



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO  
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS  
DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS

**“EFECTO INHIBIDOR DE LA PROLIFERACIÓN Y  
MIGRACIÓN DEL ESTEVIOL EN CÉLULAS DE CÁNCER  
DE PRÓSTATA Y SU INTERACCIÓN CON LA VÍA DEL  
RECEPTOR DE ANDRÓGENOS”**

**TESIS**

QUE COMO PARTE DE LOS REQUISITOS PARA OBTENER EL  
GRADO DE

DOCTORA EN CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS

PRESENTA

**M. en C. ELIZABETH MARTÍNEZ ROJO**

DIRIGIDO POR

**DRA. JESICA ESTHER ESCOBAR CABRERA**

QUERÉTARO

23 - FEBRERO - 2023

MÉXICO



Dirección General de Bibliotecas y Servicios Digitales de  
Información



Efecto inhibitor de la proliferación y migración del  
esteviol en células de cáncer de próstata y su  
interacción con la vía del receptor de andrógenos

**por**

Elizabeth Martínez Rojo

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

**Clave RI:** FQDCC-178971-0223-223



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS

**“EFECTO INHIBIDOR DE LA PROLIFERACIÓN Y MIGRACIÓN DEL  
ESTEVIOL EN CÉLULAS DE CÁNCER DE PRÓSTATA Y SU  
INTERACCIÓN CON LA VÍA DEL RECEPTOR DE ANDRÓGENOS”**

**TESIS**

QUE COMO PARTE DE LOS REQUISITOS PARA OBTENER EL GRADO DE

**DOCTORA EN CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS**

**PRESENTA:**

M. en C. Elizabeth Martínez Rojo

**DIRIGIDA POR:**

Dra. Jesica Esther Escobar Cabrera.

COMITÉ TUTORAL

Dra. Jesica Esther Escobar Cabrera  
Presidente

Dr. Rubén Antonio Romo Mancillas  
Secretario

Dra. Raquel Cariño Cortés  
Vocal

Dra. Ma. Guadalupe García Alcocer  
Suplente

Dra. Laura Cristina Berumen Segura  
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

#### DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD DE ESTUDIANTE:

Declaro que los datos propios obtenidos en esta investigación fueron generados durante el desarrollo de mi trabajo de tesis de forma ética y que reporto detalles necesarios para que los resultados de esta tesis sean reproducibles en eventuales investigaciones futuras. Finalmente, este manuscrito de tesis es un trabajo original en el cual se declaró y dio reconocimiento a cualquier colaboración o cita textual presentadas en el documento.

## RESUMEN

El cáncer de próstata en México ocupa el primer lugar en incidencia y mortalidad. El desarrollo del cáncer de próstata está regulado por la vía del receptor de andrógenos, por lo que, de los tratamientos existentes, los fármacos antiandrógenos son los más utilizados; sin embargo, las células cancerosas crean resistencia a la terapia mediante mecanismos de resistencia como la activación del receptor de andrógenos mediante la vía de las MAPK. Los productos naturales se han estudiado desde la antigüedad, siendo fuente de compuestos de importancia médica como el esteviósido y sus derivados que se han estudiado en diversas líneas celulares mostrando efectos antiproliferativos; sin embargo, no están evaluados en líneas de cáncer de próstata, y su capacidad antimigratoria carece de estudios *in vitro*. Debido a los mecanismos de resistencia, planteamos la búsqueda de otros compuestos como alternativa coadyuvante para el cáncer de próstata, un candidato para ello es el esteviol, para el cual se estudió el efecto sobre la proliferación y, por primera vez, en migración de células de cáncer de próstata, además de identificar si el mecanismo de acción involucra la inhibición del receptor de andrógenos inducida por MAPK. Se realizó una curva de proliferación utilizando tres líneas celulares de cáncer de próstata, LNCaP, PC-3 y DU-145; en cuanto a migración, se realizó un ensayo Transwell. Finalmente, se utilizó el acoplamiento molecular para identificar el sitio de unión de los compuestos con el receptor de andrógenos o las proteínas ERK 1/2. El esteviol mostró una disminución significativa en la proliferación celular, a partir de 25  $\mu\text{M}$  en células LNCaP y PC-3, aunque no se observó el mismo efecto para DU-145, donde se requirió una mayor concentración para disminuir el porcentaje de células vivas. En el ensayo Transwell para LNCaP se observó una disminución en la migración de las células con concentración de 25  $\mu\text{M}$  y 200 $\mu\text{M}$ . Se concluyó que el esteviol muestra un efecto en la inhibición de proliferación y migración para células LNCaP y PC-3 y que su efecto está relacionado con la inhibición del RA.

Palabras clave: cáncer de próstata, esteviol, receptor de andrógenos, proliferación, migración.

