



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
PROGRAMA DE MAESTRÍA CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS

**“EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LOS EXTRACTOS DE
Stevia pilosa Y *Stevia eupatoria* SOBRE LA
PROLIFERACIÓN Y MIGRACIÓN DE CÉLULAS DE
CÁNCER DE PRÓSTATA LNCaP Y PC-3”**

TESIS

QUE COMO PARTE DE LOS REQUISITOS PARA OBTENER EL
GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS

PRESENTA

QFB. ELIZABETH MARTÍNEZ ROJO

DIRIGIDO POR

DRA. JESICA ESTHER ESCOBAR CABRERA

QUERÉTARO
DICIEMBRE 2017
MÉXICO



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
FACULTAD DE QUÍMICA
MAESTRÍA EN CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS

**"EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LOS EXTRACTOS DE *Stevia pilosa* Y *Stevia eupatoria* SOBRE LA
PROLIFERACIÓN Y MIGRACIÓN DE CÉLULAS DE CÁNCER DE PRÓSTATA LNCaP Y PC-3"**

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de
Maestro en Ciencias Químico Biológicas

PRESENTA:

Q.F.B. Elizabeth Martínez Rojo

DIRIGIDO POR:

Dra. Jesica Esther Escobar Cabrera

SINODALES


Dra. Jesica Esther Escobar Cabrera
Presidente

Dra. María Guadalupe García Alcocer
Secretario

Dra. Laura Cristina Berumen Segura
Vocal

Dra. Raquel Cariño Cortés
Suplente

Dr. Mamadou Moustapha Bah
Suplente


M.S.P. Sergio Pacheco Hernández
Director de la Facultad de Química

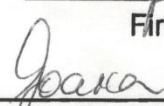

Firma


Firma


Firma


Firma


Firma


Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña
Directora de Investigación y Posgrado

Centro Universitario
Querétaro, Qro.
DICIEMBRE 2017

RESUMEN

El cáncer de próstata es la segunda neoplasia maligna en hombres a nivel mundial, y se posiciona en México como primer lugar en incidencia y mortalidad en hombres mayores a 65 años. Las células prostáticas sanas y al inicio de la enfermedad son dependientes de andrógeno, sin embargo, pueden convertirse en andrógeno independientes en un cáncer de próstata avanzado, situación en la cual el pronóstico de supervivencia en el paciente es menor y ocurre la migración celular. Actualmente, existen diversos tratamientos utilizados contra el cáncer de próstata, siendo los fármacos anti-andrógenos los de primera elección. La enzalutamida pertenece a este grupo. Sin embargo, las células cancerosas logran crear resistencia a estos tratamientos por lo tanto en la presente investigación se plantea la búsqueda de nuevas alternativas de tratamiento que favorezcan la eficacia de los fármacos existentes y frenen la migración de las células cancerosas. *Stevia pilosa* y *Stevia eupatoria*, dos especies del género *Stevia*, contienen β -sitosterol, estigmasterol, luteolina y quercetina en su composición y que estos compuestos han demostrado efecto anticarcinogénico en diversos estudios *in vitro* e *in vivo*, es por ello que estas especies fueron seleccionadas para este estudio. Se evaluó el efecto de los extractos metanólicos de ambas especies sobre la proliferación de células de cáncer de próstata dependientes de andrógenos LNCaP y andrógeno independientes PC-3, mediante una curva de concentración respuesta y el efecto sobre la migración por el ensayo herida. Los resultados demostraron que los extractos de ambas especies disminuyeron la proliferación celular con las concentraciones de 2000 $\mu\text{g/mL}$ y 2500 $\mu\text{g/mL}$ para LNCaP Y PC-3, respectivamente; mientras que el ensayo de migración para células andrógeno independientes no mostró cierre en la herida desde las 24 horas hasta las 72 horas con la concentración de 2500 $\mu\text{g/mL}$ para los extractos metanólicos de *Stevia pilosa* y *Stevia eupatoria*. Se concluyó que los extractos metanólicos de *Stevia pilosa* y *Stevia eupatoria* disminuyen la proliferación en ambas líneas celulares de cáncer de próstata LNCaP y PC-3, y muestran efecto anti-migratorio, pero no se pudo observar un efecto aditivo con enzalutamida.

Palabras clave: cáncer de próstata, *Stevia pilosa*, *Stevia eupatoria*, enzalutamida, proliferación, migración.

SUMMARY

Prostate cancer is the second most harmful disease in men worldwide. In Mexico, it is positioned as first in incidence and mortality in men over 65 years of age. Both healthy prostate cells and the onset of cancer are androgen dependent, however, they can become androgen independent in an advanced prostate cancer. When the cell becomes androgen independent, the prognosis for patient survival is less and cell migration occurs to other organs. Currently, there are several treatments used in prostate cancer, the anti-androgens being the first drug choice. Enzalutamide belongs to this group. However, cancer cells manage to create resistance to these treatments. So we try to look for new more effective agents, which enhance the response of existing therapeutic drugs and stop migration of cancer cells. *Stevia pilosa* and *Stevia eupatoria* are two species from the genus *Stevia*; it is known that this species contains β -sitosterol, stigmasterol, luteolin, quercetin in their composition and these compounds show anti-cancer effects. This is the reason why these species were selected for this study. We evaluated the effect of *S. pilosa* and *S. eupatoria* methanolic extracts on the proliferation of androgen-dependent LNCaP and androgen-independent PC-3 prostate cancer cells by a concentration-response curve. The effect on migration was evaluated by wound healing assay. The results shown that both extracts decreased cell proliferation with 2000 $\mu\text{g/mL}$ and 2500 $\mu\text{g/mL}$ for LNCaP and PC-3 respectively; with the wound healing assay of androgen-independent cells, it was not show wound closure from 24 hours to 72 hours with 2500 $\mu\text{g/mL}$ for methanolic extracts of *Stevia pilosa* and *Stevia eupatoria*. It was concluded that *Stevia pilosa* and *Stevia eupatoria* methanolic extracts decreased cell proliferation in both androgen-dependent (LNCaP) and androgen-independent cells (PC-3) of prostate and showed an anti-migratory effect, but we cannot observed an additive effect with enzalutamide.

Keywords: prostate cancer, *Stevia pilosa*, *Stevia eupatoria*, enzalutamide, proliferation, migration.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el financiamiento en económico para la realización de este proyecto, con número de FOMIX M0016-2014-C03 50289.

Agradezco a la Universidad Autónoma de Querétaro a través del Fondo de Proyectos Especiales de Rectoría (FOPER) otorgado en Marzo de 2017.

ÍNDICE GENERAL

| Contenido | Página |
|---|--------|
| RESUMEN | |
| ABSTRACT | |
| AGRADECIMIENTOS | |
| ÍNDICE GENERAL | i |
| ÍNDICE DE TABLAS | iv |
| ÍNDICE DE FIGURAS | v |
| 1. INTRODUCCIÓN | 1 |
| 2. ANTECEDENTES | 3 |
| 2.1 Cáncer. | 3 |
| 2.2 Cáncer de Próstata. | 4 |
| 2.2.1 Anatomía de la próstata. | 4 |
| 2.2.2 Epidemiología del Cáncer de Próstata. | 7 |
| 2.2.3 Factores de riesgo. | 8 |
| 2.2.3.1 Edad y etnia. | 9 |
| 2.2.3.2 Historia familiar. | 9 |
| 2.2.3.3 Dieta. | 10 |
| 2.2.3.4 Agentes ambientales. | 11 |
| 2.2.4 Diagnóstico. | 12 |
| 2.2.4.1 Examen de tacto rectal (DRE). | 12 |
| 2.2.4.2 Antígeno Prostático Específico (PSA). | 12 |
| 2.2.4.3 Ecografía transrectal (TRUS). | 13 |
| 2.2.4.4 Biopsia. | 13 |
| 2.2.5 Tratamiento. | 14 |
| 2.2.5.1 Terapia hormonal. | 14 |
| 2.2.5.2 Prostatectomía. | 15 |
| 2.2.5.3 Radioterapia. | 15 |
| 2.2.5.4 Quimioterapia. | 15 |
| 2.3 Andrógenos. | 15 |

| | | |
|---------|---|----|
| 2.3.1 | Testosterona. | 17 |
| 2.3.1.1 | Biosíntesis de la testosterona. | 17 |
| 2.4 | Vías de señalización implicadas en el Cáncer de Próstata. | 20 |
| 2.4.1 | Vía de señalización de AR. | 20 |
| 2.4.2 | Vías de señalización involucradas con estrógenos. | 22 |
| 2.4.3 | IGF-1 PI3K/Akt. | 22 |
| 2.4.4 | IL-6 y señalización de JAK/STAT. | 22 |
| 2.5 | Fármacos anti-andrógenos. | 23 |
| 2.5.1 | Enzalutamida. | 23 |
| 2.6 | Stevia | 25 |
| 2.6.1 | <i>Stevia pilosa</i> y <i>Stevia eupatoria</i> | 27 |
| 2.7 | Fitosteroles. | 27 |
| 3. | JUSTIFICACIÓN | 28 |
| 4. | HIPÓTESIS | 29 |
| 5. | OBJETIVOS | 30 |
| 5.1 | Objetivo general | 30 |
| 5.2 | Objetivos específicos | 30 |
| 6. | MATERIALES Y MÉTODOS | 31 |
| 6.1 | Cultivo celular | 31 |
| 6.2 | Ensayo de proliferación | 31 |
| 6.3 | Ensayo herida | 31 |
| 6.4 | Análisis estadístico | 32 |
| 7. | RESULTADOS | 33 |
| 7.1 | Fibroblastos humanos. Curva de proliferación | 34 |
| 7.2 | Células andrógeno dependientes LNCaP | 34 |
| 7.2.1 | Curva de proliferación con <i>Stevia pilosa</i> | 35 |

| | | |
|-------|--|----|
| 7.2.2 | Curva de proliferación con <i>Stevia eupatoria</i> | 36 |
| 7.2.3 | Comparación del efecto del extracto metanólico de <i>Stevia pilosa</i> vs el extracto metanólico de <i>Stevia eupatoria</i> en LNCaP | 37 |
| 7.2.4 | Curva de proliferación con enzalutamida | 38 |
| 7.2.5 | Combinación de los extractos metanólicos de <i>Stevia pilosa</i> y <i>Stevia eupatoria</i> con enzalutamida | 40 |
| 7.3 | Células andrógeno independientes PC-3 | 40 |
| 7.3.1 | Curva de proliferación con <i>Stevia pilosa</i> | 41 |
| 7.3.2 | Curva de proliferación con <i>Stevia eupatoria</i> | 42 |
| 7.3.3 | Comparación del efecto del extracto metanólico de <i>Stevia pilosa</i> vs el extracto metanólico de <i>Stevia eupatoria</i> en PC-3 | 43 |
| 7.3.4 | Curva de proliferación con enzalutamida | 43 |
| 7.3.5 | Combinación de los extractos metanólicos de <i>Stevia pilosa</i> y <i>Stevia eupatoria</i> con enzalutamida | 44 |
| 7.3.6 | Ensayo herida | 46 |
| 7.3.7 | Ensayo herida de la combinación de los extractos metanólicos de <i>Stevia pilosa</i> y <i>Stevia eupatoria</i> con enzalutamida | 50 |
| 8. | DISCUSIÓN | 54 |
| 8.1 | Curva de proliferación de fibroblastos humanos | 54 |
| 8.2 | Células de cáncer de próstata: LNCaP y PC-3 | 54 |
| 8.2.1 | Curvas de proliferación | 54 |
| 8.2.2 | Ensayo herida | 58 |
| 9. | CONCLUSIONES | 59 |
| 10. | REFERENCIAS | 60 |

ÍNDICE DE TABLAS

| Contenido | Página |
|--|--------|
| 1. Riesgo relativo e intervalo de confianza al 95% relacionado con la historia familiar del CaP. | 10 |
| 2. Principales funciones de los andrógenos en el varón | 16 |
| 3. Usos medicinales de algunas especies de <i>Stevia</i> . | 26 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| Contenido | Página |
|--|--------|
| 1. Vejiga y próstata, corte sagital mediano de la pelvis. | 5 |
| 2. Imagen simplificada que ilustra las estructuras glandulares de próstata. | 6 |
| 3. Incidencia y mortalidad del cáncer de próstata a nivel mundial. | 8 |
| 4. Internalización del colesterol a la célula por los receptores LDL y el flujo intermembranal mediado por la proteína StAR para iniciar esteroidogénesis. | 17 |
| 5. Biosíntesis de la testosterona. | 19 |
| 6. Estructura de la testosterona y la conversión por 5 α - reductasa a dihidrotestosterona. | 19 |
| 7. Vías de señalización celular esenciales para el desarrollo del CaP y el cruce entre ellas. | 20 |
| 8. Vía de señalización de RA. | 21 |
| 9. Estructura química de enzalutamida. | 24 |
| 10. Mecanismo de acción de enzalutamida. | 25 |
| 11. Efecto del extracto metanólico de <i>Stevia pilosa</i> en la proliferación de fibroblastos humanos | 33 |
| 12. Efecto del extracto metanólico de <i>Stevia eupatoria</i> en la proliferación de fibroblastos humanos | 34 |
| 13. Efecto del extracto metanólico de <i>Stevia pilosa</i> en la proliferación de células andrógeno dependientes LNCaP | 35 |
| 14. Efecto del extracto metanólico de <i>Stevia eupatoria</i> en la proliferación de células andrógeno dependientes LNCaP | 36 |

| | |
|---|----|
| 15. Comparación entre los extractos metanólicos de <i>Stevia pilosa</i> y <i>Stevia eupatoria</i> en la proliferación de células andrógeno dependientes | 37 |
| 16. Efecto de la enzalutamida en la proliferación de células andrógeno dependientes | 38 |
| 17. Efecto de la combinación de enzalutamida con el extracto metanólico de <i>Stevia pilosa</i> sobre la proliferación de células andrógeno dependientes | 39 |
| 18. Efecto de la combinación de enzalutamida con el extracto metanólico de <i>Stevia eupatoria</i> sobre la proliferación de células andrógeno dependientes | 40 |
| 19. Efecto del extracto metanólico de <i>Stevia pilosa</i> en la proliferación de células andrógeno dependientes PC-3 | 41 |
| 20. Efecto del extracto metanólico de <i>Stevia eupatoria</i> en la proliferación de células andrógeno dependientes PC-3 | 42 |
| 21. Comparación entre los extractos metanólicos de <i>Stevia pilosa</i> y <i>Stevia eupatoria</i> en la proliferación de células andrógeno independientes | 43 |
| 22. Efecto de la enzalutamida en la proliferación de células andrógeno independientes | 44 |
| 23. Efecto de la combinación de enzalutamida con el extracto metanólico de <i>Stevia pilosa</i> sobre la proliferación de células andrógeno independientes | 45 |
| 24. Efecto de la combinación de enzalutamida con el extracto metanólico de <i>Stevia pilosa</i> sobre la proliferación de células andrógeno independientes | 46 |
| 25. Ensayo herida para PC-3 tratadas con <i>Stevia pilosa</i> | 47 |
| 26. Ensayo herida para PC-3 tratadas con <i>Stevia eupatoria</i> | 48 |
| 27. Efecto del extracto metanólico de <i>Stevia pilosa</i> sobre la migración | 49 |

| | |
|---|----|
| celular de PC-3 | |
| 28. Efecto del extracto metanólico de <i>Stevia eupatoria</i> sobre la migración celular de PC-3 | 50 |
| 29. Ensayo herida para PC-3 tratadas con <i>stevia pilosa</i> en combinación con enzalutamida | 51 |
| 30. Ensayo herida para PC-3 tratadas con <i>stevia eupatoria</i> en combinación con enzalutamida | 52 |
| 31. Efecto de la combinación de <i>Stevia pilosa</i> con enzalutamida sobre la migración de células PC-3 | 52 |
| 32. Efecto de la combinación de <i>Stevia eupatoria</i> con enzalutamida sobre la migración de células PC-3 | 53 |
| 33. Mecanismos de acción propuestos para β -sitosterol | 57 |

1. INTRODUCCIÓN

El cáncer de próstata es la segunda neoplasia maligna en hombres a nivel mundial, y se posiciona en México, como primer lugar en incidencia y mortalidad en hombres mayores de 65 años. Existen factores de riesgo que pueden llevar al desarrollo del cáncer de próstata como lo son la edad, historia familiar, genética, dieta y factores ambientales.

El cáncer de próstata inicia con una atrofia inflamatoria proliferativa donde las células prostáticas dependen de los andrógenos, le sigue una neoplasia intraepitelial prostática, cáncer de próstata localizado y finalmente metástasis a otros órganos, en estas últimas etapas las células pierden la respuesta a los andrógenos. Los andrógenos son hormonas sexuales masculinas cuyas funciones son: determinación del sexo (formación de los genitales externos masculinos), espermatogénesis, desarrollo de caracteres sexuales secundarios, crecimientos de huesos, eritropoyesis. La activación de la vía de señalización del receptor de andrógenos es esencial para el desarrollo fisiológico de la próstata, regulando la proliferación, diferenciación y apoptosis de las células prostáticas. Debido a esta vía de señalización, los fármacos anti-andrógenos son el tratamiento de primera elección, existiendo en la actualidad los de primera generación (flutamida, bicalutamida, nilutamida) y los de segunda generación (enzalutamida). La enzalutamida tiene una afinidad hacia los receptores de andrógenos (RA) ocho veces mayor que los anti-andrógenos de primera generación, además de actuar en tres niveles importantes de la vía de señalización de los RA, no obstante, las células de cáncer de próstata logran crear resistencia hacia esos fármacos, es por ello que se requiere de coadyuvantes para esta terapia.

El género *Stevia* cuenta con una amplia variedad de compuestos entre todas sus especies, lo que lo hace blanco de estudios fitoquímicos, que han permitido encontrar alguno de los metabolitos presentes en sus especies. En el caso de *Stevia pilosa* y *Stevia eupatoria*, se han identificado fitoesteroles como β -sitosterol y estigmasterol, al igual que los flavonoides quercetina y luteolina.

El β -sitosterol es un agente prometedor que exhibe varias funciones incluyendo actividad antifúngica, anti-inflamatoria, antihipercolesterolémica y antibacteriana; sumándose a estas actividades, recientemente, se ha sugerido que tiene efecto anticancerígeno en cáncer de pulmón, mama y colón. A la quercetina se le han atribuido diferentes propiedades entre las que destacan la actividad antiinflamatoria, antigenotóxica y antitumoral. La luteolina tiene propiedades antioxidantes y se ha reportado que inhibe el desarrollo de tumores sólidos. Es por la riqueza en compuestos dentro del género *Stevia* y la necesidad de combatir el cáncer de próstata tanto en etapas tempranas como avanzadas, que se llevó a cabo el estudio del efecto de los extractos de *Stevia pilosa* y *Stevia eupatoria* sobre células de cáncer de próstata, así como su posible efecto aditivo o sinérgico para potenciar el efecto de la enzalutamida.

2. ANTECEDENTES

2.1 Cáncer

El cáncer es una enfermedad en la que las células del cuerpo destruyen la armonía del organismo pluricelular al proliferar cuando no deberían hacerlo e invaden tejidos en los que no deberían penetrar (Alberts, 2006).

Las células cancerosas y su progenie se definen por dos propiedades heredables: 1) proliferan en contra de las limitaciones normales e 2) invaden y colonizan territorios que en condiciones normales están reservados para otras células. La combinación de estas dos características determina un peligro mortal. Las células que tienen la primera propiedad pero no la segunda proliferan en forma excesiva pero permanecen agrupadas en una sola masa que produce un *tumor*, pero el tumor en este caso es *benigno* y por lo general puede extirparse en forma completa y con márgenes libres por medio de la cirugía. Un tumor es canceroso solo si sus células tienen la capacidad de invadir los tejidos circundantes, caso en el cual se dice que es *maligno*. Las células tumorales malignas con esta propiedad invasora pueden separarse del tumor primario, ingresar en la corriente sanguínea o en los vasos linfáticos y formar tumores secundarios o *metástasis* en otros sitios del cuerpo (Alberts, 2006).

Se considera que la transformación maligna de las células normales tiene lugar mediante la adquisición progresiva de una serie de alteraciones moleculares que les confieren una ventaja para el desarrollo de la enfermedad y son comunes a todos los tipos de cánceres (Hanahan y Weinberg, 2000):

- Autosuficiencia en el crecimiento
- Resistencia a estímulos antiproliferativos
- Evasión de la muerte celular programada (apoptosis)
- Capacidad replicativa ilimitada
- Capacidad de invasión y metástasis

Según datos obtenidos de la OMS, en 2012 hubo 14 millones de nuevos casos de cáncer, y 8.2 millones de muertes relacionadas con el cáncer. Los cánceres

diagnosticados con más frecuencia en el hombre fueron los de próstata, pulmón, estómago, hígado, colon y recto. Se prevé que el número de nuevos casos aumente en aproximadamente un 70% en los próximos 20 años.

2.2 Cáncer de Próstata

El cáncer de próstata (CaP) es un trastorno heterogéneo y multifocal. Alrededor de 70% de los casos de CaP se originan en la zona periférica de la glándula prostática, el 15% - 20% en la zona central y solo el 10% - 15% en la zona transicional. El CaP puede asumir diversos patrones histológicos, pero la mayoría de los casos corresponde a adenocarcinoma acinar, que surge de las células epiteliales prostáticas las cuales expresan receptores de andrógenos. El adenocarcinoma ductal, carcinoma mucinoso y adenocarcinoma en “anillo de sello” son extremadamente raros (Felgueiras *et al.*, 2014).

