

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

**COMPARACIÓN DEL EFECTO INHIBIDOR DE LA PROLIFERACIÓN Y  
MIGRACIÓN DEL EXTRACTO DE *Stevia tomentosa* Y LA MEZCLA DE  $\beta$ -  
SITOSTEROL Y ESTIGMASTEROL EN CÉLULAS DE CÁNCER DE MAMA.**

**TESIS**

**QUE COMO PARTE DE LOS REQUISITOS PARA OBTENER EL GRADO DE**

**MAESTRA EN CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS**

**PRESENTA:**

Q. F. B. Marian Astrid Mera Cazares

**DIRIGIDA POR:**

Dra. Jesica Esther Escobar Cabrera

QUERÉTARO  
ENERO 2023  
MÉXICO



Dirección General de Bibliotecas y Servicios Digitales de  
Información



Comparación del efecto inhibitor de la proliferación y migración del extracto de Stevia tomentosa y la mezcla de B-sitosterol y estigmasterol en células de cáncer de mama.

**por**

Marian Astrid Mera Cazares

se distribuye bajo una [Licencia Creative Commons Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0 Internacional](#).

**Clave RI:** FQMAC-253076-0223-123



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA  
PROGRAMA DE MAESTRÍA EN CIENCIAS QUÍMICOBIOLOGICAS

COMPARACIÓN DEL EFECTO INHIBIDOR DE LA PROLIFERACIÓN Y  
MIGRACIÓN DEL EXTRACTO DE *Stevia tomentosa* Y LA MEZCLA DE  $\beta$ -  
SITOSTEROL Y ESTIGMASTEROL EN CÉLULAS DE CÁNCER DE  
MAMA  
TESIS

QUE COMO PARTE DE LOS REQUISITOS PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRA EN CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS

**PRESENTA:**

Q.F.B. Marian Astrid Mera Cazares

**DIRIGIDA POR:**

Dra. Jesica Esther Escobar Cabrera

COMITÉ TUTORAL

Dra. Jesica Esther Escobar Cabrera  
Presidente

Dra. María Guadalupe García Alcocer  
Secretario

Dra. Laura Cristina Berumen Segura  
Vocal

M. en C.Q.B. Elizabeth Martínez Rojo  
Suplente

Dra. Alicia Irasema Mendieta Trejo  
Suplente

\_\_\_\_\_  
Dra. Silvia Lorena Amaya Llano  
Directora de la Facultad de Química

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

Centro Universitario  
Santiago de Querétaro  
Enero de 2023

## Agradecimientos

A Dios, por darme la fortaleza y todo lo que he necesitado para poder llegar hasta aquí.

A CONACYT por darme la beca que me permitió concentrarme en mi maestría.

A FOPER por los recursos necesarios para la investigación.

A la Dra. Jesi, por haber creído en mi desde el servicio social y por aguantar los múltiples correos en poco tiempo cada que se me ocurre algo.

A la Dra. Alcocer y la Dra. Berumen, por siempre brindarme una palabra de aliento.

A Eli e Irasema; por leerme, por siempre enseñarme, ayudarme cuando lo necesitaba, darme consejos e incluso en algunas ocasiones ayudarme a relajarme.

A mis papás; por siempre estar ahí dándome su amor incondicional, por seguir apoyándome como siempre y por seguirme la corriente en cada una de mis locuras.

A mi pato, por ser siempre mi mejor amiga y darme siempre una excusa para tomarme un descanso.

A May, por cuidar a mis hijas los fines de semana y darle un respiro a mi salud mental.

A mi Lana, por ser mi perrito de servicio no oficial.

A mis gordos, por siempre ser parte de mis recuerdos.

A Meli, Alberto, Karen, Sugey y Xol por siempre preguntarme ¿Cómo vas?

# ÍNDICE

Página

RESUMEN.....	x
ABSTRACT .....	xi
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES.....	3
2.1 Cáncer .....	<b>3</b>
2.2 Tipos de cáncer.....	<b>3</b>
2.3 Carcinogénesis.....	<b>4</b>
2.4 Vías de señalización importantes en cáncer.....	<b>7</b>
2.4.1 Ciclo celular.....	7
2.4.2 Apoptosis .....	8
2.5 Glándula mamaria .....	<b>10</b>
2.5.1 Morfología macroscópica.....	10
2.5.2 Morfología microscópica.....	11
2.6 Cáncer de mama.....	<b>12</b>
2.6.1 Epidemiología del cáncer de mama.....	12
2.6.2 Clasificación molecular de cáncer de mama.....	13
2.6.3 Estadios de cáncer de mama .....	14
2.6.3 Síntomas de cáncer de mama.....	15
2.6.4 Diagnóstico.....	16
2.6.5 Tratamientos .....	17
2.6.6 Mecanismos de resistencia a quimioterapéuticos.....	19
2.7 Productos naturales .....	<b>20</b>
2.8 Género <i>Stevia</i> .....	<b>22</b>
2.8.1 Efecto anticancerígeno de diferentes especies de <i>Stevia</i> .....	22

2.8.2 Composición química de la <i>Stevia</i> .....	23
2.9 <i>Stevia tomentosa</i> .....	<b>23</b>
2.9.1 Efecto anticancerígeno de <i>Stevia tomentosa</i> .....	24
2.9.2 Moléculas con efecto anticancerígeno presentes en <i>Stevia tomentosa</i> .....	25
3. JUSTIFICACIÓN .....	27
4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN .....	28
5. HIPÓTESIS .....	28
6. OBJETIVOS.....	29
6.1 Objetivo general .....	<b>29</b>
6.2 Objetivos específicos.....	<b>29</b>
7. MATERIALES Y MÉTODOS.....	30
7.1 Materiales.....	<b>30</b>
7.2 Métodos.....	30
7.2.1 Cultivo celular .....	30
7.2.2 Disolución del extracto metanólico de <i>Stevia tomentosa</i> . .....	30
7.2.3 Disolución de la mezcla de fitoesteroles .....	31
7.2.4 Proliferación .....	31
7.2.5 Migración.....	31
7.2.4 Análisis estadístico.....	32
8. RESULTADOS.....	33
8.1 Proliferación de células de cáncer de mama dependientes de hormonas tratadas con el extracto de <i>Stevia tomentosa</i> .....	33
8.1.1 Curva de proliferación de células MCF-7 tratadas con extracto de <i>Stevia tomentosa</i> .....	33
8.1.2 Curva dosis-respuesta de células de cáncer de mama dependientes de hormonas MCF-7 .....	34
8.2 Proliferación de células de cáncer de mama triple negativo tratadas con el extracto de <i>Stevia tomentosa</i> .....	34

8.2.1 Curva de proliferación de células MDA-MB-231 tratadas con extracto de Stevia tomentosa	34
8.2.2 Curva dosis-respuesta de células de cáncer de mama triple negativo MDA-MB-231	35
8.3 Proliferación de células de cáncer de mama dependientes de hormonas tratadas con la mezcla de fitoesteroles	36
8.3.1 Curva de proliferación de células MCF-7 tratadas con la mezcla de fitoesteroles	36
8.3.2 Curva dosis-respuesta de células de cáncer de mama dependientes de hormonas MCF-7 tratadas con la mezcla de fitoesteroles	37
8.4 Proliferación de células de cáncer de mama triple negativo tratadas con la mezcla de fitoesteroles	38
8.4.1 Curva de proliferación de células MDA-MB-231 tratadas con la mezcla de fitoesteroles	38
8.4.2 Curva dosis-respuesta de células de cáncer de mama independientes de hormonas MDA-MB-231	39
8.5 Comparación del efecto del extracto de Stevia tomentosa y la mezcla de fitoesteroles sobre la proliferación de células de cáncer de mama dependientes de hormonas	40
8.6 Comparación del efecto del extracto de Stevia tomentosa y la mezcla de fitoesteroles sobre la proliferación de células de cáncer de mama triple negativo	41
8.7 Comparación del efecto del extracto de Stevia tomentosa sobre células MCF-7 contra células MDA-MB-231	42
8.8 Comparación del efecto de la mezcla de fitoesteroles sobre células MCF-7 contra células MDA-MB-231	43
8.9 Efecto antimigratorio del extracto de Stevia tomentosa sobre células de cáncer de mama MCF-7	44
8.10 Efecto antimigratorio de la mezcla de fitoesteroles ( $\beta$ -sitosterol y estigmasterol) sobre células de cáncer de mama MCF-7	46
8.11 Efecto antimigratorio del extracto de Stevia tomentosa sobre células de cáncer de mama MDA-MB-231	48

8.12	Efecto antimigratorio de la mezcla de fitoesteroides ( $\beta$ -sitosterol y estigmasterol) sobre células de cáncer de mama MDA-MB-231. ....	50
8.13	Comparación del efecto antimigratorio del extracto de Stevia tomentosa contra la mezcla de fitoesteroides ( $\beta$ -sitosterol y estigmasterol) sobre células de cáncer de mama MCF-7. ....	52
8.14	Comparación del efecto antimigratorio del extracto de Stevia tomentosa contra la mezcla de fitoesteroides ( $\beta$ -sitosterol y estigmasterol) sobre células de cáncer de mama MDA-MB-231. ....	53
8.15	Comparación del efecto antimigratorio del extracto de Stevia tomentosa sobre células dependientes de hormonas MCF-7 y triple negativo MDA-MB-231. ....	54
9.	DISCUSIÓN.....	57
9.1	Proliferación y migración de células dependientes de hormonas MCF-7 y MDA-MB-231 tratadas con un extracto metanólico de Stevia tomentosa.....	57
9.2	Comparación del efecto de un extracto de Stevia tomentosa con el efecto de una mezcla de fitoesteroides ( $\beta$ -sitosterol y estigmasterol) sobre la proliferación y migración de células de cáncer de mama dependientes de hormonas MCF-7 y triple negativo MDA-MB-231. ....	59
9.3	Comparación del efecto de ambos tratamientos sobre la proliferación y migración de células de cáncer de mama dependientes de hormonas MCF-7 contra triple negativo MDA-MB-231. ....	61
9.4	Vías de señalización involucradas en el efecto de Stevia tomentosa sobre células de cáncer de mama.....	64
10	CONCLUSIONES.....	66
11	REFERENCIAS.....	67

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla</b>	<b>Página</b>
1. Clasificación molecular de cáncer de mama .....	13
2. Estadios del cáncer de mama .....	14
3. Diagnóstico del cáncer de mama .....	16
4. Mecanismos de resistencia a quimioterapéuticos .....	19
5. Moléculas con efecto anticancerígeno en <i>Stevia tomentosa</i> .....	25
6. Diferencias moleculares entre las líneas MCF-7 y MDA-MB-231. ....	62

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1. Ciclo celular .....	7
2. Vías de la apoptosis.....	10
3 Estructura macroscópica de la glándula mamaria.....	11
4. Estructura microscópica de la glándula mamaria.....	12
5. Estadística del cáncer de mama .....	12
6. Síntomas del cáncer de mama .....	15
7. <i>Stevia tomentosa</i> .....	24
8. Efecto del extracto de <i>Stevia tomentosa</i> en la proliferación de células de cáncer de mama MCF-7 luego de 24 horas de tratamiento.....	33
9. Curva dosis-respuesta de células de cáncer de mama MCF-7.....	34
10. Efecto del extracto de <i>Stevia tomentosa</i> en la proliferación de células de cáncer de mama MDA-MB-231 luego de 24 horas de tratamiento.....	35
11. Curva dosis-respuesta de células de cáncer de mama MDA-MB-231.....	36
12. Efecto de la mezcla de fitoesteroles en la proliferación de células de cáncer de mama MCF-7 luego de 24 horas de tratamiento.....	37
13. Curva dosis-respuesta de células de cáncer de mama MCF-7 obtenida a partir de los resultados de la curva de proliferación. ....	38
14. Efecto de la mezcla de fitoesteroles en la proliferación de células de cáncer de mama MDA-MB-231 luego de 24 horas de tratamiento.....	39
15. Curva dosis-respuesta de células de cáncer de mama MDA-MB-231 obtenida a partir de los resultados de la curva de proliferación. ....	40
16. Gráfica comparativa del efecto del tratamiento con la mezcla de fitoesteroles y el extracto completo de <i>Stevia tomentosa</i> en células MCF-7. ....	41
17. Gráfica comparativa del efecto del tratamiento con la mezcla de fitoesteroles y el extracto completo de <i>Stevia tomentosa</i> en células MDA-MB-231. ....	42
18. Gráfica comparativa del efecto del tratamiento un extracto de <i>Stevia tomentosa</i> sobre células dependientes de hormonas MCF-7 contra células triple negativo MDA-MB-231...	43
19. Gráfica comparativa del efecto del tratamiento una mezcla de fitoesteroles sobre células dependientes de hormonas MCF-7 contra células triple negativo MDA-MB-231...	44
20. Micrografías del efecto del extracto de <i>Stevia tomentosa</i> sobre células MCF-7.....	45

21. Efecto antimigratorio del extracto metanólico de hoja de Stevia tomentosa a las 0, 6,12 y 24 horas sobre células dependientes de hormonas MCF-7.....	46
22. Micrografías del efecto del extracto de la mezcla de fitoesteroles sobre células MCF-7. ....	47
23. Efecto antimigratorio de la mezcla de fitoesteroles ( $\beta$ -sitoesterol y estigmasterol) a las 0,6,12 y 24 horas sobre células dependientes de hormonas MCF-7. ....	48
24. Micrografías del efecto del extracto de Stevia tomentosa sobre células MDA-MB-231. ....	49
25. Efecto antimigratorio del extracto metanólico de hoja de Stevia tomentosa a las 0,6,12 y 24 horas sobre células independientes de hormonas MDA-MB-231.....	50
26. Micrografías del efecto del extracto de la mezcla de fitoesteroles sobre células MDA-MB-231.....	51
27. Efecto antimigratorio de la mezcla de fitoesteroles ( $\beta$ -sitoesterol y estigmasterol) a las 0,6,12 y 24 horas sobre células independientes de hormonas MDA-MB-231. ....	52
28. Gráfica comparativa del efecto del tratamiento con la mezcla de fitoesteroles y el extracto completo de Stevia tomentosa en células MCF-7. ....	53
29. Gráfica comparativa del efecto del tratamiento con la mezcla de fitoesteroles y el extracto completo de Stevia tomentosa en células MDA-MB-231. ....	54
30. Gráfica comparativa del efecto del tratamiento con el extracto completo de Stevia tomentosa en células MCF-7 y MDA-MB-231. ....	55
31. Gráfica comparativa del efecto del tratamiento con la mezcla de fitoesteroles en células MCF-7 y MDA-MB-231.....	56

## **ACRÓNIMOS**

**MCF-7** Michigan Cancer Center 7, Células dependientes de hormonas

**MDA-MB-231** M.D. Anderson - Metastatic Breast 231, Células triple negativo

**ACS** American Cancer Society

**CTCA** Cancer Treatment Centers of America

**CDC** Center for Disease Control and Prevention

## RESUMEN

El cáncer de mama ocupa el primer lugar de casos de cáncer femenino en México. Si bien la enfermedad cuenta con distintos tratamientos, todos ellos presentan efectos secundarios adversos. Además, las células cancerígenas son capaces de adquirir resistencia a ellos, por este motivo la búsqueda de terapias más inocuas y que puedan sobrellevar esa resistencia es importante. Los productos naturales, han sido utilizados a lo largo de la historia humana para el tratamiento de diversos malestares y es por ello que actualmente la investigación de productos naturales usados por la medicina tradicional, se ha posicionado como una opción viable como anticancerígenos. México es un país de gran biodiversidad y, por lo tanto, de considerable diversidad de productos naturales. La *Stevia tomentosa* es una especie endémica de México del género *Stevia*.

La *Stevia tomentosa* cuenta con un estudio realizado por este grupo de investigación en el que se demostró su efecto antiproliferativo y antimigratorio. Debido a todo lo anterior, el objetivo de este trabajo fue determinar si el extracto de *Stevia tomentosa* tiene el mismo efecto que una mezcla de  $\beta$ -sitosterol y estigmasterol, los fitoesteroles más reportados como sus componentes, para ello se realizaron estudios de proliferación por la técnica de azul tripano y de migración por ensayo herida en líneas celulares de cáncer de mama dependientes de hormonas MCF-7 y triple negativo MDA-MB-231. Se encontró que tanto para la proliferación como para la migración de las células de cáncer de mama el efecto antiproliferativo y antimigratorio del extracto de *Stevia tomentosa* es mayor que el de la mezcla de fitoesteroles, lo que podría hablar de que los compuestos diferentes a fitoesteroles contenidos en el extracto contribuyen al efecto antiproliferativo y antimigratorio.

### Palabras clave:

Cáncer de mama, *Stevia tomentosa*, vías de señalización, Ciclo celular, apoptosis, fitoesteroles.

## ABSTRACT

Breast cancer ranks first in female cancer cases in Mexico. Although the disease has different treatments, all of them have unwanted side effects, moreover, cancer cells have the ability of acquiring resistance to them. For this reason, the search for safer treatments that can overcome that resistance is important. Natural products have been used throughout human history for the treatment of various ailments and that is why currently the investigation of natural products used by traditional medicine has been positioned as a viable option to use anticancer agents. Mexico is a country of great natural diversity and, therefore, of great diversity of natural products. *Stevia tomentosa* is an endemic Mexican species of the genus *Stevia*.

*Stevia tomentosa* has a study carried out by this research group in which its antiproliferative and antimigratory effect was demonstrated. Due to all the above, the objective of this work is to determine if the extract has the same anticancerogenic effect as a mixture of the two phytosterols most reported ( $\beta$ -sitosterol and stigmasterol) as components of *Stevia tomentosa*, for this purposes proliferation with trypan blue technique and migration with wound healing technique assays were performed in breast cancer cell lines MCF-7 and MDA-MB-231. This study demonstrated that *Stevia tomentosa* has a bigger antiproliferative and antimigratory effect on both cell lines than the phytosterol mixture. This could imply that the molecules different to phytosterols of the extract contribute to the antiproliferative and antimigratory effects.

### Keywords:

Breast cancer, *Stevia tomentosa*, Signaling pathways, Cell cycle, apoptosis, phytosterols

## 1. INTRODUCCIÓN

El cáncer de mama es el tipo de cáncer más diagnosticado en mujeres a nivel mundial, y en México causa alrededor de 15.3% de los casos registrados de esta enfermedad. Los casos de cáncer de mama han ido en aumento en la última década posicionando a la enfermedad como la primera causa de mortalidad femenina a nivel mundial. En México, los tumores malignos son la cuarta causa de muerte femenina. De los 105, 963 casos nuevos de cáncer femenino reportados en México en 2020, 29,929 se trataron de cáncer de mama. Los tratamientos actuales, generan graves efectos adversos y en etapas más avanzadas de la enfermedad se disminuye su efectividad. La búsqueda de nuevos quimioterapéuticos y/o sustancias de origen natural con efecto antineoplásico y menores efectos secundarios ha cobrado gran relevancia en los últimos años debido a lo antes mencionado; se conoce como producto natural a las sustancias producidas por un organismo vivo. Estos productos naturales se dividen en metabolitos primarios y metabolitos secundarios. Tradicionalmente, estos metabolitos son obtenidos por medio de extracciones de los productos naturales. Desde la década de 1940 hasta 2019 se registraron 247 moléculas usadas para el tratamiento del cáncer; de estos fármacos el 70% son macromoléculas biológicas (péptidos largos >50 residuos o proteínas que pueden ser aisladas de un organismo vivo o una línea celular), productos naturales (sustancias producidas por un organismo vivo), fitomedicamentos (medicamento de origen vegetal elaborado con un extracto estandarizado), miméticos de productos naturales (inhibidores de proteínas que pueden tomar el lugar de un sustrato en un sitio catalítico) o derivados de productos naturales (producto natural modificado semisintéticamente). De este 70%, el 43.29% son productos naturales. El género *Stevia* es una planta herbácea perenne con 250 especies conocidas, 116 son endémicas de las zonas de bosque de pino-encino, claros o matorrales derivados de bosques y orillas de caminos y parcelas mexicanas; principalmente en pastizales templados. En recientes investigaciones se ha reportado que los fitoesteroles, sesquiterpenos y flavonoides encontrados en las diferentes especies del género *Stevia* cuentan con efecto anticancerígeno. Por

ejemplo, *Stevia pilosa* y *Stevia eupatoria* inhiben la viabilidad y la migración de células de cáncer de próstata (LNCaP y PC-3) y *Stevia tomentosa* tiene efecto antiproliferativo y antimigratorio en células de cáncer de mama dependientes de hormonas MCF-7 y triple negativo MDA-MB-231. En otros estudios de caracterización, se demostró que los extractos contienen moléculas con actividad anticancerígena como  $\beta$ -sitosterol, estigmasterol, lactonas sesquiterpénicas y bisabolenos. Con base en lo antes mencionado, el objetivo de este trabajo es determinar si el extracto cuenta con el mismo efecto anticancerígeno que una mezcla de los fitoesteroles más reportados ( $\beta$ -sitosterol y estigmasterol) como componentes de *Stevia tomentosa*, para con ello determinar si la vía hormonal está involucrada en el efecto del extracto.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 Cáncer

El Instituto Nacional de Cáncer de Estados Unidos define Cáncer como una serie de enfermedades, en las que las células anormales se dividen sin control y son capaces de invadir tejidos cercanos o lejanos por medio del sistema circulatorio y linfático.

Cuando una célula normal envejece o se daña muere y una célula nueva toma su lugar; sin embargo, cuando se desarrolla el cáncer, las células viejas o dañadas pierden la capacidad de morir cuando es necesario y proliferan indiscriminadamente hasta formar tumores; se dice que un tumor es maligno cuando tiene la capacidad de invadir tejidos cercanos o lejanos por medio del sistema circulatorio y linfático. El cáncer es una enfermedad genética debido a mutaciones en el ADN de una persona. Estas mutaciones pueden ser hereditarias o adquirirse durante la vida por errores que ocurren en la división celular o por exposición ambiental a agentes cancerígenos como químicos, tabaco, radiación y luz ultravioleta (NIH, 2020).

### 2.2 Tipos de cáncer

Cada tipo de cáncer recibe su nombre según el área afectada en primer lugar y el tipo de célula del que se origina, o de las áreas del cuerpo a las que se propague. Sin embargo, existe una clasificación general que engloba a todos los tipos de cáncer en cuatro categorías (Team, 2017).