## ABSTRACT

Prostate cancer in Mexico is the first place in incidence and mortality. Prostate cancer development is regulated by androgen receptor pathway, therefore, of the existing treatments, antiandrogens drugs are the most used; however, prostate cancer cell create resistance against therapy through resistance mechanisms such as androgen receptor activation by MAPK pathway. Natural products have been studied since ancient times, being a source of medical important compounds such as stevioside and its derivatives that have been studied in many cell lines showing antiproliferative effects; however, they have not been evaluated in prostate cancer lines, and their antimigratory capacity has not been studied *in vitro*. Due to the resistance mechanisms, this project proposes the search for other compounds as an adjuvant alternative for prostate cancer, one candidate for this is steviol, for which the effect on proliferation and, for the first time, on cell migration of prostate cancer cells was studied, in addition to identify if the mechanism of action involves the inhibition of the androgen receptor induced by MAPK pathway. In order to achieve the objective of this work, a proliferative curve was made using three prostate cell lines LNCaP, PC-3 AND DU-145; in terms of migration, an assay with a Boyden chamber or Transwell was performed. Finally, molecular docking was used to identify the binding site of the compounds with the androgen receptor or ERK 1/2 proteins. Steviol showed a significant decrease in cell proliferation from 25  $\mu\text{M}$  in LNCaP and PC-3 cells, although the same effect was not observed for DU-145 cells, where a higher concentration was required to decrease the percentage of living cells. In Transwell assay for LNCaP, a decrease in cell migration was observed with concentrations of 25  $\mu\text{M}$  and 200  $\mu\text{M}$ . We concluded that steviol shows an effect on the inhibition of proliferation and migration for LNCaP and PC-3 cells and that its effect is related to the inhibition of AR.

Key words: prostate cancer, steviol, androgen receptor, proliferation, migration

## DEDICATORIA

A mi madre:

Los logros cosechados durante este camino, siempre han sido de tu mano; y en los fracasos esa misma mano me ha levantado.

Mis alas aprendieron a abrirse desde muy pequeña, porque tú me diste la seguridad que necesitaba, me diste tu confianza y lo más importante, tu amor.

A mi abuelo:

Hombre justo, trabajador, honesto, guapo, de buen corazón, aunque de pocas palabras.

Un intruso llegó a la familia, y tu supiste que hacer con él, fuiste fuerte, resiliente e incluso capaz de darnos calma.

Los amo

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el financiamiento en económico para la realización de este proyecto.

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

A la Dra. Jesica Esther Escobar Cabrera, gracias por la confianza brindada.

A la Dra. Ma. Guadalupe García Alcocer y la Dra. Laura Cristina Berumen Segura, por su disposición para ayudar y sus comentarios para mejorar.

A la Dra. Raquel Cariño Cortes, gracias por su tiempo, su amabilidad y sus consejos. Por confiar en mí desde que la conocí y por estar siempre abierta a la colaboración.

Al Dr. Antonio Romo, por su apoyo, su compromiso, y su guía en un área nueva para mí.

Al Dr. Giovanni Aguilera Durán, por el apoyo en la realización de la parte computacional de este proyecto.

A la Dra. Brenda Anguiano (UNAM) y a la maestra Claudia Gutiérrez (ITESM) por la donación de líneas celulares para la realización de este proyecto.

A mi familia, madre, abuela Marina, abuelo Francisco, tía Nélida, tía Marina son mi fuerza, mi alegría y mi orgullo. Los amo.

A mi esposo, Jesús Gonzalo Stringhini Torres, este camino lo iniciamos como novios, pero el amor nos llevó a unirnos en matrimonio. Gracias por estar en buenas y malas. Te amo.

## ÍNDICE GENERAL

Contenido	Página
RESUMEN	
ABSTRACT	
DEDICATORIA	
AGRADECIMIENTOS	
ÍNDICE GENERAL	i
ÍNDICE DE TABLAS	iv
ÍNDICE DE FIGURAS	v
ABREVIATURAS	vii
1 INTRODUCCIÓN	1
2 ANTECEDENTES	2
2.1 Anatomía y función de la próstata	2
2.2 Enfermedades que afectan la próstata	5
2.3 Cáncer de próstata (CaP)	6
2.4 Receptor de andrógenos y vía de señalización del receptor de andrógenos	8
2.5 Diagnóstico del CaP	11
2.6 Tratamientos	13
2.7 Mecanismos de resistencia en cáncer de próstata	15
2.8 Productos naturales	16

2.9 <i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni	16
2.9.1 Esteviósido	17
2.9.2 Metabolismo del esteviósido	18
2.9.3 Toxicología del esteviósido y sus derivados	19
2.9.4 Actividad anticancerígena del esteviósido y sus derivados	20
2.10 Acoplamiento molecular	22
3 JUSTIFICACIÓN	23
4 PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	24
5 HIPÓTESIS	24
6 OBJETIVOS	25
6.1 Objetivo general	25
6.2 Objetivos específicos	25
7 METODOLOGÍA	26
7.1 Acoplamiento molecular	26
7.1.1 Preparación de la estructura cristalográfica del RA	25
7.1.2 Obtención de las estructuras y modelado por homología para ERK1 y ERK2.	26
7.1.3 Preparación de la estructura de los ligandos.	26
7.1.4 Elaboración de los <i>dockings</i> de los ligandos elegidos en tres proteínas distintas: Autodock 4.2.	27