El desarrollo y homeostasis de la próstata requiere de una señalización bidireccional entre los constituyentes de las células epiteliales y las células estromales, incluyendo fibroblastos y células del músculo liso, vasculatura, factores solubles y proteínas de matriz extracelular. Esta señalización está interrumpida en el cáncer, donde el estroma comienza a desorganizarse, los fibroblastos prostáticos normales no malignos son reemplazados por fibroblastos activados asociados a cáncer, y la composición de la matriz extracelular se altera (Leach *et al.*, 2015).

2.2.1 Anatomía de la próstata

La próstata es una glándula mixta túbulo alveolar que se encuentra sólo en los hombres y es un órgano que forma parte del sistema reproductor masculino (Mendoza, 2013). Esta glándula rodea el cuello de la vejiga y de la uretra, y está cubierta por una capa fibrosa y muscular (Figura 1). Se divide anatómicamente en cinco lóbulos (anterior, medio, posterior y dos laterales). Una división que correlaciona mejor con las características fisiológicas y patológicas, divide la próstata en regiones periférica, central, transicional y periuretral (Ramírez-Balderrama *et al.*, 2013).

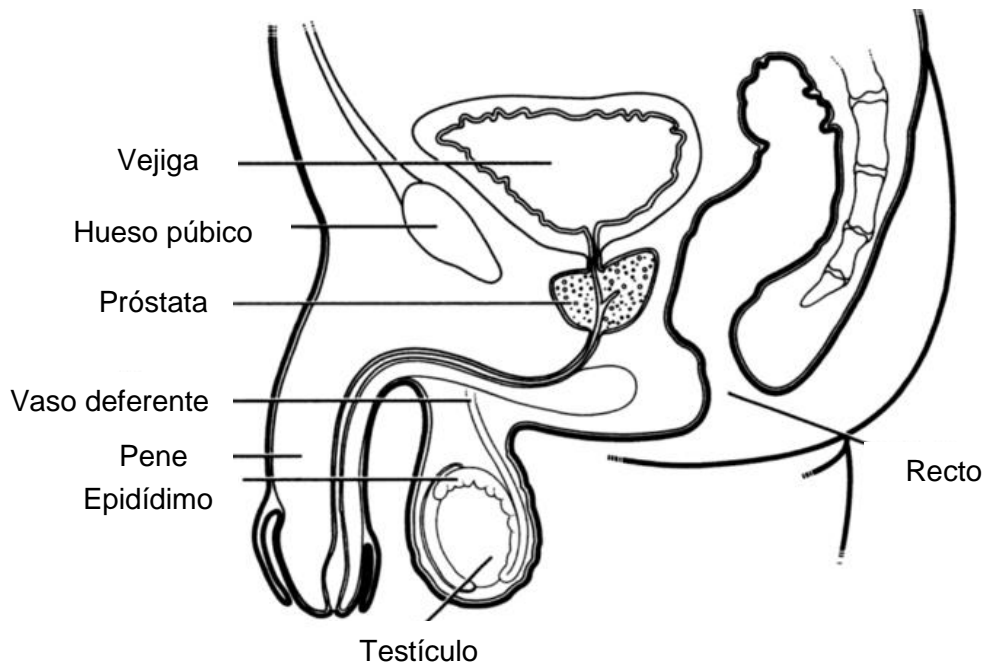


Figura 1. Vejiga y próstata, corte sagital mediano de la pelvis (Taguchi, 2006).

La próstata humana normal es considerada un complejo glandular túbulo alveolar dividido en dos compartimentos, el estromal y el epitelial. El compartimiento estromal consiste en una matriz de tejido conectivo formado por una amplia variedad celular, como tejido nervioso, fibroblastos, linfocitos, macrófagos y células de músculo liso, con funciones estructurales e inmunológicas definidas. El compartimiento epitelial está formado por un complejo glandular epitelial inmerso en una matriz de tejido conectivo organizado por glándulas que se ramifican desde la uretra hasta los acinos secretores. El epitelio está integrado por tres variedades celulares (Figura 2), las epiteliales luminales, las epiteliales basales y las neuroendócrinas (Ramírez-Balderrama *et al.*, 2013).

Las células epiteliales luminales constituyen la mayoría del epitelio prostático, están diferenciadas y llevan a cabo las funciones secretoras (liberan antígeno prostático específico y fosfatasa ácida a la luz glandular); la mayoría de estas células depende de la señalización de andrógenos para su supervivencia (Xin, 2012).

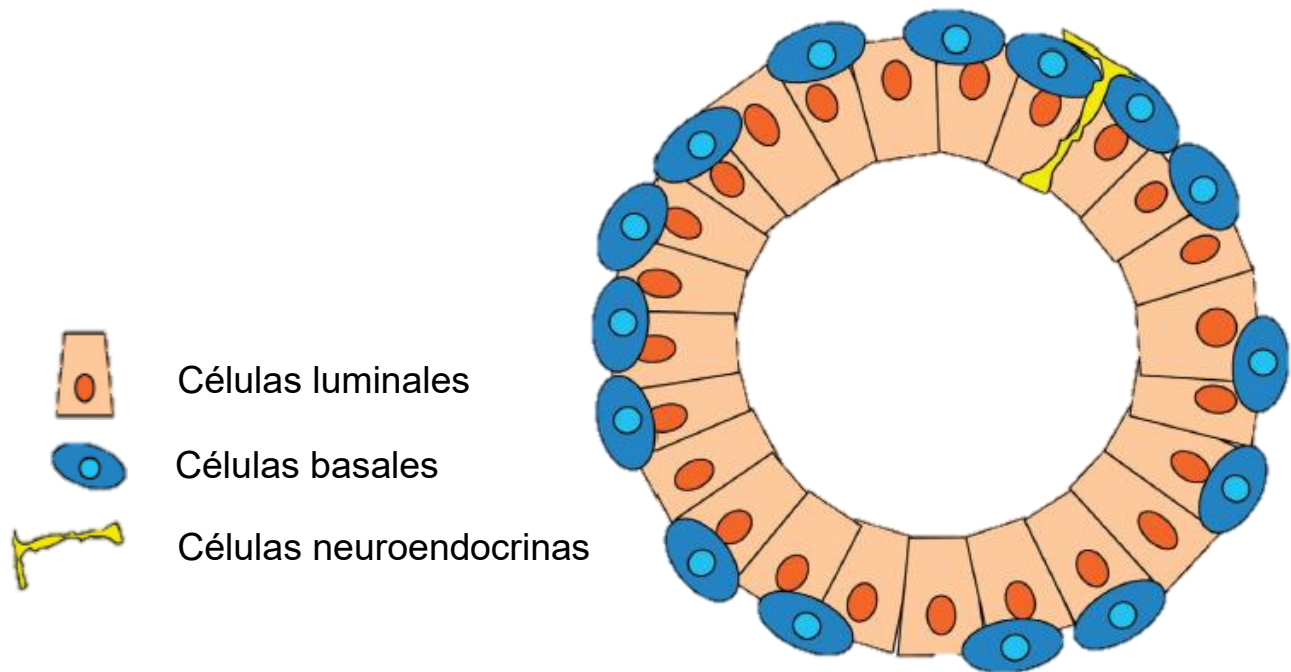


Figura 2. Imagen simplificada que ilustra las estructuras glandulares de próstata (Xin, 2012).

Las células epiteliales basales por el contrario, están poco diferenciadas, no tienen actividad secretora, están distribuidas en la membrana basal y su número es menor; se caracterizan morfológicamente, por ser pequeñas con formas aplanadas cuboides, expresan bajos niveles de receptores androgénicos y son independientes de andrógenos para su supervivencia. Sin embargo, pueden expresar receptores β de estrógenos y proliferar durante la terapia estrogénica (Ramírez-Balderrama *et al.*, 2013).

Las células neuroendocrinas son el tercer tipo de células epiteliales, constituyen solo una fracción muy pequeña y se encuentran ubicadas entre las células del compartimiento basal (Xin, 2012). Esta variedad celular tiene propiedades duales de células endocrinas y neuronas. Las células neuroendocrinas forman una red de comunicación que, a través de una gran variedad de productos secretados, regula las funciones celulares, la secreción y la diferenciación prostática (Ramírez-Balderrama *et al.*, 2013).

La función principal de la próstata es producir el líquido que enriquece el semen y nutre a los espermatozoides, a fin de que éstos puedan ser viables para la fecundación después de la eyaculación (Mendoza, 2013).

2.2.2 Epidemiología del Cáncer de Próstata

El CaP es la segunda neoplasia maligna más frecuente en hombres, con casi un millón de nuevos casos diagnosticados cada año, de los cuales un tercio son fatales y representa aproximadamente el 10% de todos los nuevos casos de cáncer en los hombres a nivel mundial. Sin embargo, en los países occidentales incluyendo países europeos y EUA, aproximadamente 25% de los nuevos casos de cáncer en hombres se deben a CaP (Tao *et al.*, 2015).

De acuerdo con GLOBOCAN un estimado de 1.1 millones de casos de cáncer de próstata, a nivel mundial, fueron diagnosticados en 2012, de los cuales 70% de los casos (759,000) se encontraron en pacientes de regiones más desarrolladas. La incidencia de CaP varía más de 25 veces en todo el mundo (Figura 3); las tasas son más altas en Australia/Nueva Zelanda, América del Norte (111.6 y 97.2 por 100,000, respectivamente), y en Europa Occidental y del Norte, debido a que la práctica de antígeno prostático específico (PSA) y la posterior biopsia se ha generalizado en esas regiones. Las tasas de incidencia son también relativamente altas en ciertas regiones menos desarrolladas, como el Caribe (79.8), el sur de África (61.8) y de América del Sur (60.1). Sin embargo, siguen siendo bajos en Asia con tasas estimadas de 10.5 y 4.5 en el este y sur-central (GLOBOAN, 2012).

Con un estimado de 307,000 muertes en 2012, el cáncer de próstata es la quinta causa principal de muerte por cáncer en hombres a nivel mundial (6.6% del total de muertes en hombres). Las tasas de mortalidad son generalmente más altas en poblaciones con predominio de raza negra (Caribe, 29 por 100,000 y África Subsahariana 19-24 por 100,000), muy bajas en Asia (2.9 por 100,000 en centro y sur de Asia) e intermedias en América y Oceanía (Bashir, 2015).

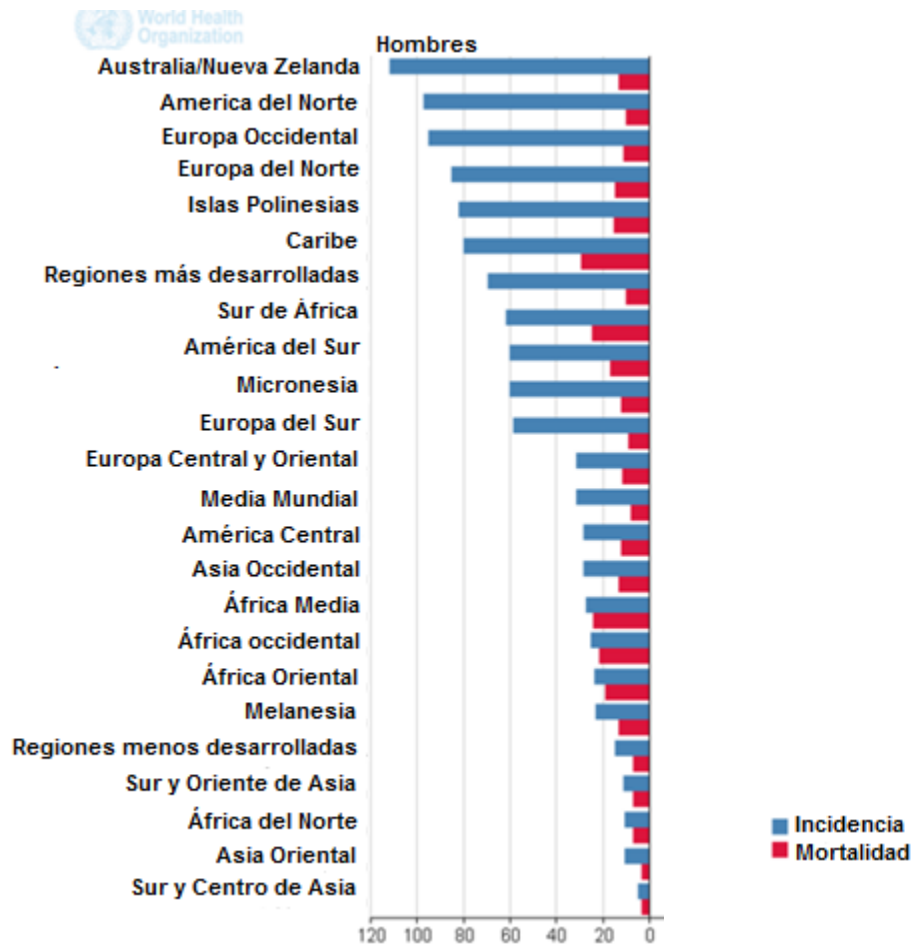


Figura 3. Incidencia y mortalidad de Cáncer de Próstata a nivel mundial (GLOBOCAN, 2012).

En México, según el Instituto Mexicano del Seguro Social en 2013, el cáncer de próstata es la causa más frecuente de mortalidad por tumores malignos en hombres con un 16% de incidencia en México. Los datos más recientes publicados por el Instituto Nacional de Cancerología (INCan) indican que la tasa de mortalidad es 13 defunciones por cada 100 hombres.

2.2.3 Factores de riesgo

Existen varios factores importantes que influyen en el riesgo de tener cáncer de próstata, como la edad, etnia, historia familiar, dieta y agentes ambientales.

2.2.3.1 Edad y etnia

El CaP es una enfermedad de hombres de edad avanzada; 6 de cada 10 casos son diagnosticados en pacientes con una media de edad de 65 años. Es poco común que la enfermedad se presente antes de los 40 años, pero la probabilidad de desarrollar CaP aumenta después de los 50 años (Bashir, 2015). Está estimado que mientras la incidencia de CaP es alrededor de 1 en 55 hombres en un rango de edad de 40-60 años, este se incrementa ocho veces, de 1 a 7 hombres en un rango de edad de 60-80 años (Tao *et al.*, 2015).

La población afroamericana tiene la tasa más alta de CaP en el mundo (23.0 por 100,000 hombres). La tasa de incidencia entre los afroamericanos es 60% mayor que la población de hombres blancos (139.9 por 100,000 hombres). La tasa de incidencia para todas las razas es 147.8 por 100,000 hombres. Por otra parte, para el período 2007 – 2011, la tasa de mortalidad para afroamericanos fue 2.4 veces mayor que en la población de hombres blancos (Bashir, 2015).

2.2.3.2 Historia familiar

Además de la edad y el origen racial, la historia familiar de la enfermedad es otro factor de riesgo importante. Varios estudios han mostrado que el riesgo de desarrollar CaP se incrementa de 2 a 3 veces en hombres que tienen familiares de primer grado (padre, hermano, hijo) con una historia positiva de CaP, aunado a esto, en hombres que tengan dos o más familiares de primer grado afectados por CaP, el riesgo de desarrollar la enfermedad aumenta a 5 veces. La mayoría de casos (64%) de CaP de inicio temprano reportaron una historia familiar de la enfermedad y más del 40% con familiares de primer grado afectados (Bashir, 2015).

Estudios en gemelos nórdicos, demostraron que, gemelos monocigotos tenían un riesgo de 50% mayor que los gemelos dicigóticos. En la Tabla 1 se muestra el resumen del riesgo relacionado con una historia familiar (Tao *et al.*, 2015).

Tabla 1. Riesgo relativo e intervalo de confianza al 95% relacionado con la historia familiar del CaP (Bashir, 2015).

| Grupo de riesgo | Riesgo relativo para CaP (IC 95%) |
|---|-----------------------------------|
| Padre con CaP | 2.35 (2.02-2.72) |
| Hermano(s) con CaP | 3.14 (2.37-4.15) |
| Un familiar de primer grado afectado | 2.48 (2.25-2.74) |
| Familiar de primer grado diagnosticado <65 años | 2.87 (2.21-3.74) |
| Familiar de primer grado diagnosticado a los 65 años o más. | 1.92 (1.49-2.47) |
| Familiares de segundo grado afectados | 2.52 (0.99-6.46) |
| Dos o más familiares de primer grado afectados. | 4.39 (2.61-7.39) |

2.2.3.3 Dieta

Una amplia variedad de factores dietéticos están implicados en el desarrollo del CaP. El consumo de grasas, especialmente grasas poliinsaturadas, muestra una fuerte correlación con la incidencia y mortalidad del CaP. En el estilo de vida occidental, el mayor consumo de grasas, carne roja y productos lácteos puede ser responsable de desarrollar el mayor riesgo de CaP. En un estudio multiétnico de factores dietéticos, el riesgo de desarrollar CaP fue asociado positivamente con la ingesta total de grasas en la población de raza blanca, asiaticoamericanos y africanoamericanos (Bashir, 2015). Se ha encontrado que la obesidad está asociada con el incremento de la incidencia de CaP agresivo así como la recurrencia del CaP. Es probable que la mortalidad específica por CaP también se eleve significativamente por la obesidad (Tao, 2015).

Los retinoides, incluidos la vitamina A, ayudan a regular la diferenciación y proliferación de células epiteliales, con una asociación positiva con el riesgo de CaP. La vitamina C es un eliminador de especies reactivas de oxígeno (ROS) y radicales libres, pero no hay una asociación consistente con la ingesta y el riesgo de CaP. Una deficiencia de vitamina D puede ser un factor de riesgo, la forma hormonal, 1,25-dihidroxitamina D, inhibe la invasividad y tiene efectos antiproliferativos y antidiferenciativos en CaP. La vitamina E (α -tocoferol) es un antioxidante que inhibe el crecimiento de las células de CaP a través de la apoptosis. En Finlandia se llevó a cabo un estudio clínico donde pudieron concluir que una ingesta diaria de vitamina E disminuye el riesgo de CaP en un 32%. En cuanto al Zn, la relación entre el zinc de la dieta y el riesgo a padecer la enfermedad no es claro hasta el momento, sin embargo, existen datos donde la concentración de Zn se reduce a un 90% en próstatas con cáncer. La ingesta de alcohol no tiene una asociación significativa con el riesgo de desarrollar CaP (Bostwick *et al.*, 2004).

2.2.3.4 Agentes ambientales

Una clase de agentes ambientales que ha recibido mucha atención son los químicos de alteración endócrina (EDC, Endocrine Disrupting Chemicals), estos están definidos como un agente ambiental que altera positiva o negativamente la actividad hormonal y que puede conducir a la carcinogénesis, particularmente en los órganos reproductores. Se ha identificado que los EDCs ejercen un efecto sobre estrógenos, andrógenos y actividades de la tiroides. Ciertos residuos de pesticidas en los alimentos, químicos usados en la producción de plásticos y fitoestrógenos en productos vegetales, se comportan como EDCs (Bostwick *et al.*, 2004).

La vinclozolina, es un EDC usado comúnmente como fungicida en la fruta utilizada en la industria. La vinclozolina y sus dos metabolitos principales, M1 y M2, tienen propiedades anti-androgénicas. La exposición prenatal a vinclozolina tiene como resultado defectos de desarrollo en el aparato reproductor masculino y la exposición en la pubertad promueve cambios morfológicos y de expresión de

genes. Además de los defectos reproductivos observados, se han reportado anomalías en el comportamiento y aprendizaje (Anway y Skinner, 2008).

Las enzimas androgénicas clave que pueden ser blanco de los EDC son el citocromo P450 (CYP17), el cual tiene funciones de hidroxilasa y liasa, y es responsable de la síntesis de los precursores de todos los andrógenos, esteroides y 5 α -reductasa que convierte la testosterona en su forma activa (Robitaille *et al.*, 2015).

2.2.4 Diagnóstico

Los cuatro procedimientos comúnmente usados para el diagnóstico del cáncer de próstata son: examen de tacto rectal (DRE, digital rectal examination), niveles de Antígeno Prostático Específico (PSA) en sangre, ecografía transrectal (TRUS, transrectal ultrasound) y biopsia (National Institute for Health and Care Excellence, 2014).

2.2.4.1 Examen de tacto rectal (DRE)

El DRE mejoró significativamente la estadificación del CaP a principios de 1900 y fue recomendado anualmente para los hombres de 50 años de edad y mayores. Es una evaluación subjetiva y dependiente de la habilidad del médico en el reconocimiento de la sensación del tumor; desafortunadamente, este método no permite que se examine manualmente toda la próstata. La DRE es una evaluación importante cuando se usa en conjunto con otras herramientas de diagnóstico, como el PSA (Kash *et al.*, 2014).

2.2.4.2 Antígeno Prostático Específico (PSA)

El PSA es una proteína producida específicamente por las células epiteliales del tejido prostático benigno y maligno. Su función biológica consiste en licuar el coágulo seminal, lo cual aumenta la motilidad de los espermatozoides (Duskova y Vesely, 2015).

La mayor parte del PSA se encuentra en la sangre en forma libre, y una pequeña porción se halla formando complejos con otras proteínas, entre las que se encuentran α 1-antitripsina y α 2-macroglobulina (Pinto y Vallejos, 2012).