Carcinoma: Tipo más común de cáncer. Inicia en tejido epitelial de la piel o tejido de órganos internos. Este tipo de cáncer se subdivide en carcinoma *in situ*, invasivo y metastásico. El carcinoma *in situ* es la etapa temprana del cáncer, con células que se mantienen confinadas al tejido inicial y no se han propagado a tejidos cercanos ni a otras partes del cuerpo, pero que pueden fácilmente realizar esa conversión maligna y comenzar a invadir; el carcinoma invasivo es aquel que ya se ha esparcido a tejido cercano y el carcinoma metastásico es el cáncer que ha usado sistema circulatorio o linfático para invadir otros órganos y tejidos (CTCA, 2020).

Sarcoma: Cáncer que inicia en hueso y tejidos blandos como músculo, tejido adiposo, nervios, tejido fibroso, vasos sanguíneos o tejido epitelial profundo. Se pueden encontrar en todo el cuerpo, pero generalmente inician en brazos o piernas. Son tumores poco comunes. Existen más de 50 subtipos de sarcoma (ACS, 2021).

Leucemia: enfermedad en la que la médula ósea y otros tejidos formadores de sangre producen un número incrementado de leucocitos inmaduros o anormales. Esto reprime la producción normal de células sanguíneas causando anemia y otros síntomas (NIH, 2021). La leucemia se clasifica según qué tan rápido progresan y el tipo de célula que afectan. Existen cuatro tipos básicos de leucemia: Leucemia mieloide aguda, linfoblástica aguda, mieloide crónica y linfocítica crónica (Columbia University Herbert Irving Comprehensive Cancer Center, 2017).

Linfoma y mieloma: Son tipos de cáncer que afectan al sistema inmune. El linfoma afecta al sistema linfático generando aglomeraciones de linfocitos en los nódulos linfáticos, mientras que el mieloma se desarrolla en la médula ósea afectando a las células del plasma productoras de anticuerpos (CTCA, 2020).

### **2.3 Carcinogénesis**

El proceso mediante el cual las células sanas se transforman en células cancerígenas se llama carcinogénesis. El desarrollo de un tumor es un proceso de diferentes pasos iniciados por daños del ADN que promueven la sobreexpresión de oncogenes e inhiben a los genes supresores de tumores que son importantes para las funciones y estructuras celulares (EdCaN, 2020). La carcinogénesis puede ser dividida en iniciación, promoción, conversión maligna y progresión.

En la iniciación de la carcinogénesis el genoma sufre modificaciones generalmente causadas por mutaciones puntuales. Las mutaciones en el ADN pueden ser causadas por agentes carcinógenos externos que modifican la estructura del ADN, como la formación de aductos entre el carcinógeno y la doble hebra. Los aductos formados pueden activar protooncogenes o inactivar genes supresores de tumor. Estudios recientes han demostrado que la iniciación implica cambios epigenéticos,

como la metilación de regiones promotoras de genes supresores de tumor como un evento temprano (Wenston *et al.*, 2017).

La iniciación puede estar asociada a los protooncogenes que son genes involucrados en funciones normales de la célula pero que, cuando se activa por mutación, se convierte en un oncogén y contribuye a la progresión del cáncer. Los protooncogenes pueden tener funciones celulares como división celular y regulación de apoptosis. Una sola copia alterada del oncogén puede provocar el mal funcionamiento (Ellisen, 2016). Los protooncogenes se clasifican como factores de crecimiento, receptores tirosinquinasa, tirosinquinasa no acopladas a la membrana, receptores acoplados a proteínas G, proteínas G asociadas a membrana, quinasas serina/treonina y factores de transcripción y pueden ser activados por mutación, rearrreglo cromosómico o amplificación del gen (Gupta, 2018).

Los genes supresores de tumores son genes encargados de disminuir la división celular, reparar daño del ADN, o inducir la apoptosis. Si estos genes se apagan por una mutación, las células comienzan a proliferar en exceso. Estos genes pueden causar cáncer hereditario en familias (ACS, 2020 (a)).

La promoción consiste en la expansión clonal de las células iniciadas. La acumulación de la tasa de mutaciones es proporcional a la tasa de división celular, por lo tanto, la expansión de las células iniciadas produce una población más grande de células en riesgo de sufrir cambios genéticos y conversión maligna más adelante. Los promotores tumorales son agentes no cancerígenos, caracterizados por su habilidad de reducir el tiempo entre que ocurre el estímulo y la formación del tumor. Se le llama conversión maligna a la transformación de una célula preneoplásica a una que exprese el fenotipo maligno.

La progresión que consiste en la expresión del fenotipo maligno y la tendencia que tienen las células malignas a adquirir o expresar características más agresivas. El fenotipo maligno incluye entre otras características la metástasis, inestabilidad genómica y crecimiento incontrolado. En esta etapa la célula puede sufrir más

cambios genéticos y epigenéticos que resulten en la activación de más oncogenes y la supresión de más genes supresores de tumor que le lleven a mayor agresividad (metástasis, invasividad, quimiorresistencia, promoción de fenotipo STEM, etc.) (Wenston *et al.*, 2017).

La metástasis es la mayor causa de mortalidad por cáncer. Es un proceso encargado de la migración de células malignas del tumor principal hacia otros tejidos del cuerpo. Esta invasión puede ser a tejidos cercanos o lejanos por medio del sistema circulatorio o el sistema linfático. Los pasos de este proceso son infiltración de las células tumorales a tejidos adyacentes, migración trans-endotelial a los vasos sanguíneos (intravasación), supervivencia en sistema circulatorio, extravasación y subsecuente proliferación en órganos competentes (Hapach *et al.*, 2019). Recientemente, se ha demostrado que una alteración en la vía de las MAPK es esencial para llevar a cabo la transición epitelio-mesénquima, necesaria para llevar a cabo la intravasación. Además, la vía de NFkB es necesaria para la supervivencia de las células en torrente sanguíneo y la vía de VEGFR para la colonización y proliferación en otros órganos (Chen *et al.*, 2017). La transición epitelio-mesénquima es el proceso mediante el cual las células epiteliales son reprogramadas y toman un fenotipo que les permite perder su adhesión y generar migración o invasión. Esta transición ocurre fisiológicamente en diferentes etapas del desarrollo embrionario y está regulada por una serie de factores de transcripción que modulan la expresión de las cadherinas (como la E-cadherina). Las células cancerígenas utilizan la transición para obtener la malignidad (Yang *et al.*, 2020).

## 2.4 Vías de señalización importantes en cáncer

### 2.4.1 Ciclo celular

El cáncer se caracteriza por proliferación acelerada dada por descontrol del ciclo celular (Figura 5) que es el proceso mediante el cual la célula se divide dando origen a dos células hijas. Este proceso se divide en cuatro etapas: G1, G2, S y M. Las fases “gap” G1 y G2 proveen a la célula de tiempo para duplicar proteínas y organelos además de permitirle monitorear el ambiente y asegurarse de tener las condiciones necesarias para la división. En conjunto, G1, S y G2 son llamadas interfase. Es en la fase S en la que se lleva a cabo la duplicación del ADN y en la M ocurre la segregación de cromosomas y la división celular.

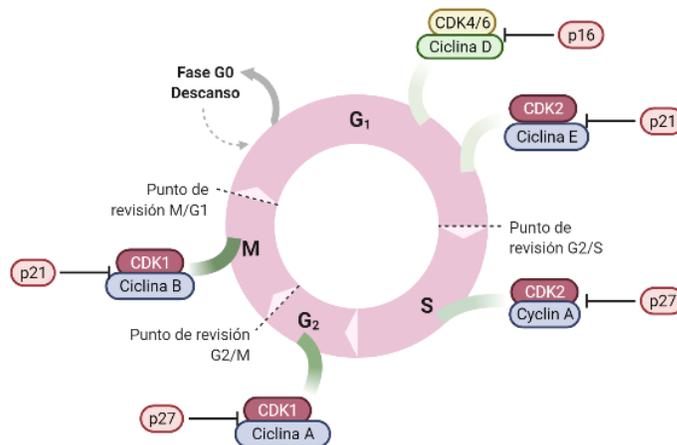


Figura 1. Ciclo celular. Se muestran las diferentes fases del ciclo celular y las ciclinas e inhibidores que intervienen en él (Modificado de Alberts *et al.*, 2017).

A su vez, la fase M se divide en dos: mitosis (fase de duplicación de cromosomas) y citocinesis que lleva a cabo la división celular. En la parte inicial de la mitosis llamada profase, las moléculas de ADN son desenredadas y condensadas en cromátides hermanas unidas al huso acromático y en la metafase se alinean en el

huso ecuatorial. En la anafase, las cromátides hermanas son separadas mientras son atraídas a polos opuestos del huso para que en la telofase, el huso sea desensamblado y los cromosomas sean segregados a núcleos separados. Después de este proceso la citoquinesis divide la célula en dos células hijas.

El ciclo celular es regulado por una familia de quinasas de proteína llamadas Cdks (quinasas dependientes de ciclinas). Estas proteínas realizan fosforilaciones esenciales de proteínas intracelulares que regulan los eventos que ocurren durante el ciclo. Las Cdks necesitan de la unión a ciclinas para realizar su actividad. Existen cuatro clases de ciclinas que intervienen a lo largo del ciclo. Las ciclinas G1/S activan a las Cdks ayudando a iniciar la fase S mientras que las ciclinas S estimulan la duplicación cromosómica y controlan algunos eventos mitóticos y las ciclinas M activan a las Cdks que estimulan la entrada a mitosis. La actividad de las Cdks puede ser inhibida por su fosforilación o por la unión de las proteínas inhibidoras de Cdk, las cuales estimulan un rearrreglo en la estructura del sitio activo de la Cdk que la vuelve inactiva (Alberts *et al.*, 2017).

Se ha demostrado que *Stevia rebaudiana* causa arresto del ciclo celular en la fase G1 en células de cáncer gastrointestinal, cérvix, colon y páncreas por medio del aumento de las proteínas p21 y p53 que logran la inhibición de los complejos ciclina D-Cdk4 y ciclina E-Cdk2 que en condiciones normales inhibirían a retinoblastoma lo que ocasionaría la liberación de E2F y subsecuente síntesis de proteínas de la fase S y entrada a esa misma fase (Chen *et al.*, 2018; López *et al.*, 2016). También causa arresto celular en fase G2/M en células de cáncer de mama MCF-7 (Gupta *et al.*, 2017). Y en células de cáncer de mama MDA-MB-231, el  $\beta$ -Sitosterol (fitoesterol encontrado en diferentes especies del género *Stevia* incluyendo *Stevia tomentosa*) logra inducir arresto celular en fase G1 por medio del aumento de las proteínas inhibidoras p21/cip1 y p27/kip1 (Vundru *et al.*, 2013).

#### **2.4.2 Apoptosis**

Otro proceso característicamente alterado en cáncer es la apoptosis. La apoptosis es una serie de cambios morfológicos que llevan a una muerte celular ordenada y programada. El proceso comienza con la disminución del tamaño de las células, su

condensación y fragmentación hasta que liberan cuerpos apoptóticos que pueden ser absorbidos por otras células. La apoptosis se puede dar por dos vías, la intrínseca y la extrínseca (Lodish *et al.*, 2021).

La vía extrínseca de la apoptosis inicia con una señal fuera de la célula y se realiza por un mecanismo independiente a la mitocondria. El proceso inicia cuando es activada por la unión de un ligando a un receptor de muerte como TNFR1 o DR4 (TRAIL). La unión causa la trimerización de proteínas adaptadoras como el receptor TNF 1 asociado por el dominio de muerte TRADD o FADD y su posterior reclutamiento a la superficie celular lo que resulta en la activación de la caspasa 8, por medio de la escisión de su procaspasa. La caspasa 8 cataliza la activación de caspasas ejecutoras río abajo (3 y 7) encargadas de llevar a cabo la apoptosis (Figura 6a) (Pfeffer y Singh, 2018).

La vía intrínseca inicia por señales internas como daño genético irreparable, hipoxia, concentraciones altas de electrolitos y estrés oxidativo severo. Esta vía está regulada por proteínas de la familia de Bcl-2 que se divide en proteínas proapoptóticas (Bax, Bak, Bcl-Xs, Bid, Bik, Bim y Hrk) y antiapoptóticas (Bcl-2, Bcl-X, Bcl-W, Bfl-1 y Mcl-1). Las proteínas de la familia Bcl-2 regulan la apoptosis por medio de un balance entre ellas, si el balance se encuentra a favor de las proapoptóticas se estimula el inicio y si lo está de las antiapoptóticas se inhibe. Las proteínas proapoptóticas aumentan la permeabilidad de la membrana mitocondrial y esto resulta en la liberación de otras moléculas proapoptóticas como el citocromo C que una vez liberado es capaz de formar el apoptosoma por medio de su unión con Apaf1 y la procaspasa 9. La formación del apoptosoma genera la ruptura de la procaspasa 9 liberando la caspasa 9 que es capaz de activar a las caspasas ejecutoras (3 y 6) que llevan a cabo las proteólisis necesarias para la muerte celular. La vía intrínseca de la apoptosis también puede ser activada por medio de la vía extrínseca; en este mecanismo, la unión de un ligando a FADD provoca la ruptura de la procaspasa 8 y su activación en caspasa 8, la caspasa 8 rompe a BID (proteína proapoptótica) en Bid, lo que provoca la despolarización de la mitocondria y la liberación de citocromo C (Figura 6b) (Lodish *et al.*, 2021).

El extracto de *Stevia rebaudiana* demostró causar apoptosis por la vía intrínseca mediante el aumento del ratio Bax/Bcl2 en células de cáncer de mama MDA-MB-231 y SKBR3 (Khare y Chandra, 2019), células de cáncer gástrico y de colon HCT-116, MKN-45, HGC-27 (Chen *et al*, 2018).

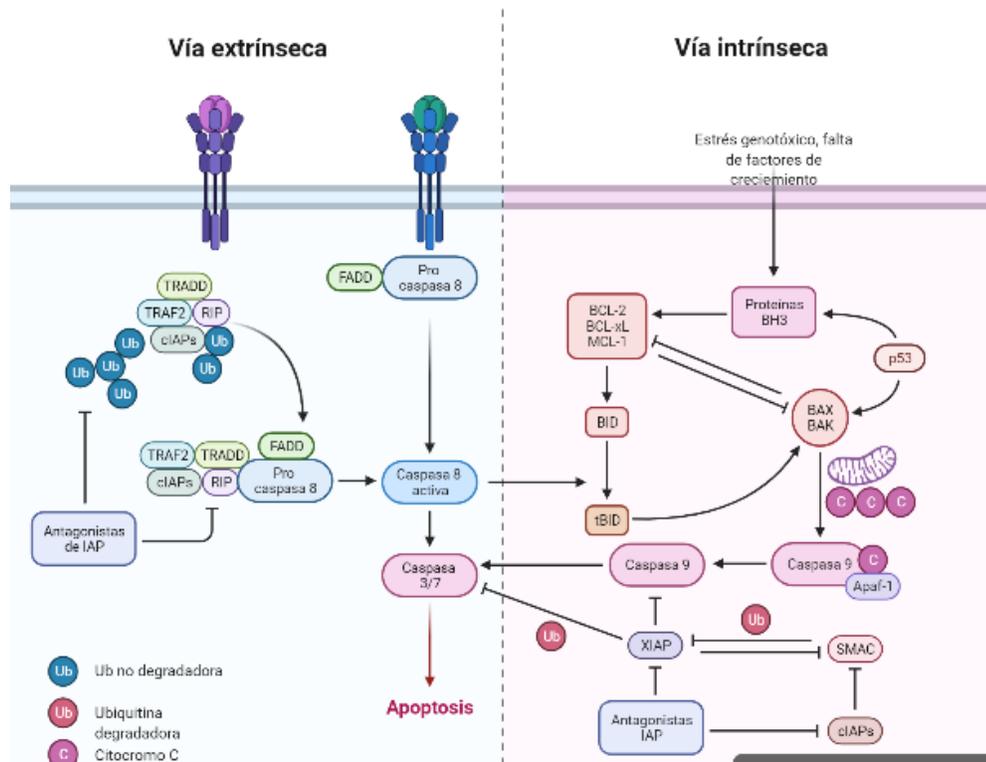


Figura 2. Vías de la apoptosis. a) Vía extrínseca b) Vía intrínseca (Modificado de Treuting *et al.*, 2018).

## 2.5 Glándula mamaria

### 2.5.1 Morfología macroscópica

El cáncer más común en mujeres es el que se da en las glándulas mamarias (Figura 1) que son órganos tubulares ramificados relativamente simples formados por una o dos capas de células epiteliales que responden constantemente a señales hormonales y cambios epigenéticos. Estos cuentan con ductos extendidos en ramas segmentadas que toman un patrón radial, desde el pezón para formar de 11 a 48 lóbulos separados compuestos de tejido glandular incrustado en estroma fibrocolágeno. Los lóbulos se encuentran separados unos de otros por tejido

adiposo y cada lóbulo cuenta con su propio ducto lactífero que lo drena por el pezón; estas estructuras parenquimatosas se encuentran interdigitadas por engrosamientos fibrosos de tejido conectivo que conectan la fascia con la dermis de la piel suprayacente, para formar ligamentos suspensorios llamados ligamentos de Cooper, los cuales le dan movilidad y soporte a la glándula (Cardiff *et al.*, 2018).

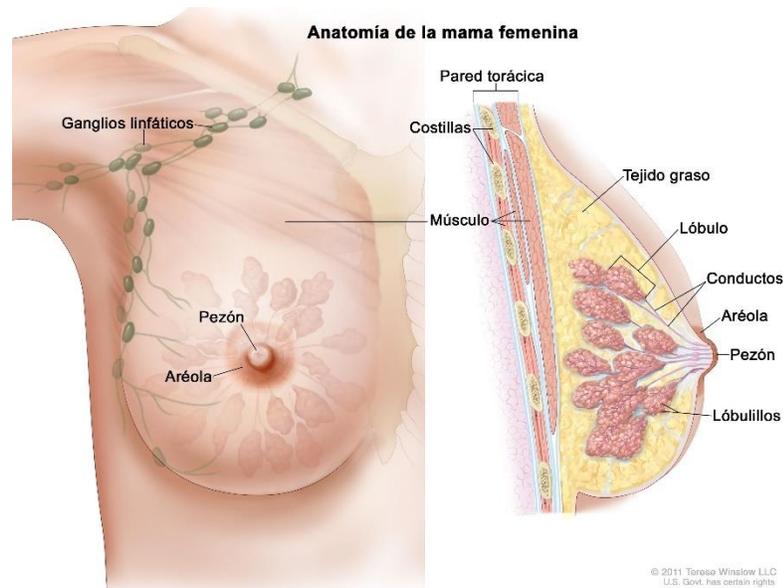


Figura 3. Estructura macroscópica de la glándula mamaria. Se muestran vistas frontales y laterales de la mama dónde se pueden observar los lóbulos, conductos, lobulillos, tejido adiposo, areola y pezón (Cardiff *et al.*, 2018).

La glándula mamaria cuenta con morfología tubuloalveolar compuesta por ductos tubulares terminados en acinos glandulares secretores (Figura 2). Los lóbulos están compuestos por grupos de acinos y los lóbulos a su vez componen lóbulos más grandes. La unidad básica productora de leche es la unidad lobular ducto terminal (TDLU por sus siglas en inglés). Cada TDLU se compone de lóbulos asociados a ductos terminales intra y extralobulares. Los TDLUs se drenan primero en los ductos terminales intralobulares y luego en los extralobulares. El drenado pasa por los ductos colectores, los ductos lactíferos y sale por la ostia del pezón. La importancia de estas unidades recae en que la mayor parte de los casos de cáncer de mama se origina en ellas (Cardiff *et al.*, 2018).

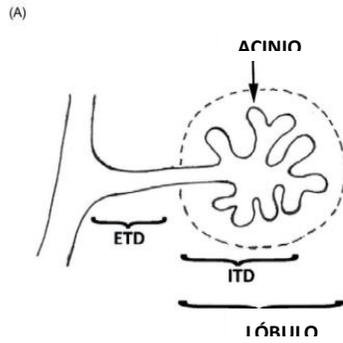


Figura 4. Estructura microscópica de la glándula mamaria. ETD: Conductos terminales extralobulares; ITD: Conductos terminales intralobulares (Cardiff et al., 2018).

## 2.6 Cáncer de mama

El cáncer de mama es una enfermedad caracterizada por el crecimiento sin control de las células de la glándula mamaria. Este tipo de cáncer puede iniciar en los lóbulos, ductos o tejido conectivo de la mama (CDC, 2020 (a)).

### 2.6.1 Epidemiología del cáncer de mama

Según la Organización Mundial de la salud, en el 2020 se presentaron 19,292,789 casos nuevos de cáncer en el mundo, de los cuales, el 11.7% del total se trató de cáncer de mama y el 6.9% del total de muertes causadas por cáncer se trató de cáncer de mama. En México, en el mismo año se presentaron 195,499 casos nuevos de cáncer y 90,222 muertes asociadas a la enfermedad, siendo el cáncer de mama el mayor contribuyente con 15.3% (Figura 3) del total de los casos y 8.8 % del total de muertes asociadas a cáncer en el país (Globocan, 2021).

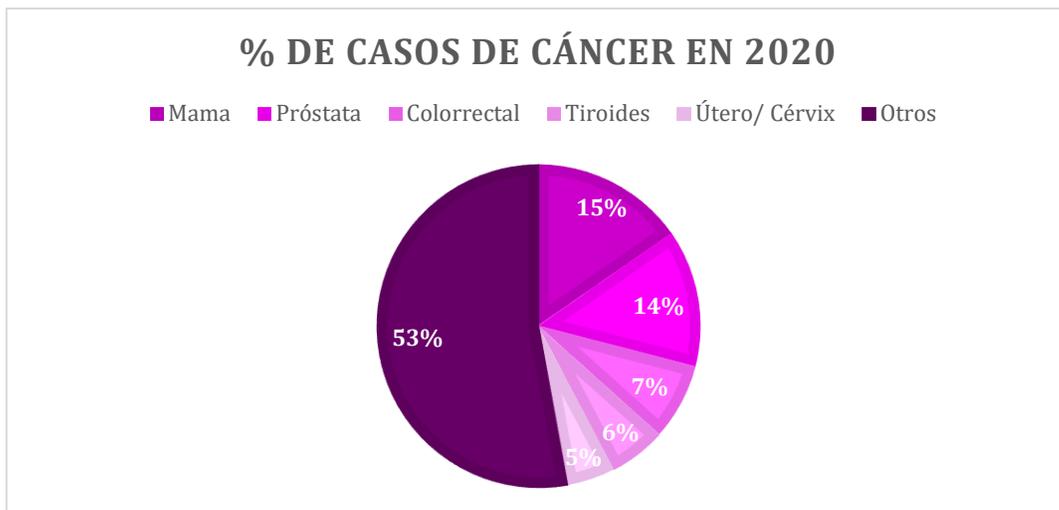


Figura 5. Estadística del cáncer en México (GLOBOCAN, 2021)

Según el Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI) la tasa nacional de defunciones por tumores malignos por cada 10,000 habitantes en Querétaro fue de 6.99 en 2019. El cáncer de mama tiene una tasa de mortalidad de entre 18.01 y 22.35 por cada 100 mil mujeres en la entidad. Del total de muertes por cáncer de mama en Querétaro, el 1% se trata de mujeres de entre 15 y 29 años, el 13% de mujeres de entre 30 y 44 años, el 38% de entre 45 y 59 años y el 48% son mujeres mayores a 59 años (INEGI, 2020).