7.1.5 Simulaciones de dinámica molecular	27
7.1.6 Simulaciones de <i>Umbrella Sampling</i>	28
7.2 Actividad antiproliferativa	29
7.3 Actividad antimigratoria mediante cámara de Boyden	30
7.4 Análisis estadístico	30
7.4 Procedimiento para desechar los residuos peligrosos biológico- infecciosos	30
8 RESULTADOS	31
8.1 Acoplamiento molecular	31
8.2 Proliferación celular	35
8.1 Migración celular	38
9 DISCUSIONES	40
10 CONCLUSIONES	47
11 REFERENCIAS	48

## ÍNDICE DE TABLAS

Contenido	Página
1. Incidencia y mortalidad de CaP, estimada en México.	6
2. Clasificación de Gleason del CaP.	13
3. Datos de los sistemas para la simulación de dinámica molecular.	28
4. Datos de los sistemas para la simulación de dinámica molecular de tipo <i>Umbrella Samplin</i>	29
5. Acoplamiento molecular dirigido al sitio de unión de DHT.	32
6. Energías de unión de los diferentes ligandos posteriores a una dinámica molecular.	34
7. Dinámicas moleculares y sus energías de unión para las proteínas ERK1/ERK2 en comparación con sus inhibidores.	35

## ÍNDICE DE FIGURAS

Contenido	Página
1. Esquema de las zonas anatómicas de la próstata.	3
2. Esquema de los tipos de células en la próstata.	4
3. Progresión del CaP.	8
4. Estructura del receptor de andrógenos.	9
5. Vía de señalización del RA.	10
6. Estructura del esteviósido.	18
7. Vías metabólicas del esteviósido en la microbiota intestinal humana.	20
8. Mecanismo de acción propuesto para esteviol en células de cáncer de mama, MCF-7.	21
9. Estructura cristalográfica del dominio de unión a ligando del receptor de andrógenos.	28
10. Gráfica de proliferación celular para LNCaP tratadas con esteviol.	33
11. Gráfica de proliferación celular para PC-3 con tratamiento de esteviol.	34
12. Gráfica de proliferación celular para DU-145 con tratamiento de esteviol.	35
13. Imágenes de cámara de Boyden para LNCaP.	36
14. Estructura cristalina del RA unido a DHT (naranja) y un co-activador.	41
15. Efecto anticancerígeno de los glucósidos de esteviol y sus derivados.	44

16. Mecanismo de acción propuesto para esteviol e isosteviol.

46

## ABREVIATURAS

<b>Abreviatura</b>	<b>Significado</b>
5AR	5 $\alpha$ reductasa
AF-1	Función de activación transcripcional – 1
AF-2	Función de activación transcripcional – 2
AIP	Atrofia inflamatoria proliferativa
CaP	Cáncer de próstata
CK	Citoqueratina
CPRC	Cáncer de próstata resistente a castración
DBD	Dominio de unión a ADN (DNA binding domain)
DHT	Dihidrotestosterona
ENZ	Enzalutamida
ERA	Elementos de respuesta a andrógenos
ERD	Examen rectal digital
HPB	Hiperplasia prostática benigna
HR	Región bisagra (Hinge region)
HSP	Proteínas de shock térmico (Heat shock proteins)
LBD	Dominio de unión a ligando (Ligand binding domain)
NIP	Neoplasia intraepitelial prostática
NTD	Dominio amino terminal ( <i>N</i> -terminal domain)
PSA	Antígeno prostático específico (Prostatic specific antigen)
RA	Receptor de andrógenos
T	Testosterona

## 1 INTRODUCCIÓN

El cáncer de próstata (CaP) es el segundo tipo de cáncer más común en hombres a nivel mundial, y en México este cáncer ocupa el primer lugar en incidencia y mortalidad; sin embargo, comparado con otras enfermedades es la tercera causa de muerte, solo después de las enfermedades cardiovasculares y diabetes mellitus. El desarrollo y progresión del cáncer de próstata está regulado por los andrógenos y su receptor, siendo un blanco terapéutico importante. En la actualidad, existen diversos tratamientos como la radioterapia, prostatectomía, orquiectomía, fármacos antiandrógenos y quimioterapia; sin embargo, las células prostáticas cancerosas logran crear resistencia a la terapia, disminuyendo las probabilidades de recuperación o supervivencia de un paciente. Se ha observado que una de las formas en que las células cancerígenas de próstata desarrollan resistencia a los fármacos es mediante el entrecruzamiento de vías, es decir, que otras vías de señalización como la vía de las MAPK (proteínas cinasas activadas por mitógenos) pueden activar al receptor de andrógenos, permitiendo la proliferación y migración de las células cancerígenas. El CaP que presenta resistencia se ha nombrado cáncer de próstata resistente a castración (CPRC) e implica una mayor probabilidad de causar metástasis y poco porcentaje de supervivencia. El manejo de los pacientes con CPRC se realiza combinando los fármacos antiandrógenos con la quimioterapia, pero, en este punto el tratamiento es paliativo. Por otro lado, la investigación, desarrollo y uso de productos naturales como agentes terapéuticos han ido incrementando en los últimos años, con la finalidad de encontrar nuevos compuestos que sirvan como coadyuvantes o presenten mayor eficacia. En este proyecto se propone el esteviol e isosteviol, los cuales se obtienen por la hidrólisis de tres moléculas de glucosa del esteviósido. El esteviósido ha ganado importancia desde 2008, cuando fue aceptado por la Unión Europea como edulcorante no calórico y es muy utilizado actualmente por pacientes diabéticos. Además de la dulzura, el esteviósido y sus derivados ofrecen otros beneficios terapéuticos como actividad anticancerígena que se ha observado en diferentes líneas celulares, como HT-29 de colon, MCF-7 de mama y HGC-27 gastrointestinal, mostrando arresto en el ciclo celular en la fase G2/M y promoviendo la apoptosis, al aumentar la expresión de caspasas efectoras como caspasa 3. Estos compuestos también, han mostrado un efecto en la inhibición de vías de señalización como las MAPK, disminuyendo la expresión de ERK, que se traduce en disminución de la proliferación celular. Cabe recalcar que a pesar de que existen estudios del efecto antiproliferativo de esteviol e isosteviol en otras líneas celulares, no está evaluado su efecto en cáncer de próstata y su capacidad antimigratoria, esta última en ningún tipo de línea celular; es por ello que en este proyecto se busca estudiar el efecto del esteviol e isosteviol sobre la proliferación y, por primera vez, en migración de células de cáncer de