En 1986, el PSA fue aprobado por la Administración de Alimentos y Fármacos de los Estados Unidos (FDA, USA Food and Drug Administration) para monitorear el CaP y en 1994 se aceptó como una herramienta para la detección de la enfermedad en hombres mayores de 50 años. Aunque representa uno de los biomarcadores más usados en la detección y el manejo del CaP, no es el ideal y causa muchas controversias (Duskova y Vesely, 2015); pues a pesar de ser una proteína órgano-específica puede verse afectada, elevándose, por agrandamiento de la próstata, prostatitis, eyaculación, una edad avanzada, ejercicio en bicicleta, algunas condiciones urológicas y ciertos medicamentos; o bien, disminuirse por inhibidores de la 5- α -reductasa, obesidad y uso de aspirina (Daniyal *et al.*, 2014).

2.2.4.3 Ecografía transrectal (TRUS)

Los avances tecnológicos en ecografía y biopsia desde 1940 han hecho de TRUS una herramienta integral en la detección de las primeras etapas del CaP. Es una técnica de imagen que utiliza ondas sonoras inofensivas y sus ecos para crear un “mapa” de la próstata. Este procedimiento detecta aproximadamente el 68% de los cánceres en la zona periférica de la próstata y el 8% de la zona central (Kash *et al.*, 2014).

2.2.4.4 Biopsia

El diagnóstico de cáncer se confirma mediante una biopsia con aguja guiada por TRUS. La observación directa, por ecografía, asegura que se extraigan muestras de todas las zonas de la glándula. Los sujetos con prostatitis deben ser sometidos a un ciclo de antibioticoterapia antes de la biopsia. En algunos casos, pueden observarse niveles anormales de PSA y una biopsia negativa, por lo que lo recomendable es repetir el procedimiento (Longo *et al.*, 2012).

Actualmente, un aproximado de 25% de los hombres sometidos a biopsia con niveles de PSA por encima del umbral, serán diagnosticados con CaP. Las tasas

de detección tienen un estimado de 14-22% en la primer biopsia, 10-15% en la segunda biopsia y 5-10% para la tercer biopsia (National Institute for Health and Care Excellence, 2014).

La necesidad de una biopsia basal se determina en función de la concentración de PSA, un DRE sospechoso o ambos; debe tenerse en cuenta la edad biológica del paciente, las posibles enfermedades concomitantes y las consecuencias terapéutica (Heidenreich *et al.*, 2010).

El primer valor elevado de PSA no conlleva a una biopsia inmediata, se debe comprobar al cabo de unas semanas con el mismo análisis en condiciones normalizadas, sin eyaculación ni manipulación, como sedaje cistoscopia o resección transuretral, y sin infección urinaria; en el mismo laboratorio de diagnóstico, utilizando los mismos métodos (Heidenreich *et al.*, 2010). Comprobados los niveles de PSA, la biopsia basal está recomendada para hombres con niveles en suero de PSA por encima de un umbral de diagnóstico actualmente fijado en 3ng/ml para hombres de entre 50 y 59 años, 4ng/ml para aquellos que están en un rango de edad de 60 a 69 años y de 5ng/ml para quienes superan los 70 años de edad (National Institute for Health and Care Excellence, 2014).

Las indicaciones para repetir una biopsia son principalmente tres: elevación en los niveles de PSA o que estos sean persistentes, un DRE sospechoso y proliferación microacinar atípica (ASAP) (Heidenreich *et al.*, 2010).

2.2.5 Tratamiento

Los tratamientos para el cáncer de próstata incluyen terapia hormonal, prostatectomía, radioterapia y quimioterapia.

2.2.5.1 Terapia hormonal

Su objetivo es suprimir los estímulos sobre la próstata mediante la supresión de la liberación de hormona luteinizante hipofisaria. Para ello se puede usar estrógenos, progestágenos y antagonistas de la LHRH. Se puede recurrir a la ablación de las fuentes endócrinas por medio de orquidectomía bilateral, suprarrenalectomía

bilateral o hipofisectomía, así como la inhibición de la acción androgénica en los tejidos efectores (inhibición intracelular), para lo que se puede utilizar antiandrógenos esteroideos y antiandrógenos no esteroideos (Lozano, 2004).

2.2.5.2 Prostatectomía

Fue inicialmente realizada para aliviar los síntomas de la obstrucción urinaria, ahora desempeña su papel en los enfermos con procesos confinados a la próstata. Se puede practicar por vía perineal o retropúbica (Denmeade e Isaacs, 2002).

2.2.5.3 Radioterapia

Se puede utilizar en estadios tempranos del CaP, en el control de la enfermedad localmente avanzada y como paliativo en el tratamiento de los síntomas de la metástasis. Las modalidades son esencialmente: braquiterapia o implantes locales radiactivos, la radiación externa y el tratamiento con radiofármacos (Lozano, 2004).

2.2.5.4 Quimioterapia

Inicialmente muchos pacientes responden a la terapia hormonal pero, con el tiempo, desarrollan ineficacia al tratamiento androgénico. Esto lleva a probar la quimioterapia citotóxica como tratamiento para el CaP hormona-refractario (Denmeade e Isaacs, 2002).

2.3 Andrógenos

Los andrógenos forman parte de las hormonas esteroideas y presentan funciones esenciales en el desarrollo y fisiología del cuerpo humano (Tabla 2). Es conocida su función en los hombres, donde participan en la diferenciación sexual durante la vida intrauterina (diferenciación de conductos de Wolff, glándulas anexas y genitales externos), desarrollo de caracteres sexuales secundarios en la pubertad y pospubertad, regulación del eje gonadal (“feedback” negativo a la LH), inicio y

mantenimiento de la espermatogénesis y desarrollo de la masa muscular (Levalle y Lalosa, 2015).

Tabla 2. Principales funciones de los andrógenos en el varón (Fox, 2008).

| Tipo | Función del andrógeno |
|---------------------------------|--|
| Determinación del sexo | <p>Crecimiento y desarrollo de los conductos wolffianos en epidídimo, conducto deferente, vesículas seminales y conductos eyaculadores.</p> <p>Transformación del seno urogenital en próstata.</p> <p>Formación de los genitales externos masculinos (pene y escroto).</p> |
| Espermatogénesis | <p>En la pubertad: culminación de la división meiótica y maduración precoz de las espermátides.</p> <p>Después de la pubertad: mantenimiento de la espermatogénesis.</p> |
| Caracteres sexuales secundarios | <p>Crecimiento y mantenimiento de los órganos sexuales accesorios.</p> <p>Crecimiento del pene.</p> <p>Crecimiento del pelo facial y del vello axilar.</p> <p>Crecimiento del cuerpo.</p> |
| Efectos anabolizantes | <p>Síntesis proteica y crecimiento muscular.</p> <p>Crecimientos de los huesos.</p> <p>Crecimiento de otros órganos (incluyendo la laringe).</p> <p>Eritropoyesis.</p> |

2.3.1 Testosterona

La testosterona es el andrógeno natural más importante, cuya producción ocurre principalmente en las células de Leydig, en los testículos y en menor cantidad, en ovarios y corteza suprarrenal (Mendoza-Patiño, 2008).

2.3.1.1 Biosíntesis de la testosterona

El proceso por el cual el colesterol es convertido en hormonas esteroideas biológicamente activas se le llama esteroidogénesis. Las células de Leydig pueden sintetizar colesterol a partir de acetil CoA, sin embargo, lo obtienen fundamentalmente del plasma, a partir de los ésteres de colesterol que forman las lipoproteínas de baja densidad (LDL) (Gal-Iglesias *et al.*, 2007).

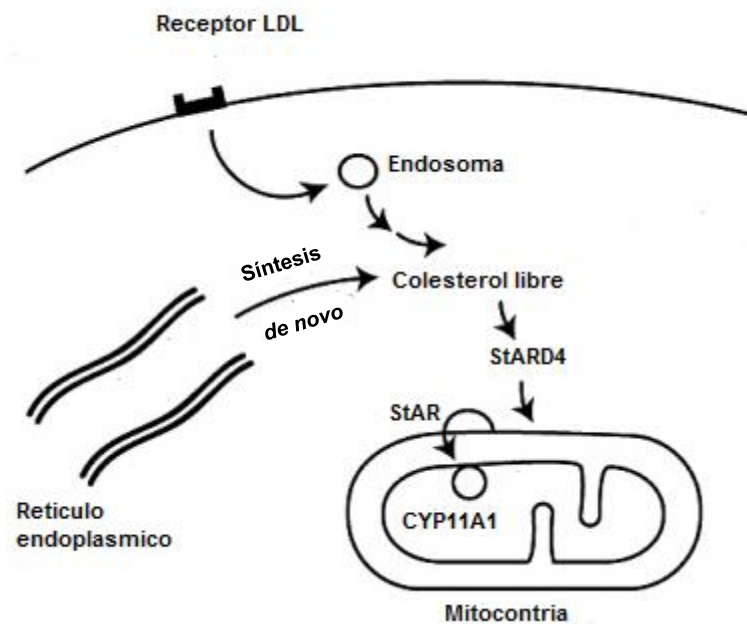


Figura 4. Internalización del colesterol a la célula por los receptores LDL y el flujo intramembranal mediado por la proteína StAR para iniciar esteroidogénesis (Miller y Auchus, 2011).

La conversión de colesterol a pregnenolona se lleva a cabo en la mitocondria, el paso del colesterol libre desde la membrana mitocondrial interna se considera un paso limitante de la ruta biosintética. En los ovarios, los testículos y las glándulas

suprarrenales, este flujo intramitcondrial de colesterol es estimulado por la proteína reguladora aguda esteroidógena (StAR) (Figura 4), la cual se sintetiza rápidamente en respuesta de AMPc y posee una vida media breve, lo que permite un control fino y rápido de la esteroidogénesis (Yen *et al*, 2001).

El paso del colesterol a pregnenolona, envuelve tres distintas reacciones químicas, catalizadas por la enzima CYP11A1, 20 α -hidroxilación, 2-hidroxilación y la escisión de la cadena lateral del colesterol, produciendo pregnenolona. Estas reacciones se llevan a cabo en un solo sitio activo que está en contacto con la membrana mitocondrial interna (Miller y Auchus, 2011).

La pregnenolona sale de la mitocondria y pasa al retículo endoplasmático liso. Dos rutas conducen a la síntesis de testosterona en el testículo, una a partir de la 17 α -hidroxi-pregnenolona, conocida como ruta delta 5, y otra a partir de la hidroxiprogesterona o delta 4. En el testículo humano la principal ruta de producción de testosterona es la vía delta 5, mientras que la delta 4 predomina en los ovarios (Gal-Iglesias *et al.*, 2007). La pregnenolona experimenta una 17 α -hidroxilación para convertirse en 17 α -hidroxipregnenolona, este esteroide luego sufre la escisión de la ligadura C17-20 para formar dehidroepiandrosterona (DHEA). Estas dos reacciones son mediadas por una única enzima CYP17. La enzima 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa/ $\Delta^5 \rightarrow \Delta^4$ isomerasa (3 β HSD) convierte la DHEA en Δ^4 -androstenediona. La 3 β HSD posee como mínimo dos isoenzimas humanas codificadas por genes distintos. La enzima que cataliza la actividad de los 3 β HSD en los ovarios, testículos y las glándulas suprarrenales es de tipo II; la tipo I cataliza la actividad de 3 β HSD en la placenta, las mamas y los tejidos extracelulares. Por último la conversión Δ^4 -androstenediona en testosterona es catalizada por un grupo de enzimas, denominadas 17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (17 β HSD) y, a veces, designadas 17-cetoesteroide reductasa, dado que también son capaces de catalizar la reacción inversa (Figura 5) (Yen *et al*, 2001).

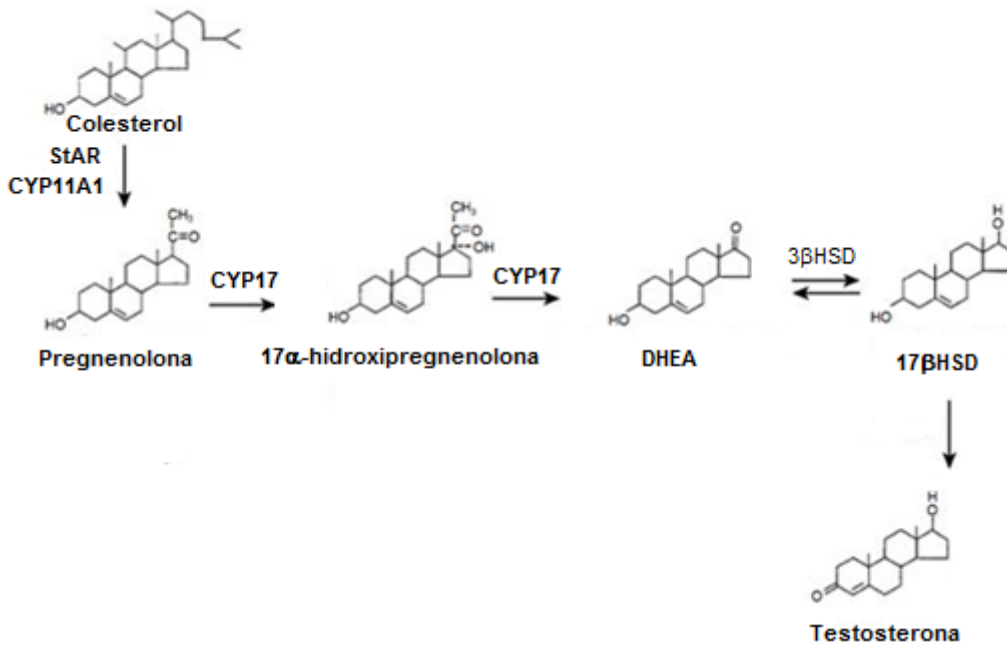


Figura 5. Biosíntesis de la testosterona (Finco *et al.* 2015).

La testosterona recién sintetizada, circula en la sangre, donde se une a la albúmina y a la hormona sexual ligada a globulina (SHBG), con una pequeña fracción disuelta libre en el suero. Cuando la testosterona libre entra en las células prostáticas, 90% es convertida a dihidrotestosterona (DHT) por la enzima 5 α -reductasa (SRD5A), DHT es la hormona más activa (Figura 6), teniendo cinco veces más afinidad para el receptor de andrógenos (RA) que la testosterona (Feldman y Feldman, 2001).

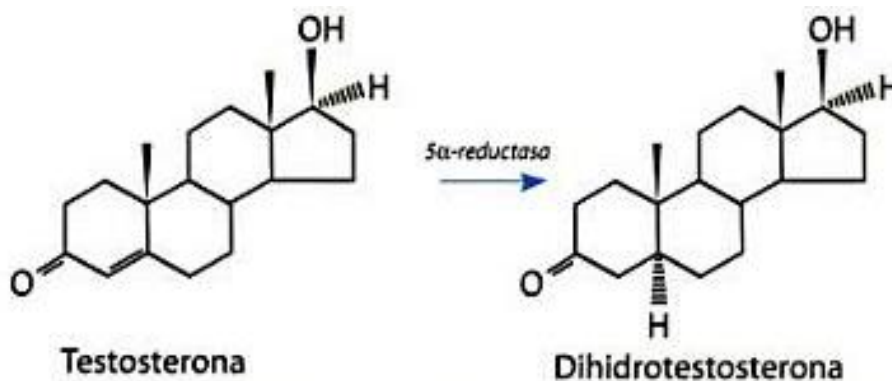


Figura 6. Estructura de la testosterona y la conversión por 5 α -reductasa a dihidrotestosterona (Feldman y Feldman, 2001).

2.4 Vías de señalización implicadas en el cáncer de próstata.

La progresión del cáncer de próstata depende de la disminución de los niveles de andrógenos hasta un cáncer de próstata andrógeno independiente (Joshi, *et al.*, 2015). Existen varias vías de señalización (Figura 7) y una relación entre ellas que está implicada en la patofisiología del cáncer de próstata (Felgueiras *et al.*, 2014).

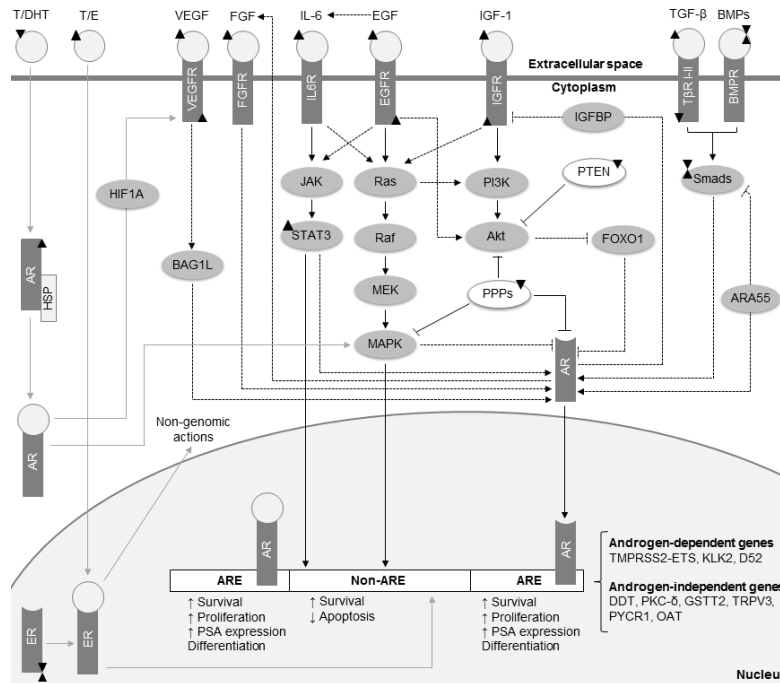


Figura 7. Vías de señalización celular esenciales para el desarrollo del CaP y el cruce entre ellas (Felgueiras *et al.* 2014)

2.4.1 Vía de señalización de RA

El receptor de andrógenos (RA) es un factor de transcripción que dirige la regulación génica en respuesta a ligandos androgénicos, incluyendo la testosterona y su derivado dihidrotestosterona (DHT). La señalización de RA juega un rol central en el crecimiento, diferenciación y función de los genitales masculinos internos y externos, y por lo tanto, es crítica para la fertilidad masculina, aunque también tiene un rol en la fertilidad y reproducción femenina, siendo expresada en los ovarios y el endometrio uterino (Querol *et al.*, 2013).

En el epitelio prostático y las células estromales, la testosterona es convertida a su forma más activa DHT, por la enzima 5- α -reductasa. La testosterona o DHT se une al sitio de unión a ligando del RA, causando un cambio de conformación y la activación del receptor. Esto permite la formación del homodímero y la translocación del RA del citoplasma al núcleo. Dentro del núcleo, el RA se une a los elementos de respuesta, reclutando co-factores (co-activadores o correpresores) que regulan la transcripción de genes diana (Figura 8). En células prostáticas malignas, la vía de señalización de RA conduce a un crecimiento incontrolado y el balance entre la tasa de proliferación celular y la tasa de apoptosis se pierde (Schalken *et al.*, 2015). El RA en ausencia de andrógenos se encuentra inactivo en el citoplasma, unido a proteínas de shock térmico (Hsp 70 y Hsp 90) y sus chaperonas formando un complejo dinámico (Levalle y Lalosa 2015).

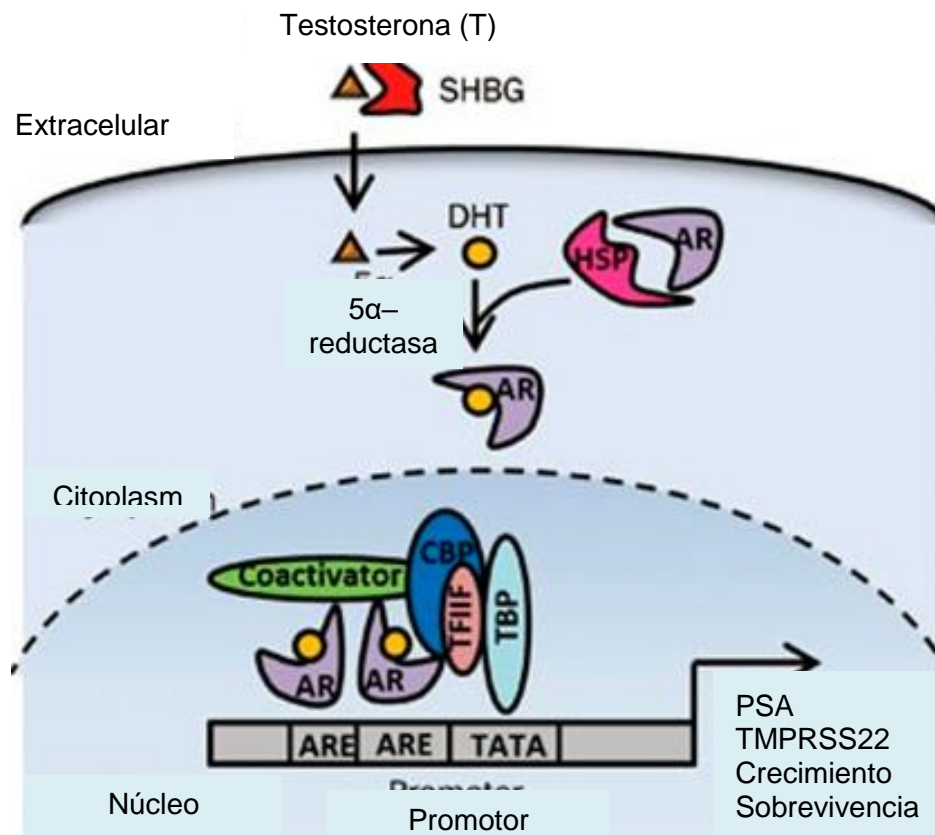


Figura 8. Vía de señalización de RA (Tan *et al.*, 2014).