### 2.6.2 Clasificación molecular de cáncer de mama

El cáncer de mama se puede clasificar en cinco tipos moleculares basados en los genes que expresa.

Tabla 1. Clasificación molecular de cáncer de mama (Eroles et al., 2012).

Tipo/ Receptor	Estrógeno	Progesterona	Her2	Ki-67	Prognosis
Luminal A	Positivo	Positivo	Negativo	Niveles bajos	Bajo grado, crecimiento lento, mejor prognosis
Luminal B	Positivo	Positivo	Variable	Niveles altos	Prognosis peor mala
Triple negativo	Negativo	Negativo	Negativo	-	Mala, Común en mutaciones BRCA1
HER2-enriquecido	Negativo	Negativo	Positivo	-	Mala
Tipo normal	Positivo	Positivo	Negativo	Niveles bajos	Mejor prognosis

### 2.6.3 Estadios de cáncer de mama

El estadio del cáncer de mama se determina según las características que posea como tamaño y localización del tumor y se clasifican del I al IV (Breastcancer.org, 2020).

Tabla 2. Estadios del cáncer de mama (Akram et al., 2017)

Estadio	Tumor en mama	Tumor en nódulos linfáticos	Subdivisión	Migración
0 (carcinoma in situ)	--	--	*No invasivo *Carcinoma ductal in situ: Ductos y lóbulos	--
I	2 cm	--	*IA: 2 cm sin propagación *IB: menor a 2 cm en mama y 2 mm en nódulos.	Comienza
II	2-5 cm	Sí	*IIA: tumor en nódulos o tumor de 2-5 cm pero no en mama. *IIB: 2-5 cm en mama y presencia en nódulos o 5 cm pero no en nódulos.	Tejidos cercanos
III	Mayor a 5 cm	Sí	*IIIA: Tumor en nódulos cerca del hueso o tumor en mama de 2-5 cm y presencia en nódulos unido a otras estructuras o cerca del hueso. *IIIB: Tumor de cualquier tamaño que se ha esparcido al pecho o piel o a nódulos cercanos al hueso. *IIIC: Tumor de cualquier tamaño que se ha esparcido a pecho, piel, nódulos cercanos a la clavícula o axilares.	Tejidos cercanos
IV	Mayor a 5 cm	Sí	Nódulos linfáticos axilares o del interior de la mama.	Zonas lejanas (cerebro, pulmón, hígado, hueso)

### 2.6.3 Síntomas de cáncer de mama

Los síntomas del cáncer de mama suelen variar de paciente a paciente y pueden no presentarse en lo absoluto. Los síntomas más comunes (mostrados en la figura 4) son: abultamiento sobre el pecho o bajo la axila, engrosamiento o hinchazón de una parte del pecho, irritación o formación de hoyuelos en la piel, enrojecimiento o piel escamosa en el pezón u otra área del pecho, dolor o hundimiento en el pezón exudado por el pezón de sustancias diferentes a la leche incluyendo sangre, cualquier cambio en el tamaño o la forma del pecho, venas crecientes, dolor en cualquier área del pecho (CDC, 2020 (b)).



Figura 6. Síntomas del cáncer de mama (Monroy, 2020).

### 2.6.4 Diagnóstico

El diagnóstico del cáncer de mama se puede hacer por diversas técnicas dependiendo de si es un análisis preventivo, confirmatorio o para verificar el tipo y estadio de la enfermedad.

Tabla 3. Diagnóstico del cáncer de mama (Akram *et al.*,2017).

Tipo	Razón	Técnica	Característica
Autoexploración	Preventivo	Palpado manual	Puede encontrar anormalidades en forma y textura en etapas tempranas.
Mamografía	Preventivo	Rayos X	Puede encontrar tumores muy pequeños para ser palpados.
Mamografía especializada	Diagnóstico	Rayos X	Provee imágenes de diferentes ángulos para hacer énfasis sobre anomalía sospechosa.
Ultrasonido	Diagnóstico	Ondas sonoras	Puede ser usado para diferenciar entre masas sólidas y líquidas y para determinar el tamaño y localización de la masa y tejido que la rodea.
RMN	Diagnóstico	Energía magnética	Se usa cuando la mamografía y ultrasonido no tienen resultados concluyentes. Distingue entre tejido sano y dañado.
Tomografía computarizada	Diagnóstico	Rayos $\gamma$	Se usa para detectar tumores tanto primarios como metastásicos.

por emisión de un solo protón			
Tomografía de emisión de positrones	Diagnóstico	Positrones	Se usa para detectar invasión y metástasis después de la detección del tumor primario. También es útil para la detección de recaídas.
Biopsia	Confirmatorio	Quirúrgico/ patológico	Existen diferentes tipos según el tejido analizado.
Laboratorios	Determinar clasificación molecular y avance	Biología molecular	Determina prognosis por medio del análisis de la expresión de receptores a hormonas y HER2/neu así como en avance de la enfermedad o tratamiento por medio de marcadores tumorales (CA15-3, CA27.29).

### 2.6.5 Tratamientos

Los tratamientos para cáncer de mama pueden ser locales o sistémicos. Los tratamientos locales son aquellos que atacan al tumor sin afectar a otras partes del cuerpo y son la cirugía y la radiación. La cirugía puede ser usada para remover la mayor parte del tumor, determinar si se ha esparcido hacia nódulos linfáticos, restaurar la forma de la mama o disminuir los síntomas del cáncer de mama avanzado. Se puede hacer de forma conservativa o mastectomía. La radiación se usa después de una cirugía para disminuir la probabilidad de que el cáncer vuelva o si se removió la mama completa pero el cáncer ya se había esparcido a más de un nódulo linfático.

Los tratamientos sistémicos son medicamentos que pueden alcanzar a casi cualquier célula en el cuerpo. La administración de los tratamientos es por vía oral

o intravenosa. Estos tratamientos son la quimioterapia, terapia hormonal, terapia dirigida y la inmunoterapia. La quimioterapia usa fármacos anticancerígenos (taxoles, doxorubicina, 5-FU, etc.) vía oral o intravenosa y se utiliza después de la cirugía para matar a las células cancerígenas que pudieron haber escapado de la cirugía o aquellas que se han esparcido y no fueron localizadas; también se utilizan antes de la cirugía para disminuir el tamaño del tumor; se usa para cáncer de mama avanzado como tratamiento principal en casos en los que las células han comenzado la migración. La terapia hormonal (Tamoxifeno, inhibidores de la aromataasa, etc.) es usada para cáncer de mama positivo a receptores hormonales. Se usa generalmente después de cirugía como adyuvante para reducir el riesgo de recaída, pero también puede ser usado como tratamiento para cáncer recurrente o para cáncer metastásico. La terapia dirigida (Tastuzumab, pertuzumab, neratinib, etc.) puede ayudar a otros tratamientos incrementando su acción, es especialmente útil en casos de cáncer de mama positivos a HER2. Se pueden usar anticuerpos monoclonales que atacan a un objetivo específico como HER2 y evitan la proliferación, conjugados anticuerpo-fármaco que dirigen el fármaco específicamente a las células que reconoce el anticuerpo e inhibidores de quinasas que inhiben la acción de HER2. Finalmente, la inmunoterapia estimula al sistema inmune para reconocer y destruir a las células cancerígenas más efectivamente, este tratamiento ayuda a restaurar la respuesta inmune contra las células cancerígenas (ACS, 2020 (b)).

Como todo tratamiento, las diferentes terapias contra el cáncer de mama pueden traer consigo diferentes efectos secundarios. Los efectos secundarios son problemas que afectan órganos o tejidos sanos debido a la falta de especificidad del tratamiento y se encuentran los siguientes: anemia, alopecia, cambios en piel y uñas, infertilidad, delirio, diarrea, dolor, edema, estreñimiento, anorexia, fatiga, inflamación de órganos, infecciones, neutropenia, linfedema, náuseas, vómitos, neuropatía, problemas en boca y garganta, problemas para dormir, problemas de salud sexual, problemas urinarios, sangrado, moretones y síntomas pseudogripales entre otros (NIH, 2019).

### 2.6.6 Mecanismos de resistencia a quimioterapéuticos

A pesar de que se cuentan con todos los tratamientos anticancerígenos ya mencionados, las células cancerosas tienden a generar resistencia a los mismos por los mecanismos mencionados en seguida.

Tabla 4. Mecanismos de resistencia a quimioterapéuticos (Mansoori et al., 2017)

Mecanismo	Descripción
Heterogeneidad tumoral	Cambios genéticos: mutaciones, amplificaciones, deleciones, rearrreglos cromosómicos, transposiciones, traslocaciones. Factores epigenéticos: miRNA, heterogeneidad transcriptómica y proteómica. Factores externos: pH, hipoxia, señalización parácrina.
Microambiente tumoral	Comunicación celular tumor-tumor, comunicación celular tumor-célula estromal, interfaz tumor-matriz extracelular.
Células madre cancerígenas	Transportadores, reparación de DNA, resistencia a apoptosis, nicho vascular, inactividad, estabilidad hipóxica.
Inactivación de quimioterapéuticos	Interacción de fármaco con proteínas que alteran sus características moleculares.
Expulsión de quimioterapéuticos	Transportadores de la familia ABC: glicoproteína P (PGP), proteína 1 asociada a resistencia múltiple (MRP1) y Proteína de resistencia de cáncer de mama (BCRP/ABCG2).

<b>Reducción de absorción de fármaco</b>	Reducción de tendencia de unión de fármaco y reducción de número de transportadores.
<b>Inhibición de muerte celular</b>	Sobreexpresión de proteínas antiapoptóticas y reducción de proteínas proapoptóticas.
<b>Cambio de metabolismo de fármaco</b>	Reducción de activación de profármacos y aumento de inactivación de fármacos.
<b>Cambio de blancos farmacológicos</b>	Modificación de proteína blanco
<b>Aumento de reparación de ADN</b>	Sistemas de reparación de ADN: Sistema de reparación de escisión de nucleótido y recombinación homóloga y no homóloga.
<b>Amplificación de genes</b>	Provee de múltiples copias de proteína blanco.
<b>Alteraciones epigenéticas</b>	Metilación/desmetilación y acetilación/desacetilación de histonas
<b>miRNA</b>	Ruptura de RNA, acortamiento de poliA de mRNA y traducción deficiente.

## 2.7 Productos naturales

Actualmente, uno de los retos más grandes para la industria farmacéutica es el de encontrar candidatos a fármacos que tengan pocos o casi nulos efectos secundarios, debido a que las enfermedades crónicas como hipertensión, diabetes y cáncer e infecciosas como VIH/SIDA y malaria son cada vez más comunes y graves en la población mundial (Thomford *et al.*, 2018); es debido a ello que se ha comenzado a poner atención nuevamente en la medicina tradicional para tratar las enfermedades; prueba de esto es que desde los 40's hasta 2019 se registraron ante la FDA 247 moléculas para el tratamiento del cáncer de los cuales, alrededor del 70% se trata de macromoléculas biológicas, productos naturales, fitomedicamentos

o sus derivados (Newman y Cragg, 2020). La búsqueda de productos naturales con efecto farmacológico es posible debido a que las plantas cuentan con gran diversidad, pues crecen en casi cualquier espacio y se ven forzadas a sobrevivir a diferentes estresores como lo son cambios de clima, temperatura, radiación UV y depredadores (Thomford *et al.*, 2018). Las plantas requieren de metabolitos primarios para realizar las funciones más básicas para su supervivencia, y de metabolitos secundarios específicos para un género o especie que les ayudan a favorecer su supervivencia. Estos metabolitos secundarios son producidos por las rutas del acetato-malonato, ácido shikímico, ácido mevalónico, terpenoides, esteroides y flavonoides (Dewick, 2010).

Aunque los productos naturales han demostrado tener gran actividad para tratar diferentes patologías, su investigación aún tiene que afrontar desafíos como la falta de procedimientos estandarizados, falta de aislamiento de compuestos puros, poca elucidación de mecanismos de acción y las pruebas clínicas de acuerdo con estándares. La investigación de estos productos es complicada debido a la complejidad de las mezclas de diferentes moléculas que puede tener un extracto. Sin embargo, es debido a la misma complejidad que muchos de ellos logran tener su efecto farmacológico debido a que sus moléculas trabajan sinérgicamente teniendo poco o ningún efecto cuando son purificadas (Thomford *et al.*, 2018).

## **2.8 Género *Stevia***

*Stevia* es un género perteneciente a la tribu *Eupatoriae* y a la familia *Asteraceae* con alrededor de 250 especies distribuidas a lo largo del continente americano. México cuenta con 116 de estas especies, de las cuales, 107 son endémicas. Las plantas de este género pueden crecer como hierbas anuales, hierbas perennes, sufrútices o arbustos y pueden tener hojas opuestas o alternas. Este género se caracteriza por tener una cabeza de flores con cinco floretes blancos, rosas o morados cada una y pubescencia densa en la superficie interior de la garganta de la corola con apéndices anterados (estambres) que van de obovados a elípticos con márgenes crenulados. Las cabezuelas están organizadas en grupos peniculiformes, amplios y laxos o corimbiformes, compactos y densos (Villagómez-Flores *et al.*, 2018).

### **2.8.1 Efecto anticancerígeno de diferentes especies de *Stevia***

Recientemente se ha demostrado el efecto anticancerígeno de diferentes especies del género *Stevia*. Se ha reportado que el extracto etanólico de *Stevia rebaudiana* tiene efectos negativos sobre la viabilidad de células de cáncer de mama (MCF-7 y MDA-MB-231), cáncer de colon (CaCo2 y HCT116), cáncer de pulmón (A-549), cáncer cervical (He-La) y cáncer de páncreas (López *et al.*, 2016). Este mismo extracto demostró tener, en un modelo murino de carcinoma de ascitis de Erlich, un efecto antitumoral significativamente mayor que el 5-Fluorouracilo (fármaco estándar) a una concentración de 300 mg/kg/i.p. (Rajesh *et al.*, 2010).

Mann y colaboradores reportaron que el aceite esencial de *S. rebaudiana* tiene la capacidad de disminuir la proliferación de células de glioma de rata y cáncer de ovario de hámster (Mann *et al.*, 2014).

El esteviósido encontrado en *Stevia rebaudiana* ha demostrado tener la capacidad de inhibir el crecimiento celular en líneas de cáncer de mama como MDA-MB-231 y KBR3, además de inducir la apoptosis de las mismas células (Khare y Chandra,

2019). Mientras que el esteviol presente en la misma especie tiene efecto proapoptótico dependiente de la concentración en células de cáncer de mama responsivas a hormonas MCF-7 (Gupta *et al.*, 2017) e inhibición de crecimiento de células cancerígenas gastrointestinales, por medio de la inducción de apoptosis mitocondrial (Chen *et al.*, 2018).

Finalmente, Martínez-Rojo y colaboradores reportaron en 2020 que los extractos metanólico de *Stevia pilosa* y *Stevia eupatoria* disminuyen la proliferación y la migración de células de cáncer de próstata LNCaP y PC-3 (Martínez-Rojo *et al.*, 2020).

### **2.8.2 Composición química de la *Stevia***

Actualmente, no se conoce la composición química de todas las especies del género *Stevia*; sin embargo, 70 de ellas han sido caracterizadas y se ha encontrado que comparten familias de metabolitos secundarios que le proveen al género de efectos hipoglucemiantes, reguladores de presión arterial, anticancerígenos, protectores renales, antioxidantes y antiinflamatorios (Gupta *et al.*, 2013) como los aceites esenciales (borenol, cineol, pulegona, geraniol, acetato de linalol, chamazuleno, a-humuleno, cariofileno, etc.), derivados de acetofenona, benzofurano y cromeno (p-hidroxiacetofenona), sesquiterpenos funcionalizados (bisabolenos, germacrenos, eudesmanos, guaianólidos, longipinanos, elemanólidos, eremaofilanos, pseudoguaianólidos), diterpenos, triterpenos, esteroides ( $\beta$ -sitosterol, estigmasterol, campersterol, olenanos, lupanos, taraxateranos, friedelanos) y flavonoides (Álvarez-García, 2005).

### **2.9 *Stevia tomentosa***

*Stevia tomentosa* es una planta herbácea perenne, erecta que llega a medir hasta 1 metro de altura. Su tallo puede ser simple o ramificado con pelos muy entrecruzados color café o púrpura. Todas sus hojas son opuestas o alternas y son crenadas o aserradas en el margen. Cuenta con tres nervios prominentes que se unen arriba de la base de la lámina. Su inflorescencia consta de cabezuelas agregadas compactamente en las que todas quedan al mismo nivel y su flor de cabezuelas formadas por cinco flores pequeñas dispuestas sobre un receptáculo

plano. Las flores son todas bisexuales de color blanco o rosa (Figura 7). Esta planta es endémica de los bosques pino-encino (Mondragón, 2009).



Figura 7. *Stevia tomentosa*. Se muestra las partes aéreas y arteriales de *Stevia tomentosa* (Mondragón, 2009).

De *Stevia tomentosa* se logró aislar compuestos como triterpenos (acetato de dammaranilo, 3 $\beta$ -friedelanol,  $\beta$ -sitosterol y estigmasterol), compuestos que ya habían sido caracterizados en otras especies del género (Álvarez-García, 2005), además de una lactona sesquiterpénica (diepoxiguaianolida) y un bisaboleno ((2R,3R,6R,7S)-2,3-epoxi-2,3- dihidrobisabolen-1-ona) (Valdez-Calderón *et al.*, 2011; Valdez-Calderón *et al.*, 2013) que solo han sido reportados para esta especie del género. *Stevia tomentosa* tiene efecto antibacteriano contra *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* y *Salmonella typhi* (Álvarez-García, 2005).

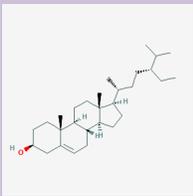
### **2.9.1 Efecto anticancerígeno de *Stevia tomentosa***

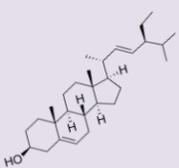
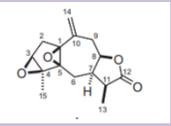
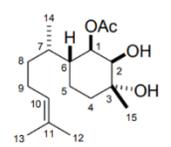
En un estudio previo realizado por el grupo de investigación al que pertenece esta tesis, se demostró que el extracto metanólico de hoja de *Stevia tomentosa* cuenta con efecto antiproliferativo en células de cáncer de mama dependientes de hormonas MCF-7 y triple negativo MDA-MB-231 dependiente de la concentración. Además, se encontró que el extracto logra inhibir la migración de las células cancerígenas dependientes de hormonas hasta en un 95% a las 24 horas y las células triple negativo en alrededor de 40% (Mera-Cazares, 2020).

## 2.9.2 Moléculas con efecto anticancerígeno presentes en *Stevia tomentosa*

Dentro de las moléculas encontradas en *Stevia tomentosa* hay algunas que ya tienen efectos anticancerígenos reportados ( $\beta$ -sitosterol, estigmasterol) y otras que no han sido reportadas debido a que sólo están presentes en esta especie del género pero que pertenecen a familias que tienen efectos reportados.

Tabla 5. Moléculas con efecto anticancerígeno en *Stevia tomentosa*.

Compuesto	Estructura	Células	Efecto (inhibición)	Vía	Referencia
$\beta$ -sitosterol		MCF-7 y MDA (mama)	Proliferación	Apoptosis intrínseca por PI3K; arresto celular por disminución de CDK4 y ciclina 1 y activación de MAPK	Xu <i>et al.</i> , 2018; Vundru <i>et al.</i> , 2013
		PC-3 (próstata)	Migración	No estudiado	Awad <i>et al.</i> , 2001
Estigmasterol		ES2 y OV90 (ovario), cáncer hepático y gástrico	Proliferación y migración	Apoptosis intrínseca, inhibición de PI3K y MAPK y arresto celular, JAK/STAT	Bae <i>et al.</i> , 2020; Kim <i>et al.</i> , 2014; Li <i>et al.</i> , 2018

		Es2 y OV90 (ovario)	Migración	Reducción de VEGFA, PLAU, MMP2, MMP9 y MMP14	Bae <i>et al.</i> , 2020
Diepoxi-guaianolida (Lactonas sesquiterpénicas)		Carcinoma, mama (MCF-7 y MDA-MB-231), glioma y cáncer cérvico (Hela)	Proliferación y migración	Inhibición de NF-kB; apoptosis intrínseca, inactivación de STAT2	Babaei, 2018
2R,3R,6R,7S)-2,3-epoxi-2,3-dihidrobisabolon-1-ona (bisaboleno)		Neuroblastoma (TE671); mama (MDA-MB-231, SKBR3, MCF-7 y BT474)	Proliferación	Arresto celular, apoptosis por ambas vías	Jou <i>et al.</i> , 2016; Yeo <i>et al.</i> , 2015

### 3. JUSTIFICACIÓN

A nivel mundial el cáncer de mama representa el 11.7% de todos los casos diagnosticados teniendo un 6.9% de las muertes registradas por cáncer tomando en cuenta tanto hombres como mujeres. En América latina, del total de casos nuevos de cáncer, el 9.3% corresponde a cáncer de mama con 8.5% de las muertes por cáncer correspondiendo a este tipo. México cuenta con 15.3% de cáncer de mama entre todos los tipos de cáncer para ambos sexos, el 28.2% de todos los casos de cáncer diagnosticados en mujeres son de cáncer de mama (GLOBOCAN, 2021). Los tratamientos actuales para esta enfermedad además de no ser completamente efectivos tienen efectos secundarios adversos que disminuyen la calidad de vida de los pacientes tratados con ellos, es debido a ello que nuevas estrategias terapéuticas de origen natural con efecto antineoplásico y menores efectos secundarios son buscadas; es debido a lo antes mencionado que los productos naturales son de gran interés debido a su gran diversidad y las propiedades farmacológicas que han demostrado a lo largo de la historia de la humanidad y más recientemente en estudios farmacológicos. Hasta 2019 la FDA contaba con 247 moléculas registradas para el tratamiento de cáncer, de las cuales, alrededor del 70 % pertenecía al grupo de las macromoléculas biológicas, productos naturales, fitomedicamentos o sus derivados (Newman y Cragg, 2020). Estudios previos de diferentes especies del género *Stevia* han demostrado la existencia de metabolitos secundarios de interés para el tratamiento de diferentes tipos de cáncer como adyuvantes de tratamientos quirúrgicos. *Stevia tomentosa* es una especie endémica de los bosques mexicanos que cuenta con un solo estudio de su efecto anticancerígeno en el que demostró tener efecto antiproliferativo y antimigratorio en células de cáncer de mama dependientes de hormonas (MCF-7) y triple negativo (MDA-MB-231). Debido a lo anterior, es de gran importancia determinar si el extracto de *Stevia tomentosa* pudiera tener un mayor efecto que una mezcla de fitoesteroles reportados como parte de sus componentes.