próstata e identificar si el mecanismo de acción involucra la inhibición del receptor de andrógenos inducida por MAPK.

## **2 ANTECEDENTES**

### **2.1 Anatomía y función de la próstata**

La glándula prostática es una glándula fibromuscular densa, cuya forma es similar a un cono invertido que tiene una base que rodea el cuello de la vejiga y un vértice por debajo situado en el esfínter uretral externo. La próstata se ubica detrás de la sínfisis del pubis y anterior al recto; el tamaño normal de la glándula es de aproximadamente 4x3x3 cm y su peso oscila entre 20-30 g (Singh y Bolla, 2022; Yacoub y Oto, 2018).

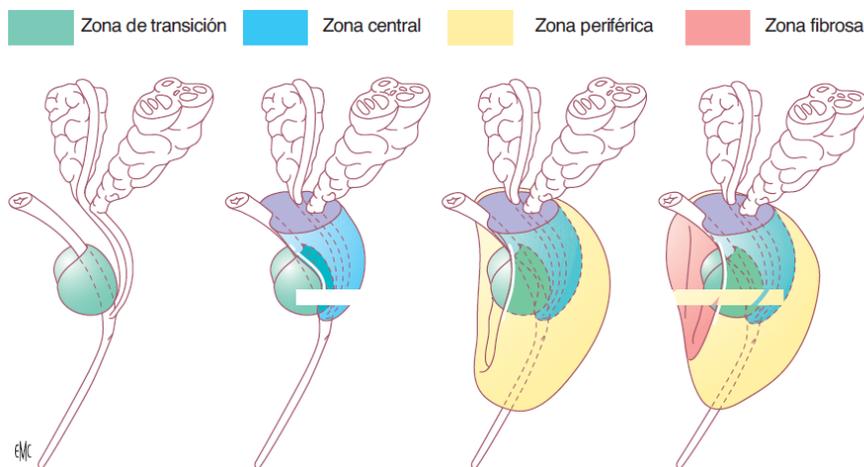
La próstata tiene una función secretora, principalmente una solución alcalina que tiene alto contenido de zinc y citrato, la cual protege a los espermatozoides del ambiente ácido de la vagina. El fluido prostático actúa como amortiguador de la acidez de la vagina, con ellos se incrementa la vida útil de los espermatozoides, aumentando el tiempo para fertilizar al óvulo con éxito. El fluido secretado también contiene proteínas y enzimas que nutren a los espermatozoides. El líquido prostático junto con el líquido seminal, permiten que la propulsión mecánica de los espermatozoides sea más fácil a través de la uretra (Tuong *et al.*, 2021; Singh y Bolla, 2022).

La estructura interna de la próstata es compleja, tanto que su anatomía estuvo sujeta a controversia por 200 años. En 1912, Lowsley describió en la próstata fetal cinco lóbulos prostáticos: dos lóbulos laterales, un lóbulo anterior, un lóbulo posterior y un lóbulo medio. Para el año 1968, John McNeal, un patólogo clínico, presentó una división de la próstata por zonas, en ella se considera tanto la morfología como los tipos histológicos celulares. A la nueva propuesta se le conoce como el esquema de McNeal el cual se mantiene hasta nuestros días. El esquema muestra tres zonas anatómicas para la próstata adulta:

- Zona central, forma la base de la glándula que rodea lo conductos eyaculadores.
- Zona periférica, la zona más grande que constituye el 70% de la glándula, rodea la mayor parte de la zona central y parcialmente la zona distal de la uretra prostática.
- Zona de transición, pequeña zona que rodea una porción de la uretra, entre la vejiga y el *verumontanum* (Figura 1).

Existe un área denominada estroma fibromuscular anterior dentro de la próstata que no es glandular y contiene principalmente tejido muscular y fibroso que rodea una porción de la próstata llamada vértice. Finalmente, la próstata está cubierta por una capa fibrosa llamada cápsula (Selman, 2011; Bastien *et al.*, 2012; Yacoub y Oto, 2018; Henry *et al.*, 2018; Singh y Bolla, 2022).