2.4.2 Vías de señalización involucradas con estrógenos

Los niveles de estrógenos circulantes en hombres tienden a incrementar con la edad, debido a que existe una descomposición de andrógenos y una predominancia de estrógenos, los cuales pueden regular el crecimiento prostático directa o indirectamente por vía de regulación de otras hormonas, tales como prolactina u hormona luteinizante (Felgueiras, 2014).

Los receptores de estrógenos (RE) también exhiben una activación de otras vías: fosfolipasa C/proteína quinasa C, Ras/Raf/proteína quinasa activada por mitogenos (MAPK), quinasa de fosfatidil inositol (PI3K)/Akt, cAMP/PKA. Diferentes genes codifican dos subtipos de RE, RE α y RE β , los cuales exhiben diversas isoformas. Las isoformas de RE β influyen en la próstata humana de diferentes maneras, dependiendo la variante expresada y el uso de los promotores alternativos, por ejemplo RE β 1 inhibe la proliferación de las células prostáticas epiteliales y la transición epitelial-mesenquimal, mientras RE β 2/5 promueve la metástasis (Felgueiras, 2014).

2.4.3 Vía de señalización activada por IGF-1 y PI3K/Akt

El factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-1) produce en las células prostáticas estromales en respuesta a una estimulación de andrógenos. En células normales, esta vía es reprimida por las proteínas de unión a IGF (IGFBPs), el cual se une con alta afinidad a IGF-1 y evita su interacción con el receptor. La activación sostenida de la vía de señalización de IGF-1 es responsable de la proliferación de las células de cáncer de próstata (Felgueiras, 2014).

En general los efectos de esta vía en CaP son debido a la amplificación del gen Akt o sus quinasas río arriba como PI3K, delección/mutación de reguladores negativos tales como PTEN, PPP1 y PPP2 (Felgueiras, 2014).

2.4.4 IL-6 y señalización de JAK/STAT

Las interleucinas, especialmente IL-6, han mostrado jugar un rol importante en el desarrollo y progresión del CaP. IL-6 se une a su receptor y activa la señalización celular de JAK (Felgueiras, 2014).

La iniciación de JAK estimula la proliferación, diferenciación y migración celular. Las mutaciones que disminuyen la actividad de la vía JAK/STAT inhiben estas funciones, mientras que aquellas que activan o fallan para regular la señalización de JAK correctamente, causan enfermedad inflamatoria y un rango de cánceres incluyendo el cáncer de próstata (Joshi *et al.*, 2015).

Subsecuente a la activación de JAK, el transductor de la señal y activador de la transcripción 3 (STAT3) es fosforilado y traslocado al núcleo. STAT3 fosforila el AR en la serina 772, un proceso esencial para su actividad transcripcional (Felgueiras, 2014).

2.5 Fármacos Anti-andrógenos

El creciente reconocimiento de la dependencia de andrógenos de las células de cáncer de próstata condujo al desarrollo de anti-andrógenos de primera generación. Ciproterona (CPA) fue el primer anti-andrógeno esteroideo “puro”, bloqueando la unión de la dihidrotestosterona al RA, sin embargo, como efectos secundarios provocaba la pérdida de libido e impotencia por lo que la búsqueda de anti-andrógenos no esteroideos puros inició. Los anti-andrógenos no esteroideos actúan solo en los receptores androgénicos y su efecto local causa un incremento en suero de testosterona, la cual preserva la libido y potencia en muchos pacientes (Wong *et al.*, 2014).

La flutamida fue el primer anti-andrógeno no esteroideo aprobado por la FDA en 1989 para el tratamiento del cáncer de próstata (Wong *et al.*, 2014), pero debido a la significativa toxicidad gastrointestinal ha sido remplazada por bicalutamida y nilutamida, aprobadas por FDA en 1995 y 1996, respectivamente (Park y Eisenberg, 2015). Sin embargo, las limitaciones de los anti-andrógenos de primera generación formaron la base para el desarrollo de anti-andrógenos de segunda generación.

2.5.1 Enzalutamida

La enzalutamida es un fármaco anti-andrógeno de segunda generación derivado de feniltiohidantoína con una sulfonamida en la cadena lateral (Figura 10)

(Guerrero et al., 2013), que afecta la vía de señalización de los RA en tres etapas clave: ejerciendo su efecto mediante el bloqueo de la unión de los andrógenos al RA, por inhibición de la translocación nuclear de RA activo, y por alterar la unión con el DNA (Figura 11) (Schalken y Fitzpatrick, 2015).

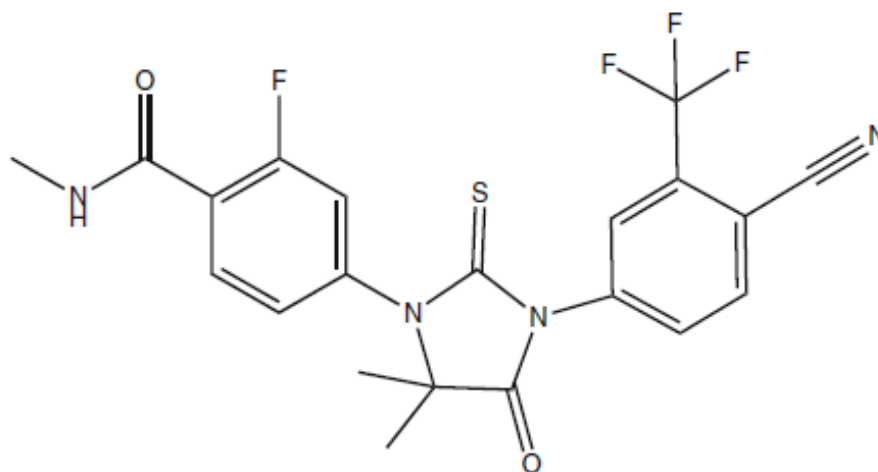


Figura 9. Estructura química de la enzalutamida (Stanford, 2013).

A diferencia de los anti-andrógenos de primera generación, como la bicalutamida, la enzalutamida no induce efectos agonistas en la señalización de AR en células que sobreexpresan AR de tipo salvaje (Guerrero et al. 2013).

La enzalutamida fue aprobada en el 2012 inicialmente como tratamiento para el cáncer de próstata metastásico resistente a castración (mCRPC) después de la quimioterapia con docetaxel, seguido de la ampliación de la indicación para su uso en pacientes sin tratamiento previo de quimioterapia en 2014 (Park y Eisenberg, 2015).

Este fármaco no requiere un tratamiento concurrente con corticoesteroides, y su absorción no está afectada por la ingesta de alimentos; sin embargo, se asocia con un bajo riesgo de sufrir convulsiones (<1%), por lo tanto debe evitarse en pacientes con enfermedades subyacentes que predisponen a una convulsión (Park y Eisenberg, 2015).

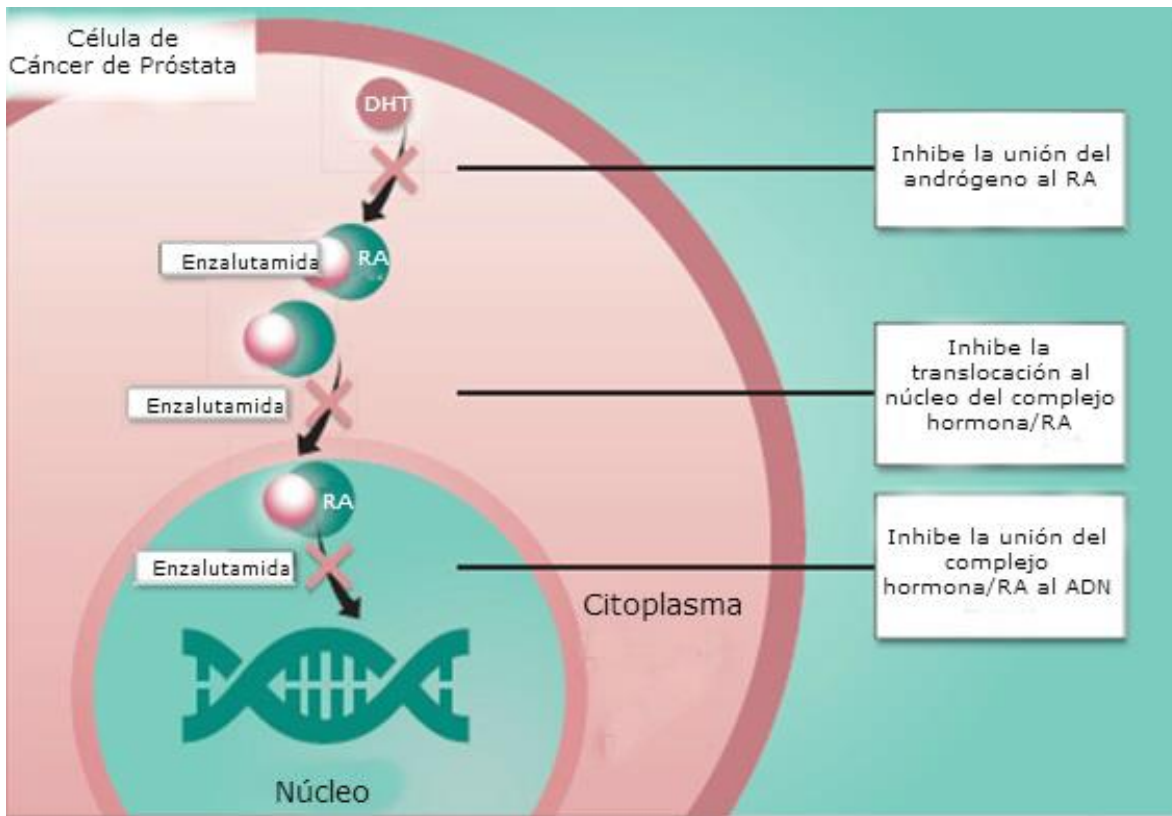


Figura 10. Mecanismo de acción de enzalutamida (Schalken y Fitzpatrick, 2015).

La enzalutamida tiene una afinidad de dos a tres veces menor para el RA que la dihidrotestosterona, sin embargo, esta afinidad es ocho veces mayor para el receptor que los anti-andrógenos de primera generación como la bicalutamida. Por otra parte, la enzalutamida mantiene su antagonismo puro en células prostáticas que sobreexpresan RA (Ramadan, 2015).

2.6 Stevia

Stevia, es un género de plantas herbáceas y arbustivas distribuido exclusivamente en el continente Americano, desde el sur de Estados Unidos hasta el centro y sur de América. Más de 200 especies pertenecen a este género, la mayoría de las especies están distribuidas entre México (aproximadamente 100 especies) y Brasil (aproximadamente 40 especies). Los miembros de *Stevia* crecen en una variedad de hábitats que van desde el bosque montañoso hasta las orillas de ríos y valles secos, prefiriendo climas semi-húmedos o fríos (Ferrazzano *et al*, 2015).

El género *Stevia* tiene una amplia variedad en su composición química, la cual ha sido blanco de estudios fitoquímicos, que han permitido encontrar algunos de los metabolitos que presenta esta especie, como lo son: aceites esenciales y otros constituyentes volátiles, derivados de la acetofenona, benoxofurano y cromeno, sesquiterpenos, diterpenos, tetracíclicos, triterpenos y esteroides, flavonoides (Álvarez-García, 2005).

Varios de los compuestos obtenidos de *Stevia* son conocidos por poseer actividades biológicas importantes, por ejemplo, los flavonoides han mostrado tener actividades antimicrobianas y antifúngicas, aunadas a acciones anticancerígenas, antiinflamatorias y antioxidantes; los sesquiterpenos, ejercen actividad antiinflamatoria y pro-apoptótica (Cariño-Cortés *et al.*, 2007).

Numerosas especies de *Stevia* son conocidas por sus usos etnofarmacológicos, algunas utilizadas para el tratamiento de condiciones cardiacas (*S. cardiatica* Perkins), como antidiarreico (*S. balansae* Hieron, *S. trifida*) o diurético (*S. eupatoria*, *S. pilosa*) por poner algunos ejemplos (Ferrazzano *et al.*, 2015).

Tabla 3. Usos medicinales de algunas especies de *Stevia*. (Ferrazzano *et al.*, 2015).

| Especies | Usos Medicinales |
|--------------------------------------|---|
| <i>S. balansae</i> Hieron | Afecciones intestinales |
| <i>S. cardiatica</i> Perkins | Enfermedades cardiacas |
| <i>S. connata</i> Lag. | Afecciones gástricas |
| <i>S. eupatoria</i> (Spreng) Willd | Enfermedades renales |
| <i>S. glandulosa</i> Hook & Arn | Antipirético |
| <i>S. lucida</i> Lag. | Analgésico, antiinflamatorio |
| <i>S. nepetifolia</i> H.B.K. | Afecciones ginecológicas |
| <i>S. pilosa</i> Lag. | Enfermedades renales e intestinales. Antipirético |
| <i>S. puberula</i> Hook | Afecciones gástricas |
| <i>S. rebaudiana</i> (Bert.) Bertoni | Afecciones ginecológicas |
| <i>S. rhombifolia</i> Kunth | Afecciones gástricas |
| <i>S. salicifolia</i> Cav. | Afecciones intestinales, antireumático |
| <i>S. serrata</i> Cav. | Antitusivo |
| <i>S. trifida</i> Lag. | Afecciones gastrointestinales |

2.6.1 *Stevia pilosa* y *Stevia eupatoria*

Se han realizado análisis de la composición química en raíces de *Stevia eupatoria* y se obtuvieron los compuestos acetato 8-14-seco-oleana-8(26)-13(14)-dien-3 β -iol, β -Sitosterol, estigmasterol, friedelanol y derivados de longipineno; mientras que para *Stevia pilosa* se aislaron β -Sitosterol, estigmasterol así como derivados de longipineno (Pérez-Pérez, 2006).

2.7 Fitoesteroles

Los fitoesteroles (esteroles de plantas) son la contraparte del colesterol en productos de origen animal. Los fitoesteroles más comunes en la dieta son β -sitosterol, campesterol y estigmasterol, representando alrededor de 50% - 65%, 10% - 40% y 0 - 35%, respectivamente (Zhao *et al.*, 2009). Las mejores fuentes dietéticas de fitoesteroles son los aceites vegetales sin refinar, nueces, semillas y legumbres (Awad y Fink, 2000). El interés en estudiar a los fitoesteroles radica en sus efectos para reducir la absorción del colesterol de la dieta ofreciendo protección para enfermedades cardiovasculares, y en años recientes que presentan propiedades anticancerígenas (Awad y Fink, 2000). Estudios en animales han demostrado que una dieta que contiene una mezcla de 2% de fitoesteroles inhibe el crecimiento celular del cáncer, reduce el tamaño del tumor, y disminuye la incidencia de cáncer de colón, mama y próstata inducidos por carcinógenos específicos (Zhao *et al.*, 2009).

3. JUSTIFICACIÓN

El cáncer de próstata inicialmente responde a la terapia anti-andrógenos. Sin embargo, las células prostáticas cancerígenas logran crear resistencia, hecho que limita la efectividad de los fármacos, por lo que se ha dado marcha a la búsqueda de alternativas contra el cáncer que sean más efectivas, que potencien la respuesta de las drogas terapéuticas ya existentes y permitan detener la migración de las células cancerosas. Posibles candidatos propuestos en este trabajo son *Stevia pilosa* y *Stevia eupatoria*, ya que como parte de su composición química presentan polifenoles y fitoesteroles, los cuales han demostrado que tienen efecto anticancerígeno contra los cánceres de mama, pulmón y colon.

4. HIPÓTESIS

Los extractos de *Stevia pilosa* y *Stevia eupatoria* inhiben la proliferación y la migración de células de cáncer de próstata responsivas a andrógenos LNCaP y no responsivas a andrógenos PC-3.

5. OBJETIVOS

5.1 General

Evaluar el efecto de los extractos de *Stevia pilosa* y *Stevia eupatoria* en la proliferación y migración en células de cáncer de próstata responsivas a andrógenos LNCaP y no responsivas a andrógenos PC-3.

5.2 Específicos

- Examinar la toxicidad de los extractos de *Stevia pilosa* y *Stevia eupatoria* en células no transformadas.
- Evaluar los cambios inducidos por los extractos de *Stevia pilosa* y *Stevia eupatoria* en la proliferación de células de cáncer de próstata LNCaP y PC-3.
- Estudiar mediante el ensayo herida, el efecto de *Stevia pilosa* y *Stevia eupatoria* sobre la migración de células de cáncer de próstata andrógeno dependiente y andrógeno independientes.
- Evaluar el efecto de la combinación del extracto de *Stevia pilosa* con enzalutamida en la proliferación de células de cáncer de próstata LNCaP y PC-3.
- Analizar el efecto de la combinación del extracto de *Stevia eupatoria* con enzalutamida en la proliferación de ambas líneas celulares de cáncer de próstata.
- Estudiar con la técnica de ensayo herida la migración de las células de cáncer de próstata expuestas a la combinación de *Stevia pilosa* con enzalutamida y *Stevia eupatoria* con enzalutamida.

6. METODOLOGÍA

6.1 Cultivo celular

La línea celular PC-3 fue adquirida en ATCC. La línea LNCaP fue amablemente donada por la Dra. Brenda Anguiano del Instituto de Neurobiología, UNAM, campus Juriquilla y la línea celular de Fibroblastos humanos fue proporcionada por la Dra. Claudia Lucía Vargas Requena, del laboratorio de Biotecnología de la Universidad Autónoma de Ciudad Juárez. Estas células se cultivaron en medio F-12K, RMPI-1640 y DMEM respectivamente, cada uno con 10% de suero fetal bovino, 50 µL de solución de suplemento penicilina-estreptomicina-fungizona a 37°C en una atmósfera humidificada de 95% aire y 5% CO₂.

6.2 Ensayo de proliferación celular

Células LNCaP y PC-3 se sembraron en placas de cultivo de 24 pozos durante 48 horas en medio de cultivo suplementado con 10% de SFB y una mezcla de antibióticos y antimicóticos. Posteriormente, se reemplazó el medio viejo por medio fresco y se trataron con diferentes concentraciones de los extractos metanólicos de raíz de *Stevia pilosa* y *Stevia eupatoria* (250, 500, 1000, 2000, 2500 y 3000 µg/ml), los cuales fueron proporcionados por la Dra. Raquel Cariño Cortés de la Universidad Autónoma de Hidalgo (UAEH), y se disolvieron en agua destilada. Del mismo modo se realizó el ensayo de proliferación para la Enzalutamida a diferentes concentraciones (10, 20, 30, 40 y 50 µM), el fármaco fue disuelto en DMSO y una misma cantidad de DMSO se agregó a todos los grupos incluyendo el control. Después de 48h de estos tratamientos, las células fueron tripsinizadas y contadas con ayuda del hematocitómetro y azul tripano. El número de células se determinó contando cada muestra por triplicado.

6.3 Ensayo herida

Se cultivaron las células PC-3 en una placa de 6 pocillos hasta confluencia (90%), tres heridas por pocillo se realizaron con ayuda de una punta estéril amarilla (P200), arrastrándola por la monocapa con un ángulo de inclinación de 30 grados

(no perpendiculares a la placa) y guiándose con una regla flameada para hacerlo lo más recto posible, sin retirar el medio. Posterior a la herida, el medio fue retirado de las placas y se lavaron suavemente con 1 mL de PBS, para finalmente agregar el medio nuevo con o sin tratamiento.

Se tomaron fotografías a tiempo de 0, 24, 48 y 72h para observar el avance del cierre de la herida. El ensayo fue realizado por triplicado.

6.4 Análisis estadístico

Para encontrar diferencias significativas en las pruebas de proliferación celular, se llevaron a cabo análisis de varianza (ANOVA) de una vía con prueba *post hoc* Tukey, análisis de varianza de dos vías con prueba *pos hoc* Sidak para 3 experimentos independientes con 3 réplicas cada uno.

7. RESULTADOS

7.1 Fibroblastos humanos. Curva de proliferación.

Se realizó una curva de proliferación con fibroblastos humanos, con el fin de observar el efecto que tenía el extracto metanólico de *Stevia pilosa* (*S. pilosa*) en células no transformadas. En la figura 11, se muestra que las concentraciones de 250 µg/mL, 500 µg/mL y 1000 µg/mL no tienen diferencia significativa con respecto al control, sin embargo, a partir de la concentración de 2000 µg/mL, se reduce el porcentaje de células vivas.

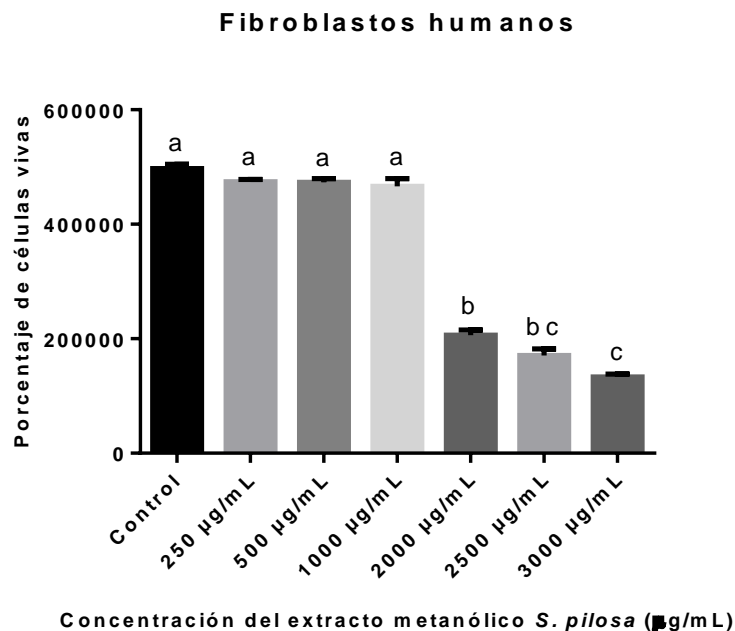


Figura 11. Efecto del extracto metanólico de *Stevia pilosa* en la proliferación de fibroblastos humanos con 48 horas de tratamiento. La gráfica representa la media \pm EE de 3 experimentos independientes. Para el análisis estadístico se realizó un ANOVA con prueba *post hoc* Tukey ($P < 0.05$).