#### **4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN**

¿El extracto metanólico de hoja de *Stevia tomentosa* tiene un efecto mayor que la mezcla de fitoesteroles  $\beta$ -sitosterol y estigmasterol sobre la proliferación y migración de las células de cáncer de mama?

#### **5. HIPÓTESIS**

El efecto antiproliferativo y antimigratorio del extracto metanólico de hoja de *Stevia tomentosa* es mayor que el de la mezcla de fitoesteroles  $\beta$ -sitosterol y estigmasterol.

## 6. OBJETIVOS

### 6.1 Objetivo general

Determinar si el efecto antiproliferativo y antimigratorio del extracto de *Stevia tomentosa* es mayor o menor que el de la mezcla de fitoesteroles  $\beta$ -sitosterol y estigmasterol.

### 6.2 Objetivos específicos

1. Evaluar el efecto del extracto de *Stevia tomentosa* sobre la proliferación y la migración de células de cáncer de mama dependientes de hormonas MCF-7 y triple negativo MDA-MB-231.
2. Determinar el efecto de la mezcla de fitoesteroles sobre la proliferación y la migración de células de cáncer de mama dependientes de hormonas MCF-7 y triple negativo MDA-MB-231.
3. Identificar la línea celular más sensible al efecto del extracto de *Stevia tomentosa* en la proliferación y migración celular.
4. Identificar la línea celular más sensible en la proliferación y migración celular al efecto de la mezcla de fitoesteroles.

## **7. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **7.1 Materiales**

Las líneas celulares de cáncer de mama dependiente de hormonas MCF-7 y de cáncer de mama triple negativo MDA-MB-231 fueron amablemente donadas por la Dra. Angelina Rodríguez Torres de la Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad Autónoma de Querétaro y la Dra. Brenda Anguiano del Instituto de Neurobiología, UNAM, campus Juriquilla respectivamente.

Tanto el  $\beta$ -sitosterol (S1270-10MG) como el estigmasterol (S2424-1G) fueron comprados de SIGMA-ALDRICH.

### **7.2 Métodos**

#### **7.2.1 Cultivo celular**

Las dos líneas celulares fueron cultivadas en medio DMEM, suplementado con suero fetal bovino al 10% y penicilina-estreptomycinina al 1% como antibiótico a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. La línea celular MCF-7 fue usada como modelo de una etapa temprana del cáncer de mama, debido a que es dependiente de hormonas con baja invasividad y las células MDA-MB-231 como modelo del estado avanzado de la enfermedad, debido a que es triple negativo (negativa a receptores de estrógeno, progesterona y HER2) y por lo tanto su proliferación es independiente de hormonas, lo que la hace altamente invasiva.

#### **7.2.2 Disolución del extracto metanólico de *Stevia tomentosa*.**

Para los diferentes tratamientos, el extracto metanólico de hoja de *Stevia tomentosa* proporcionado por la Dra. Raquel Cariño Cortés de la Universidad Autónoma de Hidalgo (UAEH) fue disuelto en DMSO al 1% para luego ser sonicado durante 15 minutos. Una vez pasados los 15 minutos fue adicionado el medio DMEM (10 mL) y vuelto a sonicar por 15 minutos. Después se filtró con filtros de jeringa de 2  $\mu$ M para esterilizar y ser diluido a las concentraciones necesarias y completado con DMSO para contar con la misma concentración (0.5%) y utilizado de inmediato.

### **7.2.3 Disolución de la mezcla de fitoesteroles**

Para los diferentes tratamientos, la mezcla de fitoesteroles fue disuelta en DMSO al 3% para luego ser sonicado durante 15 minutos. Una vez pasados los 15 minutos fue adicionado el medio DMEM (10 mL) y vuelto a sonicar por 15 minutos. Después se diluyó a las concentraciones necesarias y completado con DMSO para contar con la misma concentración (1%) en todas y utilizado de inmediato. Las concentraciones de  $\beta$ -sitosterol y de estigmasterol utilizadas fueron de 10,25,50 y 100  $\mu\text{g/mL}$  de cada uno.

### **7.2.4 Proliferación**

Para cumplir con los objetivos 1 y 2, las células de cáncer de mama (MDA-MB-231 y MCF-7) se cultivaron en medio DMEM completo, en cajas p24 suplementadas y conservadas a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> hasta una confluencia del 90%. Una vez que llegaron a esta confluencia (después de 24 horas), fueron tratadas con el extracto metanólico de hoja de *Stevia tomentosa* a concentraciones de 10, 25, 50, 100, 250 y 500  $\mu\text{g/mL}$  o la mezcla de fitoesteroles a concentraciones de 10, 25, 50 y 100  $\mu\text{g/mL}$ .

Después de 24 horas las células viables fueron tripsinizadas y contadas por el método de azul tripano.

### **7.2.5 Migración**

El efecto antimigratorio fue medido por la técnica de ensayo herida. Para realizarlo las células fueron sembradas en cajas p6 (300,000 por pozo), cuando alcanzaron la confluencia de 90% (después de 24 horas), se realizaron 3 heridas por pozo y se les agregó el tratamiento. Se analizaron cuatro grupos diferentes: un control adicionado con DMSO (0.1% para el extracto y 0.3% para la mezcla de fitoesteroles), 50  $\mu\text{g/mL}$  y 100  $\mu\text{g/mL}$ .

La migración se analizó a las 0, 6, 12 y 24 horas después de la adición de los tratamientos y se tomaron fotos.

#### **7.2.4 Análisis estadístico**

El análisis estadístico se realizó con ANOVA de una vía y una *t de student* usando el software Prisma. Después se realizó una prueba *post-hoc* de Dunnet de tres experimentos independientes con sus tres réplicas cada uno. La *t de student* fue realizada para cumplir con los objetivos 3 y 4. Se tomó el valor de  $p < 0.05$ . Todos los datos fueron representados como la media  $\pm$  la desviación estándar.

## 8. RESULTADOS

### 8.1 Proliferación de células de cáncer de mama dependientes de hormonas tratadas con el extracto de *Stevia tomentosa*

#### 8.1.1 Curva de proliferación de células MCF-7 tratadas con extracto de *Stevia tomentosa*

La curva de proliferación de células de cáncer de mama dependientes de hormonas (figura 8) se realizó para determinar el efecto del extracto metanólico de *Stevia tomentosa* sobre células representantes del estadio temprano de la enfermedad. Se observó disminución significativa de la proliferación a partir de la concentración de 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (reducción de viabilidad por *Stevia tomentosa* con respecto al control: 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ : 28.34%  $\pm$  12.2%; 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ : 68.13%  $\pm$  7.06%; 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ : 87.76%  $\pm$  2.43%; 250  $\mu\text{g}/\text{mL}$ : 93.55%  $\pm$  0.31%; 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ : 100%  $\pm$  0%), con respecto al control luego de 24 horas de tratamiento.

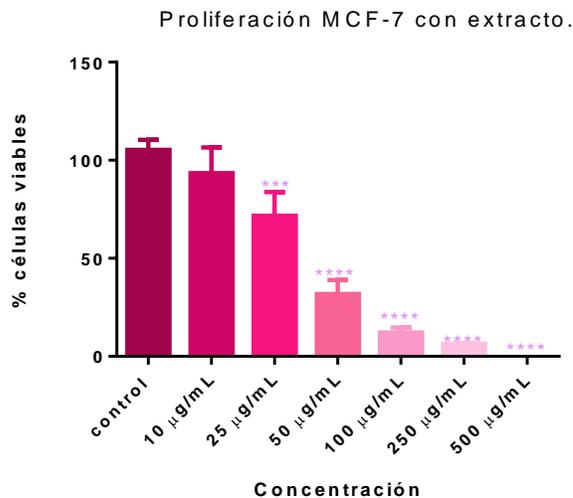


Figura 8. Efecto del extracto de *Stevia tomentosa* en la proliferación de células de cáncer de mama MCF-7 luego de 24 horas de tratamiento. Se muestra el promedio  $\pm$  la desviación estándar de tres experimentos independientes. Se realizó un ANOVA con prueba *post hoc* de Dunnet ( $p < 0.05$ )

### 8.1.2 Curva dosis-respuesta de células de cáncer de mama dependientes de hormonas MCF-7

Se realizó una curva dosis-respuesta con los resultados obtenidos de la curva de proliferación de células de cáncer de mama dependientes de hormonas MCF-7 para determinar la concentración inhibitoria 50 del extracto metanólico de hoja de *Stevia tomentosa*, esto se muestra en la figura 9, obteniendo como resultado una IC<sub>50</sub> de 40.97 µg/mL.

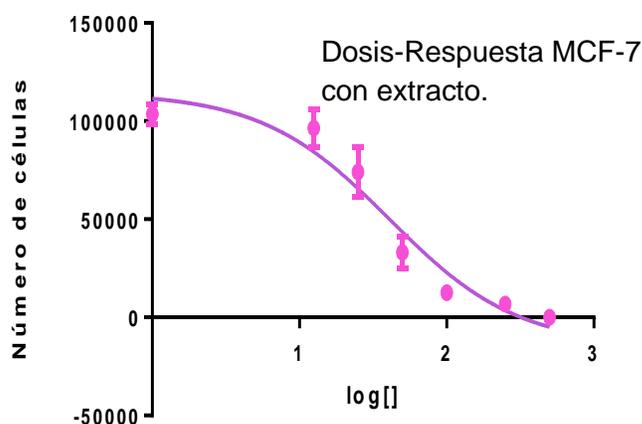


Figura 9. Curva dosis-respuesta de células de cáncer de mama MCF-7 obtenida a partir de los resultados de la curva de proliferación. Se obtuvo una IC<sub>50</sub> de 40.97 µg/mL.

## 8.2 Proliferación de células de cáncer de mama triple negativo tratadas con el extracto de *Stevia tomentosa*

### 8.2.1 Curva de proliferación de células MDA-MB-231 tratadas con extracto de *Stevia tomentosa*

La curva de proliferación de células de cáncer de mama triple negativo mostrada en la figura 10 se realizó para determinar el efecto del extracto metanólico de *Stevia tomentosa* sobre células representantes del estadio más avanzado e invasivo de la enfermedad. Se observó disminución significativa de la proliferación desde la

concentración de 10 µg/mL (reducción de viabilidad por *Stevia tomentosa* con respecto al control: 10 µg/mL: 13.12% ± 3.93%; 25 µg/mL: 17.15% ± 7.81%; 50 µg/mL: 24.60% ± 6.55%; 100 µg/mL: 58.05% ± 5.59%; 250 µg/mL: 72.24% ± 7.01%; 500 µg/mL: 81.03% ± 8.07%), con respecto al control luego de 24 horas de tratamiento.

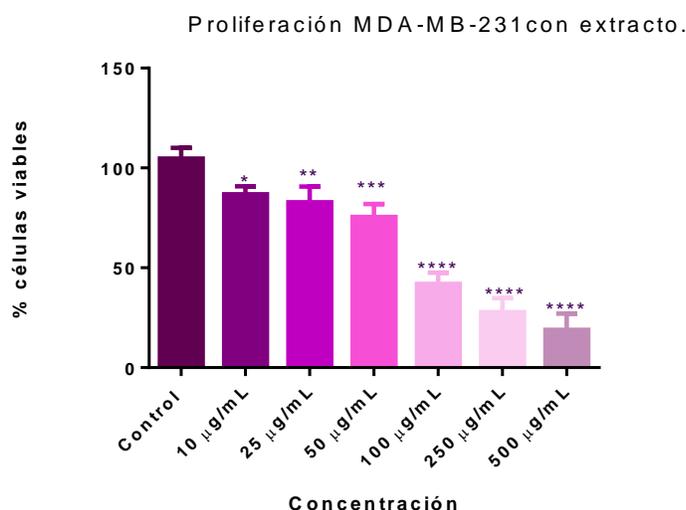


Figura 10. Efecto del extracto de *Stevia tomentosa* en la proliferación de células de cáncer de mama MDA-MB-231 luego de 24 horas de tratamiento. Se muestra el promedio ± la desviación estándar de tres experimentos independientes. Se realizó un ANOVA con prueba *post hoc* de Dunnet ( $p < 0.05$ ).

### 8.2.2 Curva dosis-respuesta de células de cáncer de mama triple negativo MDA-MB-231

Se realizó una curva dosis-respuesta con los resultados obtenidos de la curva de proliferación de células de cáncer de mama independientes de hormonas MDA-MB-231 para determinar la concentración inhibitoria 50 del extracto metanólico de hoja de *Stevia tomentosa*, esto es mostrado en la figura 11, obteniendo como resultado una  $IC_{50}$  de 86.54 µg/mL.

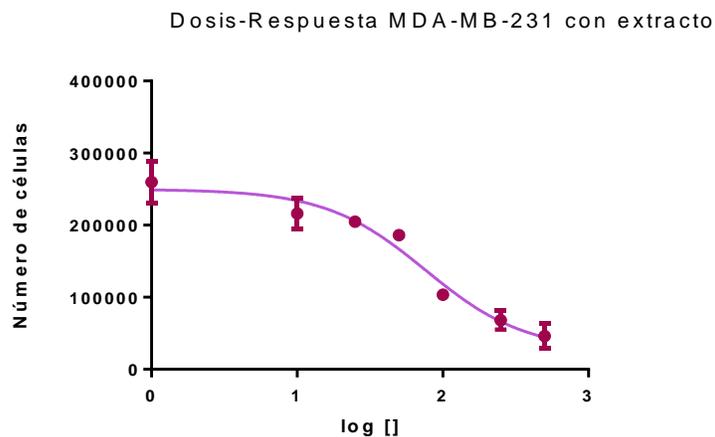


Figura 11. Curva dosis-respuesta de células de cáncer de mama MDA-MB-231 obtenida a partir de los resultados de la curva de proliferación. Se obtuvo una  $IC_{50}$  de 86.54  $\mu\text{g/mL}$ .

### 8.3 Proliferación de células de cáncer de mama dependientes de hormonas tratadas con la mezcla de fitoesteroides

#### 8.3.1 Curva de proliferación de células MCF-7 tratadas con la mezcla de fitoesteroides ( $\beta$ -sitosterol y estigmasterol)

La curva de proliferación de células de cáncer de mama MCF-7 de la figura 12 se realizó para determinar el efecto de la mezcla de  $\beta$ -sitosterol y estigmasterol sobre células representativas del estadio temprano de la enfermedad. Se observó disminución significativa de la proliferación desde los 10  $\mu\text{g/mL}$  luego de 24 horas de tratamiento contra el control (reducción de viabilidad por la mezcla de fitoesteroides con respecto al control: 10  $\mu\text{g/mL}$ : 11.57%  $\pm$  5.52%; 25  $\mu\text{g/mL}$ : 21.00%  $\pm$  2.52%; 50  $\mu\text{g/mL}$ : 22.17%  $\pm$  2.21%; 100  $\mu\text{g/mL}$ : 52.75%  $\pm$  1.57%).

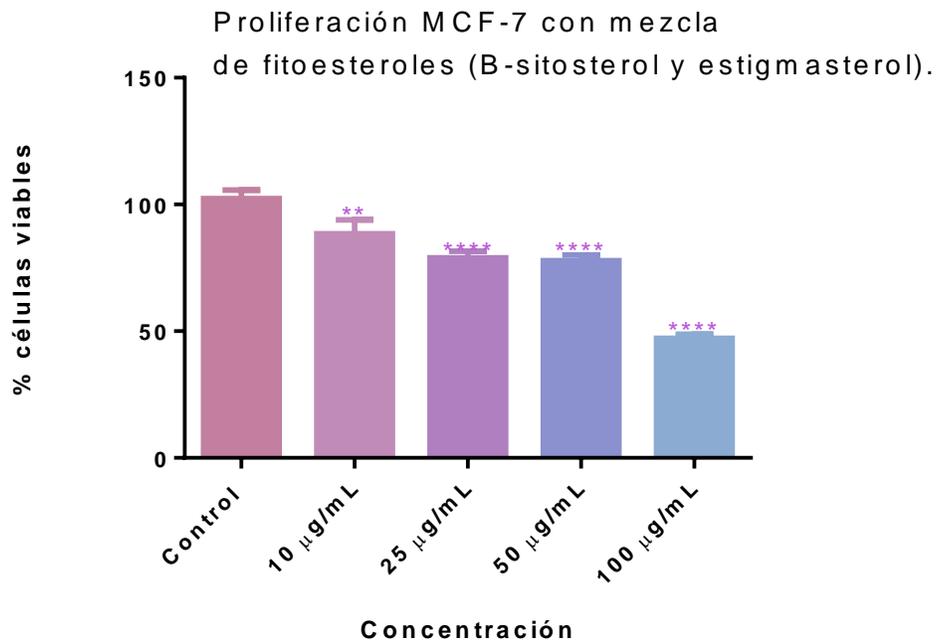


Figura 12. Efecto de la mezcla de fitoesteroides (β-sitosterol y estigmasterol) en la proliferación de células de cáncer de mama MCF-7 luego de 24 horas de tratamiento. Se muestra el promedio ± la desviación estándar de tres experimentos independientes. Se realizó un ANOVA con prueba *post hoc* de Dunnet ( $p < 0.05$ ).

### 8.3.2 Curva dosis-respuesta de células de cáncer de mama dependientes de hormonas MCF-7 tratadas con la mezcla de fitoesteroides (β-sitosterol y estigmasterol)

Se realizó una curva dosis-respuesta con los resultados obtenidos de la curva de proliferación de células de cáncer de mama dependientes de hormonas MCF-7 para determinar la concentración inhibitoria 50 de la mezcla de fitoesteroides, esto es mostrado en la figura 13, no se logró obtener una IC<sub>50</sub> para el tratamiento.

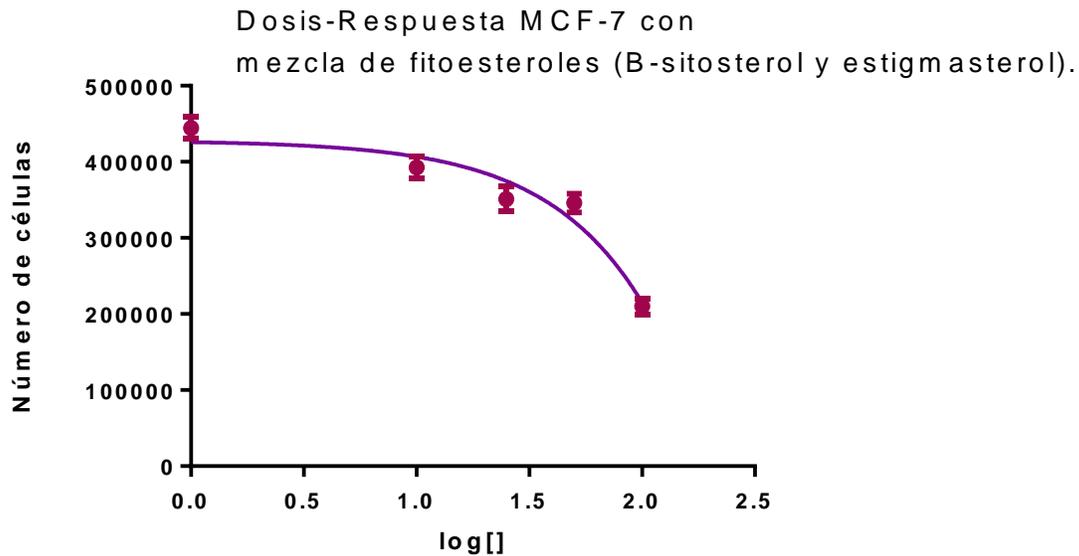


Figura 13. Curva dosis-respuesta de células de cáncer de mama MCF-7 obtenida a partir de los resultados de la curva de proliferación.

#### 8.4 Proliferación de células de cáncer de mama triple negativo tratadas con la mezcla de fitoesteroles

##### 8.4.1 Curva de proliferación de células MDA-MB-231 tratadas con la mezcla de fitoesteroles ( $\beta$ -sitosterol y estigmasterol)

La curva de proliferación de células de cáncer de mama independientes de hormonas mostrada en la figura 14, se realizó para determinar el efecto de mezcla de fitoesteroles sobre células representantes de la etapa tardía. Se observó disminución significativa de la proliferación desde los 10  $\mu\text{g/mL}$  con respecto al control después de 24 horas de tratamiento (reducción de viabilidad por la mezcla de fitoesteroles con respecto al control: 10  $\mu\text{g/mL}$ : 9.08%  $\pm$  1.47%; 25  $\mu\text{g/mL}$ : 13.07%  $\pm$  2.17%; 50  $\mu\text{g/mL}$ : 14.86%  $\pm$  1.27%; 100  $\mu\text{g/mL}$ : 18.30%  $\pm$  5.36%)

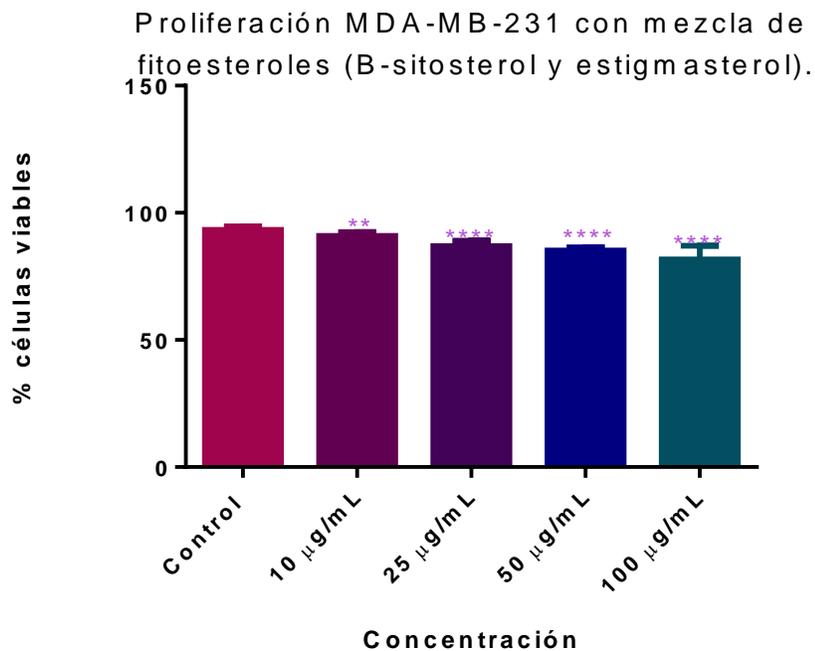


Figura 14. Efecto de la mezcla de fitoesteroides ( $\beta$ -sitosterol y estigmasterol) en la proliferación de células de cáncer de mama MDA-MB-231 luego de 24 horas de tratamiento. Se muestra el promedio  $\pm$  la desviación estándar de tres experimentos independientes. Se realizó un ANOVA con prueba *post hoc* de Dunnet ( $p < 0.05$ ).