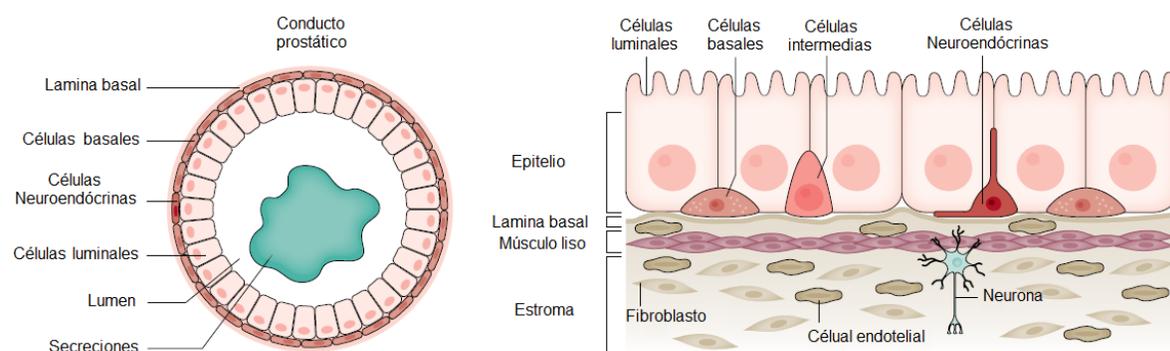
Como resultados de sus estudios, McNeal observó que la hiperplasia prostática benigna (HPB) ocurre principalmente en la zona de transición, mientras que el cáncer de próstata se desarrolla en la zona periférica (Yacoub y Oto, 2018; Henry *et al.*, 2018).



**Figura 1.** Esquema de las zonas anatómicas de la próstata. Se observan las ubicaciones relativas y la relación de la zona central, la zona de transición y la zona periférica (Bastien *et al.*, 2012; Toivanen y Shen, 2017).

El epitelio prostático adulto contiene diferentes tipos de células como las células lumbinales (Figura 2), que son alargadas y expresan altos niveles de receptor de andrógenos (RA), citoqueratinas (CK) 8 y 18; así como proteínas secretoras como el antígeno prostático específico (PSA por sus siglas en inglés, prostate specific antigen). Debajo de la capa de células lumbinales se encuentran las células basales que expresan CK5, CK14, p63, y bajos o incluso niveles indetectables de RA. Ocasionalmente se pueden encontrar células intermedias entre la capa de células basales que secretan CK19. Otro tipo de células son las neuroendocrinas que se encuentran en la base del epitelio y expresan neuropéptidos y otras hormonas; a menudo muestran un proceso dendrítico que entra en contacto con la luz glandular (Toivanen y Shen, 2017).

El estroma de la próstata contiene una capa de músculo liso que permite que se dé la contracción para la expulsión del fluido prostático en la eyaculación. También se pueden encontrar fibroblastos que secretan componentes de la matriz extracelular, como proteínas fibrilares, glicoproteínas y proteoglicanos. Existe evidencia que sugiere la capacidad protumorigénica de los fibroblastos estromales dentro del microambiente tumoral, induciendo la transformación epitelial y estimulando señales de supervivencia. Finalmente, el estroma incluye vasos sanguíneos, linfáticos, nervios y células del sistema inmune (Toivanen y Shen, 2017; Rebello *et al.*, 2021).



**Figura 2.** Esquema de los tipos de células en la próstata. Se muestra la composición del compartimiento epitelial al igual que el estromal (Toivanen y Shen, 2017; Rebello *et al.*, 2021).

## 2.2 Enfermedades que afectan la próstata

Las enfermedades más comunes que afectan la próstata son la prostatitis, la hiperplasia prostática benigna (HPB) y el cáncer de próstata (CaP).

La prostatitis es una condición inflamatoria de la próstata con una prevalencia de 8.7%. La prostatitis tiene diferentes etiologías, incluyendo infección bacteriana e inmunidad desregulada (Górski *et al.*, 2018; Shakur *et al.*, 2021).

La prostatitis bacteriana es la forma más común de prostatitis, puede presentarse tanto en hombres jóvenes, como en hombres mayores. Existen dos tipos de prostatitis bacteriana, la aguda y la crónica. *Escherichia coli* es el microorganismo que se aísla con mayor frecuencia, aunque también pueden encontrarse otras bacterias Gram negativas del género *Klebsiella*, *Proteus* y *Pseudomonas*, y bacterias Gram positivas, *Enterococcus faecalis* y *Staphylococcus aureus*. Por otra parte, la prostatitis inflamatoria asintomática se define como infiltrados inflamatorios en el tejido prostático (Górski *et al.*, 2018; Shakur *et al.*, 2021).

