-2 y del índice de proliferación Ki67.

2.2.3 Tratamientos para el Cáncer

Las terapias contra el cáncer son diversos enfoques médicos y tratamientos diseñados para combatir las células cancerosas y ayudar a controlar o eliminar la enfermedad. Estas terapias pueden ser utilizadas solas o en combinación, dependiendo del tipo de cáncer, su ubicación, el estadio de la enfermedad y las características individuales del paciente. Aquí se mencionan algunas de las terapias más comunes:

1. Cirugía: Es uno de los tratamientos más antiguos para el cáncer y consiste en la extirpación quirúrgica del tumor y, en algunos casos, de tejido circundante sano para asegurar la eliminación completa del cáncer. La cirugía puede ser curativa si el cáncer está localizado y no se ha diseminado a otras partes del cuerpo (Waks y Winer, 2019).

2. Radioterapia: Utiliza radiación de alta energía para dañar el ADN de las células cancerosas y destruirlas o impedir su crecimiento. Se puede administrar externamente (radioterapia externa) o colocando materiales radiactivos cerca del sitio del tumor (braquiterapia) (Schaue y McBride, 2015).

3. Quimioterapia: Consiste en el uso de medicamentos (quimioterápicos) que interfieren con la capacidad de las células cancerosas para crecer y dividirse. Los medicamentos de quimioterapia pueden administrarse por vía intravenosa o por vía oral y a menudo se utilizan en combinación para maximizar su efectividad (Schirrmacher, 2018).

4. Terapia hormonal: Algunos tipos de cáncer dependen de hormonas para crecer. La terapia hormonal busca bloquear o disminuir la producción de hormonas o bloquear los receptores hormonales en las células cancerosas, impidiendo así su crecimiento (Abraham y Staffurth, 2016).

5. Terapias dirigidas: Son tratamientos que actúan específicamente sobre las alteraciones genéticas o proteicas presentes en las células cancerosas, bloqueando su crecimiento y propagación mientras minimizan el daño a las células normales (Ke y Shen, 2017).

6. Inmunoterapia: Esta terapia estimula el sistema inmunológico del paciente para reconocer y atacar las células cancerosas. Puede incluir el uso de anticuerpos

monoclonales, inhibidores de puntos de control inmunológico, o la administración de células inmunes modificadas (Esfahani *et al.*, 2020).

7. Terapia génica: Aunque todavía en investigación y desarrollo, la terapia génica busca modificar el ADN de las células cancerosas o introducir genes nuevos para que las células cancerosas sean más sensibles a otros tratamientos, como la quimioterapia o la radioterapia (Amer, 2014).

A pesar de los avances significativos en los tratamientos contra el cáncer, existen varias desventajas y desafíos asociados con estos, como pueden ser los efectos secundarios severos, la toxicidad y daño a los tejidos, el desarrollo de resistencia a fármacos, entre otros.

2.2.3.1 Tratamiento contra el Cáncer con Paclitaxel

El paclitaxel (PTX) es un medicamento ampliamente utilizado en el tratamiento del cáncer, especialmente en diversos tipos de tumores sólidos. Es un taxano aislado de la corteza del tejo del Pacífico (*Taxus brevifolia*), cuya fórmula se elucidó en 1971 y en 1994 se autorizó su uso como tratamiento contra el cáncer de ovario. El PTX actúa inhibiendo la división celular al interferir con las estructuras de los microtúbulos en las células cancerosas. Los microtúbulos son esenciales para la división celular, por lo que, al bloquear su función, el PTX impide que las células cancerosas se multipliquen (Markman y Mekhail, 2002).

Los efectos secundarios comunes del tratamiento con PTX incluyen náuseas, vómitos, pérdida de cabello, neuropatía periférica (entumecimiento u hormigueo en manos y pies), supresión de la médula ósea (que puede llevar a anemia y aumento del riesgo de infecciones), entre otros. Aunque efectivo, el desarrollo de resistencia al PTX puede ocurrir en algunos pacientes, lo que limita su efectividad a largo plazo en ciertos tipos de cáncer (Sati *et al.*, 2024).

2.2.4 Terapia Combinatoria con Extractos Naturales contra el Cáncer

Los extractos de plantas se conforman de una compleja mezcla de compuestos naturales, los cuales suelen presentar diversas actividades biológicas. Es por este motivo que su uso como tratamiento contra el cáncer ha aumentado, ya que pueden presentar

componentes bioactivos que podrían conferir efectos protectores a las células sanas frente a los daños causados por las ROS, además de reducir la toxicidad de los fármacos quimioterapéuticos (Ng *et al.*, 2022). La medicina tradicional de Asia y otros continentes ha utilizado activamente extractos de plantas y regímenes terapéuticos a base de plantas, para el tratamiento de numerosas enfermedades, especialmente el cáncer.

Recientemente, numerosos estudios han revelado que la combinación de extractos vegetales y los compuestos terapéuticos, podrían ser un tratamiento prometedor con actividad multifactorial contra las vías de señalización implicadas en el desarrollo y la progresión del cáncer. Algunos otros importantes beneficios de estos tratamientos incluyen:

- Sinergia: Los extractos pueden interactuar sinérgicamente, mejorando la eficacia y reduciendo la toxicidad.
- Mecanismos de acción múltiples: Los extractos suelen contener una amplia gama de compuestos bioactivos que actúan sobre diferentes dianas moleculares.
- Reducción de la resistencia: La combinación de extractos con diferentes mecanismos de acción puede dificultar que las células cancerosas desarrollen resistencia.
- Toxicidad reducida: Los extractos naturales generalmente tienen una menor toxicidad que los agentes quimioterapéuticos, lo que permite dosis más altas y tratamientos prolongados.

Algunas especies del género *Nymphoides* han sido investigadas para evaluar su efecto anticancerígeno, ya que se ha descrito su uso en la medicina tradicional china para esta patología desde hace años (Khan *et al.*, 2018)

2.3 Género *Nymphoides*

El género *Nymphoides* pertenece a la familia Menyanthaceae, que es una pequeña familia cosmopolita de plantas acuáticas que comprende seis géneros y aproximadamente 60 especies que habitan ambientes acuáticos o húmedos (Tippery y Les, 2009). La *Nymphoides*, comúnmente conocida como corazón flotante, presenta un rizoma profundamente sumergido y hojas flotantes que mantienen las flores por encima del agua. En la mayoría de especies del género *Nymphoides*, se observan flores de cinco pétalos, muchas de las cuales tienen alas o “pelos” que las recubren; generalmente los pétalos son

de color amarillo, blanco o raramente rosados. Con unas 50 especies distribuidas en todo el mundo, el género *Nymphoides* es el más extenso y ampliamente distribuido de la familia Menyanthaceae (Tippery *et al.*, 2008).

Las especies de *Nymphoides* tienen importancia ecológica, económica y ornamental. Algunas especies son fuente de alimento para animales acuáticos y terrestres, como peces, aves y mamíferos. Otras especies tienen propiedades medicinales, como *Nymphoides indica*, que se usa en la medicina tradicional de India, China y África para tratar diversas enfermedades. Además, algunas especies son cultivadas como plantas ornamentales en estanques, acuarios y jardines acuáticos, por su belleza y capacidad de oxigenar el agua. Son bien conocidas las propiedades medicinales de una amplia gama de plantas; sin embargo, son pocas las especies de *Nymphoides* a las que se atribuye actividad antitumoral (Khan *et al.*, 2018).

2.3.1 Potencial Bioactivo del Género *Nymphoides*

Las especies de *Nymphoides* tienen un potencial medicinal que ha sido explorado por diversas investigaciones científicas. Algunos de los hallazgos más relevantes son:

Nymphoides indica tiene propiedades antiinflamatorias, analgésicas, antipiréticas, antidiabéticas, antidiarreicas, antifúngicas y antibacterianas. Se ha demostrado que sus extractos etanólicos y acuosos inhiben la producción de óxido nítrico y la expresión de COX-2 en macrófagos activados, lo que sugiere un mecanismo de acción similar al de los antiinflamatorios no esteroideos (Kim *et al.*, 2018). También se ha reportado que sus extractos reducen el nivel de glucosa en sangre, el peso corporal y el índice de masa corporal en ratas diabéticas inducidas por estreptozotocina (Hanif *et al.*, 2021). Además, se ha comprobado que sus extractos tienen actividad antidiarreica en ratones, al disminuir el tránsito intestinal y el volumen y peso de las heces. Asimismo, se ha evidenciado que sus extractos tienen actividad antifúngica y antibacteriana contra diversos patógenos, como *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* (Amin *et al.*, 2016). Finalmente, también se ha reportado que el extracto acuoso de *N. indica* presentó actividad antiproliferativa en la línea celular HeLa (Manosroi *et al.*, 2012).

Nymphoides hydrophylla tiene propiedades antioxidantes, hepatoprotectoras, antitumorales y antiparasitarias. Se ha demostrado que sus extractos metanólicos y acuosos tienen una alta capacidad de captar radicales libres y de inhibir la peroxidación

lipídica, lo que indica un potencial antioxidante. También se ha reportado que sus extractos protegen el hígado de ratas contra el daño inducido por el paracetamol, al reducir los niveles de enzimas hepáticas, el estrés oxidativo y la necrosis celular (Bharathi *et al.*, 2014). Asimismo, se ha comprobado que sus extractos tienen actividad antiparasitaria contra *Leishmania donovani*, el agente causal de la leishmaniosis visceral, al inhibir el crecimiento y la viabilidad de los parásitos (Ko *et al.*, 2014).

Nymphoides peltata tiene actividad antihelmíntica, diurética, febrífuga y galactogoga. Las hojas frescas se utilizan en el tratamiento de dolores de cabeza periódicos. *Nymphoides peltata* tiene un alto contenido de flavonoides, taninos y saponinas, que le confieren propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y antimicrobianas. *Nymphoides peltata*, mostró una actividad antitumoral significativa en el ensayo MTT utilizando un extracto de *N. peltata* al 10% de H₂O-metanol (MeOH) contra células de cáncer de próstata PC-3 y células de osteosarcoma humano U2OS con valores IC₅₀ de 40.8 µg/mL y 70.7 µg/mL, respectivamente, donde las células PC-3 mostraron más sensibilidad al extracto (Du *et al.*, 2014).

El cribado fitoquímico preliminar de las especies de *Nymphoides* reveló la presencia de muchos componentes bioactivos, como flavonoides, taninos, saponinas, triterpenos, carbohidratos, glucósidos, compuestos fenólicos, fitoesteroles, aceite volátil, cumarinas, aceites y grasas fijas, esteroides y azúcares de diferentes extractos acuosos y alcohólicos de *N. hydrophylla*, *N. indica* y *N. macrospermum* (Amin *et al.*, 2016; Madhavan *et al.*, 2012). En *N. indica*, el contenido total de flavonoides del extracto crudo se encontró en 70,28 mg de RUE/g de extracto, de forma similar el contenido fenólico total fue de 28,88 mg de GAE/g (Moghal *et al.*, 2013).

Los flavonoides de las *Menyanthaceae*, con una sola excepción, se basan en el kaempferol y la quercetina (II) y una serie de derivados O-metilados de estos compuestos. Bohm *et al.* descubrieron que la 3,7-di-O-metilquercetina se presenta como 4'-O-glucósido en cuatro especies de *Nymphoides*.

El perfil de *N. indica* se basa en kaempferol, quercetina, isorhamnetina y 3,7-di-O-metilquercetina. *N. fallax* carece de isorhamnetina, pero tiene las otras agliconas. *Nymphoides fallax* difiere de *N. indica* en los caracteres estructurales de pétalos, anteras y semillas y en la tolerancia altitudinal. Los dos taxones tienen diferentes perfiles de agliconas

y glucósidos. *Nymphoides fallax* y *N. indica* también difieren en la presencia de monorhamnósidos y glucósidos acilados en *N. fallax* y su ausencia en *N. indica*. En resumen, los datos sobre flavonoides se suman a las diferencias totales entre *N. indica* y *N. fallax* y apoyan el reconocimiento de esta última, como una especie distinta (Al-Sa'idy y Hamid, 2023).

En el estudio “Chemical Compositions and Antioxidant Activities of a Specialty Aquatic Vegetable *Nymphoides hydrophylla* in Taiwan”, los compuestos polifenólicos más abundantes encontrados en los extractos de *N. hydrophylla* fueron el ácido gálico, el kaempferol, el ácido elágico y la quercetina. En general, los extractos acuosos mostraron un contenido menor de todos los compuestos polifenólicos analizados a los obtenidos en los extractos etanólicos, con la excepción del ácido gálico, el ácido hidroxibenzoico y el ácido vanílico (Ko *et al.*, 2014).

Los flavonoides y derivados glucosilados presentes en especies del género *Nymphoides* se enumeran en la Tabla 1.

Tabla 1. Derivados glucosilados de flavonoides presentes en plantas del género *Nymphoides* (Fuente: Al-Sa'idy y Hamid, 2023).

Type of flavonoid	N. cordata	N. crenata	N. cristata	N. exigua	N. fallax	N. geminata	N. grayana	N. indica	N. peltata
Aglycone	Quercetin Kaempferol	Quercetin kaempferol	Quercetin kaempferol	kaempferol	Quercetin Kaempferol 7-O-methylquercetin 3,7-O-methylquercetin	Quercetin Kaempferol Isorhamnetin 7-O-methylquercetin 3,7-O-methylquercetin 3',7-O-methylquercetin	Quercetin	Quercetin Kaempferol Isorhamnetin 7-O-methylquercetin 3,7-O-methylquercetin	quercetin
Mono-glycoside	Kaempferol-3-O-glucoside	Kaempferol-3-O-glucoside	Kaempferol-3-O-glucoside	Quercetin-3-O-glucoside	Kaempferol-3-O-glucoside	Quercetin-3-O-glucoside	Kaempferol-3-O-glucoside	Kaempferol-3-O-glucoside	Quercetin-3-O-glucoside
	Kaempferol-3-O-galactoside	Kaempferol-3-O-galactoside	Quercetin-3-O-glucoside		Quercetin-3-O-glucoside	Quercetin-4'-O-glucoside	Quercetin-3-O-glucoside	Kaempferol-3-O-arabinoside	Quercetin-3-O-arabinoside
	Kaempferol-3-O-rhamnoside	Kaempferol-3-O-galactoside	Quercetin-3-O-glucoside		Quercetin-4'-O-glucoside		Quercetin-3-O-galactoside	Quercetin-3-O-glucoside	
	Quercetin-3-O-glucoside	Kaempferol-3-O-arabinoside	Quercetin-3-O-arabinoside		Quercetin-3-O-arabinoside		Quercetin-3-O-arabinoside	Quercetin-3-O-arabinoside	
	Quercetin-3-O-galactoside	Quercetin-3-O-glucoside			Quercetin-3-O-rhamnoside		Quercetin-3-O-rhamnoside	7-O-methyl-Quercetin-3-O-glucoside	
	Quercetin-3-O-rhamnoside	Quercetin-3-O-galactoside			7-O-methyl-Quercetin-3-O-glucoside		7-O-methyl-Quercetin-3-O-glucoside	3,7-O-dimethyl-Quercetin-4'-O-glucoside	
di-glycoside		Quercetin-3-O-arabinoside			7-O-methyl-Quercetin-3-O-rhamnoside		3,7-O-dimethyl-Quercetin-4'-O-glucoside		
					7,3'-O-dimethyl-Quercetin-3-O-glucoside				
					Acyl Quercetin-3-O-glucoside derivative		Acyl Quercetin-3-O-glucoside derivative		
di-glycoside	Kaempferol-3-O-diglycoside	Quercetin-3-O-gluco-arabinoside	Kaempferol-3-O-gluco-arabinoside	Quercetin-3-O-gluco-arabinoside	Quercetin-3-O-gluco-arabinoside	Kaempferol-3-O-diglycoside	Kaempferol-3-O-gluco-galactoside	Kaempferol-3-O-gluco-arabinoside	Quercetin-3-O-gluco-arabinoside
	Kaempferol-3-O-gluco-rhamnoside		Quercetin-3-O-gluco-arabinoside	Quercetin-3-O-gluco-rhamnoside	7-O-methyl-Quercetin-3-O-gluco-galactoside	Kaempferol-3-O-gluco-rhamnoside	Quercetin-3-O-gluco-arabinoside	Quercetin-3-O-gluco-arabinoside	Quercetin-3-O-gluco-rhamnoside
	Quercetin-3-O-diglycoside					Quercetin-3-O-diglycoside	7-O-methyl-Quercetin-3-O-diglycoside	Isorhamnetin-3-O-glucoside	Quercetin-3-O-galacto-rhamnoside
						Quercetin-3-O-gluco-rhamnoside			Quercetin-3-O-gluco-galactoside acyl derivative
						Isorhamnetin-3-O-glucoside			

2.4 *Nymphoides fallax*

La *N. fallax*, también llamada “estrella amarilla de agua” es una planta acuática enraizada, miembro de la familia de las estrellas de agua (*Menyanthaceae*). Presenta hojas flotantes de color verde oscuro en forma de corazón, una flor amarilla de cinco pétalos con una textura que recuerda al terciopelo (Imagen 1).