#### 8.4.2 Curva dosis-respuesta de células de cáncer de mama independientes de hormonas MDA-MB-231

Se realizó una curva dosis-respuesta con los resultados obtenidos de la curva de proliferación de células de cáncer de mama dependientes de hormonas MDA-MB-231 para determinar la concentración inhibitoria 50 de la mezcla de fitoesteroides, como se muestra en la figura 15, no se logró obtener una  $IC_{50}$ .

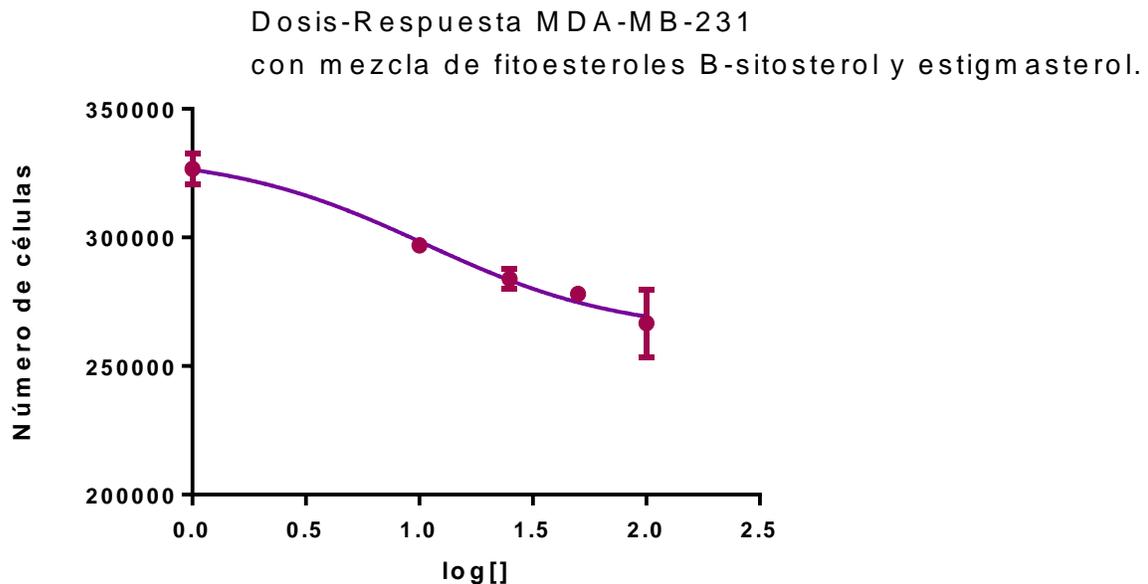


Figura 15. Curva dosis-respuesta de células de cáncer de mama MDA-MB-231 obtenida a partir de los resultados de la curva de proliferación.

### 8.5 Comparación del efecto del extracto de *Stevia tomentosa* y la mezcla de fitoesteroles $\beta$ -sitosterol y estigmasterol sobre la proliferación de células de cáncer de mama dependientes de hormonas

Se compararon los resultados obtenidos de la proliferación de las dosis comunes entre ambos tratamientos para determinar cuál tratamiento contó con mayor efecto, si la mezcla de fitoesteroles ( $\beta$ -sitosterol y estigmasterol) o el extracto. Los resultados fueron analizados con una *t de student* ( $p < 0.05$ ) y se determinó que, en las células MCF7 tratadas con el extracto completo de *Stevia tomentosa*, hay un mayor efecto antiproliferativo en comparación con las células tratadas con la mezcla de fitoesteroles (figura 16). Este efecto se observó para las concentraciones más altas, 50  $\mu\text{g/ml}$  y 100  $\mu\text{g/ml}$ .

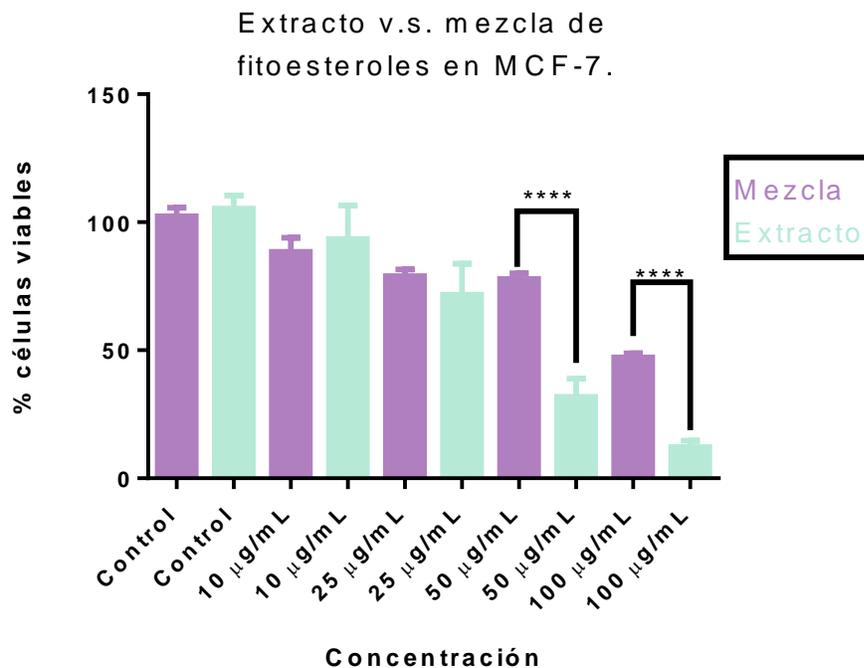


Figura 16. Gráfica comparativa del efecto del tratamiento con la mezcla de fitoesteroles ( $\beta$ -sitoesterol y estigmasterol) y el extracto completo de *Stevia tomentosa* en células MCF-7. Los resultados fueron analizados con una prueba *t de student* con un valor de  $p < 0.05$ . La barra morada indica el tratamiento con la mezcla de fitoesteroles y la barra azul el tratamiento con el extracto completo.

### 8.6 Comparación del efecto del extracto de *Stevia tomentosa* y la mezcla de fitoesteroles ( $\beta$ -sitoesterol y estigmasterol) sobre la proliferación de células de cáncer de mama triple negativo

Se realizó la comparación de la proliferación observada en los tratamientos con el extracto y la mezcla de fitoesteroles en células MDA-MB-231. Los resultados fueron analizados con una *t de student* ( $p < 0.05$ ) y se determinó que, en las células tratadas con el extracto completo de *Stevia tomentosa*, hay un mayor efecto antiproliferativo en comparación con la mezcla de fitoesteroles en las células independientes de hormonas MDA-MB-23, resultados mostrados en la figura 17. Este efecto fue observado en las concentraciones de 50  $\mu\text{g/ml}$  y 100  $\mu\text{g/ml}$ .

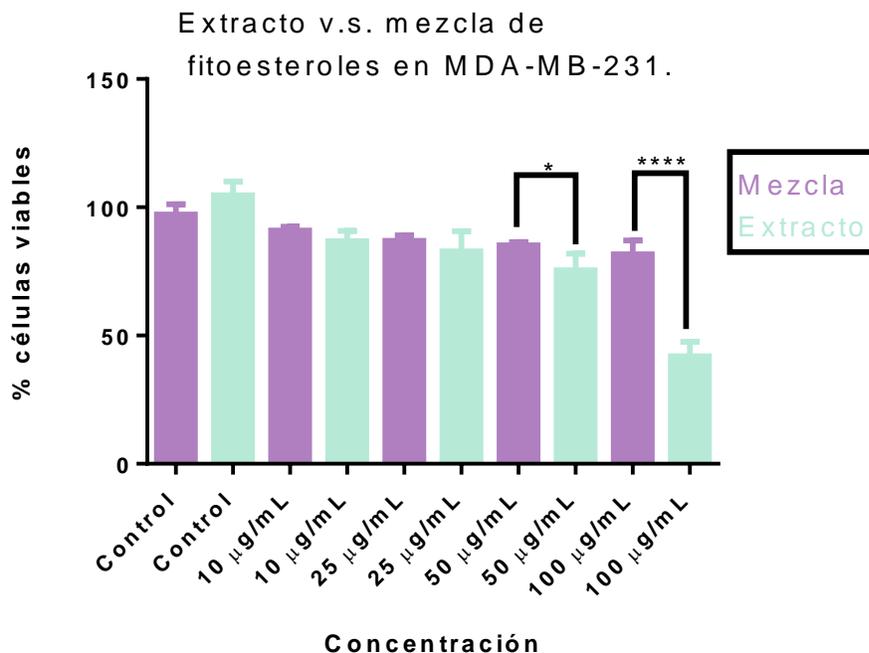


Figura 17. Gráfica comparativa del efecto del tratamiento con la mezcla de fitoesteroles y el extracto completo de *Stevia tomentosa* en células MDA-MB-231. Los resultados fueron analizados con una prueba *t de student* con un valor de  $p < 0.05$ . La barra morada indica el tratamiento con la mezcla de fitoesteroles y la barra azul el tratamiento con el extracto completo.

### 8.7 Comparación del efecto del extracto de *Stevia tomentosa* sobre células MCF-7 contra células MDA-MB-231.

Se realizó una comparación de resultados obtenidos para proliferación de células de cáncer de mama dependientes de hormonas MCF-7 tratadas con el extracto de *Stevia tomentosa* contra el efecto del mismo extracto sobre la proliferación de células de cáncer de mama triple negativo MDA-MB-231. Los resultados fueron analizados con una prueba de *t de student* con una  $p < 0.05$ . Como se observa en la figura 18 el efecto del extracto sobre las células MCF-7 fue estadísticamente

mayor que sobre las MDA-MB-231 desde la concentración de 50 µg/mL.

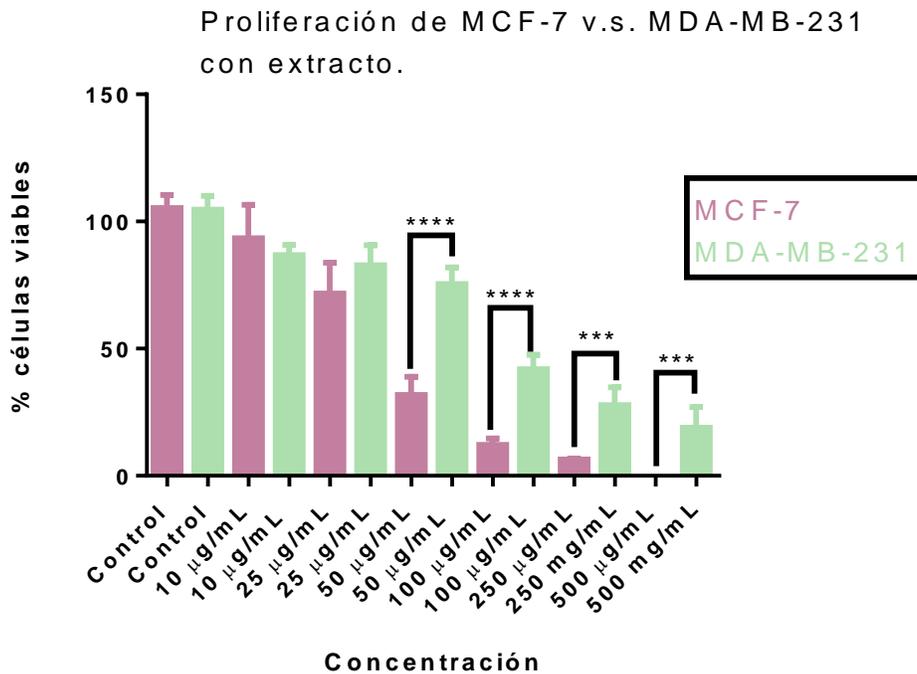


Figura 18. Gráfica comparativa del efecto del tratamiento un extracto de *Stevia tomentosa* sobre células dependientes de hormonas MCF-7 contra células triple negativo MDA-MB-231. Los resultados fueron analizados con una prueba *t de student* con un valor de  $p < 0.05$ . La barra morada indica las células MCF-7 y la barra verde células MDA-MB-231.

### 8.8 Comparación del efecto de la mezcla de fitoesteroides ( $\beta$ -sitosterol y estigmasterol) sobre células MCF-7 contra células MDA-MB-231.

La misma comparación de resultados obtenidos entre la proliferación de células de cáncer de mama dependientes de hormonas MCF-7 y triple negativo MDA-MB-231 pero esta vez tratadas con la mezcla de  $\beta$ -sitosterol y estigmasterol. Los resultados fueron analizados con una prueba de *t de student* con una  $p < 0.05$ . Como se observa en la figura 19, el efecto de la mezcla de fitoesteroides sobre las células MCF-7 fue

estadísticamente mayor que sobre las MDA-MB-231 en la concentración de 100  $\mu\text{g/mL}$ .

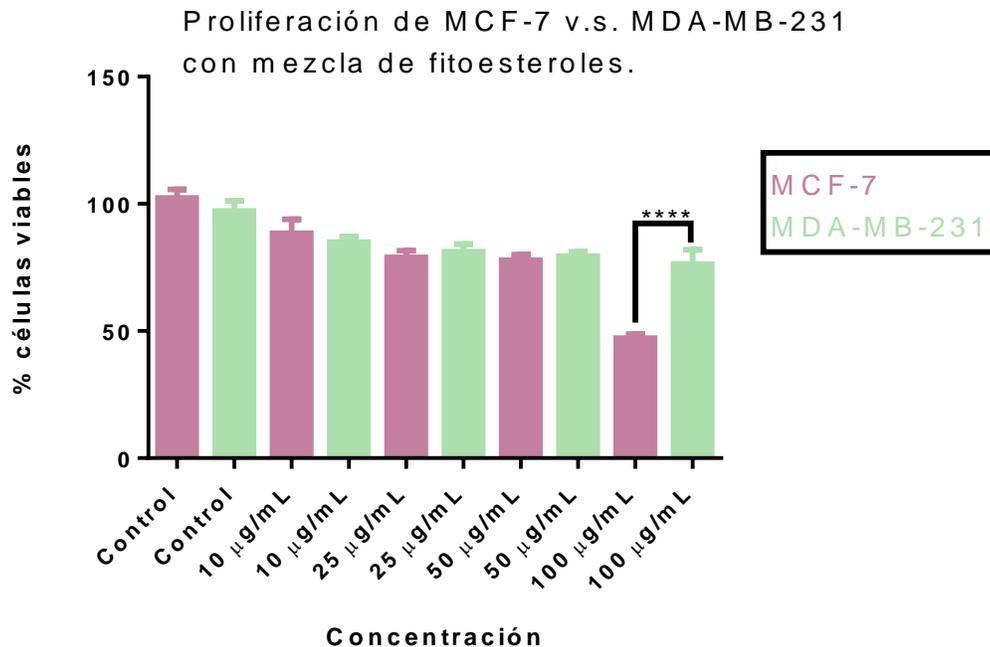


Figura 19. Gráfica comparativa del efecto del tratamiento una mezcla de fitoesteres sobre células dependientes de hormonas MCF-7 contra células triple negativo MDA-MB-231. Los resultados fueron analizados con una prueba *t de student* con un valor de  $p < 0.05$ . La barra morada indica las células MCF-7 y la barra verde células MDA-MB-231.

### 8.9 Efecto antimigratorio del extracto de *Stevia tomentosa* sobre células de cáncer de mama MCF-7.

Se realizó un ensayo herida para determinar el efecto antimigratorio del extracto de *Stevia tomentosa* sobre células de cáncer de mama dependientes de hormonas. Los resultados obtenidos muestran que los grupos tratados con las concentraciones

de 50 y 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  a las 12 y 24 horas efecto antimigratorio sutil, que no alcanza a significancia, con respecto al grupo control (figuras 20 y 21).

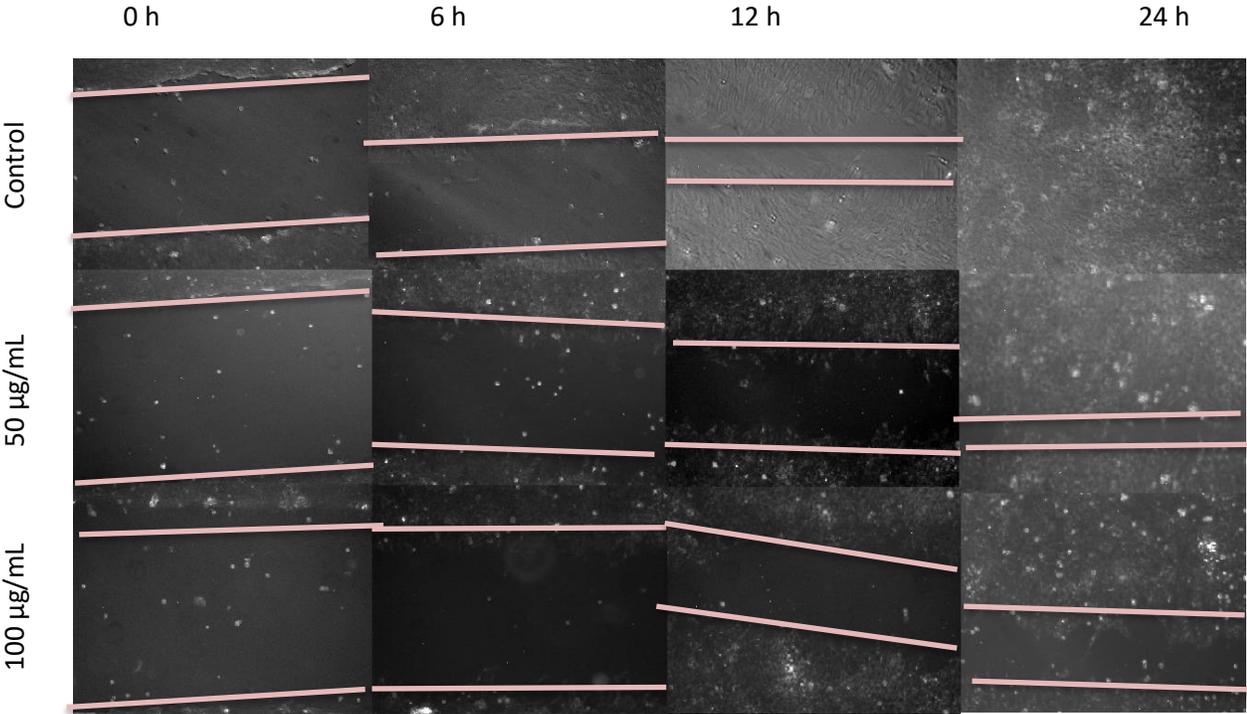


Figura 20. Micrografías del efecto del extracto de *Stevia tomentosa* sobre células MCF-7.

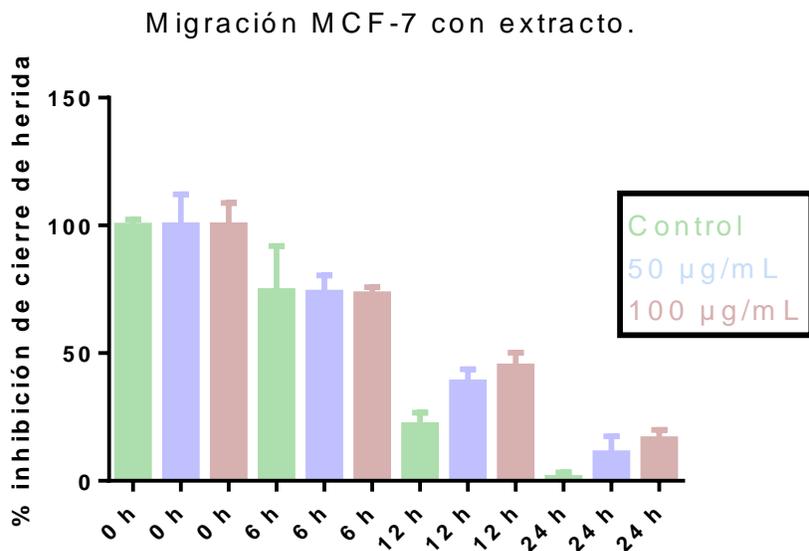


Figura 211. Efecto antimigratorio del extracto metanólico de hoja de *Stevia tomentosa* a las 0, 6, 12 y 24 horas sobre células dependientes de hormonas MCF-7. Los resultados fueron analizados con una prueba ANOVA de una sola vía con una prueba *post hoc* de Dunnet con un valor de  $p < 0.05$ . Las barras verdes indican los controles, las azules los 50 µg/mL y las rosas los 100 µg/mL.

### 8.10 Efecto antimigratorio de la mezcla de fitoesteroles ( $\beta$ -sitoesterol y estigmasterol) sobre células de cáncer de mama MCF-7.

El mismo ensayo fue realizado para determinar el efecto antimigratorio de la mezcla de fitoesteroles ( $\beta$ -sitoesterol y estigmasterol) en células de cáncer de mama MCF-7. Las figuras 22 y 23 muestran como el porcentaje de inhibición de cierre de la herida a las 12 h de tratamiento fue estadísticamente mayor que el del control para ambas concentraciones. A las 24 horas el efecto se atenúa.