El extracto metanólico de *Stevia eupatoria* (*S. eupatoria*) fue probado sobre la proliferación de fibroblastos humanos, teniendo como resultado diferencia

significativa con respecto al control a partir de los 2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$, por lo que el extracto fue seguro de usar hasta los 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Figura 12).

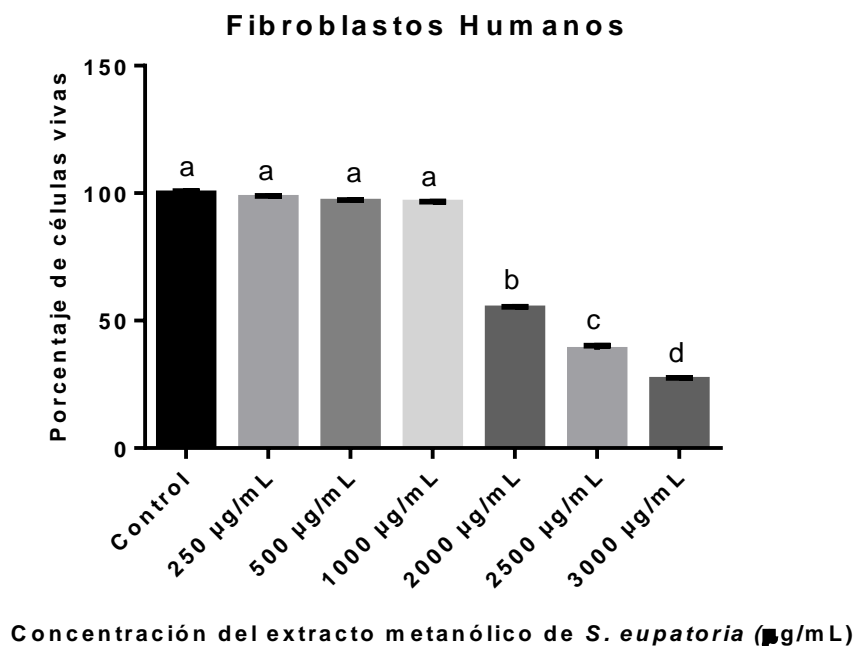


Figura 12. Efecto del extracto metanólico de *Stevia eupatoria* en la proliferación de fibroblastos humanos con 48 horas de tratamiento. La gráfica representa la media \pm EE de 3 experimentos independientes. Para el análisis estadístico se realizó un ANOVA con prueba *post hoc* Tukey ($P < 0.05$).

7.2 Células andrógeno dependientes LNCaP.

7.2.1. Curva de proliferación con *Stevia pilosa*.

En el caso de las células andrógeno dependientes (LNCaP) se observó una disminución en el porcentaje de células vivas dependiente de la concentración del extracto metanólico de *Stevia pilosa*, presentando diferencia significativa con respecto al control a partir de los 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Figura 13).

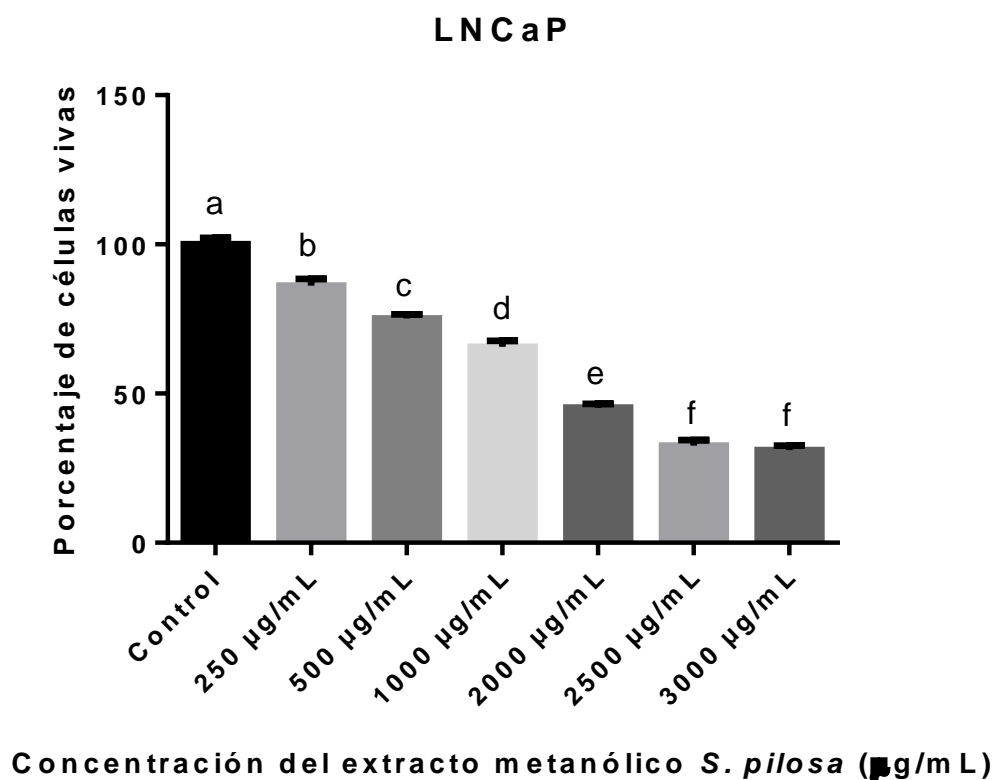


Figura 13. Efecto del extracto metanólico de *Stevia pilosa* en la proliferación de células andrógeno dependientes con 48 horas de tratamiento. La gráfica representa la media \pm EE de 3 experimentos independientes. Para el análisis estadístico se realizó un ANOVA con prueba *post hoc* Tukey ($P < 0.05$).

7.2.2 Curva de proliferación con *Stevia eupatoria*

En el tratamiento con *Stevia eupatoria* se encontró una diferencia significativa con respecto al control en la disminución del porcentaje de células a partir de los 250 µg/mL, sin embargo, no se observó diferencia significativa entre 250 µg/mL, 500 µg/mL y 1000 µg/mL (Figura 14).

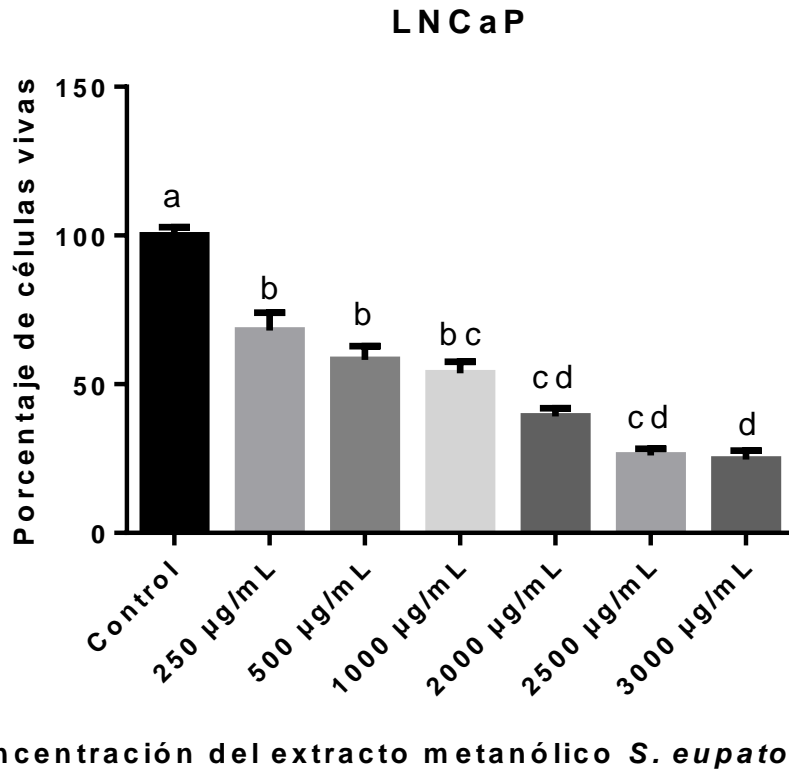


Figura 14. Efecto del extracto metanólico de *Stevia eupatoria* en la proliferación de células andrógeno dependientes con 48 horas de tratamiento. La gráfica representa la media \pm EE de 3 experimentos independientes. Para el análisis estadístico se realizó un ANOVA con prueba *post hoc* Tukey ($P < 0.05$).

7.2.3 Comparación del efecto del extracto metanólico de *Stevia pilosa* vs el extracto metanólico de *Stevia eupatoria* en LNCaP.

Se realizó una gráfica comparativa entre los extractos, observándose que no había diferencia significativa entre el efecto antiproliferativo de *S. pilosa* y *S. eupatoria* (Figura 15).

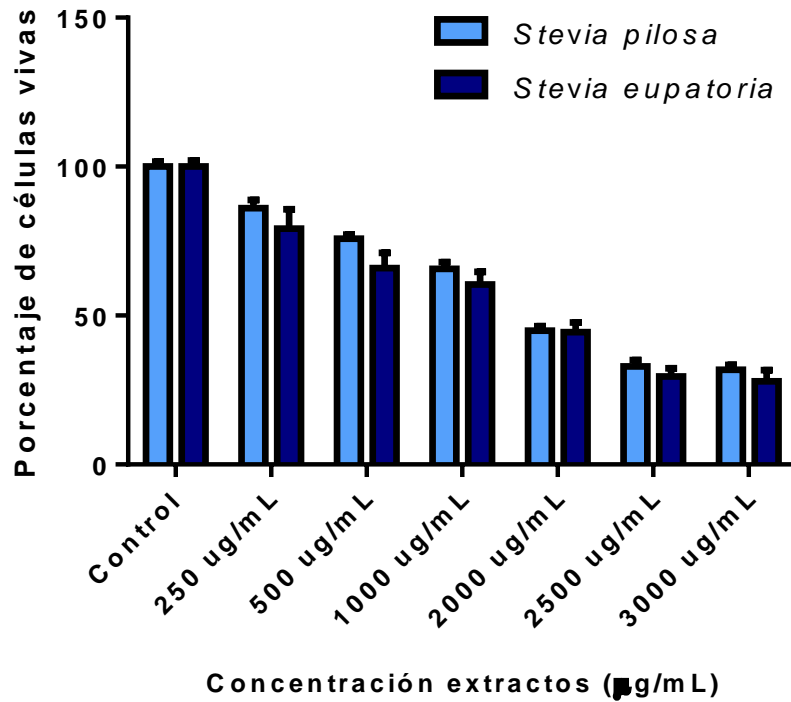


Figura 15. Comparación entre los extractos metanólicos de *Stevia pilosa* y *Stevia eupatoria* en la proliferación de células andrógeno dependientes con 48 horas de tratamiento. La gráfica representa la media \pm EE de 3 experimentos independientes. Para el análisis estadístico se realizó un ANOVA de dos vías con prueba *post hoc* Sidak ($P < 0.05$).

7.2.4 Curva de proliferación con Enzalutamida

Se observó una disminución en el porcentaje de células vivas dependiente de la concentración del fármaco enzalutamida, registrando el mayor efecto en la concentración de 40 μ M (Figura 16).

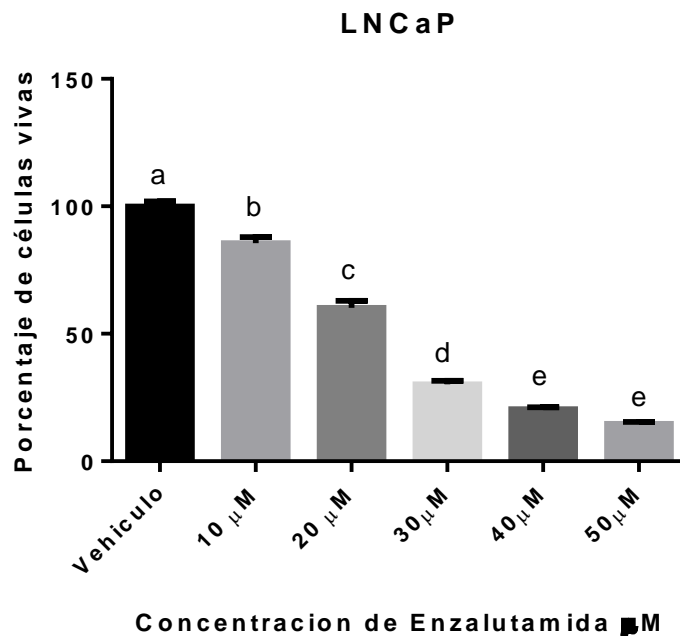


Figura 16. Efecto de la enzalutamida en la proliferación de células andrógeno dependientes con 48 horas de tratamiento. Se muestra la media \pm EE de 3 experimentos independientes. Para el análisis estadístico se realizó un ANOVA con prueba *post hoc* Tukey ($P < 0.05$).

7.2.5 Combinación de los extractos metanólicos de *Stevia pilosa* y *Stevia eupatoria* con enzalutamida.

Para la combinación se eligieron las concentraciones de 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de los extractos en conjunto con 40 μM de enzalutamida.

El tratamiento combinatorio de 40 μM de enzalutamida con 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ del extracto metanólico de *Stevia pilosa* y la combinación de 40 μM de enzalutamida con 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ del extracto metanólico de *Stevia pilosa* presentaron una disminución en el porcentaje de células vivas en un 77% y 80% respectivamente, este porcentaje resultó ser menor al que se registró con el tratamiento individual del extracto metanólico de *Stevia pilosa*, sin embargo, el resultado de la combinación es estadísticamente igual al mostrado con el tratamiento de enzalutamida (figura 17).

En la combinación con el extracto metanólico de *S. eupatoria* (figura 18), se observó un comportamiento similar al presentado con el extracto metanólico de *S. pilosa*, donde la combinación de enzalutamida con el extracto muestran una disminución significativa con respecto al tratamiento usando solo el extracto pero, una reducción del porcentaje de células vivas estadísticamente igual al mostrado con el tratamiento individual de enzalutamida.

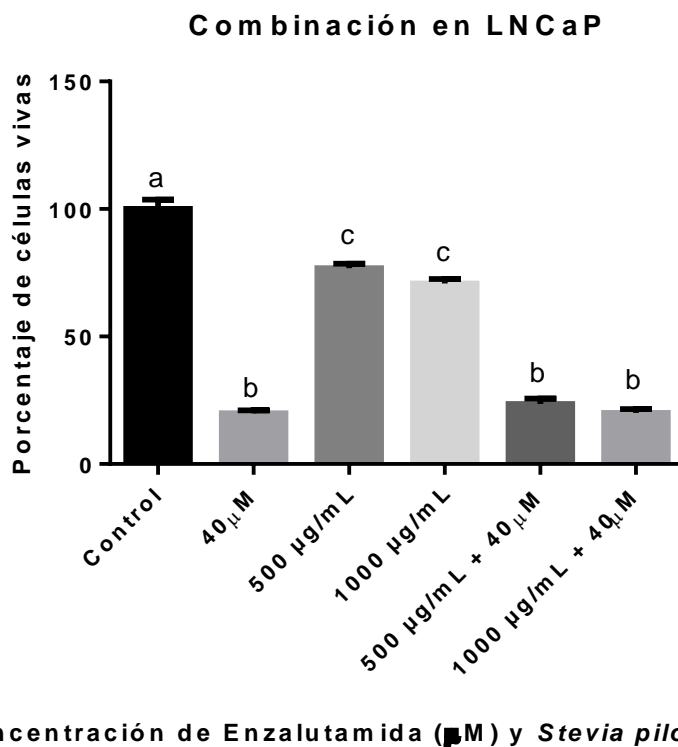


Figura 17. Efecto de la combinación de enzalutamida con el extracto metanólico de *Stevia pilosa* sobre la proliferación de células andrógeno dependientes con 48 horas de tratamiento. Se muestra la media \pm EE de 3 experimentos independientes. Para el análisis estadístico se realizó un ANOVA con prueba *post hoc* Tukey ($P < 0.05$).

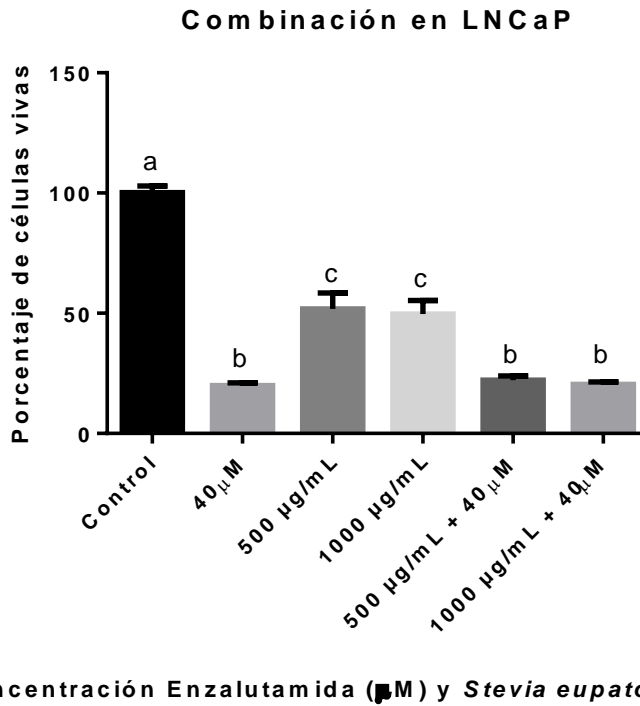


Figura 18. Efecto de la combinación de enzalutamida con el extracto metanólico de *Stevia eupatoria* sobre la proliferación de células andrógeno dependientes con 48 horas de tratamiento. Se muestra la media \pm EE de 3 experimentos independientes. Para el análisis estadístico se realizó un ANOVA con prueba *post hoc* Tukey ($P < 0.05$).

7.3 Células andrógeno independientes PC-3.

7.3.1 Curva de proliferación con *Stevia pilosa*.

Para las células andrógeno independientes, se observó un efecto dependiente de la concentración del extracto metanólico de *Stevia pilosa*, presentando una diferencia significativa sobre la disminución del porcentaje de células vivas a partir de los 250 μ g/mL (figura 19).

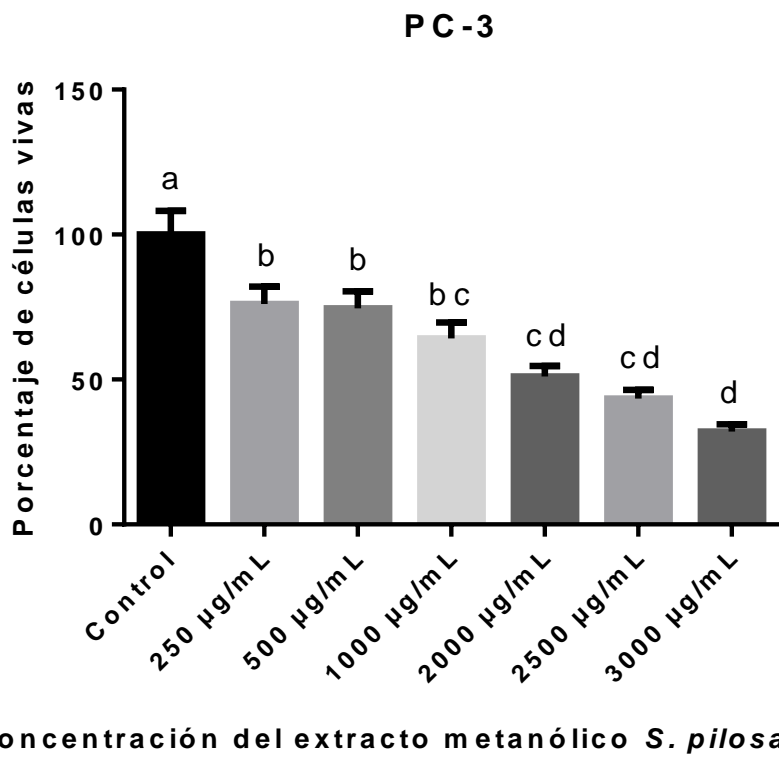


Figura 19. Efecto del extracto metanólico de *Stevia pilosa* sobre la proliferación de células andrógeno independientes con 48 horas de tratamiento. Se muestra la media \pm EE de 3 experimentos independientes. Para el análisis estadístico se realizó un ANOVA con prueba *post hoc* Tukey ($P < 0.05$).

7.3.2 Curva de proliferación con *Stevia eupatoria*.

El efecto que el extracto de *Stevia eupatoria* presentó en esta curva, es dependiente de la concentración y disminuye el porcentaje de células vivas de manera significativa a partir de los 250 µg/mL (figura 20).