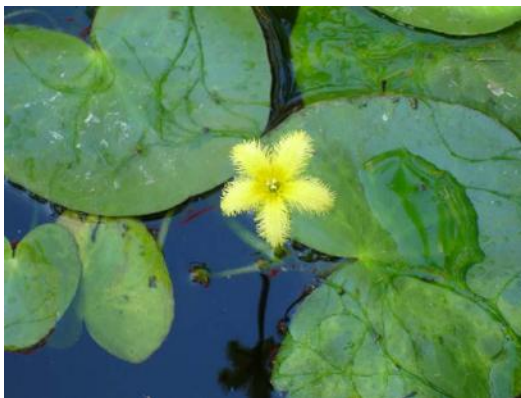


Imagen 1. *Nymphoides fallax* en estado silvestre.

Los especímenes de *N. fallax* se caracterizan por presentar largos pecíolos de hasta 2 m, que elevan las hojas hasta la superficie de agua; las flores son vistosas por presentar lóbulos de los pétalos de un intenso color amarillo. Las especies de plantas de *Nymphoides* tienen raíces bajo el agua y hojas flotantes que sostienen las pequeñas flores por encima de la superficie del agua (Chávez *et al.*, 2022). *N. fallax* tiene reproducción tanto sexual como vegetativa, y una anatomía vegetativa similar a *Nymphoides indica* (L.) Kuntze la otra especie de ese mismo género presente en México. *Nymphoides fallax* difiere de *N. indica* por tener pétalos amarillos laciniados, anteras amarillas, semillas más grandes y ocurrencia en mayores altitudes (Martínez y Gómez-Sánchez, 2006); es una especie con importancia ecológica, ya que representa un hábitat importante para la fauna acuática. Es una especie endémica de Centroamérica, y concretamente, en México es posible encontrarla en los estados de Guanajuato, Hidalgo, Jalisco, Querétaro y Zacatecas en cuerpos de agua que sobrepasan los 1500 msnm (Lobato-de Magalhães y Martínez, 2018).

La especie endémica de México y Guatemala, *N. fallax*, ha sido abordada en algunos estudios; en 1986, Bohm *et al.* describen la presencia de algunos derivados glucosilados de quercetina; en 2014, Quiroz-Flores *et al.* evaluaron la variación de biomasa

de la planta en la laguna de Tecocomulco, Hidalgo; Lobato-de Magalhães en 2020, detalla la morfología distal y de las semillas; y Chávez en 2022 describe el sistema de apareamiento y aspectos reproductivos de la especie; se ha demostrado la conectividad funcional de *N. fallax* presentes en humedales del altiplano, así como la importancia de la cubierta forestal en este aspecto (Lobato-de Magalhães y Martínez, 2020).

Es posible que extractos de *N. fallax* presenten, al igual que otras especies del género *Nymphoides*, actividad antitumoral. Dicha actividad se podría atribuir a la rica variedad de flavonoides presentes en esta especie, por lo que se identificaron y cuantificaron los compuestos fenólicos y flavonoides. Adicionalmente, los extractos se probaron en líneas celulares de cáncer de próstata (CP) y cáncer de mama (CM), para identificar si existe mayor sensibilidad en alguno de los dos. Finalmente, se evaluó si existe algún efecto sinérgico entre los extractos y el fármaco PTX, ampliamente usado en tratamientos contra el cáncer.

3. JUSTIFICACIÓN

Varias especies del género *Nymphoides* han presentado actividades antimicrobianas, antidiabéticas, hepatoprotectoras, antioxidantes, citotóxicas, entre otras. Estos efectos farmacológicos se atribuyen a la presencia significativa de flavonoides, muchos de los cuales han sido identificados en extractos de *N. peltata*, *N. hydrophylla* y *N. indica* (Amin *et al.*, 2016). En el caso particular de *N. peltata*, sus extractos etanólicos presentaron actividad antiproliferativa contra células tumorales PC-3 y U2OS, siendo las células de próstata más sensibles al extracto (Du *et al.*, 2014). Debido a la evidencia de otras especies del género *Nymphoides* y su actividad anticancerígena contra distintas líneas celulares, sugiere una posible actividad antitumoral de *N. fallax*. Investigaciones recientes demuestran el efecto de extractos de plantas medicinales como tratamientos complementarios contra distintos tipos de cáncer, gracias a la presencia de moléculas bioactivas.

De acuerdo al GCO (Global Cancer Observatory) en 2022, el cáncer de próstata fue el tipo de cáncer de mayor incidencia y mortalidad en hombres; mientras que para las mujeres ese lugar corresponde al cáncer de mama. En ambos casos, la quimioterapia con paclitaxel desempeña un papel importante en los tratamientos clínicos; sin embargo, el riesgo de desarrollar resistencia al fármaco siempre es latente. Aunado a esto, la mayoría de las terapias utilizadas en el tratamiento del cáncer conllevan un elevado número de efectos secundarios y siempre existe el riesgo de reaparición del tumor; es por eso que las terapias alternativas de medicina tradicional han tenido mayor relevancia en los últimos años, ya que pueden ayudar a que los pacientes con cáncer se sientan mejor cuando se usan junto con un tratamiento convencional.

A pesar del posible potencial de esta planta en el tratamiento contra el cáncer, o como adyuvante (debido a la presencia de metabolitos secundarios interesantes), no existen investigaciones sobre efectos anticancerígenos en ningún tipo de cáncer; determinar la concentración de compuestos aromáticos podría proveer indicios sobre otras actividades farmacológicas previamente descritas en especies de este género.

4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿El extracto etanólico de *Nymphoides fallax* presenta compuestos fenólicos que inhiben la proliferación y migración *in vitro* de células de cáncer de próstata y de mama por separado y en combinación con paclitaxel?

5. HIPÓTESIS

El extracto etanólico de *Nymphoides fallax* contiene compuestos fenólicos que inhiben la proliferación y la migración de las células PC-3 y MCF-7 *in vitro* de manera individual y en combinación con paclitaxel.

6. OBJETIVOS

6.1 Objetivo General

Identificar compuestos fenólicos presentes en los extractos etanólicos de *Nymphoides fallax* y evaluar su efecto antiproliferativo y antimigratorio en células PC-3 y MCF-7 *in vitro*, individualmente y en combinación con paclitaxel.

6.2 Objetivos Específicos

- Identificar los compuestos fenólicos y los flavonoides presentes en los extractos etanólicos de *N. fallax* mediante HPLC-DAD.
- Evaluar la actividad citotóxica del extracto etanólico de *Nymphoides fallax* en células sanas (3T3)
- Estudiar el efecto antiproliferativo del extracto en modelos de líneas celulares de cáncer de próstata y mama (PC-3 y MCF-7) *in vitro* mediante tinción con azul tripano.
- Analizar el efecto en la migración celular del extracto etanólico de *Nymphoides fallax* en PC-3 y MCF-7 *in vitro* por ensayo herida.
- Evaluar el efecto combinatorio del extracto etanólico de *Nymphoides fallax* con paclitaxel sobre la proliferación celular con la tinción con azul tripano.
- Identificar la migración celular de las líneas PC-3 y MCF-7 expuestas a la combinación del extracto y el paclitaxel, mediante el ensayo de herida.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Colecta de *Nymphoides fallax*

Los ejemplares fueron colectados en humedales previamente localizados por la Dra. Tatiana Lobato de Magalhães, los cuales se ubican en el municipio de Huimilpan, Querétaro y se detallan en la Tabla 1S.

Tabla 1S. Sitios de colecta de *Nymphoides fallax*.

Ubicación	Latitud	Longitud	Altitud
Sitio 1	20°24'57.6"	100°15'53.9"	2257 msnm
Sitio 2	20°23'55.3"	100°16'03.6"	2316 msnm
Sitio 3	20°21'20.0"	100°16'28.0"	2339 msnm

Los ejemplares fueron identificados por la especialista Dra. Tatiana Lobato de Magalhães y fueron depositados en el Herbario "Jerzy Rzedowski" de la Universidad Autónoma de Querétaro (QMEX). Las recolecciones de hojas, tallos y raíces de *N. fallax* se almacenaron en una hielera hasta su traslado al laboratorio, las cuales se limpiaron con agua destilada y se mantuvieron refrigeradas hasta su uso.

7.2 Extracción etanólica de *Nymphoides fallax*

Se utilizó la metodología descrita por (Kim *et al.*, 2018) para obtener extractos etanólicos de *N. indica* con el fin de identificar los flavonoides presentes. El material recolectado se secó a la sombra en una habitación a temperatura ambiente durante una semana para eliminar la humedad. Se obtuvieron los pesos secos de cada una de las partes de la planta y se redujo el tamaño de las muestras mediante molienda. Se obtuvieron tres extractos: planta entera (ENFC), raíces (ENFR), y tallos y hojas (ENFA). Las muestras se dejaron macerando en *n*-hexano durante una semana en proporción 10:1 (v/p) para extraer las grasas y aceites presentes. Posteriormente, el material orgánico se sumergió en etanol durante una semana, tras lo cual se cambió el disolvente dos veces más, completando tres maceraciones secuenciales. Finalmente, se mezclaron los tres macerados y se eliminó el

disolvente por evaporación a presión reducida con un rotavapor. Los extractos obtenidos se conservaron en refrigeración hasta su utilización.

7.3 Identificación de Compuestos Fenólicos y Flavonoides

Debido a la presencia de derivados glicosilados, la identificación de los compuestos se realizó tanto en los extractos hidrolizados, como en los no hidrolizados de *N. fallax*. La hidrólisis ácida de los extractos se llevó a cabo en 5 mL de H₂SO₄ 1N en un baño de agua a 100 °C con reflujo durante 2 h, luego se neutralizó con una solución saturada de NaHCO₃, y se lavó con acetato de etilo para eliminar la fase acuosa. Finalmente, el disolvente se eliminó por evaporación rotatoria. La identificación de los principales compuestos fenólicos y flavonoides se llevó a cabo mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) utilizando un cromatógrafo Waters Alliance acoplado a un detector de matriz de diodos (DAD) (Waters Alliance modelo 2998). Los análisis se realizaron mediante un método de fase inversa, que consiste en utilizar una columna agilent-Zorbax C₁₈ (4,6 x 150 mm, 5 µm), como fase estacionaria y como fase móvil, acetonitrilo y agua acidificada con ácido acético 12,5 mM, con elución en modo gradiente (Tabla 2S). Los compuestos se detectaron a una λ_{max} de 280 nm.

Tabla 2S. Gradiente de elución para el análisis de los flavonoides.

Tiempo (minutos)	Agua acidulada [12.5 mM]	Acetonitrilo
0	95%	5%
2	95%	5%
5	85%	15%
20	50%	50%
25	95%	5%
35	95%	5%

7.4 Cultivos Celulares

Las líneas celulares de fibroblastos murinos (3T3), cáncer de próstata humano (PC-3) y cáncer de mama (MCF-7) se obtuvieron del laboratorio de Biología Molecular de la

Universidad Autónoma de Querétaro. Las células se cultivaron en medio DMEM suplementado con 10% de suero de ternera (para células 3T3) y suero fetal bovino (para células PC-3 y MCF-7) con 1% de antibiótico penicilina-estreptomicina a 37 °C y 5% de CO₂.

7.5 Ensayo de Actividad Citotóxica del Extracto de *N. fallax*

En dos placas de 24 pocillos se inocularon 1x10⁴ células 3T3 por pocillo con 0,3 mL de medio. Después de 24 horas, se retiró el medio y se lavó con PBS 1X. Se administraron siete concentraciones de cada extracto de *N. fallax* (50, 100, 250, 500, 1000, 1500 y 2000 µg/mL) y un control negativo (sólo medio), cada uno por triplicado. Se incubaron durante 24 y 48 horas, tras lo cual se tripsinizaron las células y se contaron con azul tripán al 0,4% en una cámara de Neubauer. La actividad citotóxica de los extractos de *N. fallax* se calculó como porcentaje (células viables del tratamiento/células viables del control).

7.6 Evaluación del Efecto Inhibitorio de la Proliferación Celular

En dos placas de 24 pocillos, un par para cada línea celular (PC-3 y MCF-7), se inocularon 1x10⁴ células en 0,3 mL del medio suplementado correspondiente y se dejaron crecer durante 24 h, tras lo cual se retiró el medio y se lavó con 1X PBS. Basándose en los resultados obtenidos en el ensayo de citotoxicidad de los extractos de ENFC y ENFA sobre fibroblastos, se seleccionaron concentraciones de 50, 100, 150, 150, 200, 300, 400 y 500 µg/mL, más un control negativo (sólo medio) y un control positivo (paclitaxel, cuyo IC₅₀ se determinó previamente), cada uno por triplicado. La viabilidad celular se determinó mediante tinción con azul tripán a las 48 horas. Se determinaron los correspondientes IC₅₀ e IC₂₅ para cada línea celular.

7.7 Evaluación de Migración: Ensayo Herida

En una placa de 6 pocillos (una por línea celular) se inocularon 5x10⁴ células por pocillo en 2 mL de medio DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino y una mezcla de antibióticos al 1% a 37 °C y 5% de CO₂. Una vez formada una monocapa uniforme, se realizaron tres rasguños por pocillo con ayuda de una punta plástica para micropipeta. En el pocillo del control negativo se añadió sólo medio de cultivo, para el control positivo se utilizó la IC₅₀ de paclitaxel; en los pocillos restantes se añade extracto de *N. fallax* en sus

concentraciones de IC₅₀ e IC₂₅. Las células se incubaron en las mismas condiciones y las heridas se revisarán a las 0, 6, 12 y 24 hrs.

7.8 Tratamientos Combinatorios con Paclitaxel

Tanto la proliferación como la migración celular fueron evaluadas en los tratamientos combinatorios con los extractos de *N. fallax* y paclitaxel.