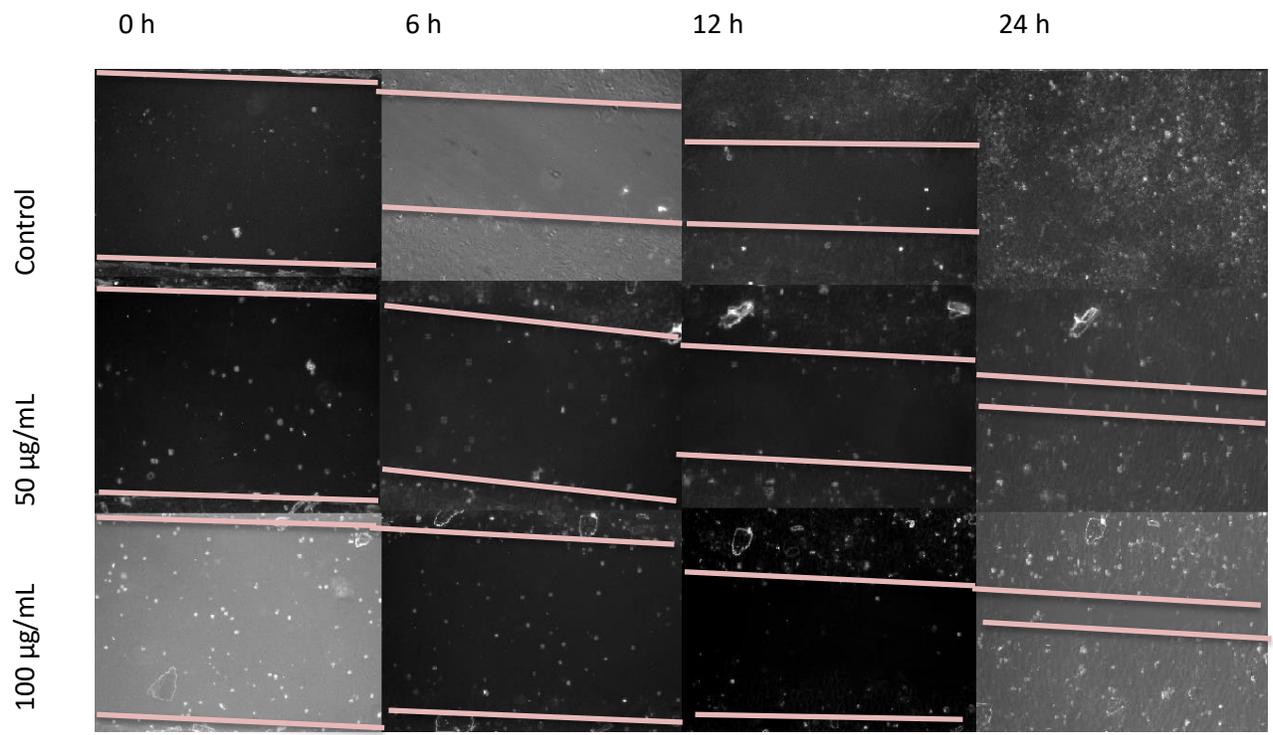


Figura 22. Micrografías del efecto del extracto de la mezcla de fitoesteroles sobre células MCF-7.

Migración MCF-7 con mezcla de fitoesteroles ( $\beta$ -sitosterol y estigmasterol).

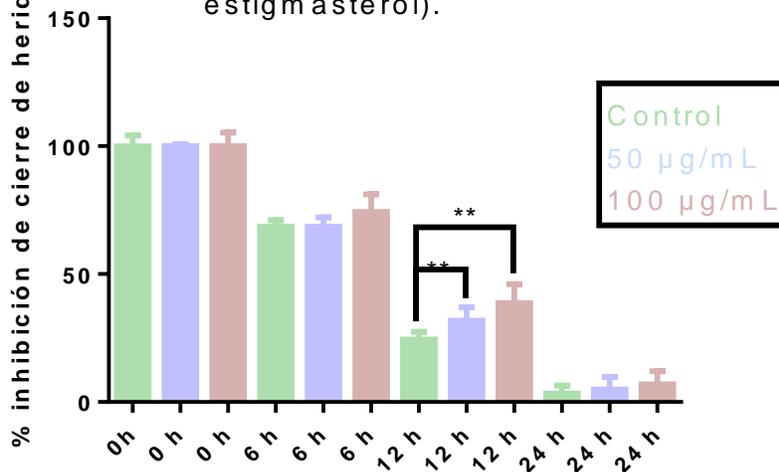


Figura 23. Efecto antimigratorio de la mezcla de fitoesteroles ( $\beta$ -sitosterol y estigmasterol) a las 0,6,12 y 24 horas sobre células dependientes de hormonas MCF-7. Los resultados fueron analizados con una prueba ANOVA de una sola vía con una prueba *post hoc* de Dunnet con un valor de  $p < 0.05$ . Las barras verdes indican los controles, las azules los 50 µg/mL y las rosas los 100 µg/mL.

### 8.11 Efecto antimigratorio del extracto de *Stevia tomentosa* sobre células de cáncer de mama MDA-MB-231.

Se realizó otro ensayo herida, esta vez para determinar el efecto antimigratorio del extracto de *Stevia tomentosa* sobre células triple negativo MDA-MB-231. En las figuras 24 y 25 se puede observar como a las 6 y a las 12 horas no hay cambios en la inhibición del cierre de la herida, mientras que a las 24 horas hay una diferencia significativa con respecto al control para la concentración de 100 µg/mL.

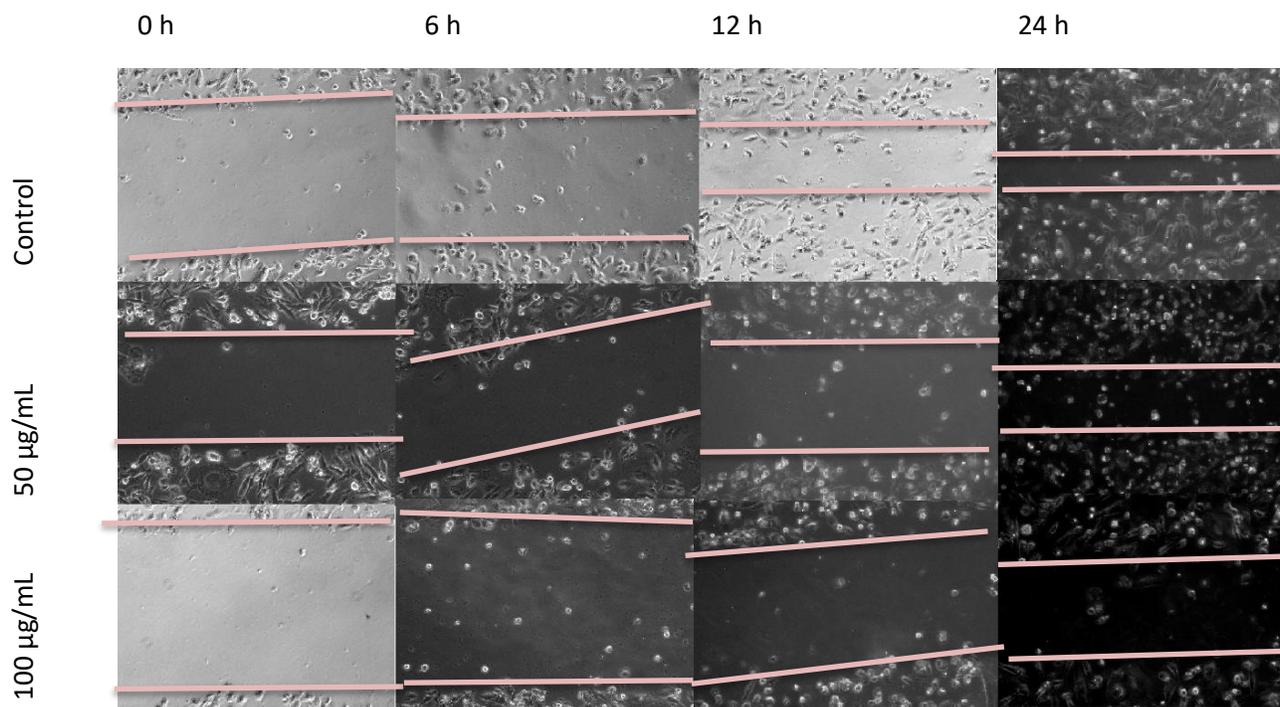


Figura 24. Micrografías del efecto del extracto de *Stevia tomentosa* sobre células MDA-MB-231.

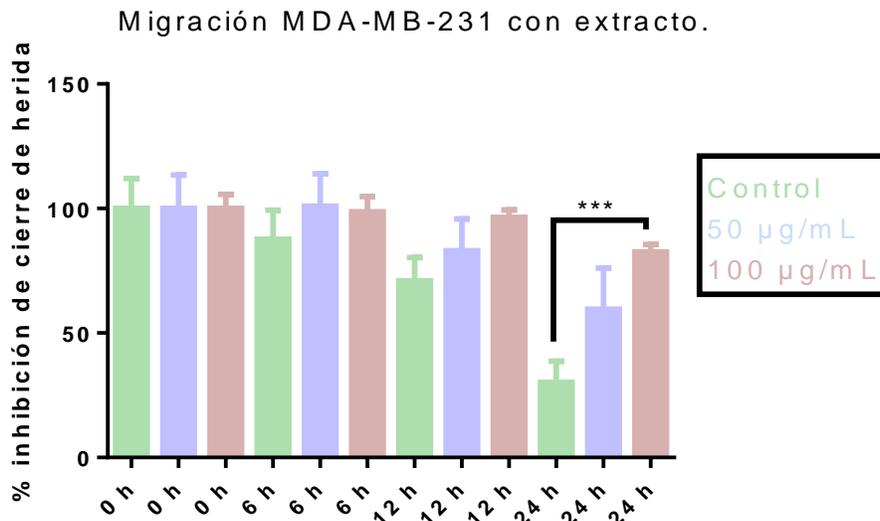


Figura 25. Efecto antimigratorio del extracto metanólico de hoja de *Stevia tomentosa* a las 0,6,12 y 24 horas sobre células independientes de hormonas MDA-MB-231. Los resultados fueron analizados con una prueba ANOVA de una sola vía con una prueba *post hoc* de Dunnet con un valor de  $p < 0.05$ . Las barras verdes indican los controles, las azules los 50 µg/mL y las rosas los 100 µg/mL.

### 8.12 Efecto antimigratorio de la mezcla de fitoesteroles ( $\beta$ -sitoesterol y estigmasterol) sobre células de cáncer de mama MDA-MB-231.

El último ensayo herida se realizó para determinar el efecto de la mezcla de fitoesteroles ( $\beta$ -sitoesterol y estigmasterol) sobre la migración de las células triple negativo MDA-MB-231. En las figuras 26 y 27 se observa que no hay diferencia significativa entre ninguno de los grupos evaluados (6,12 y 24 horas).

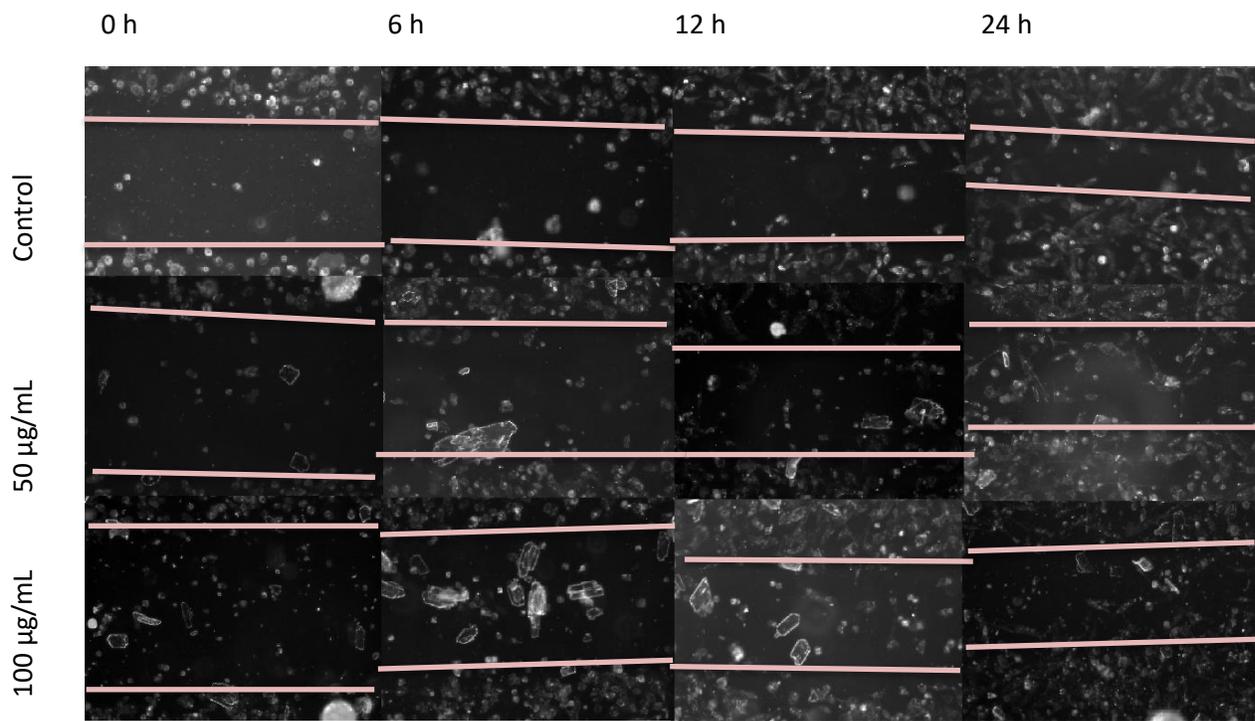


Figura 26. Micrografías del efecto del extracto de la mezcla de fitoesteroides sobre células MDA-MB-231.

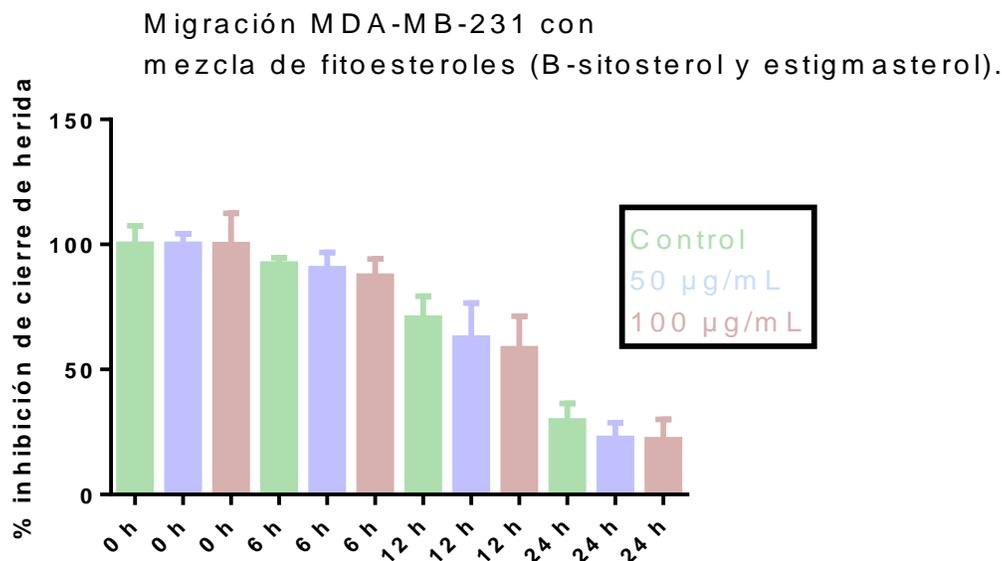


Figura 27. Efecto antimigratorio de la mezcla de fitoesteroles (β-sitosterol y estigmasterol) a las 0,6,12 y 24 horas sobre células independientes de hormonas MDA-MB-231. Los resultados fueron analizados con una prueba ANOVA de una sola vía con una prueba *post hoc* de Dunnet con un valor de  $p < 0.05$ . Las barras verdes indican los controles, las azules los 50 μg/mL y las rosas los 100 μg/mL.

### 8.13 Comparación del efecto antimigratorio del extracto de *Stevia tomentosa* contra la mezcla de fitoesteroles (β-sitosterol y estigmasterol) sobre células de cáncer de mama MCF-7.

Se realizó una comparación de resultados obtenidos entre la migración de células de cáncer de mama dependientes de hormonas MCF-7 tratadas con el extracto de *Stevia tomentosa*, contra las tratadas con la mezcla de β-sitosterol y estigmasterol. Los resultados fueron analizados con una prueba de *t de student* con una  $p < 0.05$ . Como se observa en la figura 28, el efecto del extracto de *Stevia tomentosa* y de la mezcla de fitoesteroles es estadísticamente igual para la migración exceptuando los

100 µg/mL a las 24 horas, horario en el que el efecto fue mayor con el extracto que con la mezcla de fitoesteros.

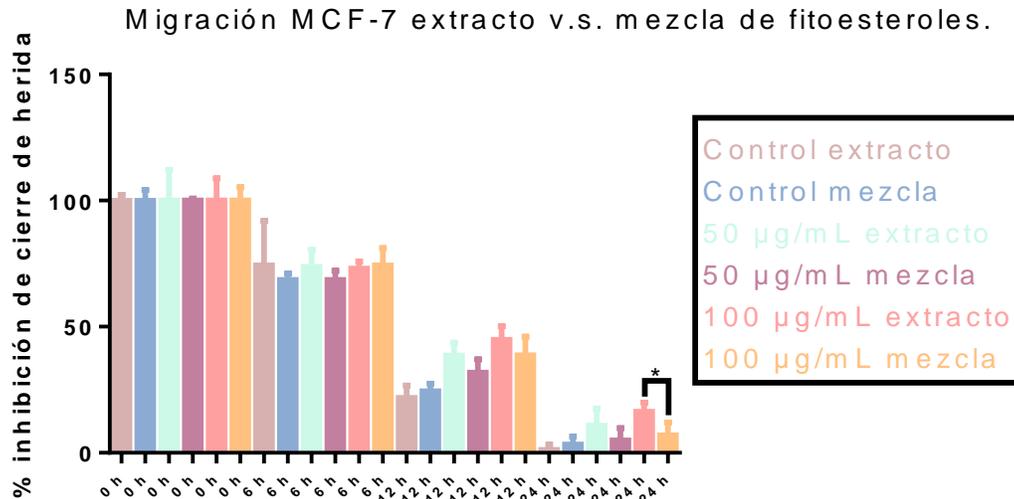


Figura 28. Gráfica comparativa del efecto del tratamiento con la mezcla de fitoesteros y el extracto completo de *Stevia tomentosa* en células MCF-7. Los resultados fueron analizados con una prueba *t de student* con un valor de  $p < 0.05$ . La barra lila indica el control para el extracto, la azul el control para la mezcla, la aqua la concentración de 50 µg/mL de extracto, la morada la concentración de 50 µg/mL de mezcla de fitoesteros, la rosa los 100 µg/mL de extracto y la naranja los 100 µg/mL de mezcla.

#### 8.14 Comparación del efecto antimigratorio del extracto de *Stevia tomentosa* contra la mezcla de fitoesteros ( $\beta$ -sitoesterol y estigmasterol) sobre células de cáncer de mama MDA-MB-231.

La misma comparación fue realizada pero esta vez sobre células triple negativo MDA-MB-231. Los resultados fueron analizados con una prueba de *t de student* con

una  $p < 0.05$ . Como se observa en la figura 29, el efecto del extracto de *Stevia tomentosa* y de la mezcla de fitoesteroles es estadísticamente igual para la migración exceptuando los 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  a las 12 horas y los 50 y 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  a las 24 horas. En este tiempo de tratamiento se observó un mayor efecto sobre la inhibición del cierre de la herida con el extracto que con la mezcla de fitoesteroles.

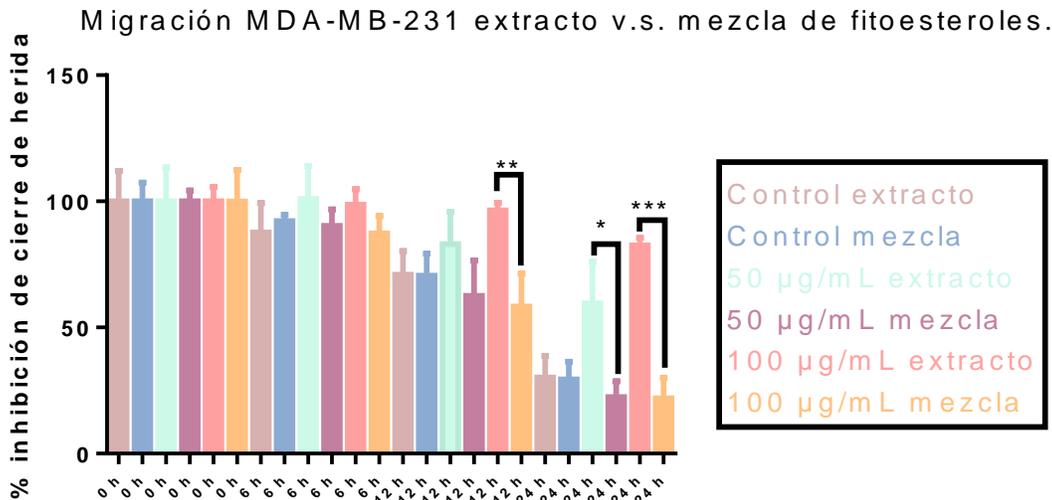


Figura 29. Gráfica comparativa del efecto del tratamiento con la mezcla de fitoesteroles y el extracto completo de *Stevia tomentosa* en células MDA-MB-231. Los resultados fueron analizados con una prueba *t de student* con un valor de  $p < 0.05$ . La barra lila indica el control para el extracto, la azul el control para la mezcla, la aqua la concentración de 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de extracto, la morada la concentración de 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de mezcla de fitoesteroles, la rosa los 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de extracto y la naranja los 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de mezcla.

### 8.15 Comparación del efecto antimigratorio del extracto de *Stevia tomentosa* sobre células dependientes de hormonas MCF-7 y triple negativo MDA-MB-231.

Los últimos análisis realizados fueron para comparar el efecto antimigratorio sobre las células dependientes de hormonas y las triple negativo. Las figuras 30 y 31 muestran los resultados obtenidos. Como se puede observar el efecto de ambos tratamientos fue mayor para la línea triple negativo que para las dependientes de

hormonas. También se puede observar que la migración de las células MCF-7 fue mayor que las MDA-MB-231.