PC-3

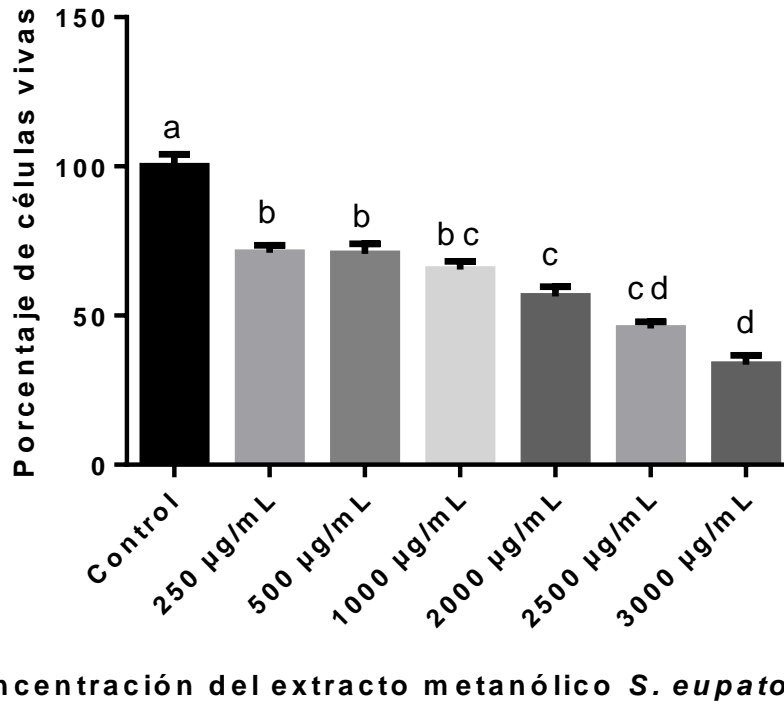


Figura 20. Efecto del extracto metanólico de *Stevia pilosa* sobre la proliferación de células andrógeno independientes con 48 horas de tratamiento. Se muestra la media \pm EE de 3 experimentos independientes. Para el análisis estadístico se realizó un ANOVA con prueba *post hoc* Tukey ($P < 0.05$).

7.3.3 Comparación del efecto del extracto metanólico de *Stevia pilosa* vs el extracto metanólico de *Stevia eupatoria*.

Se hizo la comparación del efecto que ambos extractos metanólicos de *Stevia* estaban presentando en las células andrógeno independientes (figura 21), para poder conocer cuál de los dos extractos tenía mayor efecto sobre estas células. Al hacer el análisis estadístico, se observó que el extracto metanólico de *S. pilosa* y el extracto metanólico de *S. eupatoria* no presentaban diferencia significativa.

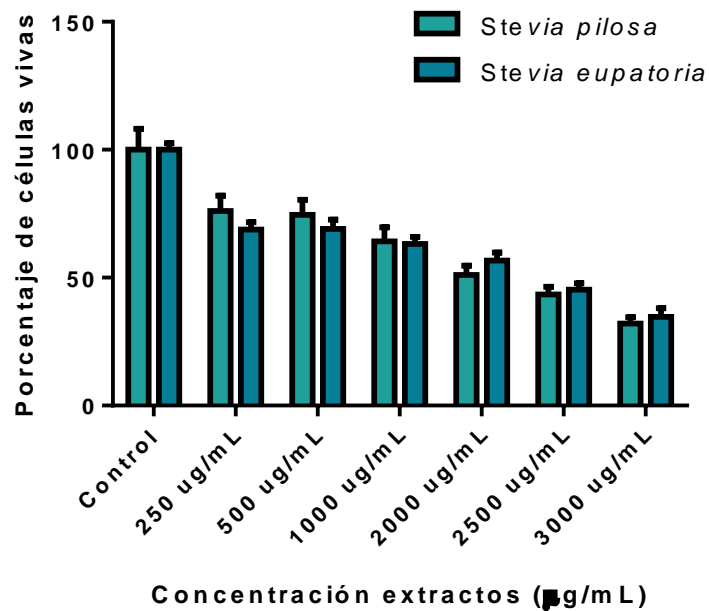


Figura 21. Comparación entre los extractos metanólicos de *Stevia pilosa* y *Stevia eupatoria* en la proliferación de células andrógeno independientes con 48 horas de tratamiento. La gráfica representa la media \pm EE de 3 experimentos independientes. Para el análisis estadístico se realizó un ANOVA de dos vías con prueba *post hoc* Sidak ($P < 0.05$).

7.3.4 Curva de proliferación con Enzalutamida

La disminución en el porcentaje de células vivas se mostró dependiente de la concentración del fármaco enzalutamida, registrando el mayor efecto en la concentración de 40 μ M (Figura 22).

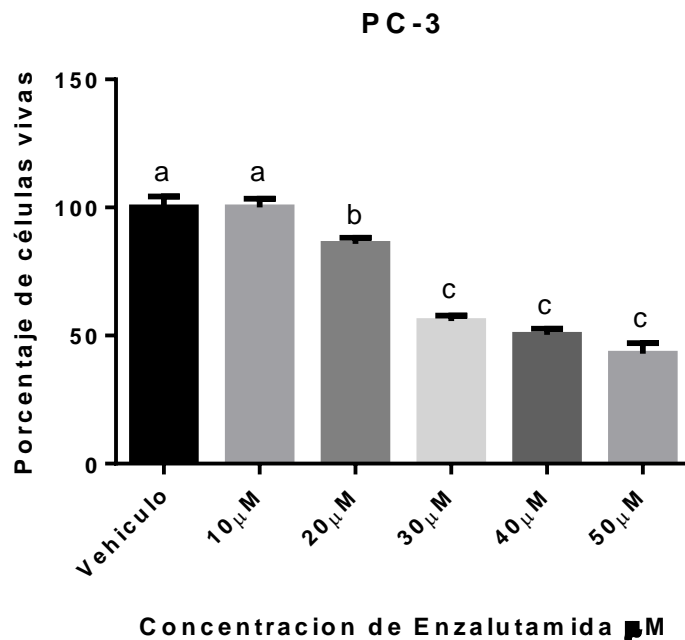


Figura 22. Efecto de la enzalutamidda en la proliferación de células andrógeno independientes con 48 horas de tratamiento. Se muestra la media \pm EE de 3 experimentos independientes. Para el análisis estadístico se realizó un ANOVA con prueba *post hoc* Tukey ($P < 0.05$).

7.3.5 Combinación de los extractos metanólicos de *Stevia pilosa* y *Stevia eupatoria* con enzalutamida.

Para la combinación se eligieron las concentraciones de 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de los extractos en conjunto con 40 μM de enzalutamida.

El tratamiento combinatorio de 40 μM de enzalutamida con 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ del extracto metanólico de *Stevia pilosa* y la combinación de 40 μM de enzalutamida con 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ del extracto metanólico de *Stevia pilosa* presentaron una disminución en el porcentaje de células vivas en un 40% y 60% respectivamente, este porcentaje resultó ser menor al que se registró con el tratamiento individual del extracto metanólico de *Stevia pilosa*, sin embargo, el resultado de la combinación es estadísticamente igual al mostrado con el tratamiento de enzalutamida (figura 23).

En la combinación con el extracto metanólico de *S. eupatoria* (figura 24), se observó un comportamiento similar al presentado con el extracto metanólico de *S. pilosa*, donde la combinación de enzalutamida con el extracto muestran una disminución significativa con respecto al tratamiento usando solo el extracto pero, una reducción del porcentaje de células vivas estadísticamente igual al mostrado con el tratamiento individual de enzalutamida.

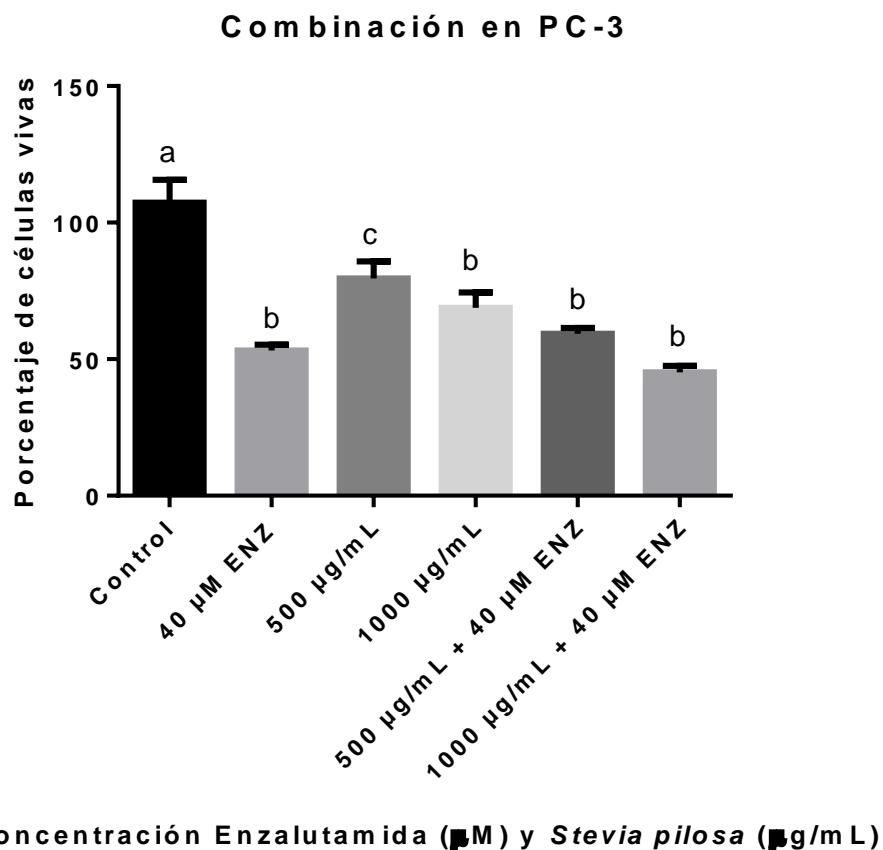


Figura 23. Efecto de la combinación de enzalutamida con el extracto metanólico de *Stevia pilosa* sobre la proliferación de células andrógeno independientes con 48 horas de tratamiento. Se muestra la media \pm EE de 3 experimentos independientes. Para el análisis estadístico se realizó un ANOVA con prueba *post hoc* Tukey ($P < 0.05$).

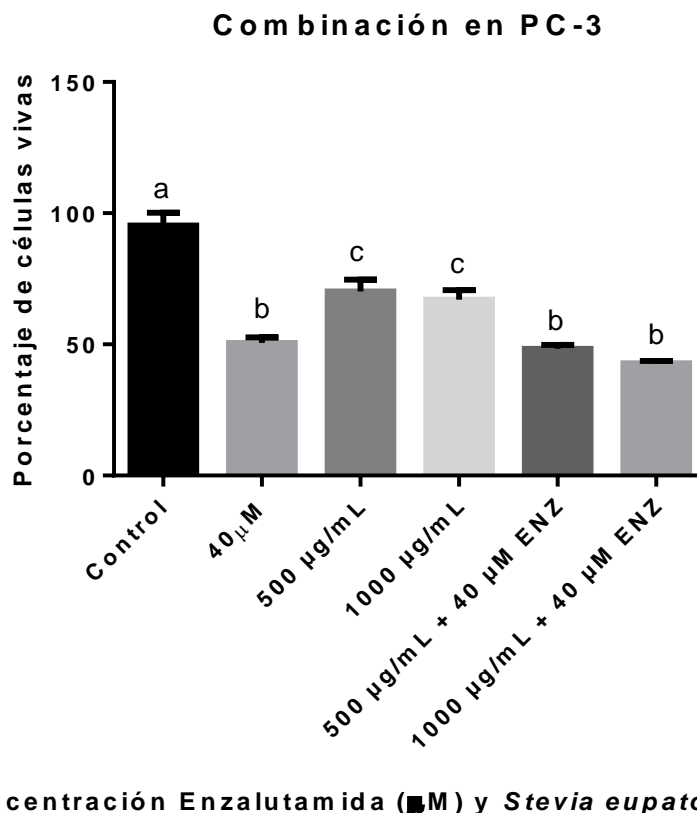


Figura 24. Efecto de la combinación de enzalutamida con el extracto metanólico de *Stevia eupatoria* sobre la proliferación de células andrógeno independientes con 48 horas de tratamiento. Se muestra la media \pm EE de 3 experimentos independientes. Para el análisis estadístico se realizó un ANOVA con prueba *post hoc* Tukey ($P < 0.05$).

7.3.6 Ensayo herida

Para evaluar el efecto de los extractos metanólicos de ambas especies de *Stevia* sobre la migración, se realizó en ensayo herida. En la figura 25, se muestra el resultado obtenido con *S. pilosa*, donde para las 24 horas se observó un cierre completo de la herida en el control, para la concentración de 250 μ g/mL se observó un cierre total a las 48 horas de tratamiento, mientras que para la concentración de 1000 μ g/mL, el cierre de la herida se presentó hasta las 72 horas y, finalmente, la concentración de 2500 μ g/mL no mostró cierre de la herida por al menos 72 horas.

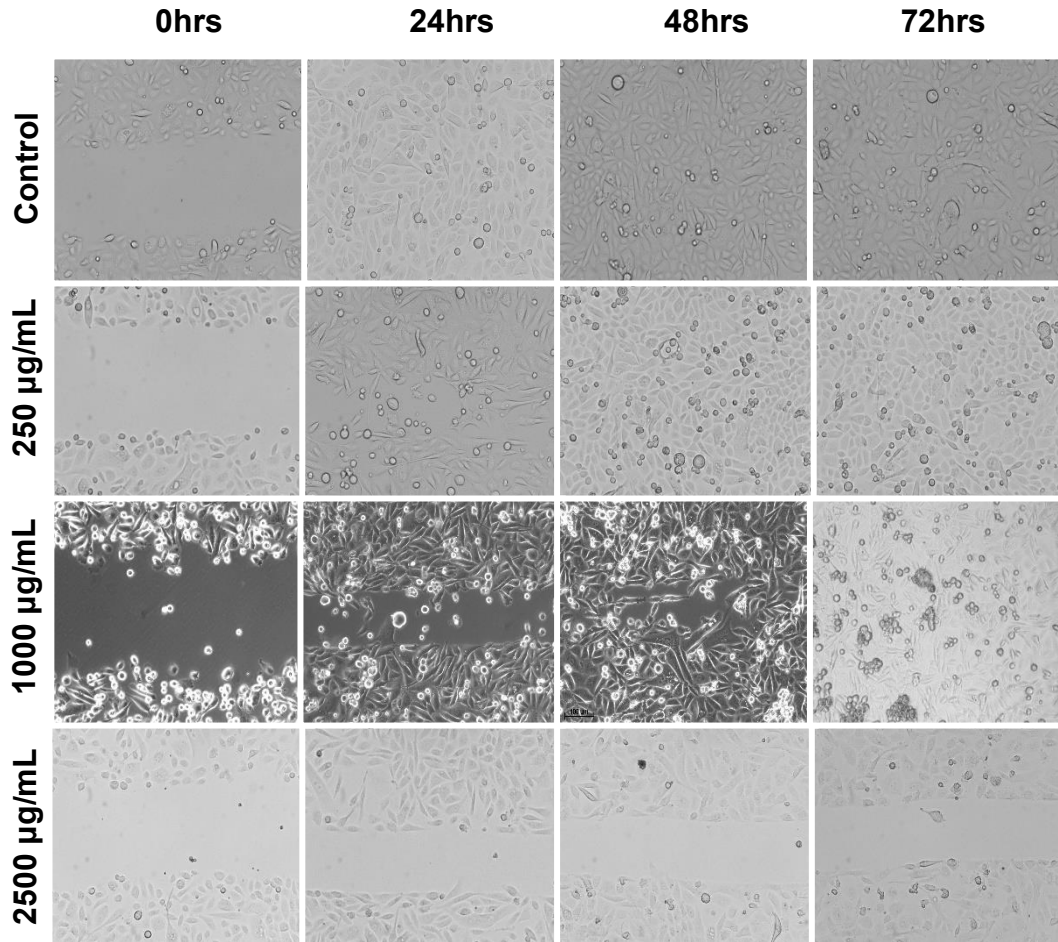


Figura 25. Micrografías del ensayo herida para las células andrógeno independientes (PC-3). Se muestra el efecto de *Stevia pilosa* sobre la migración en la línea celular PC-3 a las 24, 48, y 72 horas.

Con el extracto de *S. eupatoria* (figura 26), se observó un efecto similar que en *Stevia pilosa*, el control y la concentración de 250 µg/mL presentaron un cierre de la herida a las 24 horas, mientras que el cierre total para la concentración de 1000 µg/mL se pudo apreciar hasta las 72 horas, sin presentarse el cierre de la herida con la concentración de 2500 µg/mL.

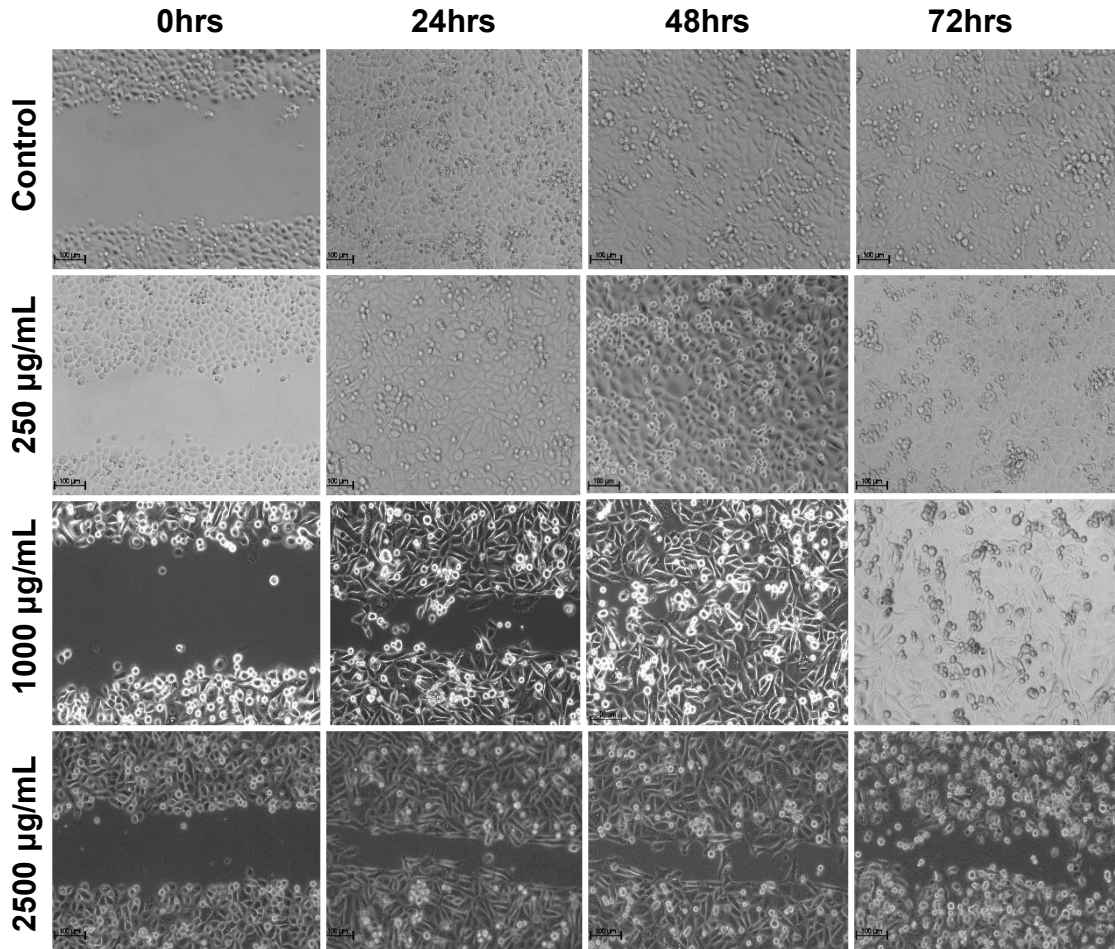


Figura 26. Micrografías del ensayo herida para las células andrógeno independientes (PC-3). Se muestra el efecto de *S. eupatoria* sobre la migración en la línea celular PC-3 a las 24, 48, y 72 horas.

Se realizó un análisis estadístico del efecto que ambos extractos presentaron sobre la migración de células andrógeno independientes, dónde se obtuvo como resultado que *Stevia pilosa* (figura 27) presentó un porcentaje de cierre de herida a las 24 horas de 100%, 83%, 54% y 37% para el control, 250 µg/mL, 1000 µg/mL y 2500 µg/mL respectivamente, cambiando estos porcentajes a 100%, 100%, 71% y 38% a las 48 horas, finalizando el ensayo a las 72 horas con los siguientes porcentajes: 100%, 100%, 100% y 40%.

Efecto de *Stevia pilosa* sobre la migración de células PC-3

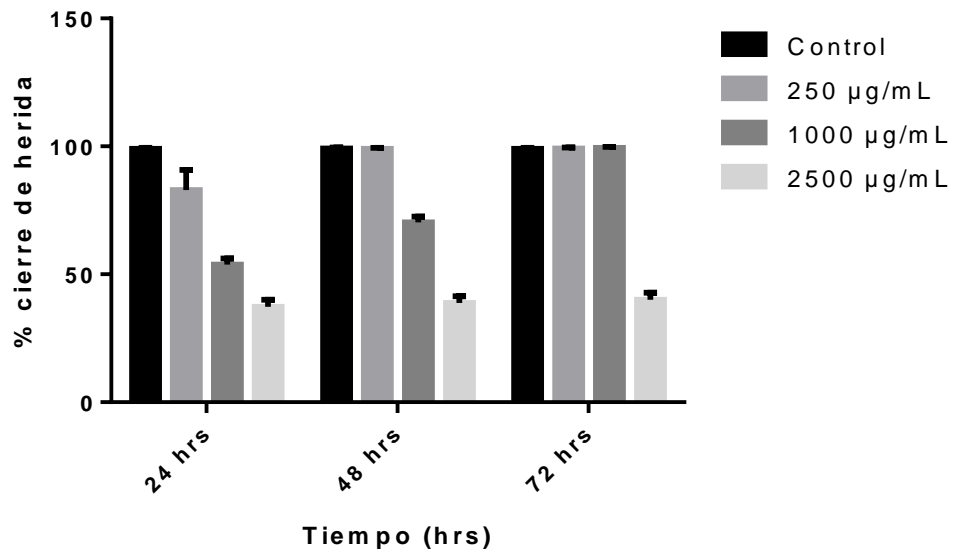


Figura 27. Efecto del extracto metanólico de *Stevia pilosa* sobre la migración celular en PC-3. Se muestra la media \pm EE de 3 experimentos independientes. Para el análisis estadístico se realizó un ANOVA de dos vías con prueba *post hoc* Tukey ($P < 0.05$).