Para los ensayos de proliferación, en placas de 24 pocillos se inocularon 1x10⁴ células por pocillo de las células PC-3 o MCF-7 en 0,3 mL de medio DMEM, suplementado con 10% de suero fetal bovino y una mezcla de antibióticos al 1% a 37 °C y 5% de CO₂. Se dejaron crecer durante 24 horas, tras lo cual se retiró el medio y se lavaron con PBS 1X para aplicarles el tratamiento. Se utilizó un control negativo (solo medio) y uno positivo (0,05 µM de paclitaxel). Para las combinaciones se añadió 0,15 mL de medicamento y 0,15 mL de extracto de *N. fallax* (IC₅₀ o IC₂₅). Las células se incubaron durante 48 horas, después de las cuales, se evaluó la viabilidad celular mediante tinción con azul tripano.

Para los ensayos combinatorios de migración celular, se cultivaron 5x10⁵ células por pocillo en dos placas de 6 pozos (un par por cada línea celular) en 2 mL del medio DMEM y se dejaron crecer hasta formar una monocapa uniforme. Con ayuda de una punta de plástico para micropipeta, se realizaron tres rasguños por pocillo. A uno de los pozos se le agregó 2 mL de medio (control negativo), para el control positivo se les agregaron 2 mL de medio y paclitaxel al 0,05 µM. Finalmente, en los pozos restantes se realizaron las combinaciones, añadiendo 1mL de medio con paclitaxel y la IC₅₀ o IC₂₅ del extracto evaluado. Las células se incubarán en las mismas condiciones y las heridas se revisarán a las 0, 6, 12 y 24 hrs.

7.9 Análisis Estadístico

Cada ensayo se realizó por triplicado en tres experimentos independientes, los datos se analizaron con el programa GraphPad Prism 9 y se expresan como media ± error estándar. Los resultados se analizaron mediante análisis de la varianza (ANOVA) y la prueba *post hoc* de Tukey con una significancia estadística de p<0,05.

8. RESULTADOS

8.1 Extracción Etanólica de *N. fallax*

La recolección de las plantas se llevó a cabo durante el mes de junio de 2023. Debido al estrés hídrico de los ejemplares poco desarrollados, se utilizó la planta entera para la extracción. El resto del material recolectado se separó en raíces, tallos y hojas. Los resultados de las extracciones se muestran en la Tabla 1.

Tabla 2. Resultados de las extracciones de *N. fallax*

ENFC: Extracto de *N. fallax* completa, ENFA: Extracto de partes aéreas de *N. fallax*. ENFR: Extracto de raíces de *N. fallax*.

Sección	Peso seco (g)	Peso del extracto (g)	% de extracción
Planta completa (ENFC)	91.7	4.037	4.40%
Tallos y hojas (ENFA)	34.5	0.751	2.17%
Raíces (ENFR)	21.7	0.192	0.88%

8.2 Análisis Fitoquímico de los Extractos de *N. fallax*

Los extractos hidrolizados y no hidrolizados se analizaron mediante HPLC-DAD. La Figura 5 muestra los cromatogramas obtenidos, mientras que las figuras suplementarias (Figuras S1-S5) corresponden a los cromatogramas de cada uno de los estándares utilizados.

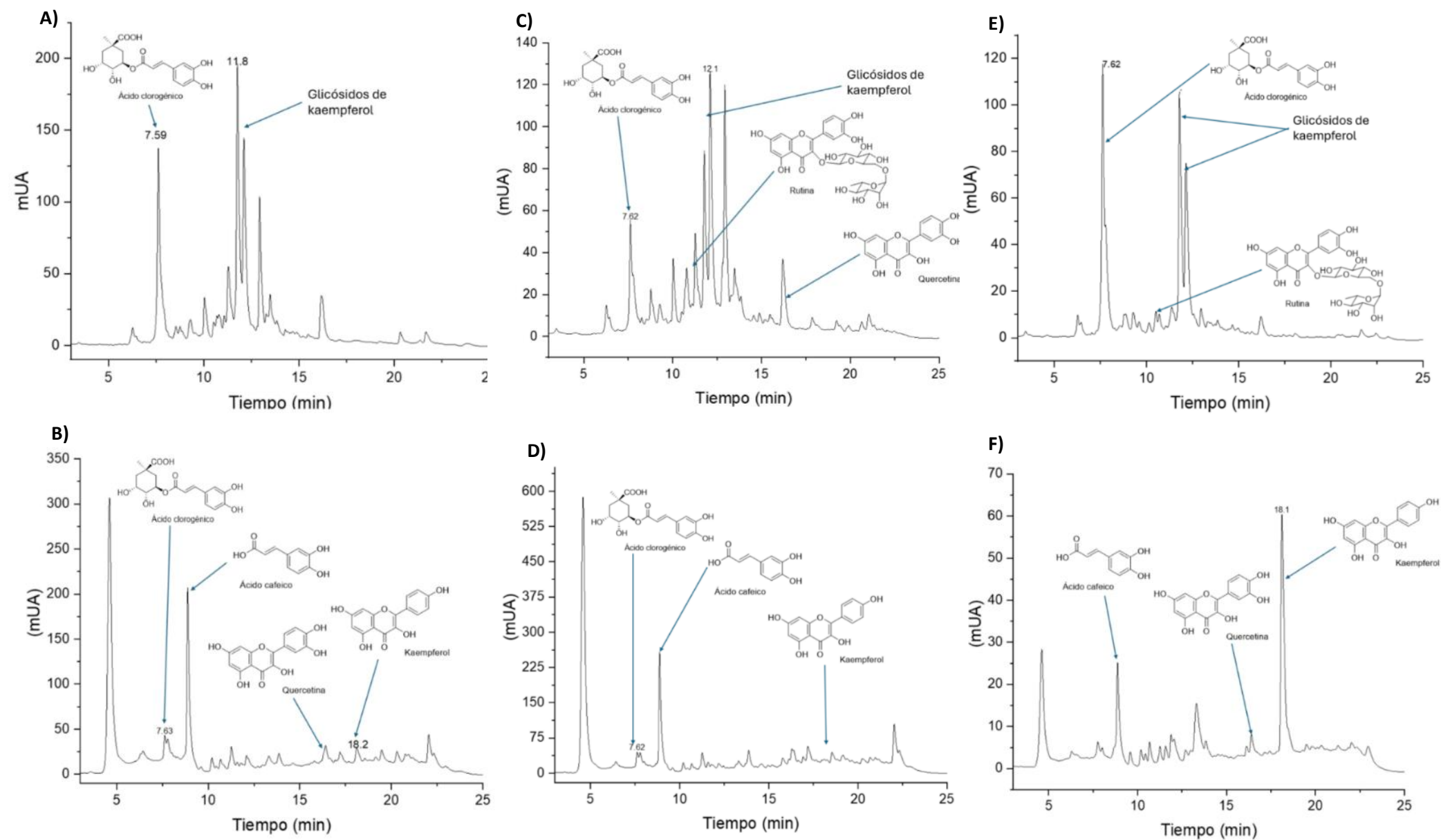


Figura 4. Cromatogramas de los extractos de *N. fallax*. **A)** ENFC; **B)** ENFC hidrolizado; **C)** ENFA; **D)** ENFA hidrolizado; **E)** ENFR; **F)** ENFR hidrolizado.

La tabla 3 remarca la presencia de flavonoides y compuestos orgánicos presentes en los cromatogramas. En los extractos no hidrolizados, se observa la presencia predominante de ácido clorogénico y glucósidos de kaempferol; en los extractos ENFC y ENFA, también se aprecian señales correspondientes a los flavonoides quercetina y rutina, ausentes en el extracto ENFR. Los cromatogramas obtenidos de todos los extractos hidrolizados muestran una concentración importante de ácido cafeico; sólo el extracto hidrolizado de ENFR mostró la presencia de otros compuestos como quercetina y kaempferol.

Tabla 3. Flavonoides y compuestos fenólicos presentes en los extractos de *N. fallax*.

Extracto	Ácido clorogénico	Ácido cafeico	Rutina	Quercetina	Kaempferol	Glicósidos de kaempferol
ENFC	+++		++	+		+++
ENFA	++		++	++		+++
ENFR	++		+	+		++
ENFC (hidrolizado)	+	++		+	+	
ENFA (hidrolizado)	+	++				
ENFR (hidrolizado)		++				+++

+: Presencia baja, ++: Presencia intermedia, +++: Presencia alta.

8.3 Actividad Citotóxica de los Extractos de *N. fallax* sobre Fibroblastos

Los tres extractos obtenidos (ENFC, ENFA y ENFR) se aplicaron a fibroblastos murinos (células 3T3) para evaluar su actividad citotóxica a las 24 y 48 h (Figura 6). Para determinar el efecto citotóxico de los extractos de *N. fallax*, se administraron a diferentes concentraciones en células 3T3 proliferantes. En todos los extractos, el efecto citotóxico dependió de la concentración y del tiempo, mostrando el extracto ENFC la mayor citotoxicidad. Los extractos ENFC y ENFA alcanzaron la citotoxicidad total a concentraciones de 500 y 1000 µg/mL, respectivamente; en el caso de ENFR no fue capaz de alcanzar la citotoxicidad completa, a pesar de administrar una concentración aún mayor que los dos extractos anteriores (3500 µg/mL). A partir de estos resultados, se determinaron las concentraciones de trabajo de ENFC y ENFA; también se decidió que, por inviabilidad, no se seguiría evaluando el extracto de ENFR.

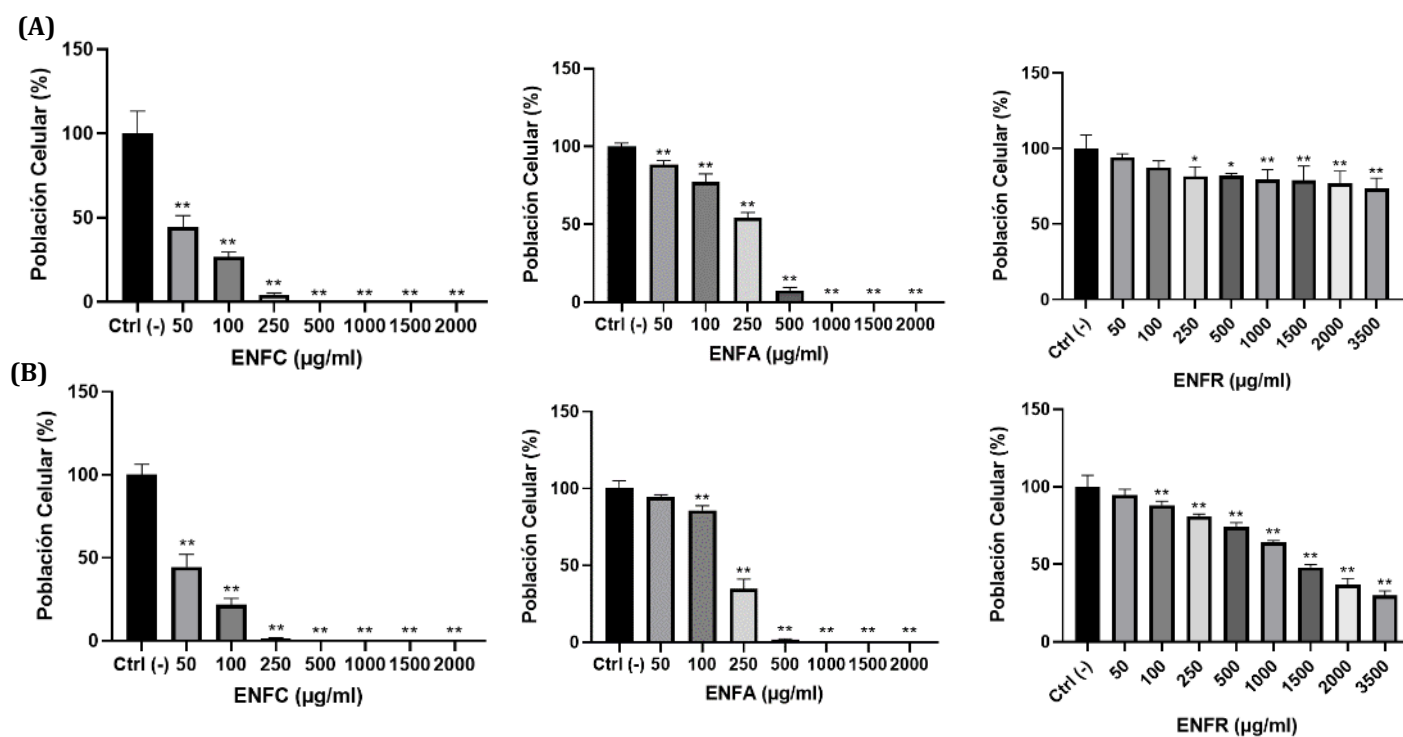


Figura 5. Actividad citotóxica de los extractos de *N. fallax* sobre fibroblastos murinos (3T3) a las **A)** 24h y **B)** 48h. Los valores se expresan como media \pm desviación estándar. *= $p < 0.05$, **= $p < 0.005$

8.4 Efecto Antiproliferativo de los Extractos de *N. fallax* sobre Líneas Celulares de Cáncer de Próstata

Los efectos de los extractos ENFC y ENFA sobre la proliferación de las células PC-3 se muestran en la figura 7. Se observó actividad antiproliferativa en todas las concentraciones evaluadas (50 a 500 µg/ml), dependiendo de la concentración del extracto y del tiempo. La tabla 4 muestra los correspondientes IC_{50} e IC_{25} calculados, pero debido a que después de 24 hrs no había grupos con inhibición total, no fue posible determinar las IC_{50} e IC_{25} en dicho tiempo.

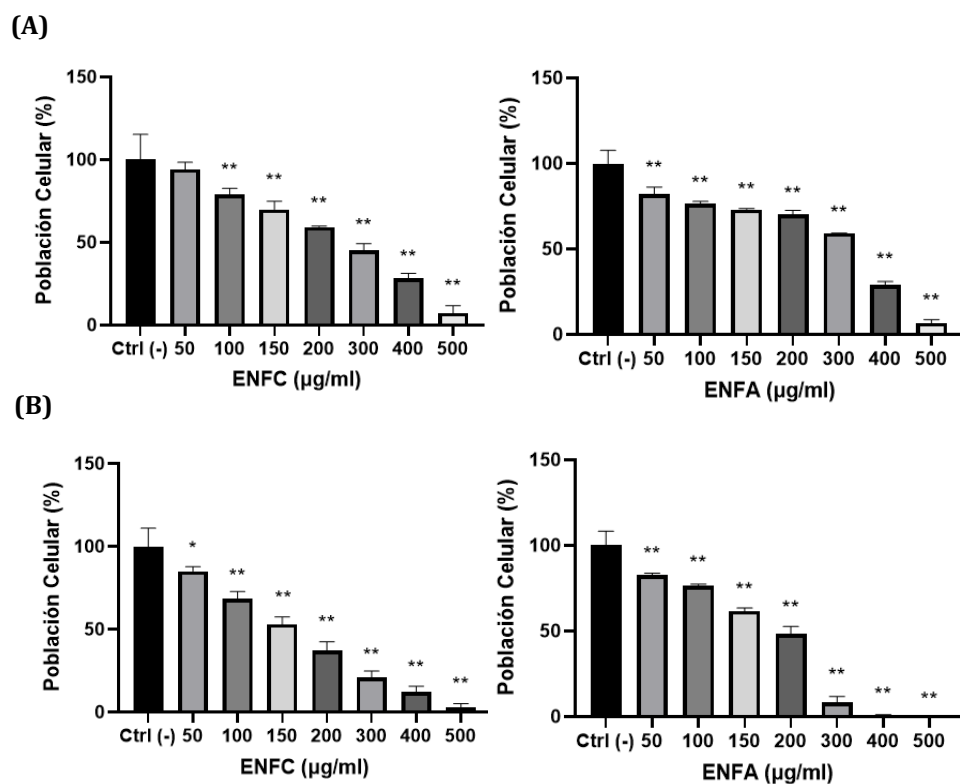


Figura 6. Actividad antiproliferativa de los extractos de *N. fallax* sobre células de CP (PC-3) a las **A)** 24h y **B)** 48h. Los valores se expresan como media \pm desviación estándar. *= $p < 0.05$, **= $p < 0.005$

Tabla 4. IC₅₀ e IC₂₅ de los extractos sobre la línea celular PC-3 (48 h).