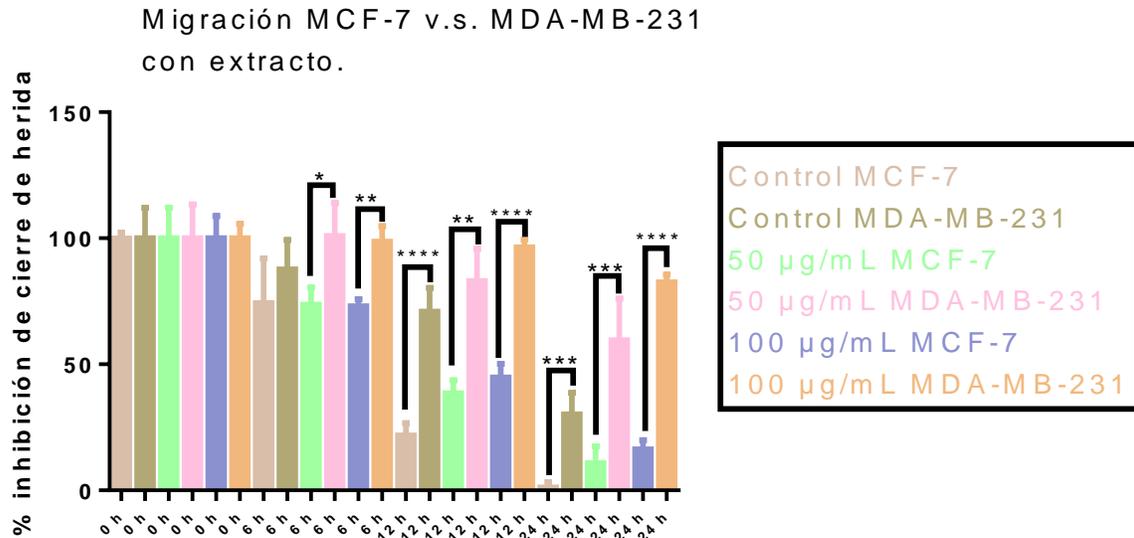


Figura 30. Gráfica comparativa del efecto del tratamiento con el extracto completo de *Stevia tomentosa* en células MCF-7 y MDA-MB-231. Los resultados fueron analizados con una prueba *t de student* con un valor de  $p < 0.05$ . La barra lila indica el control de MCF-7, la dorada el control de MDA-MB-231, la verde 50 µg/mL de extracto en MCF-7, la rosa 50 µg/mL de extracto en MDA-MB-231, la azul 100 µg/mL de extracto en MCF-7 y la naranja 100 µg/mL de extracto en MDA-MB-231.

Migración MCF-7 v.s. MDA-MB-231  
con mezcla de fitoesteroles.

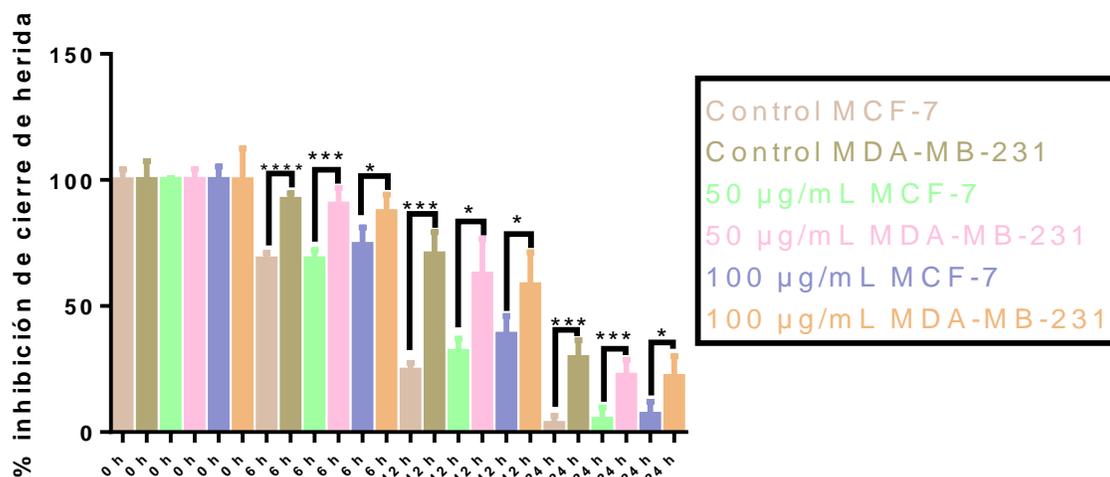


Figura 31. Gráfica comparativa del efecto del tratamiento con la mezcla de fitoesteroles en células MCF-7 y MDA-MB-231. Los resultados fueron analizados con una prueba *t de student* con un valor de  $p < 0.05$ . La barra lila indica el control de MCF-7, la dorada el control de MDA-MB-231, la verde 50 µg/mL de mezcla en MCF-7, la rosa 50 µg/mL de mezcla en MDA-MB-231, la azul 100 µg/mL de mezcla en MCF-7 y la naranja 100 µg/mL de mezcla en MDA-MB-231.

## 9. DISCUSIÓN

### 9.1 Proliferación y migración de células dependientes de hormonas MCF-7 y MDA-MB- 231 tratadas con un extracto metanólico de *Stevia tomentosa*

Las células de cáncer de mama dependientes de hormonas MCF-7 mostraron una disminución de la proliferación estadísticamente significativa y dependiente de la concentración desde los 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  hasta los 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  obteniéndose una  $\text{IC}_{50}$  de 40.97  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Esto es consistente con lo reportado por Schokrzadeh y colaboradores en 2018 que si bien no estudiaron *Stevia tomentosa* (no hay estudios previos anticancerígenos reportados por otros grupos de investigación) reportaron un efecto antiproliferativo de un extracto hidroalcohólico de *Stevia rebaudiana* obteniendo como  $\text{IC}_{50}$ : 98.82  $\mu\text{g}/\text{mL}$  en células MCF-7 (Schokrzadeh *et al.*, 2018). Así mismo, Ibrahem y colaboradores encontraron en 2020 que el extracto metanólico de *Stevia rebaudiana* reduce la proliferación de la misma línea celular obteniendo una  $\text{IC}_{50}$  de 228  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (Ibrahem *et al.*, 2020). Todas las concentraciones reportadas previamente son mayores que la encontrada para *Stevia tomentosa*.

Al no contar con estudios sobre la misma especie del género, es importante mencionar los efectos que se han reportado de los compuestos encontrados en el extracto. En 2018 Alvarez-Sala y colaboradores reportaron que a las 24 horas de tratamiento con  $\beta$ -sitosterol (52  $\mu\text{M}$ ), la viabilidad de las células MCF-7 se redujo en un 22% y a las 48 horas en un 67% (Alvarez-Sala *et al.*, 2018). Además, en 2018 Xu y colaboradores reportaron que el  $\beta$ -sitosterol diglucósido reduce la proliferación de células de cáncer de mama dependientes de hormonas teniendo como  $\text{IC}_{50}$  los 30.82  $\mu\text{M}$  (Xu *et al.*, 2018).

Otro componente reportado en el extracto de *Stevia tomentosa* es el estigmasterol, este fitoesterol ha demostrado tener efecto antiproliferativo en células de cáncer de mama.

En 2020 Bae y colaboradores demostraron que el estigmasterol es capaz de reducir la migración de células de cáncer de ovario al reducir VEGFA, PLAU, MMP2, MMP9 y MMP14 (Bae *et al.*, 2020).

En 2001 Awad y colaboradores demostraron que el  $\beta$ -sitosterol es capaz de disminuir la migración de células de cáncer de próstata (Awad *et al.*, 2001).

Martínez-Rojo y colaboradores reportaron en 2020 que los extractos metanólicos de *Stevia pilosa* y *Stevia eupatoria* disminuyen la migración de células de cáncer de próstata dependientes e independientes de hormonas en concentraciones de 250-3000  $\mu\text{g/mL}$ , las cuales son mayores a las encontradas para *Stevia tomentosa* (Martínez-Rojo *et al.*, 2020).

Además, estudios previos reportaron en 2022 que el estigmasterol reduce la viabilidad de células MCF-7 mediante la inducción de apoptosis por aumento de proteínas proapoptóticas (AmeliMojarad y Pourmahdian, 2022). Al igual que el estigmasterol, el  $\beta$ -sitosterol ha demostrado la capacidad de inducir apoptosis por medio del aumento de proteínas proapoptóticas y la disminución de las antiapoptóticas, además de que es capaz de inhibir la vía de PI3-K provocando disminución de su proliferación en células de cáncer de mama dependientes de hormonas (Xu *et al.*, 2018).

Esto concuerda con lo obtenido en este estudio pues es bien sabido que *Stevia tomentosa* contiene tanto  $\beta$ -sitosterol como estigmasterol.

Las células de cáncer de mama triple negativo también tuvieron disminución de proliferación causada por el tratamiento con el extracto de *Stevia tomentosa*, esta vez teniendo una disminución significativa dependiente de la concentración desde los 10  $\mu\text{g/mL}$  y obteniéndose una  $\text{IC}_{50}$  de 86.54  $\mu\text{g/mL}$ . Esto coincide con lo reportado por Vaško y colaboradores en 2014 al encontrar que el extracto acuoso de *Stevia rebaudiana* reduce la viabilidad de células de cáncer de mama triple negativo a 13.59% con respecto al control (Vaško *et al.*, 2014). Kulkarni y colaboradores reportaron en 2021 que el extracto de *Stevia rebaudiana* a una

concentración de 1000 µg/mL redujo el crecimiento celular en 55% (Kulkarni *et al.*, 2021).

Como ya se ha mencionado, los fitoesteroles tienen la capacidad de inducir apoptosis por la vía intrínseca por medio del aumento de proteínas proapoptóticas y disminución de las antiapoptóticas de la familia de Bcl-2. Estas moléculas también han demostrado poder causar apoptosis por la vía extrínseca al sensibilizar al receptor de muerte TRAIL por inhibición de la vía STAT3/Mcl-1. Además de sus propiedades proapoptóticas, los fitoesteroles pueden suprimir el crecimiento de tumores mamarios por medio de la inhibición de la vía Src/FAK/Rac1/MMP y evitar la angiogénesis por inhibición de la vía VEGFR2 mediada por JAK/STAT y MAPK (Xia *et al.*, 2014).

Esto concuerda con lo encontrado en esta investigación  $\beta$ -sitosterol y estigmasterol están presentes en *Stevia tomentosa* y esta especie está estrechamente relacionada con *Stevia pilosa* y *Stevia eupatoria*.

## **9.2 Comparación del efecto de un extracto de *Stevia tomentosa* con el efecto de una mezcla de fitoesteroles ( $\beta$ -sitosterol y estigmasterol) sobre la proliferación y migración de células de cáncer de mama dependientes de hormonas MCF-7 y triple negativo MDA-MB-231.**

Adicionalmente a los estudios de proliferación y migración realizados con el extracto, se evaluó la proliferación y la migración con una mezcla de  $\beta$ -sitosterol y estigmasterol, estos dos fitoesteroles son reportados como metabolitos secundarios de todas las especies de *Stevia* incluyendo a *Stevia tomentosa*.

Como se muestra en los resultados, el efecto sobre ambos procesos fue estadísticamente mayor para el extracto que para la mezcla de fitoesteroles. Este mayor efecto puede ser atribuible a que el extracto no sólo contiene esos dos fitoesteroles, se ha reportado que *Stevia tomentosa* sintetiza como metabolitos secundarios un bisabolenol ((2R,3R,6R,7S)-2,3-epoxi-2,3-dihidrobisabolen-1-ona) y

una lactona sesquiterpénica (diepoxiguaianolida) (Valdez-Calderón, 2011; Valdez-Calderón, 2013) y es posible suponer que se presenta un efecto aditivo entre las diferentes moléculas.

Químicamente tanto los bisabolenos como las lactonas sesquiterpénicas pertenecen al grupo de los sesquiterpenos (terpenos de 15 carbonos). Esta familia química ha demostrado tener la capacidad de reducir la viabilidad de células de cáncer de mama dependientes de hormonas MCF-7 con una IC<sub>50</sub> de 66.91 µg/mL y de cáncer de mama triple negativo MDA-MB-231 con una IC<sub>50</sub> de 98.39 µg/mL por medio de apoptosis demostrado por el aumento de las caspasas 3 y 7 (Yeo *et al.*, 2015). En 2019 Gogineni y colaboradores demostraron computacional y biológicamente que 3 bisabolenos diferentes son activos contra diferentes tipos líneas cancerígenas incluyendo la línea MCF-7 con IC<sub>50</sub> entre los 2.9 y 12.3 µM (Gogineni *et al.*, 2019).

La misma familia de compuestos ha demostrado suprimir la angiogénesis en células de cordón umbilical humano (HUVECs) por inhibición de Akt/GSK3β t mTOR y en cáncer gástrico por bloqueo de Notch-1. En células de cáncer de mama MCF-7, estos compuestos inhiben la transición epitelio-mesénquima por reducción de la transcripción de genes como SNAIL y TWIST, lo que también logra aumentar la expresión de E-cadherina (Xia *et al.*, 2014) lo que indica que podría reducir la migración celular.

Las guaianolidas han demostrado también efecto anticancerígeno. Por ejemplo, en 2013 Popović y colaboradores demostraron que las guainolidas extraídas del género *Laserpitium* son capaces de reducir la viabilidad de células MCF-7 con una IC<sub>50</sub> de 66.09 µg/mL (Popović *et al.*, 2013).

Todo esto concuerda con lo reportado en esta tesis.

### **9.3 Comparación del efecto de ambos tratamientos sobre la proliferación y migración de células de cáncer de mama dependientes de hormonas MCF-7 contra triple negativo MDA-MB-231.**

Para comprender el diferente efecto encontrado entre ambas líneas celulares es necesario recordar que, al ser exponentes de diferentes estadios de la enfermedad, tienen diferentes vías de señalización activadas. La diferencia más representativa entre las líneas MCF-7 y MDA-MB-231 es la existencia de receptores a estrógeno. Los receptores a estrógeno tienen dos isoformas, la isoforma  $\alpha$  y la isoforma  $\beta$ . La línea dependiente de hormonas cuenta con ambas isoformas del receptor ( $\alpha$  y  $\beta$ ) mientras que la línea MDA-MB-231 sólo cuenta con una baja proporción de la isoforma  $\beta$ . La importancia de la existencia de ambas isoformas radica en que en el cáncer de mama la isoforma  $\alpha$  tiene efectos proliferativos y la  $\beta$  efectos antiproliferativos (Grattan, 2013).

La mayor sensibilidad de las células MCF-7 en comparación con las células MDA-MB-231 ante ambos tratamientos en proliferación puede deberse a los dos fitoesteroides ya mencionados, los cuales, cuentan con estructuras parecidas a la estructura del estradiol. El estradiol se une a los receptores a estrógeno para llevar a cabo su función.

Se ha demostrado que algunos fitoesteroides como el  $\beta$ -sitosterol d-glucósido inhiben la síntesis de la isoforma  $\alpha$  del receptor y son agonistas de la isoforma  $\beta$  (Xu *et al.*, 2018) y otros como el curcumol, curcumenol, isocurcumenol y el  $\beta$ -sitosterol inhiben a la isoforma  $\alpha$  (Mustarichiei *et al.*, 2014). Además, la activación de la isoforma  $\beta$  del receptor también provoca disminución en la producción de la isoforma  $\alpha$  (Zhou y Liu, 2020).

Los fitoesteroides como el estigmasterol y el  $\beta$ -sitosterol tienen afinidad de unión por ambas isoformas del receptor. Sin embargo, al haberse inhibido la síntesis y función de la isoforma  $\alpha$  por los mismos compuestos, los fitoesteroides son capaces de

ejercer sólo las acciones inhibitorias de la isoforma  $\beta$  del receptor en las células dependientes de hormonas MCF-7.

En las células MDA-MB-231 al sólo contar con la isoforma  $\beta$ , aunque los fitoesteroides se unan a su receptor no ejerce su efecto antiproliferativo pues la proliferación no es mediada por la isoforma  $\alpha$  del receptor sino por otras vías moleculares activadas y, por lo tanto, la activación de la isoforma  $\beta$  no puede tener el efecto esperado.

Además de lo ya mencionado, las líneas tienen otras diferencias moleculares mostradas en la tabla 6.

Tabla 6. Diferencias moleculares entre las líneas MCF-7 y MDA-MB-231.

Vía	MCF-7	MDA-MB-231
PI3K	Activación dependiente de estrógenos.	Inhibición de PTEN y alta expresión de EGFR.
MAPK	Activación dependiente de estrógenos.	Alta expresión de EGFR.
JAK/STAT	Baja expresión de STAT1	Alta expresión de STAT3
Wnt	Acumulación de $\beta$ -catenina	Sobre activación de vía no canónica y sobreexpresión de LGR6.
NF-kB	Apagada	Sobre activada
SNAIL/E-cadherina	Dependiente de hormonas	Sobreexpresión de SNAIL
N-cadherina	Baja	Alta
VEGFR	Baja	Alta

(Comsa *et al.*, 2015; Cowin *et al.*, 2005; Jiang, 2020; Klemm *et al.*, 2010; Kong *et al.*, 2020; Krueger *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2017 (a); Ossovskaya *et al.*, 2011; Qin *et al.*, 2019; Velloso, 2017; Wu, 2020).

La alteración en todas estas vías además de efectos proliferativos y antiapoptóticos causa migración celular. Las diferencias moleculares entre ambas líneas provocan que la línea MDA-MB-231 sea más agresiva, invasiva y resistente a los tratamientos.

En cuanto a migración, se encontró un mayor efecto sobre las células MDA-MB-231 que sobre las MCF-7. Esto puede ser debido a que se encontró que las células MCF-7 tuvieron mayor capacidad migratoria que las MDA-MB-231.

Ambas líneas celulares pueden ser subdivididas en dos grupos gracias a su morfología: morfología fibroblástica y morfología semi epitelial. Las células con morfología fibroblástica tienden a separarse de las colonias, generan proyecciones citoplasmáticas y cuentan con un fenotipo migratorio mientras que las que cuentan con morfología semi epitelial tienden a quedarse juntas y tener una migración menos marcada (Comsa *et al.*, 2015; Martínez-Revollar *et al.*, 2015). En cuanto a las células utilizadas las MCF-7 pertenecen al subgrupo fibroblástico y las MDA-MB-231 al subgrupo semi epitelial. Sin embargo, se pudo observar que el extracto tuvo mayor efecto antimigratorio sobre las células MDA-MB-231, mientras que la mezcla de fitoesteroles tuvo mayor efecto sobre las MCF-7. Esto podría ser debido a que como se muestra en la tabla 6, los procesos migratorios de las células MCF-7 están regulados por la vía de Wnt que tiene una expresión dependiente de hormonas (Comsa *et al.*, 2015) y que por lo tanto podría estar siendo alterado por los fitoesteroles tanto de la mezcla como los contenidos en el extracto.

Wnt es una vía encargada de evitar la inhibición de  $\beta$ -catenina, para que esta pueda viajar al núcleo y ejercer su efecto como regulador de transcripción.  $\beta$ -catenina se encarga de generar la transcripción de genes como SNAIL, SLUG y TWIST que, a su vez, se encargan de inhibir la transcripción de E-cadherina y activar la de N-cadherina favoreciendo así la migración celular (Wang *et al.*, 2022).

En cuanto a las células MDA-MB-231, los procesos migratorios son regulados por mecanismos independientes a hormonas como la sobreexpresión del LGR6, lo que lleva a sobre activación de la vía de Wnt tanto canónica como no canónica y la sobre activación de NF $\kappa$ B (Ossovskaya *et al.*, 2011). La vía de NF $\kappa$ B se encarga de regular

la transcripción de genes. De especial interés son los genes de SNAIL, MMP9, MMP 2, ICAM-1, VCAM-1, ECAM-1 y E-selectina pues son los encargados de promover la transición epitelio-mesénquima y la posterior migración y metástasis (Liu *et al.*, 2017 (b)). Las lactonas sesquiterpénicas han demostrado tener la capacidad de inhibir la vía de NFkB (Babaei *et al.*, 2018) y, por lo tanto, el extracto podría actuar por esta vía.

#### **9.4 Vías de señalización involucradas en el efecto de *Stevia tomentosa* sobre células de cáncer de mama**

Cuando se habla de cáncer de mama se puede caer en el error de pensar que el efecto se da únicamente por receptores a hormonas. Esto cambia cuando se piensa en los diferentes tipos de cáncer de mama pues algunos son dependientes de hormonas (Luminal A, Luminal B, HER2 +) pero otros no lo son (triple negativo). Los resultados obtenidos en este proyecto demostraron que el extracto de *Stevia tomentosa* tuvo mayor efecto que la mezcla de fitoesteroles, debido a que estos fitoesteroles y los compuestos adicionales que componen el extracto, tienen efecto sobre la proliferación y la migración por vías tanto dependientes como independientes a los receptores hormonales (Mustarichiei *et al.*, 2014; Xu *et al.*, 2018; Zhou y Liu, 2020).

Como ya se mencionó, los fitoesteroles actúan por activación de ambas isoformas del receptor a estrógeno y, por lo tanto, se puede asumir que *Stevia tomentosa* no sólo cuenta actividad sobre ese receptor.

Los terpenoides son una familia química derivada del isopreno reportada como metabolitos secundarios de la *Stevia tomentosa*, con una gran cantidad de efectos reportados. A esta familia química además de los fitoesteroles pertenecen otras moléculas como los bisabolenos y las lactonas sesquiterpénicas.

Además de los efectos ya mencionados contra cáncer de mama, los bisabolenos han demostrado tener efecto activador del inhibidor p21 del complejo Ciclina

C1/CDK4/6 inhibiendo así la progresión del ciclo celular en células de neuroblastoma. Sobre la apoptosis también ha demostrado efecto al activar ambas vías (intrínseca y extrínseca) por medio de la desestabilización de la mitocondria por producción de ROS para la vía intrínseca (Jou *et al.*, 2016).

En cuanto a las lactonas sesquiterpénicas, estas han demostrado tener la capacidad de inhibir la vía NF- $\kappa$ B, esto causa la disminución de COX-2 reduciendo así la proliferación y migración de células de carcinoma. Así mismo, ha demostrado tener efectos proapoptóticos de la misma forma que los bisabolenos causando desbalance redox en la membrana mitocondrial. A su vez, son capaces de inhibir la vía de la STAT3, causando aumento de p53 e inhibición del ciclo celular. Estos efectos fueron encontrados en células de cáncer de mama, cervicouterino y glioma (Babei *et al.*, 2018).