Para el extracto metanólico de *S. eupatoria* (figura 28) los porcentajes de cierre de herida a las 24 horas fueron 100% para el control y 250 µg/mL, 54% para 1000 µg/mL y 42% para 2500 µg/mL. Los porcentajes se modificaron para las concentraciones de 1000 µg/mL y 2500 µg/mL en las siguientes 24 horas, mostrando un porcentaje de 77% y 48% respectivamente. Al finalizar el ensayo el cierre de la herida estaba cerrado en su totalidad con la concentración de 1000 µg/mL, mientras que para 2500 µg/mL, el porcentaje en el cierre fue de 55%.

Efecto de *Stevia eupatoria* sobre la migración de células PC-3

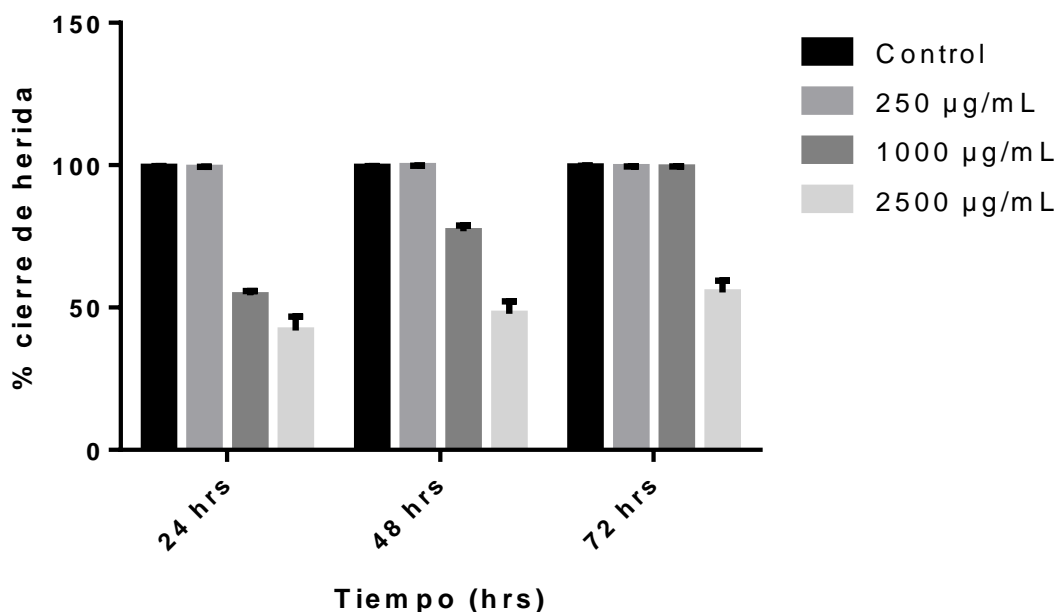


Figura 28. Efecto del extracto metanólico de *Stevia eupatoria* sobre la migración celular en PC-3. Se muestra la media \pm EE de 3 experimentos independientes. Para el análisis estadístico se realizó un ANOVA de dos vías con prueba *post hoc* Tukey ($P < 0.05$).

7.3.7 Ensayo herida para la combinación de los extractos metanólicos de *Stevia pilosa* y *Stevia eupatoria* con enzalutamida.

Se realizó el ensayo herida para las células andrógeno independientes tratadas con la combinación de los extractos de *Stevia* y la enzalutamida; en este caso, se utilizaron las concentraciones de 500 µg/mL de los extractos con 40 µM de enzalutamida y 1000 µg/mL de los extractos con 40 µM de enzalutamida. Los resultados obtenidos nos muestran que *Stevia pilosa* en combinación con el fármaco antiandrógeno no presenta cierre de la herida desde las 24 horas hasta las 72 horas (figura 29).

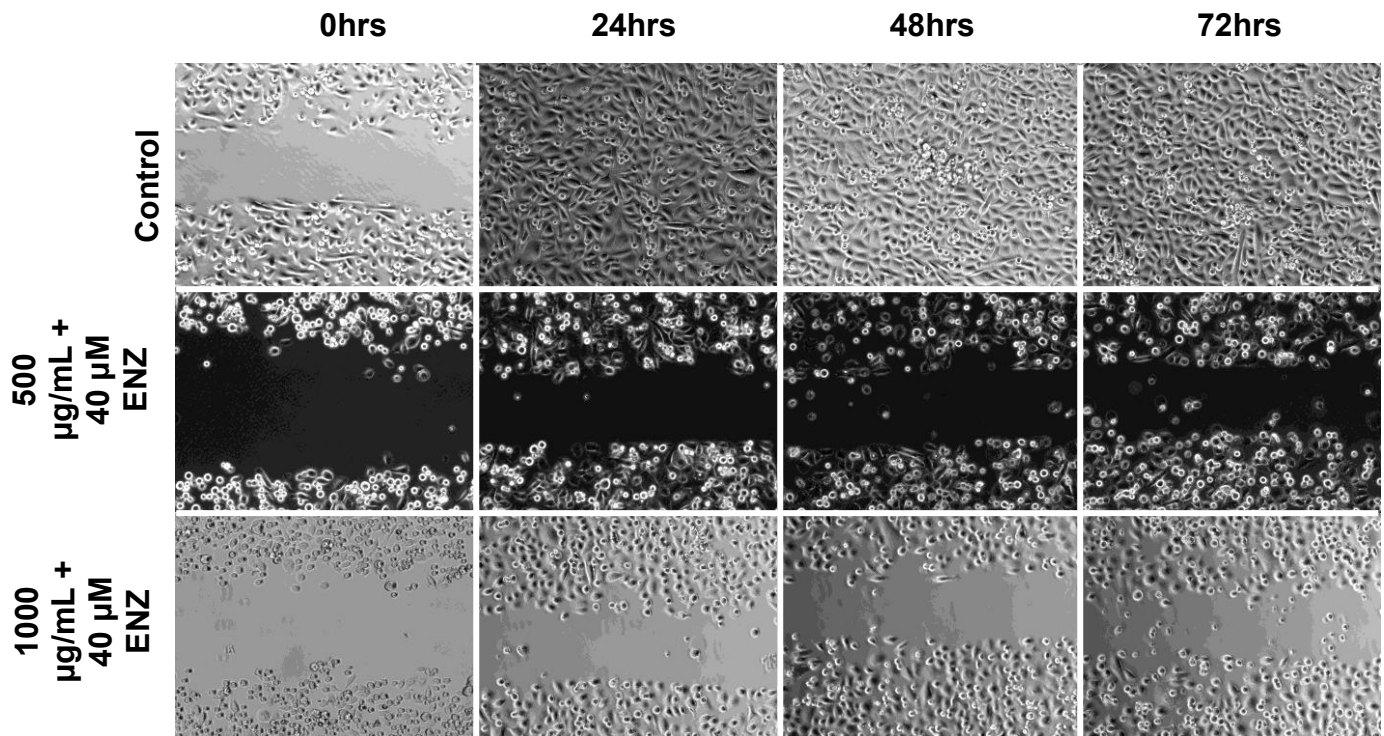


Figura 29. Micrografías del ensayo herida para las células andrógeno independientes (PC-3). Se muestra el efecto de la combinación de *S. pilosa* con enzalutamida sobre la migración en la línea celular PC-3 a las 24, 48, y 72 horas.

Para la combinación de *Stevia eupatoria* con enzalutamida, se observó el mismo comportamiento que con el extracto de *Stevia pilosa* durante las 72 horas de duración del ensayo (Figura 30).

Se llevó a cabo el análisis estadístico de los resultados obtenidos en el ensayo herida para las combinaciones, mostrando un cierre en la herida de 40%, 45% y 48% para las 24, 48 y 72 horas respectivamente con la combinación de 500 $\mu\text{g/mL}$ de *Stevia pilosa* con 40 μM de enzalutamida; mientras que para la concentración de 1000 $\mu\text{g/mL}$ con 40 μM de enzalutamida la herida cerro 40%, 42% y 45% para las 24, 48 y 72 horas (Figura 31).

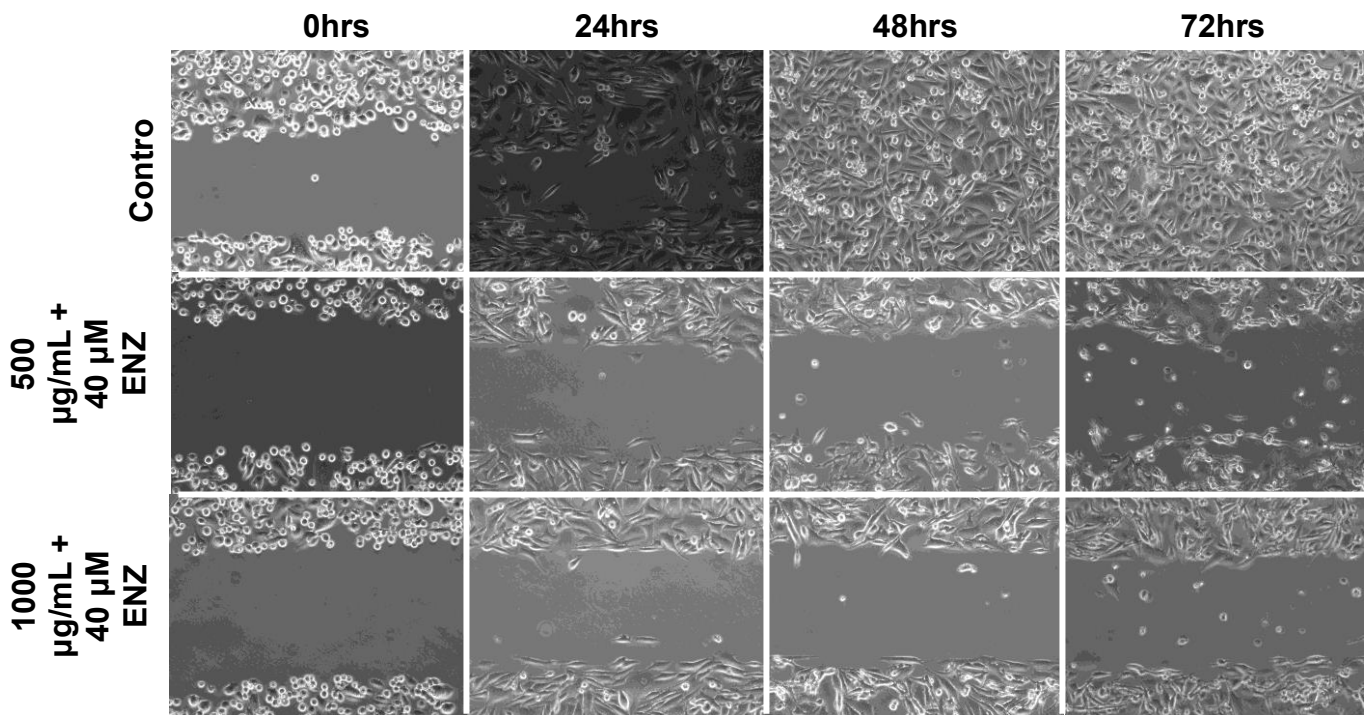


Figura 30. Figura 26. Micrografías del ensayo herida para las células andrógeno independientes (PC-3). Se muestra el efecto de la combinación de *S. eupatoria* con enzalutamida sobre la migración en la línea celular PC-3 a las 24, 48, y 72 horas.

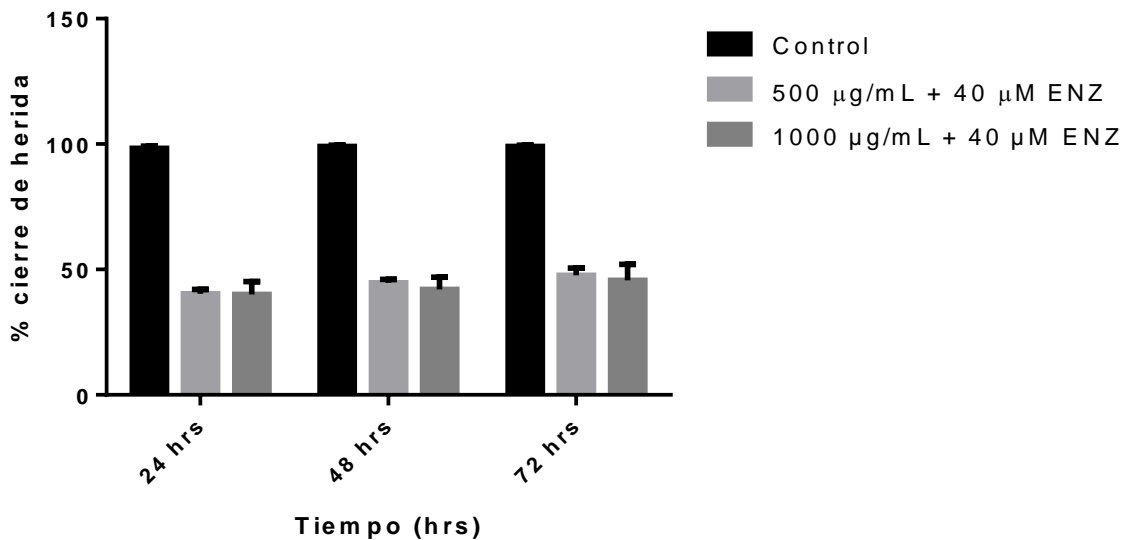


Figura 31. Efecto de la combinación del extracto metanólico de *Stevia pilosa* con enzalutamida, sobre la migración celular en PC-3. Se muestra la media \pm EE de 3

experimentos independientes. Para el análisis estadístico se realizó un ANOVA de dos vías con prueba *post hoc* Tukey ($P < 0.05$).

En cuanto a de *Stevia eupatoria* con enzalutamida en su primera combinación se presentó un cierre en la herida de 45%, 60% y 63% para las 24, 48 y 72 horas, mientras que para la combinación de 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ el cierre fue de 42%, 54% y 56% para las 24, 48 y 72 horas respectivamente (Figura 32).

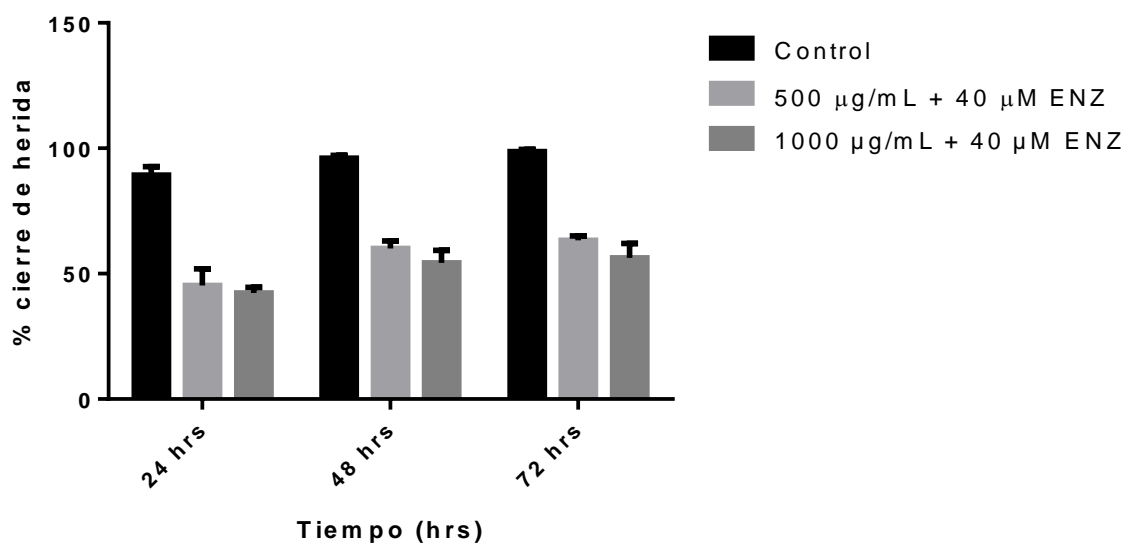


Figura 32. Efecto de la combinación del extracto metanólico de *Stevia eupatoria* con enzalutamida, sobre la migración celular en PC-3. Se muestra la media \pm EE de 3 experimentos independientes. Para el análisis estadístico se realizó un ANOVA de dos vías con prueba *post hoc* Tukey ($P < 0.05$).

8. DISCUSIÓN

8.1 Curva de proliferación de Fibroblastos humanos

Se utilizó la línea celular de fibroblastos humanos como control de citotoxicidad para los extractos metanólicos de *Stevia*, sin observarse disminución en el porcentaje de células vivas hasta 1000 µg/mL; a partir de 2000 µg/mL la cantidad de células vivas se reduce en un 50% hasta terminar con un 26% de células vivas con 3000 µg/mL. Por lo tanto, las concentraciones seguras para usar sobre las células de cáncer de próstata sin afectar células normales van de 250 µg/mL a 1000 µg/mL.

8.2 Células de cáncer de próstata: LNCaP y PC-3

8.2.1 Curvas de proliferación

Para la línea celular andrógeno dependiente LNCaP, se observó disminución significativa en el porcentaje de células vivas con todas las concentraciones utilizadas, mostrando el mayor efecto en 2000 µg/mL con ambos extractos metanólicos (*Stevia pilosa* y *Stevia eupatoria*). Al ensayar con las células andrógeno independientes PC-3, se obtuvo una disminución significativa en el porcentaje de células vivas a partir de la concentración de 250 µg/mL hasta 3000 µg/mL, presentando un mayor efecto a la concentración de 2500 µg/mL (figuras 13, 14, 19 y 20). Debido a que las células LNCaP son más sensibles a los tratamientos por presentar un estadio temprano de la enfermedad, la concentración más efectiva fue menor que la concentración de las células PC-3, dado que estas al ser andrógeno independientes representa un cáncer de próstata avanzado.

No se ha reportado efecto de estas dos especies de *Stevia* sobre la proliferación en células cancerígenas, sin embargo, existen reportes de otras especies como el de López *et al.* (2016), quienes observaron que el extracto etanólico de *Stevia rebaudiana* tiene un efecto antiproliferativo sobre células de cáncer de colón HCT116, mostrando una IC₅₀ de 230 µg/mL, mientras que los extractos

metanólicos de *S. pilosa* y *S. eupatoria*, presentaron un mayor efecto con 2000 µg/mL para LNCaP y 2500 µg/mL para PC-3. La diferencia entre concentraciones de *Stevia rebaudiana* y las dos especies utilizadas en este trabajo pueden explicarse debido a que si bien, comparten algunos compuestos como polifenoles, difieren en otro como esteviósido.

El esteviósido es un glúcido diterpénico que se encuentra como componente abundante en *Stevia rebaudiana*, conocido por su intensa dulzura y usado como endulzante no calórico en muchos países. Algunos estudios han sugerido que, además del dulzor, el esteviósido puede ofrecer beneficios terapéuticos debido a que cuenta con propiedades antihipertensivas, antihiperglucémicas, antiinflamatorias y anticancerosas (López *et al.*, 2016). Entre las propiedades anticancerosas del esteviósido, se ha observado que induce apoptosis a través de la vía mitocondrial en células de cáncer de mama MCF-7 (Paul *et al.*, 2012). En células de cáncer de colon HT-29, induce apoptosis, incrementando la caspasa-3 y la caspasa-9, además, presentó arresto celular en la fase G2/M (Ren *et al.*, 2016). Debido a que el esteviósido es un compuesto principal en *Stevia rebaudiana* y que no se ha encontrado en *S. pilosa* o *S. eupatoria*, podemos sugerir que el efecto en la primera especie y, por lo que el hecho de que la IC₅₀ es menor que para las especies estudiadas en este proyecto, es debido al esteviósido.

Los extractos metanólico de *S. pilosa* y *S. eupatoria* presentan flavonoides como luteolina y quercetina (Cariño-Cortés *et al.*, 2006). Se sabe que la luteolina posee diversas actividades biológicas, incluyendo efecto antiinflamatorio, antioxidante y antiproliferativo; además se ha demostrado que este flavonoide causa arresto en el ciclo celular e induce apoptosis en una amplia gama de líneas células de cáncer como próstata (PC-3), hígado (SMMC7721), colon (COLO205) y cáncer cervical (HeLa); también se ha reportado que la luteolina disminuye significativamente el número de tumores por rata cuando se administra en las etapas de iniciación y post-iniciación de la carcinogénesis del cáncer de colon (Lu *et al.*, 2017). Por otra parte, a la quercetina se le han atribuido varias actividades farmacológicas como

antimicrobiano, antiinflamatorio, antioxidante, así como antígenotóxico, quimiopreventivo y actividad antitumoral (Haghi *et al.*, 2017). Khorsandi *et al.* (2017) demostraron que la quercetina disminuye la viabilidad e inhibe la proliferación de células de cáncer de mama MCF-7 mediante la activación de la apoptosis, incrementando la expresión de Bax, caspasa-3 y disminuye la expresión de Bcl-2. En conjunto con la activación de la apoptosis, también se encuentra la activación de la necroptosis, mediante un aumento la expresión de RIPK1 y RIPK3. Tanto la luteolina como la quercetina fueron probadas en células de cáncer de próstata PC-3 y DU145, donde se observó, que ambos flavonoides presentaron arresto en el ciclo celular en la fase S (Zhang *et al.*, 2017).