Extracto	IC ₅₀ [µg/mL]	IC ₂₅ [µg/mL]
ENFC	196.2 \pm 14.2	93.96 \pm 10.2
ENFA	206.5 \pm 17.4	137.4 \pm 15.1

8.5 Efecto Antiproliferativo de los Extractos de *N. fallax* sobre Células de Cáncer de Mama

Las células de cáncer de mama mostraron una disminución de la proliferación dependiente de la concentración y del tiempo en ambos extractos (Figura 8). La Tabla 5 muestra el IC₅₀ y el IC₂₅ calculados a las 24 y 48 horas.

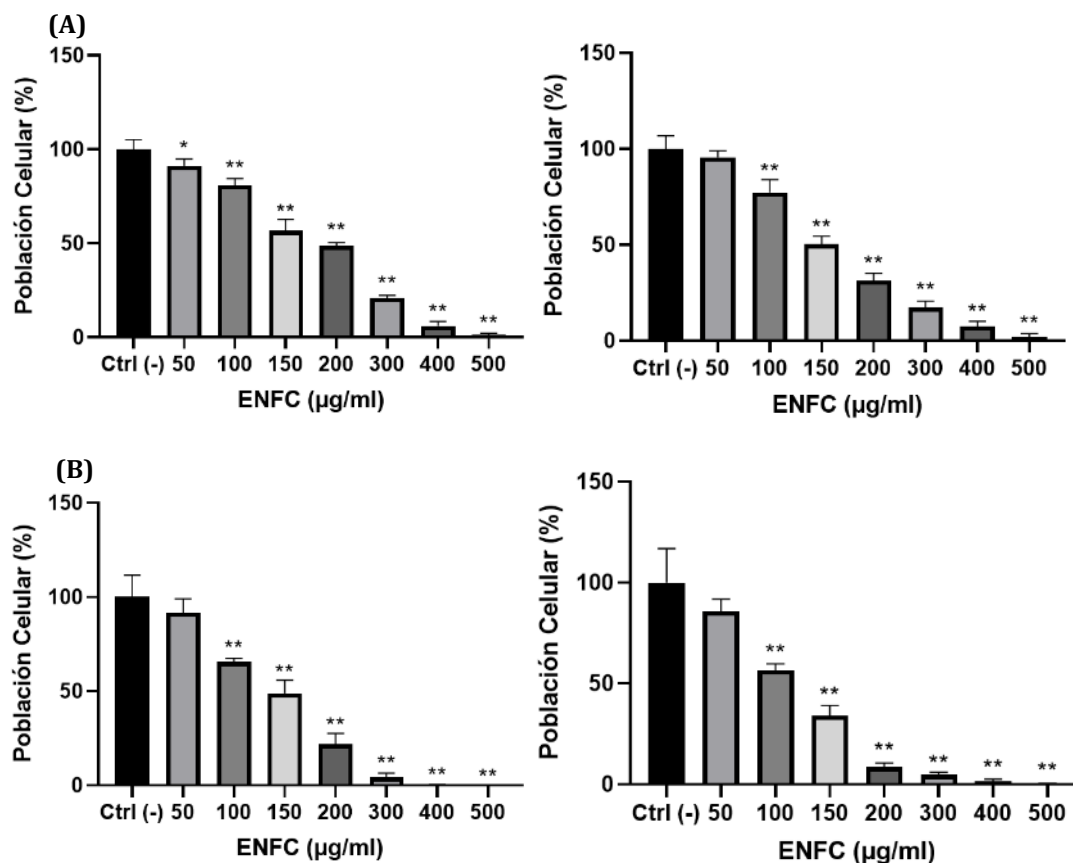


Figura 7. Actividad antiproliferativa de los extractos de *N. fallax* sobre células de CM (MCF-7) a las **A)** 24h y **B)** 48h. Los valores se expresan como media \pm desviación estándar. *= $p<0.05$, **= $p<0.005$

Tabla 5. IC₅₀ e IC₂₅ de los extractos sobre la línea celular MCF-7.

Extracto	IC ₅₀ [μg/mL]		IC ₂₅ [μg/mL]	
	24h	48h	24h	48h
ENFC	218.7 \pm 48.5	142.4 \pm 17.4	125.4 \pm 15.9	92.56 \pm 15.15
ENFA	152.4 \pm 13.4	112.8 \pm 14.57	101.1 \pm 10.23	75.23 \pm 15.38

Las concentraciones inhibitorias calculadas para ENFA fueron inferiores a las de ENFC, tanto a las 24 como a las 48 horas. Sin embargo, en ambos casos los valores fueron superiores a los obtenidos en líneas celulares de cáncer de próstata.

8.6 Efecto en la Migración Celular de los Extractos de *N. fallax* sobre Células de Cáncer de Próstata y Mama

La capacidad migratoria de las células cancerígenas se evaluó mediante el ensayo de herida. Las figuras 9 y 10 muestran el efecto de las IC_{50} (ENFC: 196.2 $\mu\text{g/mL}$, ENFA: 206.5 $\mu\text{g/mL}$) y IC_{25} (ENFC: 93.96 $\mu\text{g/mL}$, ENFA: 137.4 $\mu\text{g/mL}$) del ensayo de proliferación de los extractos de *N. fallax* sobre la migración de la línea celular PC-3 a distintos tiempos.

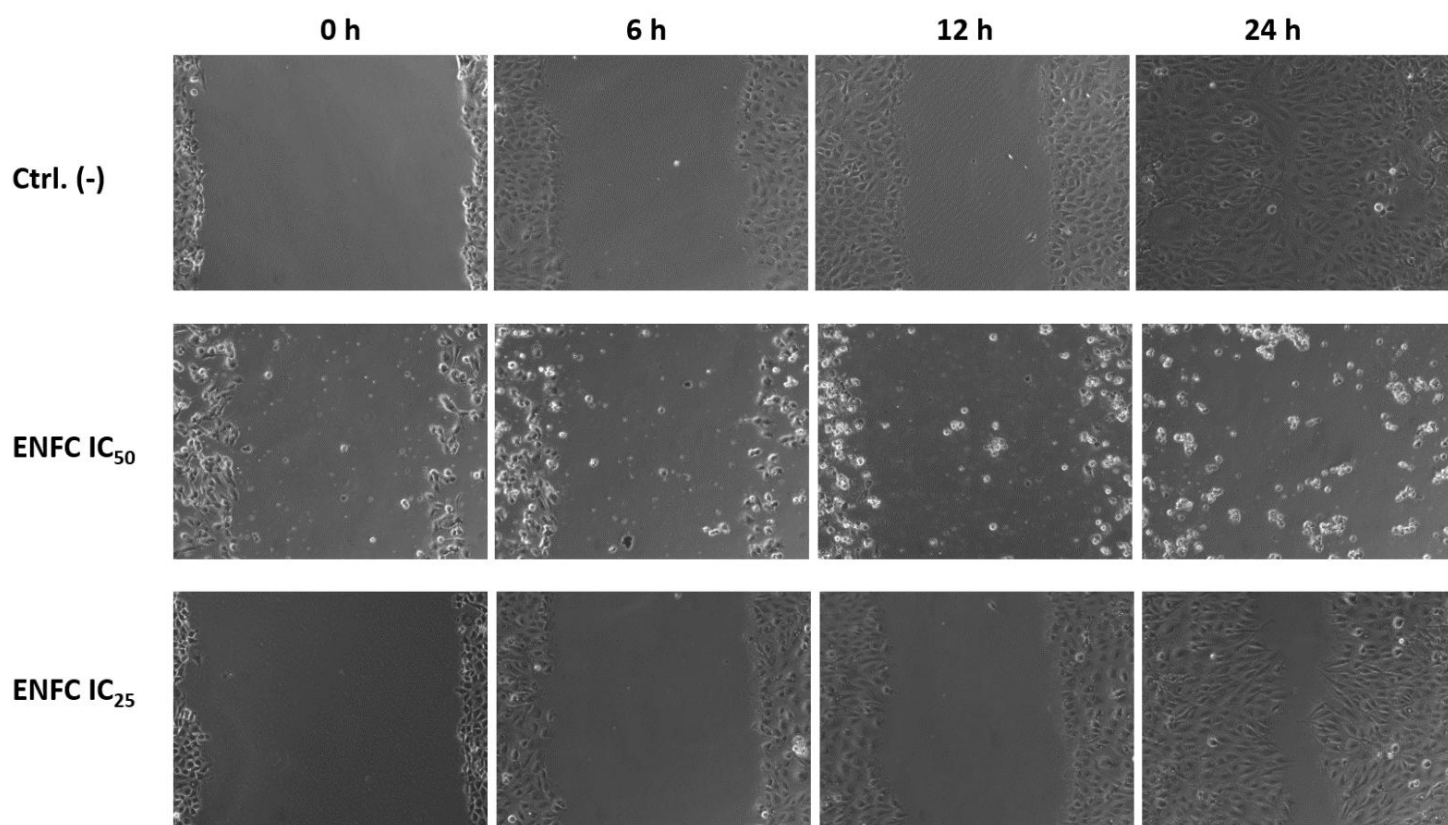


Figura 8. Efecto de ENFC sobre la migración de células de cáncer de próstata (PC-3). Las IC_{50} e IC_{25} de ENFC se aplicaron sobre células de CP en un ensayo “Scratch” y se fotografiaron a las 6, 12 y 24 horas. Se realizaron tres experimentos independientes y se seleccionaron las imágenes más representativas.

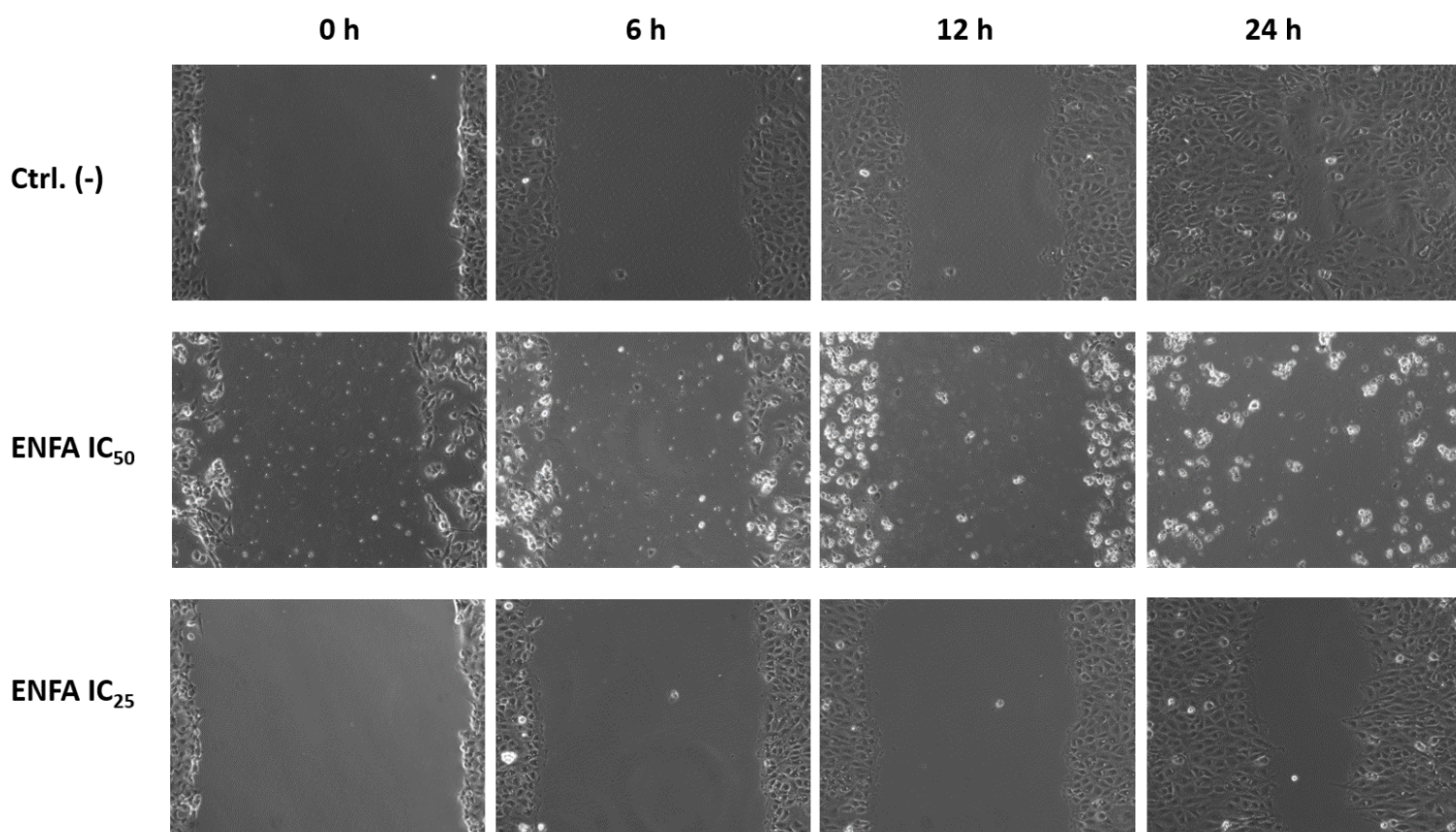


Figura 9. Efecto de ENFA sobre la migración de células de cáncer de próstata (PC-3). Las IC₅₀ e IC₂₅ de ENFA se aplicaron sobre células de CP en un ensayo “Scratch” y se fotografiaron a las 6, 12 y 24 horas. Se realizaron tres experimentos independientes y se seleccionaron las imágenes más representativas.

Las células del grupo control cubrieron la superficie rasgada al cabo de 24 horas; mientras que en el grupo expuesto al extracto IC₅₀ ENFC, las células se estresaron, pausaron su crecimiento y, después de 24 horas, perdieron la capacidad de adherirse a las superficies. El grupo expuesto al extracto IC₂₅ ENFC mantuvo esta capacidad, por lo que solo se logró reducir la velocidad de migración. Se observó un comportamiento similar en los resultados con el extracto ENFA.

En las figuras 11 y 12 se presentan los resultados en la migración celular de la línea MCF-7 en presencia de los extractos de *N. fallax* a sus respectivas concentraciones IC₅₀ (ENFC: 142.4 µg/mL, ENFA: 92.56 µg/mL) e IC₂₅ (ENFC: 112.8 µg/mL, ENFA: 75.23 µg/mL).