La HPB también conocida como adenoma de próstata o prostatismo, es la enfermedad del sistema urinario más común en hombres de edad avanzada y es el crecimiento benigno de la próstata; las principales manifestaciones patológicas son la hipertrofia proliferativa y la formación de nódulos en la zona de transición de la próstata. El riesgo de desarrollar HPB incrementa conforme el varón va envejeciendo, se considera como una enfermedad excepcional en menores de 50 años; mientras que los hombres que rondan sus 50's se estima que el 40% sufre o sufrirá los síntomas relacionados con el crecimiento benigno de la próstata, aumenta hasta el 70% en la población masculina entre los 60's y hacia los 80 años esa proporción se aumenta a un 90%. La HPB es la causa más común de síntomas del tracto urinario inferior en hombres, los cuales incluyen los involucrados con micción y retención de orina que afectan la calidad de vida. Sin embargo, algunos hombres no presentan ningún síntoma y se pueden percatar de la afección médica a través de estudios de rutina. Al mismo tiempo la HPB incrementa el riesgo de infecciones

del tracto urinario y la retención urinaria aguda (Tong y Zhou, 2020; Tsunemori *et al.*, 2021).

### 2.3 Cáncer de próstata (CaP)

El cáncer de próstata (CaP) en México ocupa el primer lugar en incidencia y el primer lugar en muertes relacionadas con cáncer en hombres mayores a 65 años, y además se ha convertido en un problema de salud pública debido a que es la tercera causa de muerte en nuestro país después de las enfermedades cardiovasculares y la diabetes mellitus. Las tasas de incidencia y mortalidad del CaP en nuestro país han estado avanzando de manera considerable desde el año 2000, siendo otro de los motivos por los que esta enfermedad pone en riesgo la salud pública de México (Tabla 1). Dentro de nuestro territorio se estima que cada año mueren 7,000 hombres y se diagnostican entre 21,000 y 25,000 nuevos casos de esta enfermedad (Adame-González *et al.*, 2020; GLOBOCAN, 2020; Beltran-Ontiveros *et al.*, 2022).

Tabla 1.- Incidencia y mortalidad de CaP estimada en México (2000 – 2019) (Beltran-Ontiveros *et al.*, 2022)

	2000	2010	2019
Incidencia (No. de casos)	11,444	17,784	27,096
Mortalidad (No. de muertes)	4812	6864	9256

El CaP es un trastorno heterogéneo y multifocal caracterizado por la reducción en las concentraciones de zinc y citrato tanto en la glándula como en el fluido prostático. El CaP se desarrolla en su mayoría en la zona periférica (70 % de los casos), del 15 – 20 % en la zona central y solo del 10 – 15 % en la zona transicional de la próstata (Tuong *et al.*, 2021).

El desarrollo del CaP está asociado a la acumulación de mutaciones somáticas en el genoma de las células epiteliales de la próstata a lo largo de la vida de un

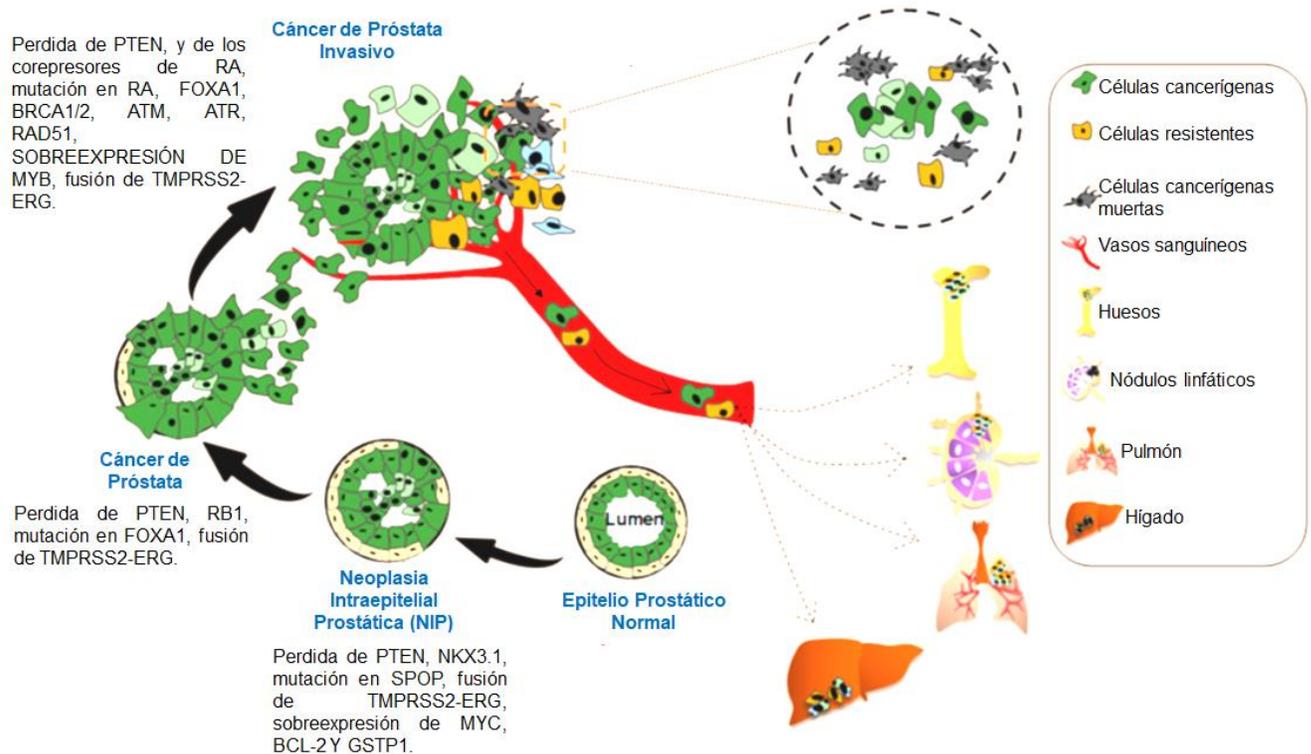
paciente; estas mutaciones pueden ocurrir tanto en oncogenes como en genes supresores de tumores. El resultado de las modificaciones genéticas son los cambios en la transcripción y/o traducción de genes que regulan el crecimiento celular, la reparación del daño al ADN, proliferación y muerte celular, lo que conduce a la desregulación de la homeostasis celular (Rebello *et al.*, 2021).