Otros compuestos presentes en *S. pilosa* y *S. eupatoria*, son los fitoesteroles (β -sitosterol, estigmasterol), de los cuales existen varios estudios sobre el efecto inductor de apoptosis que presentan en células de cáncer de colón (HT-29), cáncer de próstata (LNCaP), cáncer de hígado (HepG2) y cáncer de mama (MDA-MB-231). El β -sitosterol ha mostrado efecto antiproliferativo, activando preferencialmente la vía de señalización de Erk 1/2, además induce la apoptosis al disminuir la expresión de la proteína anti-apoptótica Bcl-2 y mostrando un moderado incremento en la proteína pro-apoptótica Bax, en células de cáncer de mama MDA-MB-231. En células LNCaP, el β -sitosterol causa cambio en el patrón de los fosfolípidos de membrana, principalmente en esfingomielina, por lo que se sugirió que el fitoesterol afectaba el ciclo de esfingomielina activándolo e incrementando la producción de ceramida, favoreciendo la apoptosis (Awad y Fink, 2000; Woyengo *et al.*, 2009; Vundru *et al.*, 2013). Por otra parte, el estigmasterol en células de cáncer de hígado (HepG2) ha mostrado inducir la apoptosis al incrementar Bax, caspasa-8, caspasa-9, p53 y disminuir Bcl-2 (Kim *et al.*, 2014) (Figura 33).

Debido a los efectos de los compuestos presentes en *Stevia pilosa* y *Stevia eupatoria*, sobre líneas celulares de cáncer, podemos sugerir que ambos extractos tiene la capacidad de inhibir la proliferación mediante arresto celular, activando vías de señalización como Erk 1/2 o el ciclo de esfingomielina, además de activar

vías de apoptosis por incremento de proteínas pro-apoptóticas Bax, caspasas y disminución de proteínas anti-apoptóticas Bcl-2.

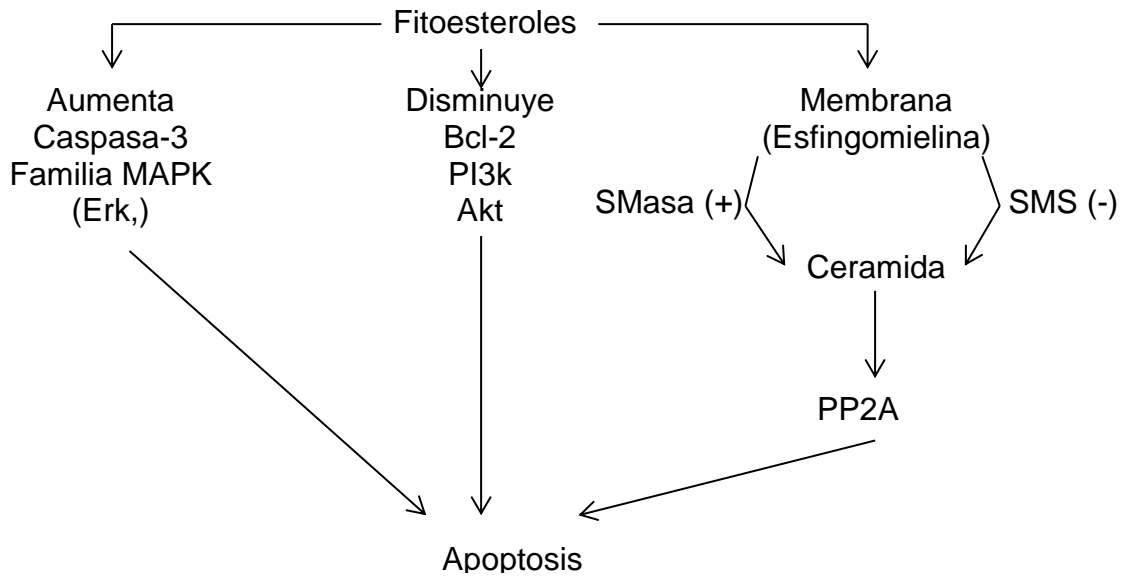


Figura 33. Mecanismos de acción propuestos para β -sitosterol. Abreviaturas: SMasa, esfingomielinasa; SMS, esfingomielina sintasa; PP2A, proteína fosfatasa A (Modificado de Awad y Fink, 2000; Woyengo *et al.*, 2009).

El ensayo realizado para observar el efecto antiproliferativo al combinar los extractos de *Stevia* con enzalutamida, mostraron que no había un efecto aditivo. La enzalutamida además de presentar un mecanismo de acción sobre la vía del receptor de andrógeno, se ha observado que tiene un efecto en la activación de las caspasas 8 y 3; Pilling *et al.* (2017), observaron una sobreexpresión de la caspasa 8 en células de cáncer de próstata LNCaP, mientras que unos años antes, Guerrero *et al.* (2013) observaron en células LNCaP y C4-2, una sobreexpresión de caspasa 3. Estos efectos encontrados con enzalutamida son los que se han observado con los compuestos presentes en *Stevia pilosa* y *Stevia eupatoria* (β -sitosterol, estigmasterol, luteolina y quercetina), por lo tanto, podríamos sugerir que el efecto sobre la apoptosis de las células no se aumenta con la combinación debido a que tanto los extractos como la enzalutamida están

activando las mismas vías, en su lugar, podría existir una competencia entre los compuestos más que una adición de efectos por mecanismos diferentes.

8.2.2 Ensayo herida

Estudios del efecto de *Stevia* sobre la migración en células de cáncer, no se han realizado hasta el momento; sin embargo, existen estudios de los compuestos encontrados en este género.

Awad y colaboradores en 2001, encontraron que el β -sitosterol disminuía la invasión y metástasis en células de cáncer de próstata PC-3 *in vitro* e *in vivo*, observaron la reducción de metástasis a nódulos linfáticos y pulmones, aunque las vías por las cual el fitoesterol presenta este efecto no fueron analizadas en este estudio. En el caso de la luteolina, se ha observado efecto sobre las metaloproteasas (MMPs), las cuales son necesarias para la degradación de la membrana basal permitiendo así la invasión y migración a sitios secundarios; así mismo se presenta un efecto sobre los inhibidores endógenos de las MMPs, los TIMPs. La luteolina, en líneas celulares de glioblastoma, U251MG Y U87MG, disminuye los niveles de proteína MMP-2, MMP-9 e incrementa TIMP-1 y TIMP-2, sugiriendo que el efecto antimigratorio de luteolina es resultado de un desbalance MMP/TIMP. En adición, la luteolina presenta efecto sobre la transición epitelio-mesénquima (TEM), disminuyendo la expresión proteica de marcadores mesenquimales como N-cadherina, Vimentina y β -catenina, aumentando la expresión proteica de E-cadherina (Wang *et al.*, 2015).

Con lo anterior, podemos sugerir que los extractos metanólicos de *Stevia pilosa* y *Stevia eupatoria* presentan un efecto anti-migratorio afectando la expresión de MMPs e involucrándose en el proceso de TEM, dejando como perspectiva de este trabajo el análisis de las proteínas que favorecen la invasión y migración celular.

9. CONCLUSIONES

- 1.- Los extractos metanólicos de *Stevia pilosa* y *Stevia eupatoria* disminuyen la proliferación de las células andrógeno dependientes (LNCaP) y andrógeno independientes (PC-3) de manera dosis-dependiente, mostrando un mayor efecto con la concentración de 2000 µg/mL en LNCaP y 2500 µg/mL en PC-3.
- 2.- La migración celular de PC-3 es inhibida por los extractos metanólicos de *Stevia pilosa* y *Stevia eupatoria*, desde las 24 horas hasta las 72 horas de tratamiento con la concentración de 2500 µg/mL.
- 3.- La combinación de los extractos metanólicos de *Stevia pilosa* y *Stevia eupatoria* con el fármaco enzalutamida no tiene efecto aditivo en la inhibición de la proliferación de LNCaP y PC-3, para las concentraciones y tiempos estudiados.
- 4.- El efecto antiproliferativo y antimigratorio de los extractos metanólicos de *Stevia pilosa* y *Stevia eupatoria* es dependiente de la concentración y el tiempo de exposición al tratamiento.

10. REFERENCIAS

Alberts, B., Bray, D., Hopkin, K., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. y Walter, P. **2006.** Introducción a la biología celular. 2ª Edición. Editorial Médica Panamericana. México. Pp. 560, 727.

Álvarez-García, R. 2005. Estudio estereoquímico y conformacional de algunos metabolitos secundarios aislados de *Stevia pilosa* y *Stevia tomentosa*. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Tesis que para obtener el grado de Doctor en Química.

Anway, M.D. y Skinner, M.K. 2008. Transgenerational Effects of the Endocrine Disruptor Vinclozolin on the Prostate Transcriptome and Adult Onset Disease. *The Prostate*. 68: 517 – 529.

Awad, A.B. y Fink, C.S. 2000. Phytosterols as anticancer dietary components: evidence and mechanism of action. *American Society for Nutritional Sciences*. 130(9): 2127 – 2130.

Awad, A.B., Fink, C.S., William, H. y Kim, U. 2001. *In vitro* and *In vivo* (SCID mice) effects of phytosterols on the growth and dissemination of human prostate cancer PC-3 cells. *European Journal of Cancer Prevention*. 10: 507 – 513.

Bashir, M.N. 2015. Epidemiology of Prostate Cancer. *Asian pacific Journal of Cancer Prevention*. 16: 5137 – 5141.

Bostwick, D.G., Burke, H.B., Djakiew, D., Euling, S., Ho, S., Landolph, J., Morrison, H. Sonawane, B., Shifflett, T., Waters, D.J., Timms, B. 2004. Human Prostate Cancer Risk Factors. *American Cancer Society*. 101(10): 2371 - 2490.

Cariño-Cortés, R., Hernández-Ceruelos, A., Torres-Valencia, J.M., González-Ávila, M., Arriaga-Alba, M. y Madrigal-Bujaidar, E. 2007. Antimutagenicity of *Stevia pilosa* and *Stevia eupatoria* evaluated with the Ames test. *Toxicology in Vitro*. 21: 691 – 697.

Daniyal, M., Siddiqui, Z.A., Akram, M., Asif, H.M., Sultana, S., Khan, A. 2014. Epidemiology, etiology, diagnosis and treatment of prostate cancer. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. 15: 9575 – 9578.

Denmeade, S.R, Isaacs, J.T. 2002. A history of prostate cancer treatment. *Nature reviews*. 2: 389 – 396.

Duskova, K., Vesely, S. 2015. Prostate Specific Antigen. Current clinical application and future prospects. *Biomedical Papers*. 159(1): 18 – 26.

Feldman, B.J., Feldman, D. 2001. The development of androgen-independent prostate cancer. *Nature*. 1: 34 – 45.

Felgueiras, J. Silva, J.V., Fardilha, M. 2013. Prostate Cancer: the need for biomarkers and new therapeutic targets. *Journal of Zhejiang Univ-Sci B (Biomedicine & Biotechnology)*. 15(1):16-42.

Ferrazzano, G. F., Cantile, T., Alcidi, B., Coda, M. Ingenito, A., Zarrelli, A., Di Fabio, G. y Pollio, A. 2015. Is Stevia rebaudiana Bertoni a Non Cariogenic Sweetener? A Review. *Molecules*. 21(38): 1 – 12.

Finco, I., LaPensee, C.R., Kril, K.T. y Hammer, G.D. 2015. Hedgehog Signaling and Steroidogenesis. *Annual Reviews Physiology*. 77: 105 – 129.

Fox, S.I. 2008 Fisiología humana.10º Edición. Editorial Mc Graw Hill. España. 688.

Gal-Iglesias, B., López-Gallardo, M., Martín-Velasco, A.I., Prieto-Montalvo J. 2007. Bases de la fisiología. 2º Edición. Tébar. España. 476-477.

GLOBOCAN. Estimated cancer incidence mortality and prevalence worldwide in 2012. Página web. Consultado 29/octubre/2015. <http://globocan.iarc.fr>.

Guerrero, J., Alfaro, I.E., Gómez, F., Protter, A.A. y Bernales, S. 2013. Enzalutamide, an androgen receptor signaling inhibitors, induces tumor regression in a mouse model of castration-resistant prostate cancer. *The prostate* 73: 1291 – 1305.

Hanahan, D. y Weinberg, R.A. 2000. The hallmarks of cancer. *Cell*. 100: 57 – 70.

Heidenreich, A., Bolla, M. Joniau, S., Mason, M.D., Matveev, V., Mottet, N., Schmid, H-P., van der Kwast, T.H., Wiegel, T., Zatton, F. **2010** Guía clínica sobre el cáncer de próstata. European Association of Urology.

Joshi, G., Singh, P.K., Negi, A., Rana, A., Singh, S. y Kumar, R. **2015**. Growth factors mediated cell signalling in prostate cancer progression: implications in discovery of anti-prostate cancer agents. *Chemico-Biological Interactions*. 240: 120 – 133.

Kash, D.P., Lal, Murli, Hashimi, A.H., Mubarak M. **2014** Utility of Digital Rectal Examination, Serum Prostate Specific Antigen, and Transrectal Ultrasound in the Detection of Prostate Cancer: A Developing Country Perspective. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. 15(7): 3087 – 3091.

Khorsandi, L. Orazizadeh, M., Niazvnd, F., Abbaspour, M.R., Mansouri, E., Khodadadi, A. **2017**. Quercetin induces apoptosis and necroptosis in MCF-7 breast cancer cells. *Bratisl Med J*. 118(2): 123 – 128.

Kim, Y.S., Li, X.F., Kang, K.H., Ryu, B.M., Kim, S.K. **2014**. Stigmasterol isolated from marine microalgae *Navicula incerta* induces apoptosis in human hepatoma HepG2 cells. *BMB Reports*. 47(8): 433 – 438.

Leach, D.A., Need, E.F., Toivanen, R., Trotta, A.P., Palenthorpe, H.M., Tamblyn, D.J., Kopsaftis, T., England, G.M., Smith, E., Drew, P.A., Pinnock, C.B., Lee, P., Holst, J., Risbridger, G.P., Chopra, S., DeFranco, D.B., Taylor, R.A., Buchanan, G. **2015** Stromal androgen receptor regulates the composition of the microenvironment to influence prostate cancer outcome. *Oncotarget*. 6(18): 16135–16150.

Levalle, O.A., Lalosa, S. **2015** Implicancias fisiopatológicas del receptor androgénico. Mutaciones, polimorfismo y patologías asociadas. *Revista Argentina de Endocrinología y Metabolismo*. 52(2): 79 – 107.

Longo, D.L., Kasper, D.L., Jameson, J.L., Fauci, A.S., Hauser, S.L, Loscalzo, J. **2012** Harrison. Principios de Medicina Interna. 10ª Edición. Mc Graw-Hill. China. 798.

López., V., Pérez, S., Vinuesa, A. Zorzetto, C., Abian, O. 2016. *Stevia rebaudiana* ethanolic extract exerts better antioxidant properties and antiproliferative effects in tumor cells than this diterpene glycoside stevioside. *Food and function*. 7: 2107 – 2113.

Lozano, J.A. 2004. Cáncer de Próstata, factores de riesgo, diagnóstico y tratamiento. *Ámbito Farmacéutico Farmacoterapia*. 23: 84 – 90.

Lu, X., Li, Y., Li, X., Aisa, H.A. 2017. Luteolin induces apoptosis *in vitro* through suppressing the MAPK and PI3K signaling pathways in gastric cancer. *Oncology letters*. 14: 1993 – 2000.

Mendoza, L. 2013 Cáncer de Próstata: información actualizada sobre el cáncer de próstata y sobre las opciones terapéuticas. AuthorHouse. México. 1 – 3.

Mendoza-Patiño, N. 2008 Farmacología Médica. Editorial Médica Panamericana. México. 428 – 430.

Miller, W.L., Auchus, R.J. 2011 The Molecular Biology, Biochemistry, and Physiology of Human Steroidogenesis and Its Disorders. *Endocrine Reviews*, 32(1), 81–151.

NICE. National Institute for Health and Care Excellence. Página web. Consultado 12/noviembre/2015. <https://www.nice.org.uk>.

Park, J.C. y Eisenberg, M.A. 2015. Advances in treatment of metastatic prostate cancer. *Mayo Clinic Proceedings*. 90(12): 1719 – 1733.

Paul, S. Sengupta, S. Bandyopadhyay, T.K., Bhattacharyya, A. 2012. Stevioside induced ROS-mediated apoptosis through mitochondrial pathway in human breast cancer cell line MCF-7. *Nutrition and Cancer*. 64(7): 1087 – 1094.

Pérez – Pérez, I. Metabolitos secundarios aislados de las raíces y las hojas de *Stevia jorullensis* H.B.K. Tesis. Centro de Investigaciones Químicas. UAEH. Pachuca, Hgo. 2006.

- Pilling**, A.B., Hwang, O., Boudreault, A., Laurent, A. y Hwang, C. **2017**. IAP Antagonists Enhance Apoptotic Response to Enzalutamide in Castration-Resistant Prostate Cancer Cells via Autocrine TNF- α Signaling. *The Prostate*. 77(8): 823 – 934.
- Pinto**, J., Vallejos, C. **2012** El antígeno prostático específico (PSA): biología y utilidad en el despistaje del cáncer de próstata. *Carcinos*. 2(1): 21 – 28.
- Querol**, L.C., Lavery, D.N., Bevan, C.L. **2013** Mini-review: foldosome regulation of androgen receptor action in prostate cancer. *Molecular and cellular endocrinology*. 369(1-2):52-62.
- Ramadan**, W.H., Kabbara, W.K., Al Masri, H.S.A. **2015** Enzalutamide for patients with metastatic castration-resistant prostate cancer. *OncoTargets and Therapy*. 8: 871 – 876.
- Ramírez-Balderrama**, L., López-Briones, S., Daza-Benítez, L., Macías, M.H., López-Gaytán, T. y Pérez-Vázquez, V. **2013**. Diferenciación neuroendócrina en adenocarcinoma de próstata. *Gaceta Médica de México*. 149: 639 – 645.
- Ren**, H.P., Yin, X.Y., Yu, H.Y., Xiao, H.F. **2016**. Stevioside induced cytotoxicity in colon cancer cells via reactive oxygen species and mitogen-activated protein kinase signaling pathways-mediated apoptosis. *Oncology letters*. 13: 2337 – 2343.
- Robitaille**, C.N., Rivest, P. y Sanderson, J.T. **2015**. Antiandrogenic Mechanisms of Pesticides in Human LNCaP Prostate and H295R Adrenocortical Carcinoma Cells. *Toxicological Science*. 143(1): 16 – 135.
- Schalken**, J., Fitzpatrick, J.M. **2015** Enzalutamide: targetin the androgen signalling pathway in metastatic castration-resistant prostate cancer. *BJU International*. 14: 2 – 11.
- Stanford**, M. **2013**. Enzalutamide: a review of its use in metastatic, castration – resistant prostate cancer. *Adis Drug Evaluation*. 73: 1723 - 1732

Tan, M.H.E., Li, J., Xu, H.E., Melcher, K., Yong, E. 2014 Androgen receptor: structure, rol in prostate cancer and drug discovery. *Acta Pharmacologica Sinica*. 36: 3 – 23.

Taguchi, Y. 2006. La Próstata. Todo lo que necesitas saber sobre la glándula masculina. 2º Edición. Editorial Amat. España.

Tao, Z.-Q., Shi, A.-M., Wang, K.-X., Zhang, W.-D. 2015 Epidemiology of Prostate Cancer: current status. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*. 19: 805 – 812.

Vundru, S.S., Kale, R.K., Singh, R.P. 2013. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 13: 280 – 289.

Wang, Q., Wang, H., Jia, Y., Ding, H., Zhang, L., Pan, H. 2015. Luteolin reduces migration of human glioblastoma cell lines via inhibition of the p-IGF-1R/PI3K/AKT/mTOR signaling pathway. *Oncology letters*. 14: 3545 – 3551.

Wong, Y.N.S., Ferraldeschi, R., Attard, G., de Bono, J. 2014 Evolution of androgen receptor targeted therapy for advanced prostate cancer. *Nature Reviews Clinical Oncology*. 11: 365 – 376.

Woyengo, T.A., Ramprasath, V.R., Jones, P.J.H. 2009. Anticancer effects of phytosterols. *European Journal of Clinical Nutrition*. 63: 813 – 820.

Xin, L. 2012. Cells of origin for cancer: an updated view from prostate cancer. *Oncogene*. 32(32): 3655 – 3663.

Yen, S.S.C., Jaffe, R.B., Barbieri, R.L. 2001 *Endocrinología de la reproducción. Fisiología, fisiopatología y manejo clínico*. 4º Edición. Editorial Médica Panamericana. Argentina.

Zhang, Q., Cheng, G., Qiu, H., Wang, Y., Wang, J., Xu, H., Zhang, T., Liu, L., Tao, Y., Ren, Z. 2017. Expression of prostate stem cell antigen is downregulated during flavonoid-induced cytotoxicity in prostate cancer cells. *Experimental and therapeutic medicine*. 14: 1795 – 1801.

Zhao, Y., Chang, S.K.C., Qu, G., Li, T., Cui, H. **2009**. B-sitosterol inhibits cell growth and induces apoptosis in SGC-7901 human stomach cancer cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 57: 5211 – 5218.