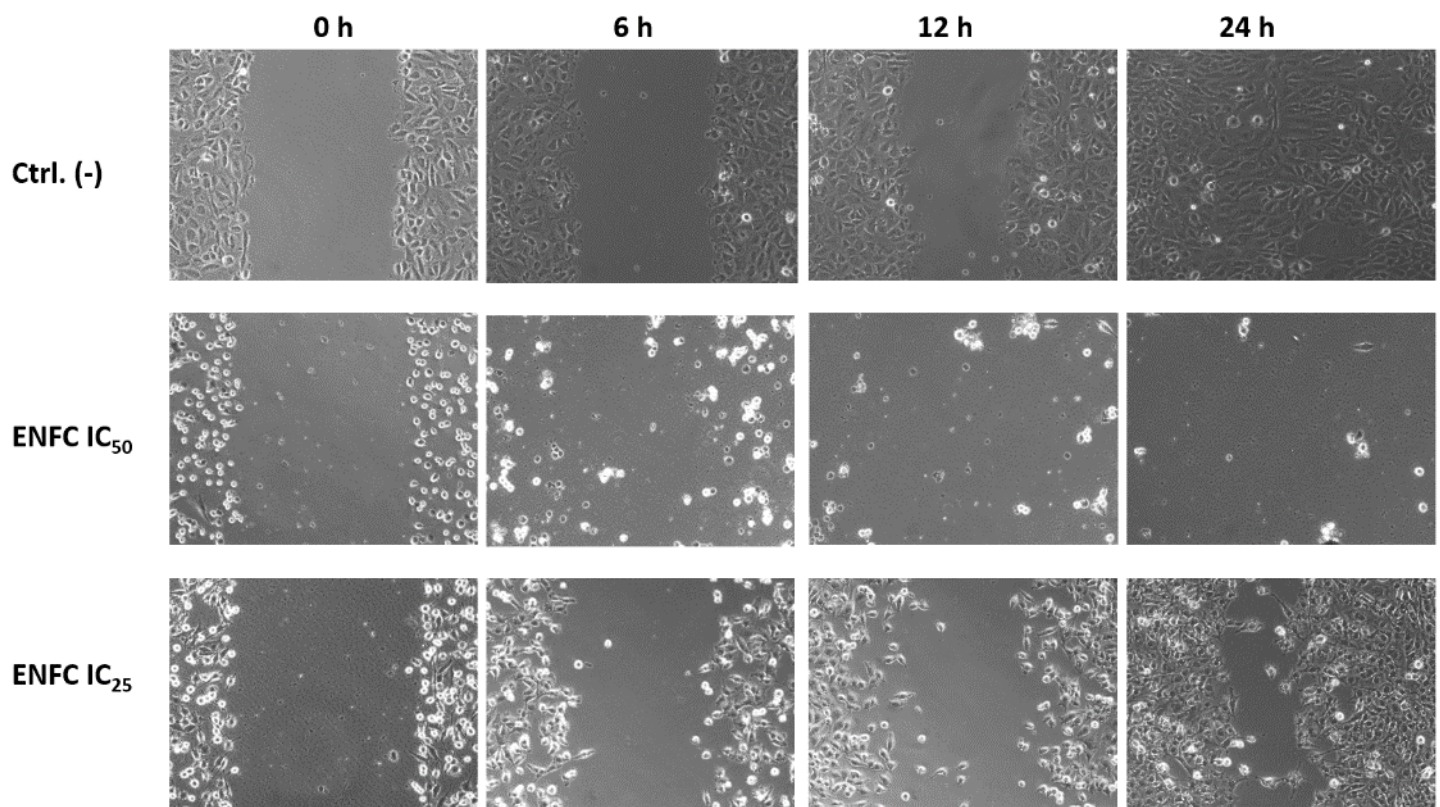


Figura 10. Efecto de ENFC sobre la migración de células de cáncer de mama (MCF-7). Las IC₅₀ e IC₂₅ de ENFC se aplicaron sobre células de CM en un ensayo “Scratch” y se fotografiaron a las 6, 12 y 24 horas. Se realizaron tres experimentos independientes y se seleccionaron las imágenes más representativas.

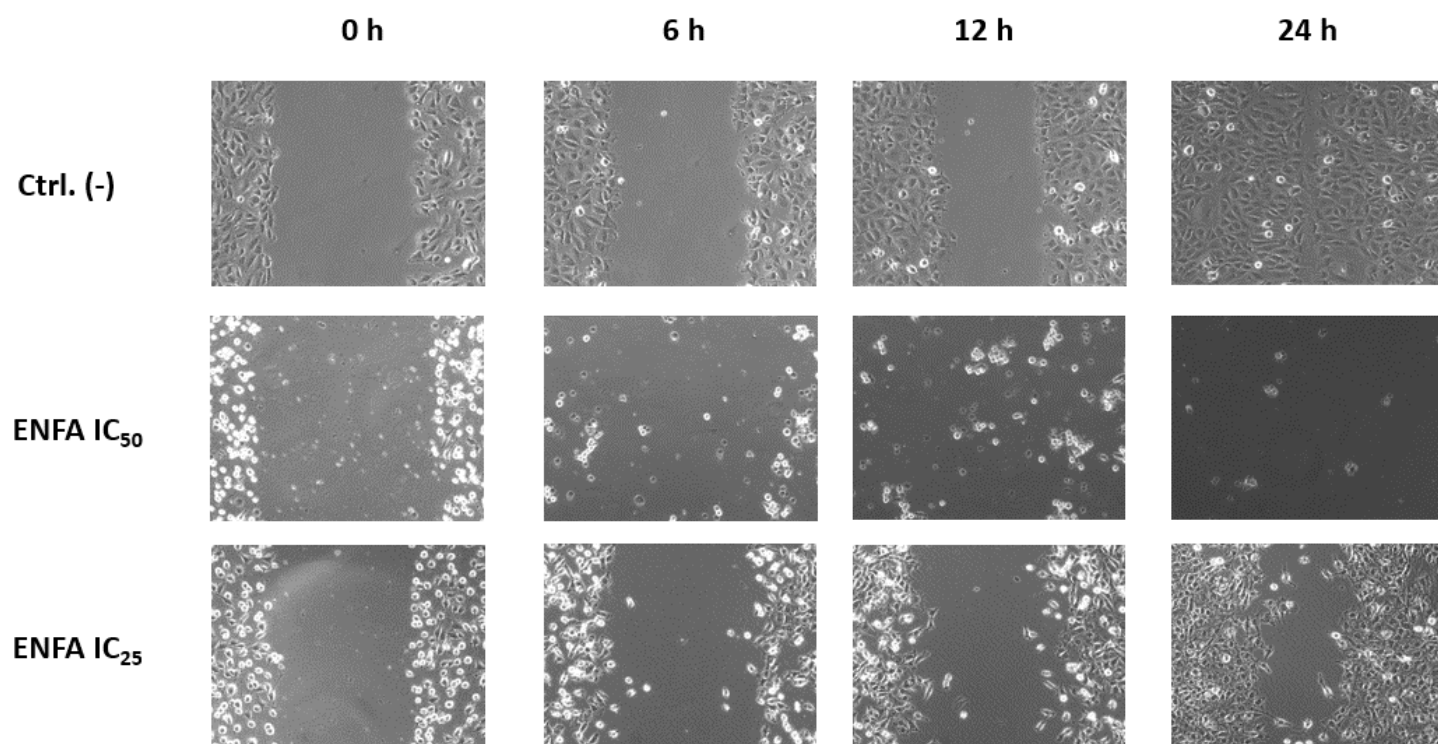


Figura 11. Efecto de ENFA sobre la migración de células de cáncer de mama (MCF-7). Las IC₅₀ e IC₂₅ de ENFA se aplicaron sobre células de CM en un ensayo “Scratch” y se fotografiaron a las 6, 12 y 24 horas. Se realizaron tres experimentos independientes y se seleccionaron las imágenes más representativas.

La línea celular MCF-7 presentó un comportamiento similar a la línea PC-3 en respuesta a los extractos de *N. fallax*. Ambos extractos a concentración IC₅₀ (ENFC: 142.4 µg/mL, ENFA: 92.56 µg/mL) frenaron la proliferación celular y provocaron la pérdida de adhesión en las células. Al exponer a las células a los extractos en concentración IC₂₅ (ENFC: 112.8 µg/mL, ENFA: 75.23 µg/mL), se observó una velocidad de migración menor a la del grupo control.

8.7 Tratamientos Combinatorios de los Extractos de *N. fallax* y Paclitaxel sobre Células de Cáncer de Próstata y Mama

La figura 13 muestra el efecto antiproliferativo de los tratamientos combinatorios de paclitaxel y los extractos de *N. fallax* sobre la línea celular PC-3.

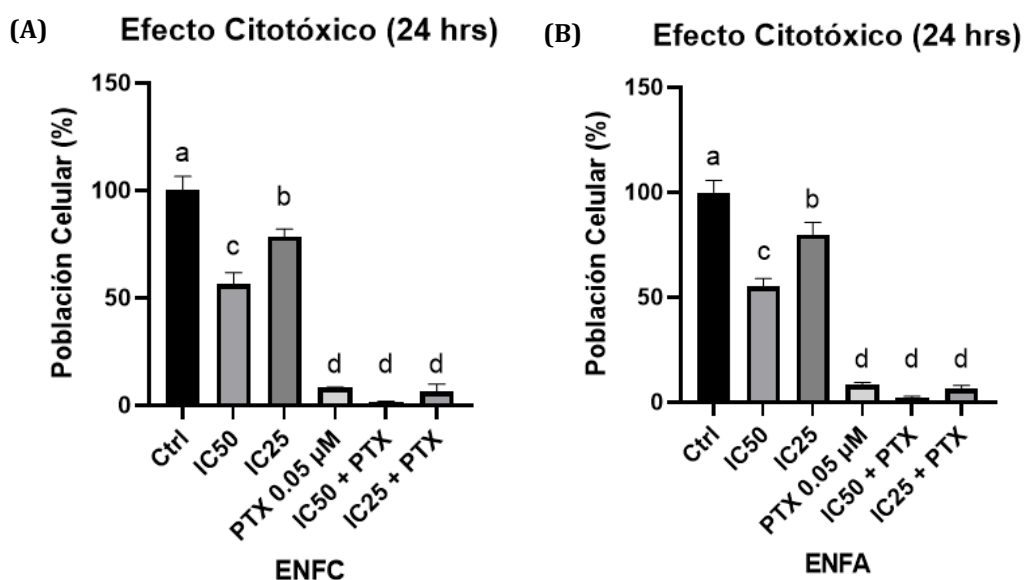


Figura 12. Actividad antiproliferativa de los tratamientos combinatorios en células de CP (PC-3). **A)** Tratamiento combinatorio con ENFC; **B)** Tratamiento combinatorio con ENFA. Los valores se expresan como media \pm desviación estándar.

Los resultados del efecto antiproliferativo de los tratamientos combinatorios sobre células de cáncer de mama se muestran en la Figura 14.

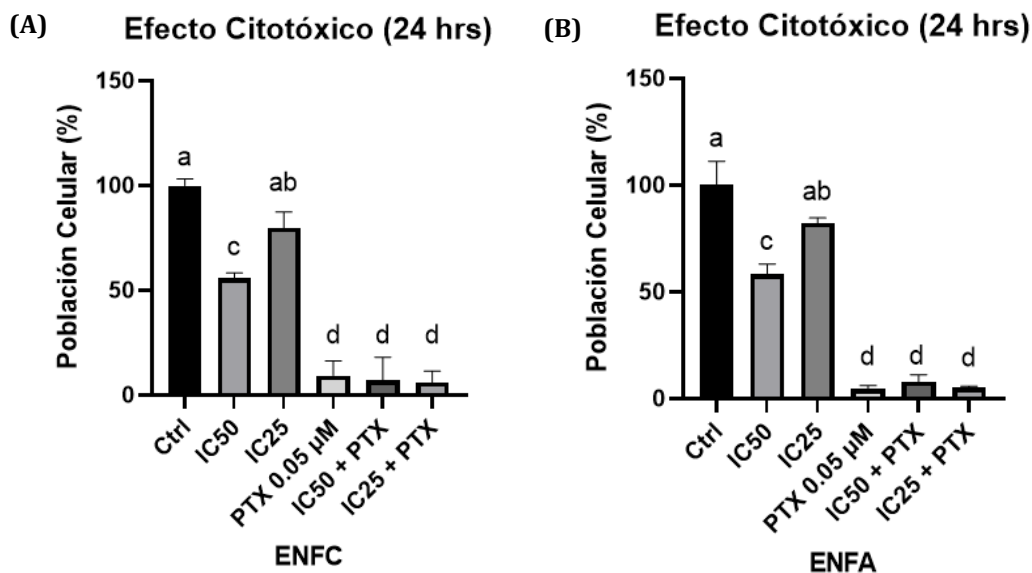


Figura 13. Actividad antiproliferativa de los tratamientos combinatorios en células de CM (MCF-7). **A)** Tratamiento combinatorio con ENFC; **B)** Tratamiento combinatorio con ENFA. Los valores se expresan como media \pm desviación estándar.

En el caso de los ensayos combinatorios de migración sobre células PC-3, la Figura 15 muestra los resultados del extracto ENFC y PTX, mientras que la figura 16, presenta los resultados del extracto ENFA y PTX. Los grupos de control muestran la migración celular bajo condiciones normales, logrando cubrir la superficie afectada después de 24 horas.