Los precursores del CaP (Figura 3) son la atrofia inflamatoria proliferativa (AIP) y la neoplasia intraepitelial prostática (NIP) (Sfanos *et al.*, 2018; Eryilmaz *et al.*, 2019; Rebello *et al.*, 2021).

La AIP, es una inflamación crónica, principalmente en la zona periférica de la próstata. Las regiones con AIP contienen células luminales atróficas que presentan alta tasa de proliferación. Las áreas que presentan AIP están enriquecidas con células intermedias que expresan CK8, CK18 Y CK5, presentan sobreexpresión de Bcl2 e incluso pueden expresar bajos niveles de RA y PSA. La presencia de AIP es considerada un factor de alto riesgo para la carcinogénesis de la próstata, puesto que estas lesiones están relacionadas con una transición directa hacia NIP y carcinoma (Sfanos *et al.*, 2018; Eryilmaz *et al.*, 2019).

La NIP se desarrolla, al igual que AIP, en la zona periférica; histológicamente existen tres niveles de NIP, siendo el NIP 1 el de bajo grado y el NIP 3 el de alto grado (Zhou, 2018). La NIP de alto grado ha sido considerada como la principal precursora del CaP, se estima que el 30% de los pacientes con esta lesión desarrollarán CaP dentro de un año. La NIP de alto grado está caracterizada por una escasez de células basales y prevalencia de células luminales. Las lesiones NIP de alto grado se caracterizan por pérdida en PTEN (*phosphatase and the tensin homolog*) y NKX3.1 (NK3 homeobox 1), sobreexpresión del protooncogen MYC, BCL-2 y el gen GSTP1 (*glutathione S-transferase pi 1*), acompañado de mutación en SPOP (*speckle type BTB/POZ protein*) y la fusión del gen regulado por andrógenos TMPRSS2 (*Transmembrane Serine Protease 2*) con el gen ERG de la familia de las ETS (Cui *et al.*, 2017; Lee y Ro, 2018, Saranyutanon, 2020).

El desarrollo de CaP a partir de la lesión NIP de alto grado se lleva a cabo a través de la pérdida del gen de la proteína de retinoblastoma (RB1) así como la activación de la telomerasa y la mutación en FOXA1 (*forkhead box A1*). La evolución a cáncer de próstata invasivo está dada a través de múltiples cambios moleculares como la pérdida de correpresores del RA, mutaciones en el RA, FOXA1, BRCA1/2, ATM, ATR y RAD51; acompañado por la ganancia de función de coactivadores del RA como CXCL12 y CXCR4 (Saranyutanon *et al.*, 2020).

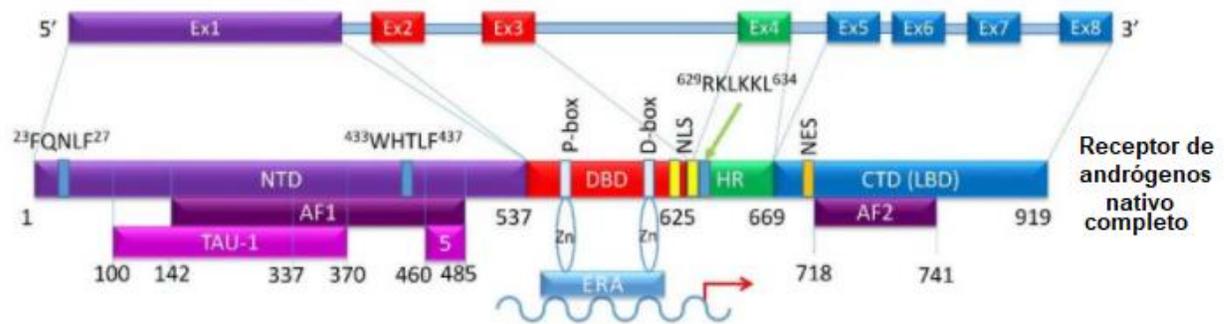


**Figura 3.** Progresión del CaP. Se muestran las lesiones previas al desarrollo del CaP y los cambios moleculares que están involucrados (Saranyutanon *et al.*, 2020).