En resumen, los fitoesteroles tienen efectos anticancerígenos por activación de la isoforma  $\beta$  de los receptores a estrógenos y subsecuente inactivación de la función y síntesis de la isoforma  $\alpha$  del mismo receptor (Mustarichiei *et al.*, 2014; Xu *et al.*, 2018; Zhou y Liu, 2020), activación del receptor de muerte por inhibición de STAT3/Mcl-1 e inhibición de Scr/FAK/Rac1/MMP y MAPK (Xia *et al.*, 2014).

Los sesquiterpenos ejercen su efecto por medio de inhibición de las vías de Akt/GSK3 $\beta$ , mTOR, SNAIL, y Twist, SNAIL/E-Cadherina, Notch 1, JNK (Xia *et al.*, 2014), NF- $\kappa$ B, STAT3 y activación de p21, apoptosis intrínseca (Jou *et al.*, 2016).

## 10 CONCLUSIONES

El extracto metanólico de hoja de *Stevia tomentosa* disminuye la proliferación de las células de cáncer de mama dependientes de hormonas MCF-7 y triple negativo MDA-MB-231.

El extracto metanólico de hoja de *Stevia tomentosa* inhibe la migración de las células de cáncer de mama dependientes de hormonas MCF-7 y triple negativo MDA-MB-231.

La línea MCF-7 es más sensible que la MDA-MB-231 al efecto antiproliferativo del extracto metanólico de *Stevia tomentosa*.

La línea MDA-MB-231 es más sensible que la MCF-7 al efecto antimigratorio del extracto metanólico de *Stevia tomentosa*.

El efecto antiproliferativo y antimigratorio del extracto metanólico de *Stevia tomentosa* es mayor que el efecto de la mezcla de fitoesteroles (50 y 100 µg/mL de cada fitoesterol).

El extracto metanólico de hoja de *Stevia tomentosa* tiene un futuro prometedor como anticancerígeno coadyuvante a los tratamientos actuales, sin embargo, se requieren estudios adicionales para determinar los mecanismos por los cuales se reducen la proliferación y migración e las células.

La limitación más importante para la realización del análisis proteico que ayudaría a determinar los mecanismos de acción antiproliferativos y antimigratorios fue la restricción de tiempo de trabajo en laboratorio y la tardanza de los reactivos y materiales provocados por la pandemia de COVID-19.

## 11 REFERENCIAS

American Cancer Society. ACS. Oncogenes and tumor suppressor genes. (2020). Retrieved September 25, 2020, from <https://www.cancer.org/cancer/cancer-causes/genetics/genes-and-cancer/oncogenes-tumor-suppressor-genes.html> (a)

American Cancer Society. ACS. Soft Tissue Sarcoma. American Cancer Society. (2021). <https://www.cancer.org/cancer/soft-tissue-sarcoma.html>.

American Cancer Society. ACS. Breast Cancer Treatment: Treatment Options for Breast Cancer. (2020). Retrieved September 27, 2020, from <https://www.cancer.org/cancer/breast-cancer/treatment.html>

Akram, M., Iqbal, M., Daniyal, M., & Khan, A. U. (2017). Awareness and current knowledge of breast cancer. *Biological Research*, 50(1).

Alberts, B. (2017). *Molecular Biology of the Cell*. New York: Garland Science. p. 813-888; 963-1020; 1021-1034.

Álvarez-García, R. (2005). Estudio estereoquímico y conformacional de algunos metabolitos secundarios aislados de *Stecia pilosa* y *Stevia tomentosa* (Master's thesis, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, 2005) (pp. 1-187). Hidalgo: Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo.

Alvarez-Sala, A., Attanzio, A., Tesoriere, L., Garcia-Llatas, G., Barberá, R., & Cilla, A. (2018). Apoptotic effect of a phytosterol-ingredient and its main phytosterol ( $\beta$ -sitosterol) in human cancer cell lines. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 70(3), 323–334.

AmeliMojarad, M., AmeliMojarad, M., & Pourmahdian, A. (2022). The inhibitory role of stigmasterol on tumor growth by inducing apoptosis in Balb/C mouse with spontaneous breast tumor (SMMT). *BMC Pharmacology and Toxicology*, 23(1).

Awad, A. B., Fink, C. S., Williams, 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(6), 507-513.

Babaei, G., Aliarab, A., Abroon, S., Rasmi, Y., Gholizadeh, S., & Aziz, C. (2018). Application of sesquiterpene lactone: A new promising way for cancer therapy based on anticancer activity. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 106, 239-246.

Bae, H., Song, G. y Lim, W. (2020). Stigmasterol Causes Ovarian Cancer Cell Apoptosis by Inducing Endoplasmic Reticulum and Mitochondrial Dysfunction. *Pharmaceutics*, 12(6), 488.

Breast Cancer Stages: 0 Through IV. (2020, May 04). Retrieved September 29, 2020, from <https://www.breastcancer.org/symptoms/diagnosis/staging?gclid>

Breast Cancer Treatment: Treatment Options for Breast Cancer. (2020). Retrieved September 27, 2020, from <https://www.cancer.org/cancer/breast-cancer/treatment.html>

Cancer Treatment Centers of America. CTCA. (2020, July 14). Retrieved September 25, 2020, from <https://www.cancercenter.com/>

Cardiff, R. D., Jindal, S., Treuting, P. M., Going, J. J., Gusterson, B., & Thompson, H. J. (2018). Mammary Gland. *Comparative Anatomy and Histology*, 487–509

Características de las defunciones registradas en México durante 2020. (2021). Retrieved April 6, 2021, from [https://www.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/boletines/2021/EstSocio/demo/DefuncionesRegistradas2020\\_Pnles.pdf](https://www.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/boletines/2021/EstSocio/demo/DefuncionesRegistradas2020_Pnles.pdf)

Centers for Disease Control and Prevention. CDC. What Are the Symptoms of Breast Cancer? (2020, September 14). Retrieved September 27, 2020, from [https://www.cdc.gov/cancer/breast/basic\\_info/symptoms.htm](https://www.cdc.gov/cancer/breast/basic_info/symptoms.htm) (b)

Centers for Disease Control and Prevention. CDC. What Is Breast Cancer? (2020, September 14). Retrieved September 27, 2020, from [https://www.cdc.gov/cancer/breast/basic\\_info/what-is-breast-cancer.htm](https://www.cdc.gov/cancer/breast/basic_info/what-is-breast-cancer.htm) (a)

Chen, X., Zheng, Z., Chen, L. y Zheng, H. (2017). MAPK, NFκB, and VEGF signaling pathways regulate breast cancer liver metastasis. *Oncotarget*, 8(60), 101452-101460.

Chen, J., Xia, Y., Sui, X., Peng, Q., Zhang, T., Li, J. y Zhang, J. (2018). Steviol, a natural product inhibits proliferation of the gastrointestinal cancer cells intensively. *Oncotarget*, 9(41), 26299-26308.

Columbia University Herbert Irving Comprehensive Cancer Center. Leukemia: Classifications. (2017, February 24). Retrieved September 25, 2020, from <https://cancer.columbia.edu/leukemia-classifications>

Comsa, S., Cimpean, A. M., & Raica, M. (2015). The story of MCF-7 breast cancer cell line: 40 years of experience in research. *Anticancer Research*, 35, 3147–3154.

Cowin, P., Rowlands, T. M., & Hatsell, S. J. (2005). Cadherins and catenins in breast cancer. *Current Opinion in Cell Biology*, 17(5), 499–508.

Dewick P M. Medicinal natural products: a biosynthetic approach. 3 Edición. Chichester, U.K.: John Wiley & sons, 2010:7

EdCan.Cancer Australia. (2020). A national government agency working to reduce the impact of cancer on all Australians. Retrieved September 25, 2020, from <https://www.canceraustralia.gov.au/>

Ellisen, L. (2016). Genética Molecular Del Cáncer. Retrieved January 10, 2023, from [https://www.medicinanet.com.br/conteudos/acp-medicine/6631/genetica\\_molecular\\_do\\_cancer.htm](https://www.medicinanet.com.br/conteudos/acp-medicine/6631/genetica_molecular_do_cancer.htm).

Eroles, P., Bosch, A., Alejandro Pérez-Fidalgo, J., & Lluch, A. (2012). Molecular biology in breast cancer: Intrinsic subtypes and signaling pathways. *Cancer Treatment Reviews*, 38(6), 698-707.

Gogineni, V., Nael, M. A., León, F., Núñez, M. J., & Cutler, S. J. (2019). Computationally aided stereochemical assignment of undescribed bisabolenes from *Calea urticifolia*. *Phytochemistry*, 157, 145–150.

GLOBOCAN. Cancer today. (2021). Retrieved April 6, 2021, from <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/20-Breastfact-sheet>

Gupta, E., Kaushik, S., Purwar, S., Sharma, R., Balapure, A. y Sundaram, S. (2017). Anticancer potential of steviol in MCF-7 human breast cancer cells. *Pharmacognosy Magazine*, 13(51), 345.

Gupta, E., Puwar, S., Sundaram, S. y Rai, G. (2013). Nutritional and therapeutic values of *Stevia rebaudiana*: A review. *Journal of Medicinal Plants REsearch*, 7(46), 3343-3353.

Gupta, R. C. (2018). *Veterinary toxicology: basic and clinical principles* (3rd ed.). Elsevier/Academic Press.

Hapach, L. A., Mosier, J. A., Wang, W., & Reinhart-King, C. A. (2019). Engineered models to parse apart the metastatic cascade. *Npj Precision Oncology*, 3(1).

Grattan, B. (2013). Plant sterols as anticancer nutrients: Evidence for their role in breast cancer. *Nutrients*, 5(2), 359-387.

Ibrahem, E. S., Ragheb, E. M., Yousef, F. M., Abdel-Azizand, M. F., & Alghamdi, B. A. (2020). Nutritional Value, Cytotoxic and Antimicrobial Activities of *Stevia rebaudiana* Leaf Extracts . *J Biochem Tech*, 11(12), 108–115.

INEGI (2020) Instituto Nacional de Estadística y Geografía. INEGI. INEGI. Retrieved April 06, 2021, from <https://www.inegi.org.mx/default.html>

Jiang, W., Wang, X., Zhang, C., Xue, L., & Yang, L. (2020). Expression and clinical significance of MAPK and EGFR in triple-negative breast cancer. *Oncology Letters*.

Jou, Y., Hua, C., Lin, C., Wang, C., Wan, L., Lin, Y. y Lin, C. (2016). Anticancer Activity of  $\gamma$ -Bisabolene in Human Neuroblastoma Cells via Induction of p53-Mediated Mitochondrial Apoptosis. *Molecules*, 7(21), 601.

Khare, N. y Chandra, S. (2019). Stevioside mediated chemosensitization studies and cytotoxicity assay on breast cancer cell lines MDA-MB-231 and SKBR3. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 26(7), 1596-1601.

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

Klemm, F., Bleckmann, A., Siam, L., Chuang, H. N., Rietkötter, E., Behme, D., Schulz, M., Schaffrinski, M., Schindler, S., Trümper, L., Kramer, F., Beissbarth, T., Stadelmann, C., Binder, C., & Pukrop, T. (2010).  $\beta$ -catenin-independent WNT signaling in basal-like breast cancer and brain metastasis. *Carcinogenesis*, 32(3), 434–442

Kong, Y., Ou, X., Li, X., Zeng, Y., Gao, G., Lyu, N., & Liu, P. (2020). LGR6 Promotes Tumor Proliferation and Metastasis through Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling in Triple-Negative Breast Cancer. *Molecular Therapy - Oncolytics*, 18, 351–359.

Krueger, J. S., Keshamouni, V. G., Atanaskova, N., & Reddy, K. B. (2001). Temporal and quantitative regulation of mitogen-activated protein kinase (MAPK) modulates cell motility and invasion. *Oncogene*, 20(31), 4209–4218.

Kulkarni, A. S., Karkhanis, D., Barve, S. S., & Sharma, S. (2021). Antioxidant and cytotoxic study of extract of vegetative and flowering stages leaves *Stevia*

rebaudiana. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 10(4), 303–306.  
<https://doi.org/https://www.phytojournal.com/archives/2021/vol10issue4/PartD/10-4-9-992.pdf>

Lee, Y.-R., Park, J., Yu, H.-N., Kim, J.-S., Youn, H. J., & Jung, S. H. (2005). Up-regulation of PI3K/Akt signaling by 17 $\beta$ -estradiol through activation of estrogen receptor- $\alpha$ , but not estrogen receptor- $\beta$ , and stimulates cell growth in breast cancer cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 336(4), 1221–1226.

Li, K., Yuan, D., Yan, R., Meng, L., Zhang, Y. y Zhu, K. (2018). Stigmasterol exhibits potent antitumor effects in human gastric cancer cells mediated via inhibition of cell migration, cell cycle arrest, mitochondrial mediated apoptosis and inhibition of JAK/STAT signalling pathway. *Journal of B.U.ON. : Official Journal of the Balkan Union of Oncology*, 23(5), 1420-1425.

Liu, J.-B., Feng, C.-Y., Deng, M., Ge, D.-F., Liu, D.-C., Mi, J.-Q., & Feng, X.-S. (2017). E-cadherin expression phenotypes associated with molecular subtypes in invasive non-lobular breast cancer: evidence from a retrospective study and meta-analysis. *World Journal of Surgical Oncology*, 15(1). (a)

Liu, T., Zhang, L., Joo, D., & Sun, S.-C. (2017). NF-KB signaling in inflammation. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 2(1). (b)

Lodish H. F., Berk A., Zipursky L., Matsudaira P., Baltimore D. y Darrel J. (2021). *Molecular cell biology*. New York: W.H. Freeman-Macmillan Learning.

López, V., Pérez, S., Vinuesa, A., Zorzetto, C. y Abian, O. (2016). Stevia rebaudiana ethanolic extract exerts better antioxidant properties and

antiproliferative effects in tumour cells than its diterpene glycoside stevioside. *Food & Function*, 7(4), 2107-2113.

Mann, T. S., Agnihotri, V. K., Kumar, D., Pal, P. K., Koundal, R., Kumar, A. y Padwad, Y. S. (2014). In Vitro Cytotoxic Activity Guided Essential Oil Composition of Flowering Twigs of *Stevia rebaudiana*. *Natural Product Communications*, 9(5).

Mansoori, B., Mohammadi, A., Davudian, S., Shirjang, S., & Baradaran, B. (2017). The Different Mechanisms of Cancer Drug Resistance: A Brief Review. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 7(3), 339–348.

Martínez-Revollar, G., Garay, E., Martín-Tapia, D., Nava, P., Huerta, M., Lopez-Bayghen, E., Meraz-Cruz, N., Segovia, J., & González-Mariscal, L. (2015). Heterogeneity between triple negative breast cancer cells due to differential activation of WNT and PI3K/AKT PATHWAYS. *Experimental Cell Research*, 339(1), 67–80.

Martínez-Rojo, E., Cariño-Cortés, R., Berumen, L. C., García-Alcocer, G. y Escobar-Cabrera, J. (2020). *Stevia Eupatoria* and *Stevia Pilosa* Extracts Inhibit the Proliferation and Migration of Prostate Cancer Cells. *Medicina*, 56(2), 90.

Mera-Cazares, M. A. (2020). Efecto antiproliferativo y antimigratorio del extracto metanólico de hoja de *Stevia tomentosa* en células de cáncer de mama dependientes de hormonas y triple negativo. (Tesis de licenciatura, Universidad Autónoma de Querétaro, 2020) (pp. 1-49) Querétaro: Universidad Autónoma de Querétaro.

Mondragón, J. (2009). *Stevia tomentosa* Kunth. Retrieved September 29, 2020, from <http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/asteraceae/stevia-tomentosa/fichas/ficha.htm>

Monroy, J.C. (2020, February 22). Síntomas de cáncer de seno que salvan vidas Retrieved September 27, 2020, from <https://doctormonroy.com/sintomas-de-cancer-de-seno/>

Mustarichiei, R., Levitas, J., & Arpina, J. (2014). In silico study of curcumol, curcumenol, isocurcumenol, and  $\beta$ -sitosterol as potential inhibitors of estrogen receptor alpha of breast cancer. *Medical Journal of Indonesia*, 15.

Newman D J, Cragg G M. (2020). Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019. *Journal of Natural Products* 2020; 83: 770–803.

National Institutes of health. NIH Comprehensive Cancer Information. (2020). Retrieved September 25, 2020, from <https://www.cancer.gov/>

National Institutes of Health. NIH. Efectos secundarios del tratamiento del cáncer. (2019). Retrieved September 25, 2020, from <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/tratamiento/efectos-secundarios>.

National Institutes of Health. NIH. Leucemia. (2021). Retrieved May 10, 2021, from <https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionarios/diccionario-cancer/def/leucemia>

Ossovskaya, V., Wang, Y., Budoff, A., Xu, Q., Lituev, A., Potapova, O., Vansant, G., Monforte, J., & Daraselía, N. (2011). Exploring Molecular Pathways of Triple-Negative Breast Cancer. *Genes & Cancer*, 2(9), 870–879.

Qin, J.-J., Yan, L., Zhang, J., & Zhang, W.-D. (2019). STAT3 as a potential therapeutic target in triple negative breast cancer: a systematic review. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 38(1).

Pfeffer, C., & Singh, A. (2018). Apoptosis: A Target for Anticancer Therapy. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(2), 448.

Popović, V., Heyerick, A., Petrović, S., Van Calenbergh, S., Karalić, I., Niketić, M., & Deforce, D. (2013). Sesquiterpene lactones from the extracts of two Balkan endemic laserpitium species and their cytotoxic activity. *Phytochemistry*, 87, 102–111.

Rajesh P, Rajech-Kannan V, Thambi-Durai M. (2010). Effect of Stevia rebaudiana Bertoni ethanolic extract on anti-cancer activity of Erlisch's Ascites carcinoma induced mice. *Current Biotic*, 3: 549-554.

Shokrzadeh, M., Rajabali, F., Habibi, E. M., & Modanloo, M. (2018). Survey cytotoxicity and genotoxicity of hydroalcoholic extract of Stevia rebaudiana in breast cancer cell line (MCF7) and human fetal lung fibroblasts (MRC-5). *J. Cancer Res. Metastasis*, 1, 12–17.

Team, T. (2017, October 24). Cancer Types - Carcinoma, Sarcoma, Leukemia, Lymphoma. Retrieved September 25, 2020, from <https://www.healthline.com/health/cancer>

Thomford, N., Senthebane, D., Rowe, A., Munro, D., Seele, P., Maroyi, A. y Dzobo, K. (2018). Natural Products for Drug Discovery in the 21st Century: Innovations for Novel Drug Discovery. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(6), 1578.

Treuting, P. M., Dintzis, S. M. y Montine, K. S. (2018). *Comparative anatomy and histology: A mouse, rat, and human atlas*. London, United Kingdom: Elsevier/Academic Press.

Valdez-Calderón, A., Torres-Valencia, J. M., Manríquez-Torres, J. J., Velázquez-Jiménez, R., Gómez-Hurtado, M. A., Román-Marín, L. U., . . . Joseph-Nathan, P. (2011). A New Bisabolene from *Stevia tomentosa*. *Natural Product Communications*, 6(9).

Valdez-Calderón, A., Torres-Valencia, J. M., Manríquez-Torres, J. J., Velázquez-Jiménez, R., Román-Marín, L. U., Hernández-Hernández, J. D., . . . Joseph-Nathan, P. (2013). An unusual diepoxyguaianolide from *Stevia tomentosa*. *Tetrahedron Letters*, 54(25), 3286-3289.

Vaško, L.; Vašková, J.; Fejerčáková, A.; Mojžišová, G.; Poracova, J. Comparison of some antioxidant properties of plant extracts from *Origanum vulgare*, *Salvia officinalis*, *Eleutherococcus senticosus* and *Stevia rebaudiana*. *Vitr. Cell. Dev. Biol. Anim.* 2014, 50, 614–622

Velloso, F. J., Bianco, A. F., Farias, J., Torres, N., Ferruzo, P., Anschau, V., . . . Correa, R. (2017). The crossroads of breast cancer progression: Insights into the modulation of major signaling pathways. *Oncotargets and Therapy*, Volume 10, 5491-5524.

Villagómez-Flores, E., Hinojosa-Espinosa, O. y Villaseñor, J. L. (2018). El género *Stevia* (Eupatorieae, Asteraceae) en el estado de Morelos, México. *Acta Botanica Mexicana*, (125), 7-36. doi:10.21829/abm125.2018.1315

Vundru, S. S., Kale, R. K. y Singh, R. P. (2013).  $\beta$ -sitosterol induces G1 arrest and causes depolarization of mitochondrial membrane potential in breast

carcinoma MDA-MB-231 cells. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 13(1).

Wang, H., Zhou, H., Ni, H., & Shen, X. (2022). COL11A1-driven epithelial–mesenchymal transition and stemness of pancreatic cancer cells induce cell migration and invasion by modulating the AKT/gsk-3 $\beta$ /snail pathway. *Biomolecules*, 12(3), 391.

Wenston, A., Harria, C. y Hofseth, L. (2017). *Chemical Carcinogenesis*. Honoken, NJ: John Wiley & sons.

Wu, P., Becker, A., & Park, J. (2020). Growth Inhibitory Signaling of the Raf/MEK/ERK Pathway. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(15), 5436.

Xia, J., Chen, J., Zhang, Z., Song, P., Tang, W., & Kokudo, N. (2014). A map describing the association between effective components of traditional Chinese medicine and signaling pathways in cancer cells in vitro and in vivo. *Drug Discoveries & Therapeutics*, 8(4), 139–153.

Xu, H., Li, Y., Han, B., Li, Z., Wang, B., Jiang, P., . . . Ye, X. (2018). Anti-breast-Cancer Activity Exerted by  $\beta$ -Sitosterol-d-glucoside from Sweet Potato via Upregulation of MicroRNA-10a and via the PI3K–Akt Signaling Pathway. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66(37), 9704-9718.

Yang, J., Antin, P., Berx, G., Blanpain, C., Brabletz, T., Bronner, M., ... Sheng, G. (2020). Guidelines and definitions for research on epithelial–mesenchymal transition. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 21(6), 341–352.

Yeo, S. K., Ali, A. Y., Hayward, O. A., Turnham, D., Jackson, T., Bowen, I. D. y Clarkson, R. (2015).  $\beta$ -Bisabolene, a Sesquiterpene from the Essential Oil Extract of Opoponax (*Commiphora guidottii*), Exhibits Cytotoxicity in Breast Cancer Cell Lines. *Phytotherapy Research*, 30(3), 418-425.

Zhou, Y., & Liu, X. (2020). The role of estrogen receptor beta in breast cancer. *Biomarker Research*, 8(1).