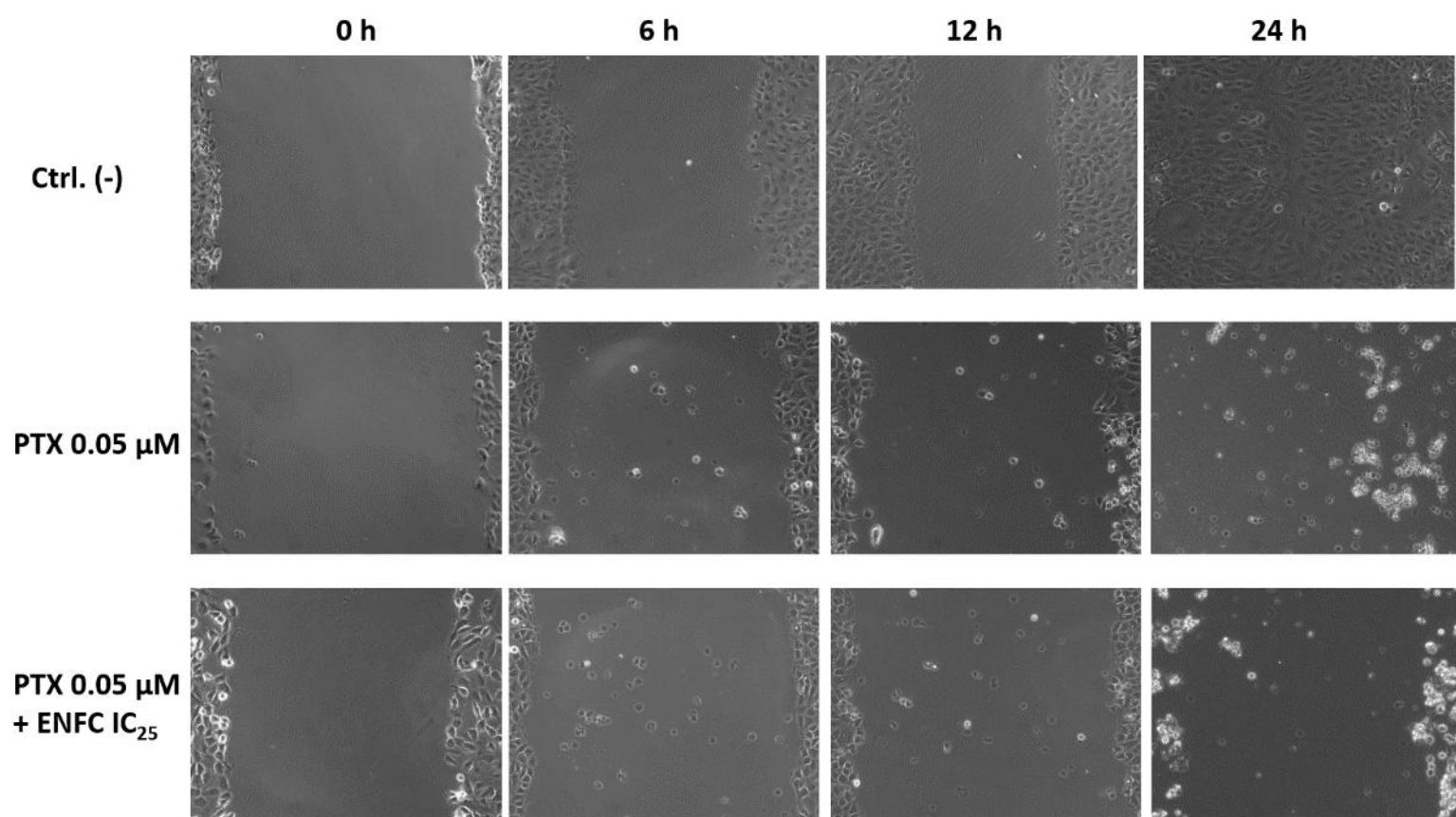


Figura 14. Efecto del tratamiento combinatorio de ENFC y PTX sobre la migración de células de CP (PC-3). Las IC₅₀ e IC₂₅ de ENFC se aplicaron sobre células de CP en un ensayo "Scratch" y se fotografiaron a las 6, 12 y 24 horas. Se realizaron tres experimentos independientes y se seleccionaron las imágenes más representativas.

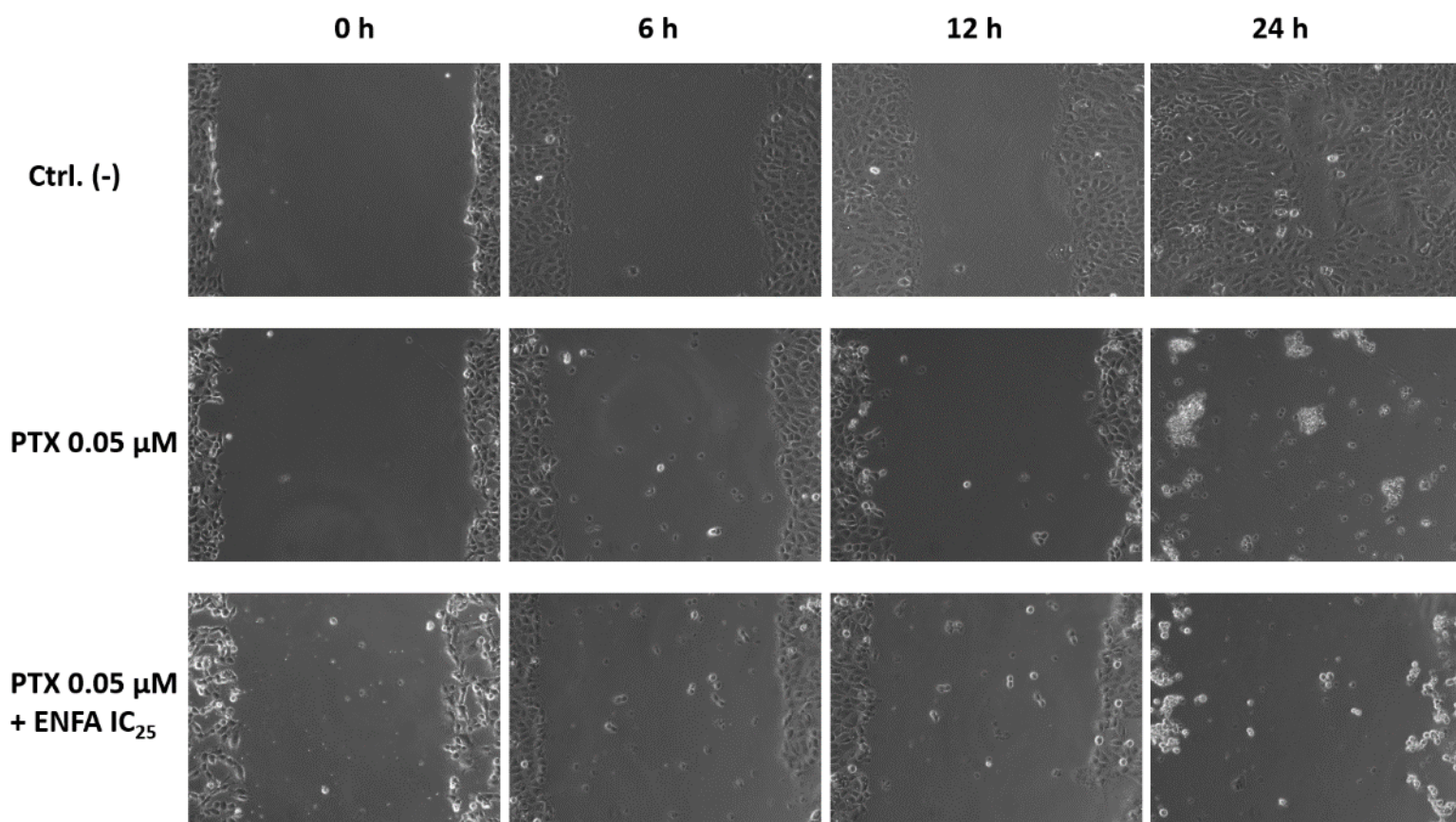


Figura 15. Efecto del tratamiento combinatorio de ENFA y PTX sobre la migración de células de CP (PC-3). Las IC₅₀ e IC₂₅ de ENFA se aplicaron sobre células de CP en un ensayo “Scratch” y se fotografiaron a las 6, 12 y 24 horas. Se realizaron tres experimentos independientes y se seleccionaron las imágenes más representativas.

En los grupos expuestos al PTX se observa que la migración celular se ve reducida, al grado de, prácticamente, detenerse; después de 24 horas, el medicamento induce la muerte celular, lo que provoca el desprendimiento de las células en el pocillo. En los grupos de los tratamientos combinatorios, ambos extractos mostraron un efecto sinérgico con el PTX, ya que las concentraciones IC₂₅ (ENFC: 93.96 μ g/mL, ENFA: 137.4 μ g/mL) de cada uno lograron un mayor efecto antimigratorio en comparación con los resultados observados de manera individual en las figuras 11 y 12, respectivamente.

Las Figuras 17 y 18 muestran los resultados de los tratamientos combinatorios sobre las células de cáncer de mama (MCF-7).

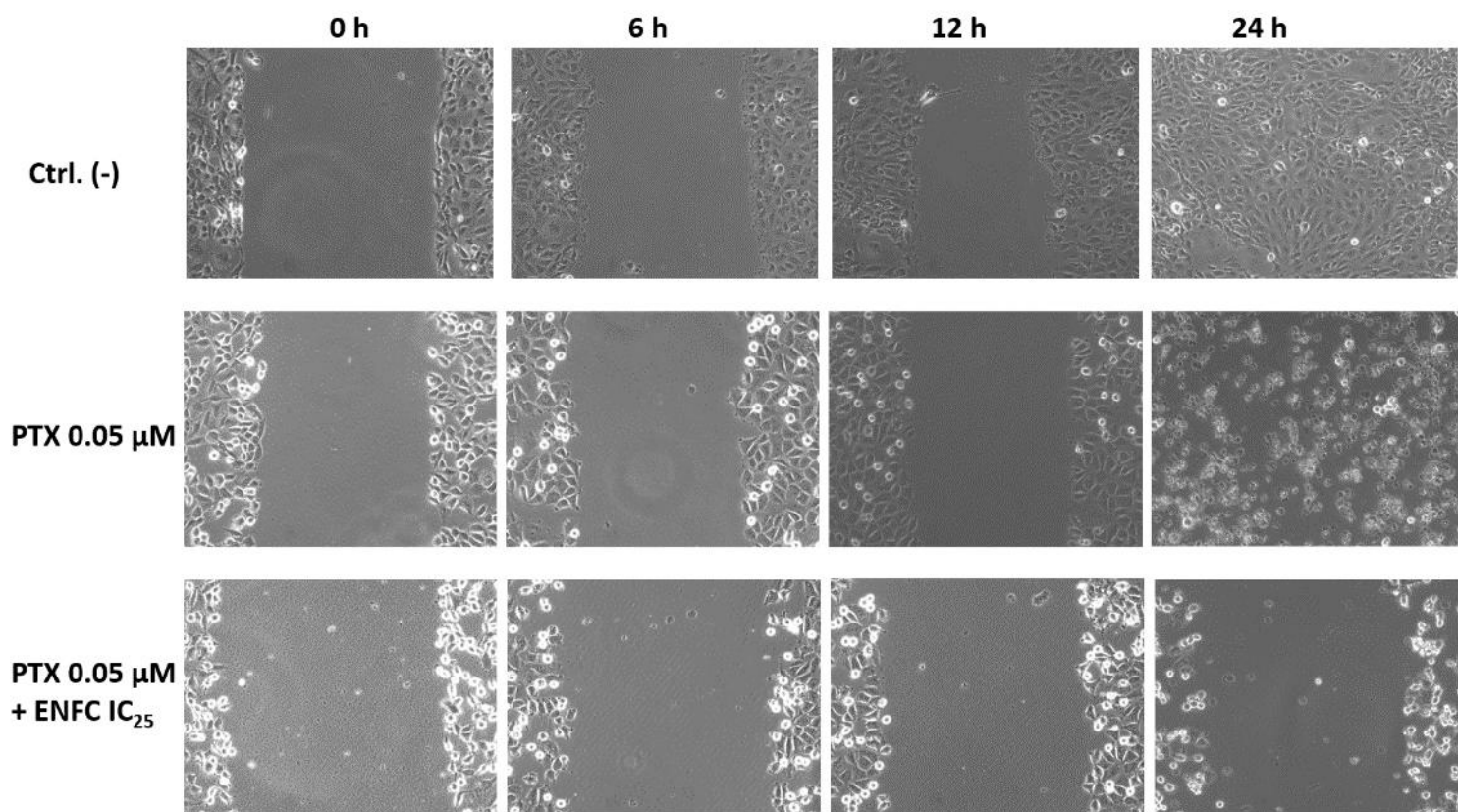


Figura 16. Efecto del tratamiento combinatorio de ENFC y PTX sobre la migración de células de CM (MCF-7). Las IC₅₀ e IC₂₅ de ENFC se aplicaron sobre células de CM en un ensayo “Scratch” y se fotografiaron a las 6, 12 y 24 horas. Se realizaron tres experimentos independientes y se seleccionaron las imágenes más representativas.

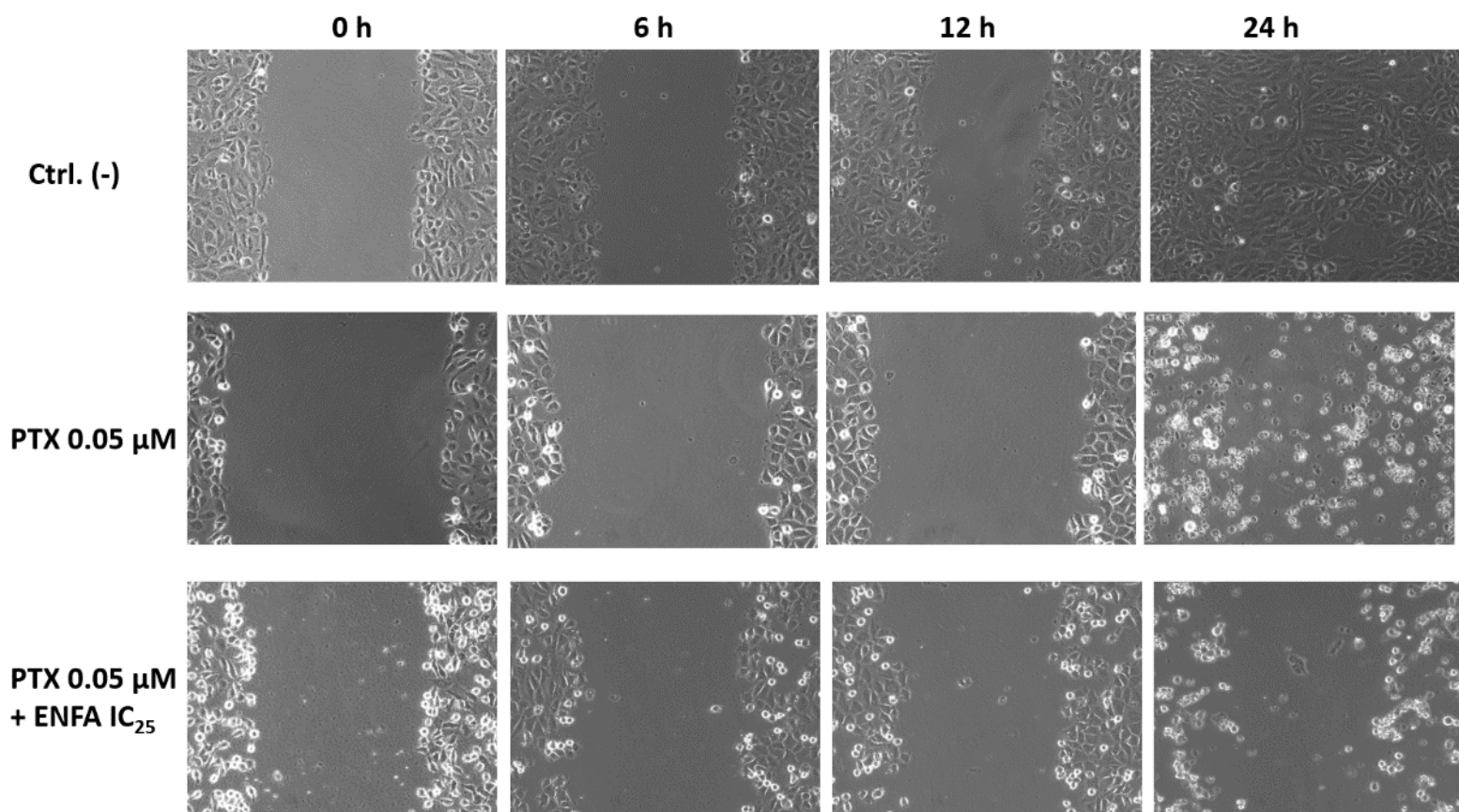


Figura 17. Efecto del tratamiento combinatorio de ENFA y PTX sobre la migración de células de CM (MCF-7). Las IC₅₀ e IC₂₅ de ENFA se aplicaron sobre células de CM en un ensayo “Scratch” y se fotografiaron a las 6, 12 y 24 horas. Se realizaron tres experimentos independientes y se seleccionaron las imágenes más representativas.

Las células MCF-7 también se ven afectadas por el PTX; la presencia del medicamento detiene la migración de las células y evita el cierre de la herida, a diferencia de los grupos control (en los que, después de 24 horas, logran cubrir el área afectada). La combinación de los extractos IC₂₅ (ENFC: 112.8 μ g/mL, ENFA: 75.23 μ g/mL) con el PTX exhiben un mayor efecto antimigratorio en las células de CM, en contraste con el efecto observado en los resultados individuales de cada extracto. La presencia del PTX induce la muerte celular después de 24 horas, tanto de manera individual como en conjunto con cada uno de los extractos; motivo por el cual se observa el desprendimiento de las células con la superficie del pocillo.

9. DISCUSIÓN

Los perfiles de expresión de los metabolitos secundarios en las plantas se ven afectados por diferentes tipos de ambientes estresantes, ya que ejercen efectos sobre el crecimiento y la supervivencia. Cuando se realiza una extracción etanólica, los principales metabolitos secundarios obtenidos son compuestos fenólicos. Estos compuestos intervienen en el crecimiento, la reproducción, la absorción de nutrientes, la fotosíntesis o la síntesis de proteínas. Los fenoles también actúan como indicadores de estrés, ya que su producción es máxima en plantas expuestas a diversos tipos de estrés y a sustancias químicas letales (Yeshi *et al.*, 2022). El estrés por sequía en las muestras menos desarrolladas puede ser el responsable del aumento de estos compuestos, dando lugar a un mayor rendimiento de extracción. Diferentes investigaciones han descrito una mayor concentración de compuestos aromáticos en las hojas que en el resto de las plantas, lo que es consistente con lo observado en este estudio (Raudone *et al.*, 2022).

El ácido clorogénico (CGA) fue identificado en los cromatogramas de *N. fallax*, además rutina (un flavonoide) y derivados glucosilados derivados del kaempferol (posiblemente atribuidos al estrés hídrico en el que las plantas se encontraban). El CGA posee numerosas propiedades biomédicas, farmacológicas y fitoprotectoras, como antioxidante, antiséptico, antibacteriano y antiinflamatorio; por su parte, se ha demostrado que la rutina inhibe la proliferación de los cánceres de mama, colon, pulmón y próstata, entre otros. La presencia de CGA en los extractos de *N. fallax* se debe a la sequía y al estrés UV sufridos, ya que facilita los mecanismos de respuesta al estrés de las plantas para contrarrestar los efectos de los ambientes adversos. Cuando se realiza la hidrólisis de los extractos, se favorece la liberación de las agliconas de los compuestos glicosilados presentes; del mismo modo, el CGA presente se separa en moléculas más simples (ácido quínico y ácido cafeico); ambas reacciones producen un aumento considerable de la concentración de estos compuestos.

El efecto citotóxico observado de los extractos de ENFC y ENFA puede atribuirse a la presencia de compuestos fenólicos con actividad citotóxica previamente descrita, como la quercetina, la rutina o el CGA. La quercetina induce la apoptosis celular mediante la regulación al alza de los niveles de AMPK, una proteína que media las vías ERK y JNK

(Moskot *et al.*, 2015); se ha demostrado que la rutina regula varias vías de señalización en las que intervienen Ras/Raf y PI3K/Akt, MAPK y TGF- β 2/Smad2/3Akt/PTEN, etc., relacionadas con los procesos de carcinogénesis e inducción de la apoptosis (Imran *et al.*, 2019); mientras que el CGA puede eliminar la sobreproducción de ROS y reducir la peroxidación de la membrana celular, protegiendo así a las células del estrés oxidativo (Soviguidi *et al.*, 2022). La presencia de quercetina, junto con la elevada concentración de rutina y CGA, podría explicar por qué el extracto ENFC presentó un efecto más notable. Por otro lado, el extracto ENFA mostró una mayor diversidad de derivados glicosilados, así como una menor concentración de CGA. Se ha observado que, debido a los diferentes patrones de glicosilación de los flavonoides, es difícil predecir el impacto sobre las actividades biológicas de la aglicona. Por ejemplo, se ha observado que la O-glicosilación generalmente reduce la bioactividad de sus compuestos; debido a la marcada presencia de derivados glicosilados en ENFR, podrían ser el motivo por el cual el extracto no presento actividad citotóxica considerable. Sin embargo, se carece de ensayos *in vivo*, en los que se puedan presentar efectos benéficos; ya que, en tratamientos de esta naturaleza, se ha observado que la actividad antiinflamatoria puede ser similar o incluso superior a la de sus formas agliconas, probablemente porque los glucósidos flavonoides presentan niveles plasmáticos más altos y estables que el de las agliconas (Xiao, 2015). La presencia de estos compuestos en el extracto de ENFA puede explicar el efecto identificado sobre la citotoxicidad en los fibroblastos. Por último, al encontrar únicamente la presencia de CGA y algunos derivados glicosilados en el extracto de ENFR, la actividad citotóxica evaluada fue mucho menor en comparación con los otros dos extractos.

Tanto en la línea PC-3 como en MCF-7, los extractos ENFC y ENFA mostraron actividad antiproliferativa; ENFA fue ligeramente más eficaz, ya que presentó valores de IC₅₀ inferiores. La citotoxicidad de los extractos podría atribuirse a la presencia de CGA; investigaciones recientes revelan que el CGA puede ejercer una actividad anticancerígena inhibiendo el ciclo celular, desencadenando la apoptosis y suprimiendo la proliferación (Gupta *et al.*, 2022); también se ha descrito la participación del CGA en reacciones prooxidantes y antioxidantes (lo que contribuye a regular los niveles oxidativos del microambiente tumoral) con efectos antiinflamatorios, antiangiogénicos e inductores de apoptosis en diferentes líneas celulares (Hayakawa *et al.*, 2020). En el caso del CP, se ha descrito que el CGA reduce la viabilidad y proliferación celular en células PC-3 al reducir la

expresión de factores como HIF-1 α , SPHK-1, p-Akt, p-GSK-3 β y VEGF (Lee *et al.*, 2017). Estudios en células MCF-7 descubrieron que el CGA inhibe el crecimiento celular y reduce la viabilidad celular; Deka y colaboradores descubrieron que las células estimuladas con CGA provocan la translocación de PKC, que desencadena la apoptosis a través de las mitocondrias (Deka *et al.*, 2017). La presencia de quercetina y kaempferol en los extractos también contribuyó al efecto observado, ya que los efectos de estos flavonoides también se han investigado en terapias contra el cáncer; se ha indicado que la rutina puede modular los activadores de la transcripción, la proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK), PI3K/Akt, y las cascadas de señalización Wnt/ β -catenina en células carcinógenas (Hashemzaei *et al.*, 2017). En el caso del kaempferol y sus derivados han demostrado ser tener propiedades cardioprotectoras, neuroprotectoras, antiinflamatorias, antidiabéticas, antioxidantes, antimicrobianas, antitumorales y anticancerígenas; en concreto, el kaempferol-3-O-ramnósido inhibe la proliferación de las células de cáncer de próstata mediante el aumento de la expresión de las proteínas caspasa-8, -9, -3 y poli (ADP-ribosa) polimerasa (Imran *et al.*, 2019).

Los resultados obtenidos en las pruebas de migración mostraron un comportamiento similar de los extractos independientemente de la línea celular a la que se aplicaron; las concentraciones de IC₂₅ de ambos extractos lograron disminuir la velocidad de migración celular, mientras que las concentraciones de IC₅₀ provocaron la pérdida total de la capacidad de adherencia en las células. Estos cambios en la migración podrían ser atribuidos a los compuestos mayoritarios identificados en los extractos; se ha observado que el CGA aumenta la expresión de biomarcadores epiteliales (E-cadherina y ZO-1) y disminuye la expresión de proteínas mesenquimales (ZEB1, N-cadherina, vimentina, snail y slug), además de atenuar la actividad de las MMP-2 y MMP-9 (proteínas involucradas en la transición epitelio-mesénquima) (Xue *et al.*, 2023). El flavonoide rutina también podría estar involucrado en el efecto antimigratorio de los extractos, ya que se ha descrito que disminuye la velocidad de migración en células de cáncer de pulmón (A549) y de colon (HT29); sin embargo, los mecanismos involucrados aún no se conocen con certeza (ben Sghaier *et al.*, 2016).

Los tratamientos combinatorios de los extractos de *N. fallax* y el paclitaxel no mostraron una diferencia significativa con respecto al grupo control del PTX; esto puede atribuirse a la efectiva acción del PTX sobre las células cancerosa, el cual provoca el arresto

celular y, posteriormente, apoptosis. Todos los grupos con la combinación IC₅₀ y PTX fueron capaces de frenar la proliferación celular hasta casi su totalidad; por su parte, las combinaciones de IC₂₅ y PTX mantuvieron niveles similares en proliferación. En el caso de la migración celular, las células de los grupos de PTX frenaban su crecimiento y al cabo de 24 horas, las células entraban en apoptosis y se desprendían de la superficie; este comportamiento puede deberse a la presencia de metabolitos en los extractos (CGA, quercetina y kaempferol), los cuales son los responsables de disminuir la velocidad de migración (gracias a los mecanismos previamente mencionados), ya que el PTX no actúa sobre proteínas de adhesión.

10. CONCLUSIÓN

Los cromatogramas de los extractos de *N. fallax* mostraron diferencias en los perfiles de expresión de los metabolitos secundarios; estos extractos contienen altas concentraciones de ácido clorogénico, rutina y derivados glicosilados de kaempferol. Los extractos ENFC y ENFA de *N. fallax* inhiben la proliferación y la migración de las células de cáncer de próstata y de mama. La presencia de estos metabolitos puede contribuir a la actividad antiproliferativa e inhibición de la migración. El paclitaxel no aumenta la actividad antiproliferativa ni de inhibición de la migración de los extractos de *N. fallax*. Sin embargo, es necesario continuar investigando el efecto de los extractos de *N. fallax* con otros fármacos y en otras líneas celulares. El presente estudio provee evidencia del potencial farmacológico de *N. fallax* como terapia complementaria contra el cancer de próstata y de mama.

11. REFERENCIAS

- Aasim, M., Khawar, K. M., Ahmed, S. I., & Karataş, M. (2019). Multiple Uses of Some Important Aquatic and Semiaquatic Medicinal Plants. In *Plant and Human Health, Volume 2* (pp. 541–577). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-03344-6_23
- Abotaleb, M., Samuel, S., Varghese, E., Varghese, S., Kubatka, P., Liskova, A., & Büsselberg, D. (2018). Flavonoids in Cancer and Apoptosis. *Cancers*, 11(1), 28. <https://doi.org/10.3390/cancers11010028>
- Abraham, J., & Staffurth, J. (2016). Hormonal therapy for cancer. *Medicine*, 44(1), 30–33. <https://doi.org/10.1016/j.mpmed.2015.10.014>
- Al-Sa'idy, H., & Hamid, H. K. (2023). Investigations on Kaempferol, Quercetin and Other Flavonoids in Aquatic Plants of Iraqi Marshlands-I. *Asian Journal of Pharmaceutical Research and Development*, 11(1), 22–38. <https://doi.org/10.22270/ajprd.v11i1.1226>
- Amer, M. H. (2014). Gene therapy for cancer: present status and future perspective. *Molecular and Cellular Therapies*, 2(1), 27. <https://doi.org/10.1186/2052-8426-2-27>
- Amin, A., Tuenter, E., Exarchou, V., Upadhyay, A., Cos, P., Maes, L., Apers, S., & Pieters, L. (2016). Phytochemical and Pharmacological Investigations on *Nymphoides indica* Leaf Extracts. *Phytotherapy Research*, 30(10), 1624–1633. <https://doi.org/10.1002/ptr.5663>
- Ariza, I. N., Peñas Pita Da Veiga, M., García, L. B., Cendra, C. S., & Cassinello Espinosa, J. (2021). Cáncer de próstata. In *Medicine* (Vol. 13, Issue 26).
- Ballard, C. R., & Maróstica, M. R. (2019). Health Benefits of Flavonoids. In *Bioactive Compounds* (pp. 185–201). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814774-0.00010-4>
- ben Sghaier, M., Pagano, A., Mousslim, M., Ammari, Y., Kovacic, H., & Luis, J. (2016). Rutin inhibits proliferation, attenuates superoxide production and decreases adhesion and migration of human cancerous cells. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 84, 1972–1978. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2016.11.001>
- Bharathi, R., Shankar, R. K., & Geetha, K. (2014). In-Vitro Antioxidant Activity and In-Vivo Hepatoprotective activity of Ethanolic Whole Plant extracts of *Nymphoides hydrophylla* in Ccl4 induced Liver damage in albino rats. *International Journal of Research in Ayurveda and Pharmacy*, 5(6), 667–672.

- Bohm, B. A., Nicholls, K. W., & Ornduff, R. (1986). FLAVONOIDS OF THE MENYANTHACEAE: INTRA- AND INTERFAMILIAL RELATIONSHIPS. *American Journal of Botany*, 73(2), 204–213. <https://doi.org/10.1002/j.1537-2197.1986.tb08521.x>
- Bourgaud, F., Gravot, A., Milesi, S., & Gontier, E. (2001). Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. *Plant Science*, 161(5), 839–851. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(01\)00490-3](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(01)00490-3)
- Bray, F., Laversanne, M., Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Soerjomataram, I., & Jemal, A. (2024). Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 74(3), 229–263. <https://doi.org/10.3322/caac.21834>
- Changxing, L., Galani, S., Hassan, F., Rashid, Z., Naveed, M., Fang, D., Ashraf, A., Qi, W., Arif, A., Saeed, M., Chishti, A. A., & Jianhua, L. (2020). Biotechnological approaches to the production of plant-derived promising anticancer agents: An update and overview. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 132, 110918. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110918>
- Chávez, L. E. O., curp, & OUCL960814HHGLHS07. (2022). *Aspectos reproductivos de la planta acuática distílica Nymphoides fallax Ornduff (Menyanthaceae)*. <https://ri-ng.uaq.mx/handle/123456789/3539>
- Chirumbolo, S., Bjørklund, G., Lysiuk, R., Vella, A., Lenchyk, L., & Upyr, T. (2018). Targeting Cancer with Phytochemicals via Their Fine Tuning of the Cell Survival Signaling Pathways. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(11), 3568. <https://doi.org/10.3390/ijms19113568>
- Deka, S., Gorai, S., Manna, D., & Trivedi, V. (2017). Evidence of PKC Binding and Translocation to Explain the Anticancer Mechanism of Chlorogenic Acid in Breast Cancer Cells. *Current Molecular Medicine*, 17(1), 79–89. <https://doi.org/10.2174/1566524017666170209160619>
- Du, Y., Wang, R., Zhang, H., & Liu, J. (2014). *Antitumor Constituents of the Wetland Plant Nymphoides peltata: A Case Study for the Potential Utilization of Constructed Wetland Plant Resources*.
- Esfahani, K., Roudaia, L., Buhlaiga, N., Del Rincon, S. V., Papneja, N., & Miller, W. H. (2020). A Review of Cancer Immunotherapy: From the Past, to the Present, to the Future. *Current Oncology*, 27(12), 87–97. <https://doi.org/10.3747/co.27.5223>
- Ferlay, J., Colombet, M., Soerjomataram, I., Parkin, D. M., Piñeros, M., Znaor, A., & Bray, F. (2021). Cancer statistics for the year 2020: An overview. *International Journal of Cancer*, 149(4), 778–789. <https://doi.org/10.1002/ijc.33588>

- García-Perdomo, H. A., Zapata-Copete, J. A., & Sánchez, A. (2018). An updated and global review on prostate cancer. In *Revista Facultad de Medicina* (Vol. 66, Issue 3, pp. 429–437). Universidad Nacional de Colombia. <https://doi.org/10.15446/revfacmed.v66n3.65770>
- Ghafouri-Fard, S., Shabestari, F. A., Vaezi, S., Abak, A., Shoorei, H., Karimi, A., Taheri, M., & Basiri, A. (2021). Emerging impact of quercetin in the treatment of prostate cancer. In *Biomedicine and Pharmacotherapy* (Vol. 138). Elsevier Masson s.r.l. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.111548>
- Gupta, A., Atanasov, A. G., Li, Y., Kumar, N., & Bishayee, A. (2022). Chlorogenic acid for cancer prevention and therapy: Current status on efficacy and mechanisms of action. *Pharmacological Research*, 186, 106505. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2022.106505>
- Hanif, M., Khan, M. A., Rafey, M. R. A., Zaman, A., Aziz, I., & others. (2021). Inhibitive efficacy of *Nymphoides indica* rhizome extract on α -glucosidase, and cross-link formation of advanced glycation end products. *Journal of Traditional Chinese Medicine*, 41(3), 376.
- Hashemzaei, M., Far, A. D., Yari, A., Heravi, R. E., Tabrizian, K., Taghdisi, S. M., Sadegh, S. E., Tsarouhas, K., Kouretas, D., Tzanakakis, G., Nikitovic, D., Anisimov, N. Y., Spandidos, D. A., Tsatsakis, A. M., & Rezaee, R. (2017). Anticancer and apoptosis-inducing effects of quercetin in vitro and in vivo. *Oncology Reports*, 38(2), 819–828. <https://doi.org/10.3892/or.2017.5766>
- Hassanpour, S. H., & Dehghani, M. (2017). Review of cancer from perspective of molecular. *Journal of Cancer Research and Practice*, 4(4), 127–129. <https://doi.org/10.1016/j.jcrpr.2017.07.001>
- Hayakawa, S., Ohishi, T., Miyoshi, N., Oishi, Y., Nakamura, Y., & Isemura, M. (2020). Anti-Cancer Effects of Green Tea Epigallocatechin-3-Gallate and Coffee Chlorogenic Acid. *Molecules*, 25(19), 4553. <https://doi.org/10.3390/molecules25194553>
- Imran, M., Salehi, B., Sharifi-Rad, J., Aslam Gondal, T., Saeed, F., Imran, A., Shahbaz, M., Tsouh Fokou, P. V., Umair Arshad, M., Khan, H., Guerreiro, S. G., Martins, N., & Estevinho, L. M. (2019). Kaempferol: A Key Emphasis to Its Anticancer Potential. *Molecules*, 24(12), 2277. <https://doi.org/10.3390/molecules24122277>
- Jacobo-Salcedo, M. del R., Alonso-Castro, A. J., Salazar-Olivo, L. A., Carranza-Alvarez, C., González-Espíndola, L. Á., Domínguez, F., Maciel-Torres, S. P., García-Lujan, C., González-Martínez, M. del R., Gómez-Sánchez, M., Estrada-Castillón, E., Zapata-Bustos, R., Medellín-Milán, P., & García-Carrancá, A. (2011). Antimicrobial and Cytotoxic Effects of Mexican Medicinal Plants. *Natural Product Communications*, 6(12), 1934578X1100601. <https://doi.org/10.1177/1934578X1100601234>

- Jain, A., Roshnibala, S., Kanjilal, P., Singh, R., & Singh, H. B. (2007). Aquatic/semi-aquatic plants used in herbal remedies in the wetlands of Manipur, Northeastern India. *IJTK Vol.6(2) [April 2007]*. <https://nopr.niscpr.res.in/handle/123456789/941>
- Ke, X., & Shen, L. (2017). Molecular targeted therapy of cancer: The progress and future prospect. *Frontiers in Laboratory Medicine*, 1(2), 69–75. <https://doi.org/10.1016/j.flm.2017.06.001>
- Khan, Z. R., Chowdhury, N. S., Sharmin, S., & Sohrab, M. H. (2018). Medicinal values of aquatic plant genus *Nymphoides* grown in Asia: A review. In *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* (Vol. 8, Issue 2, pp. 113–119). Medknow Publications. <https://doi.org/10.4103/2221-1691.225615>
- Kim, Y., Kim, D., Park, C., Park, T., & Park, B. (2018). Anti-Inflammatory and Skin-Moisturizing Effects of a Flavonoid Glycoside Extracted from the Aquatic Plant *Nymphoides indica* in Human Keratinocytes. *Molecules*, 23(9), 2342. <https://doi.org/10.3390/molecules23092342>
- Ko, H. J., Huang, S. H., & Ng, L. T. (2014). Chemical compositions and antioxidant activities of a specialty aquatic vegetable *nymphoides hydrophylla* in Taiwan. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 23(6), 591–600. <https://doi.org/10.1080/10498850.2012.741188>
- Kontomanolis, E. N., Koutras, A., Syllaios, A., Schizas, D., Mastoraki, A., Garmpis, N., Diakosavvas, M., Angelou, K., Tsatsaris, G., Pagkalos, A., Ntounis, T., & Fasoulakis, Z. (2020). Role of Oncogenes and Tumor-suppressor Genes in Carcinogenesis: A Review. *Anticancer Research*, 40(11), 6009–6015. <https://doi.org/10.21873/anticancer.14622>
- Kopustinskiene, D. M., Jakstas, V., Savickas, A., & Bernatoniene, J. (2020). Flavonoids as anticancer agents. In *Nutrients* (Vol. 12, Issue 2). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/nu12020457>
- Lee, M.-S., Lee, S.-O., Kim, K.-R., & Lee, H.-J. (2017). Sphingosine Kinase-1 Involves the Inhibitory Action of HIF-1 α by Chlorogenic Acid in Hypoxic DU145 Cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(2), 325. <https://doi.org/10.3390/ijms18020325>
- Lobato-de Magalhães, T., & Martínez, M. (2018). Temporary freshwater wetlands floristics in central Mexico highlands. *Botanical Sciences*, 96(1), 138–156. <https://doi.org/10.17129/botsci.1532>
- Lobato-de Magalhães, T., Rico, Y., Cabrera-Toledo, D., & Martínez, M. (2020). Plant functional connectivity of *Nymphoides fallax* in geographically isolated temporary wetlands in Mexican highlands. *Aquatic Botany*, 164, 103215. <https://doi.org/10.1016/j.aquabot.2020.103215>
- Madhavan, V., Jayashree, M., Yoganarasimhan, S. N., Gurudeva, M., Deveswaran, R., & Mythreyi, R. (2012). Pharmacognostical studies on the root and rhizome of *Nymphoides hydrophylla*

- (Linn.) O. Kuntze—An alternate source for Tagara drug. *Indian Journal of Natural Products and Resources*, 3(3), 371–385.
- Manosroi, J., Boonpisuttinant, K., Manosroi, W., & Manosroi, A. (2012). Anti-proliferative activities on HeLa cancer cell line of Thai medicinal plant recipes selected from MANOSROI II database. *Journal of Ethnopharmacology*, 142(2), 422–431. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2012.05.012>
- Markman, M., & Mekhail, T. M. (2002). Paclitaxel in cancer therapy. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 3(6), 755–766. <https://doi.org/10.1517/14656566.3.6.755>
- Martínez, M., & Gómez Sánchez, M. (2006). Descripción anatómica vegetativa de dos especies de Nymphoides (Menyanthaceae). *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 77(1), 81–87.
- Martins, N., Barros, L., & Ferreira, I. C. F. R. (2016). In vivo antioxidant activity of phenolic compounds: Facts and gaps. *Trends in Food Science & Technology*, 48, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2015.11.008>
- Moghal, M. M. R., Foysal, K. A., Haque, M. M., Kader, M. A., Hossain, M. S., & Mogumder, S. (2013). In vitro study of cytotoxic, anthelmintic and antioxidant activities of Nymphoides hydrophylla. *Int J Pharm Phytopharmacol Res*, 2(5), 328–331.
- Moskot, M., Jakóbkiewicz-Banecka, J., Smolińska, E., Piotrowska, E., Węgrzyn, G., & Gabig-Cimińska, M. (2015). Effects of flavonoids on expression of genes involved in cell cycle regulation and DNA replication in human fibroblasts. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 407(1–2), 97–109. <https://doi.org/10.1007/s11010-015-2458-3>
- Murphy, K., Efremov, A., Davidson, T. A., Molina-Navarro, E., Fidanza, K., Crivelari Betiol, T. C., Chambers, P., Tapia Grimaldo, J., Varandas Martins, S., Springuel, I., Kennedy, M., Mormul, R. P., Dibble, E., Hofstra, D., Lukács, B. A., Gebler, D., Baastrup-Spohr, L., & Urrutia-Estrada, J. (2019). World distribution, diversity and endemism of aquatic macrophytes. *Aquatic Botany*, 158, 103127. <https://doi.org/10.1016/j.aquabot.2019.06.006>
- Ng, C. X., Affendi, M. M., Chong, P. P., & Lee, S. H. (2022). The Potential of Plant-Derived Extracts and Compounds to Augment Anticancer Effects of Chemotherapeutic Drugs. *Nutrition and Cancer*, 74(9), 3058–3076. <https://doi.org/10.1080/01635581.2022.2069274>
- Oliveira-Marques, V., Marinho, H. S., Cyrne, L., & Antunes, F. (2009). Role of Hydrogen Peroxide in NF-κB Activation: From Inducer to Modulator. *Antioxidants & Redox Signaling*, 11(9), 2223–2243. <https://doi.org/10.1089/ars.2009.2601>
- Panche, A. N., Diwan, A. D., & Chandra, S. R. (2016). Flavonoids: an overview. *Journal of Nutritional Science*, 5, e47. <https://doi.org/10.1017/jns.2016.41>

- Pathania, S., Ramakrishnan, S. M., & Bagler, G. (2015). Phytochemica: a platform to explore phytochemicals of medicinal plants. *Database*, 2015, bav075.
<https://doi.org/10.1093/database/bav075>
- Quiroz-Flores, A., Ramírez-García, P., & Lot-Helgueras, A. (2014). *Variación Anual De La Biomasa De Nymphoides Fallax Ornduff (Menyanthaceae) En La Laguna De Tecocomulco, Hidalgo, México Seasonal Changes Of Biomass Of Nymphoides Fallax Ornduff (Menyanthaceae) In The Lagoon Of Tecocomulco, Hidalgo, Mexico* (Vol. 37). México.
- Raudone, L., Radušienė, J., Seyis, F., Yayla, F., Vilkickyte, G., Marksa, M., Ivanauskas, L., & Cırak, C. (2022). Distribution of Phenolic Compounds and Antioxidant Activity in Plant Parts and Populations of Seven Underutilized Wild Achillea Species. *Plants*, 11(3), 447.
<https://doi.org/10.3390/plants11030447>
- Soviguidi, D., Pan, R., Liu, Y., Rao, L., Zhang, W., & Yang, X. (2022). Chlorogenic Acid Metabolism: The Evolution and Roles in Plant Response to Abiotic Stress. *Phyton*, 91(2), 239–255.
<https://doi.org/10.32604/phyton.2022.018284>
- Sati, P., Sharma, E., Dhyan, P., Attri, D. C., Rana, R., Kiyekbayeva, L., Büsselberg, D., Samuel, S. M., & Sharifi-Rad, J. (2024). Paclitaxel and its semi-synthetic derivatives: comprehensive insights into chemical structure, mechanisms of action, and anticancer properties. *European Journal of Medical Research*, 29(1), 90. <https://doi.org/10.1186/s40001-024-01657-2>
- Schaue, D., & McBride, W. H. (2015). Opportunities and challenges of radiotherapy for treating cancer. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 12(9), 527–540.
<https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2015.120>
- Schirmacher, V. (2018). From chemotherapy to biological therapy: A review of novel concepts to reduce the side effects of systemic cancer treatment (Review). *International Journal of Oncology*, 54(2), 407–419. <https://doi.org/10.3892/ijo.2018.4661>
- Schottenfeld, D., & Fraumeni Jr, J. F. (2006). *Cancer epidemiology and prevention*. Oxford University Press.
- Smolarz, B., Nowak, A. Z., & Romanowicz, H. (2022). Breast Cancer—Epidemiology, Classification, Pathogenesis and Treatment (Review of Literature). *Cancers*, 14(10), 2569.
<https://doi.org/10.3390/cancers14102569>
- Sun, J., Chu, Y.-F., Wu, X., & Liu, R. H. (2002). Antioxidant and Antiproliferative Activities of Common Fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(25), 7449–7454.
<https://doi.org/10.1021/jf0207530>

- Taiz, L., & Zeiger, E. (2006). Secondary metabolites and plant defense. *Plant Physiology*, 4, 315–344.
- Tipperry, N. P., & Les, D. H. (2009). A New Genus and New Combinations in Australian Villarsia (Menyanthaceae). *Novon: A Journal for Botanical Nomenclature*, 19(3), 404–411. <https://doi.org/10.3417/2007181>
- Tipperry, N. P., & Les, D. H. (2011). Phylogenetic Relationships and Morphological Evolution in *Nymphoides* (Menyanthaceae). *Systematic Botany*, 36(4), 1101–1113. <https://doi.org/10.1600/036364411X605092>
- Tipperry, N. P., Les, D. H., Padgett, D. J., & Jacobs, S. W. L. (2008). Generic Circumscription in Menyanthaceae: A Phylogenetic Evaluation. *Systematic Botany*, 33(3), 598–612. <https://doi.org/10.1600/036364408785679851>
- Tiwari, R., & Rana, C. S. (2015). Plant secondary metabolites: a review. *International Journal of Engineering Research and General Science*, 3(5), 661–670.
- Waks, A. G., & Winer, E. P. (2019). Breast Cancer Treatment. *JAMA*, 321(3), 288. <https://doi.org/10.1001/jama.2018.19323>
- Xiao, J. (2015). Dietary Flavonoid Aglycones and Their Glycosides: Which Show Better Biological Significance? *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 00–00. <https://doi.org/10.1080/10408398.2015.1032400>
- Xue, W., Hao, J., Zhang, Q., Jin, R., Luo, Z., Yang, X., Liu, Y., Lu, Q., Ouyang, Y., & Guo, H. (2023). Chlorogenic Acid Inhibits Epithelial-Mesenchymal Transition and Invasion of Breast Cancer by Down-Regulating LRP6. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 384(2), 254–264. <https://doi.org/10.1124/jpet.122.001189>
- Yeshi, K., Crayn, D., Ritmejeriytè, E., & Wangchuk, P. (2022). Plant Secondary Metabolites Produced in Response to Abiotic Stresses Has Potential Application in Pharmaceutical Product Development. *Molecules*, 27(1), 313. <https://doi.org/10.3390/molecules27010313>
- Yoo, K. Y., & Shin, H. R. (2003). Cancer epidemiology and prevention. *Epidemiology and Health*, 25(1), 1–15.
- Zhang, Y., Xu, H., Chen, H., Wang, F., & Huai, H. (2014). Diversity of wetland plants used traditionally in China: a literature review. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 10(1), 72. <https://doi.org/10.1186/1746-4269-10-72>