## 2.4 Receptor de Andrógenos y Vía de señalización del Receptor de Andrógenos.

El RA es un factor de transcripción responsivo a andrógenos que pertenece a la familia de los receptores nucleares. El gen del RA está localizado en el brazo largo del cromosoma X (q11-12), consta de 8 exones y codifica a una proteína de 110

kDa y 920 aminoácidos. El RA consta de un dominio amino terminal codificado por el exón 1 (NTD), un dominio de unión al ADN codificado por los exones 2 y 3 (DBD), una región bisagra del exón 4, (HR), y un dominio de unión a ligando que abarca de los exones 5 al 8 (LBD) (Figura 4). En la actualidad no existe estructura cristalizada del RA completo, pero si, de la estructura del dominio de unión a ligando y, por separado el dominio de unión a ADN (Messner *et al.*, 2020; Tan *et al.*, 2020).

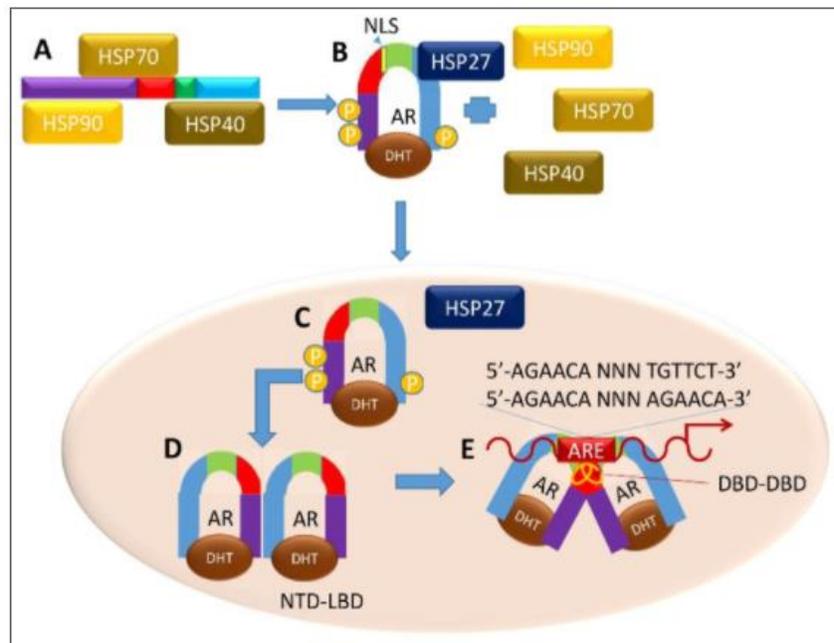


**Figura 4.** Estructura del receptor de andrógenos. En la parte superior se muestran los 8 exones que conforman el gen del RA, mientras que en la parte inferior se observa la proteína con sus cuatro dominios, se pueden identificar también los dedos de zinc y los dominios menores de función de activación transcripcional AF-1 y AF-2 (Messner *et al.*, 2020).

El NTD incluye el dominio de activación de función transcripcional 1 (AF-1). El DBD contiene dos motivos de dedo de zinc, el primero cercano al NTD que controla la unión a los elementos de respuesta a andrógenos (ERA) en el ADN; el segundo facilita la dimerización del RA. La HR, localizada entre el DBD y el LBD muestra una señal de localización nuclear que se une a la importina- $\alpha$  y facilita la translocación nuclear. El LBD es el principal blanco para los inhibidores del RA; esta región consiste en once  $\beta$ -hélices y presenta un dominio de activación de función transcripcional 2 (AF-2), en esta región se han identificado mutaciones relacionadas con el CaP (Messner *et al.*, 2020; Fujita y Nonomura, 2019).

Los dos ligandos principales del RA que se unen y pueden activarlo son la testosterona (T) y su metabolito, dihidrotestosterona (DHT). El 90% de la testosterona es sintetizada en los testículos en las células de Leydig y el resto por

las glándulas suprarrenales, dentro del torrente sanguíneo la T puede encontrarse unida a una globulina transportadora de hormonas sexuales (SHBG) o bien a albúmina. La T es capaz de difundirse dentro de las células prostáticas y es convertida a dihidrotestosterona (DHT) por acción de la enzima 5 $\alpha$ -reductasa (5AR). Se conocen dos isoformas de la enzima 5AR, la 5AR1 y la 5AR2 que difieren en su afinidad por la T; la 5AR1 presenta baja afinidad por la T y se expresa en tejido no prostático como hígado, piel y folículos pilosos. La 5AR2 tiene gran afinidad por la T y se expresa en las células epiteliales y estromales de la próstata (Messner *et al.* 2020).



**Figura 5.** Vía de Señalización del RA. A) El RA se encuentra en el citoplasma unido a las proteínas de shock térmico. B) Unión del RA con la DHT, disociación de las proteínas de shock térmico. C) RA activado transloca al núcleo. D) Formación del homodímero. E) Unión del homodímero a los ERA (Messner *et al.* 2020).

En ausencia de la DHT, el RA se localiza en el citoplasma formando un complejo que incluye moléculas chaperonas de la familia de las proteínas de shock térmico (HSP) como la HSP 90, 70 Y 40, las cuales protegen al RA de la degradación. Después de la conversión de la testosterona, la DHT se une directamente al RA, lo que ocasiona un cambio en la conformación en el complejo formado por las

proteínas de shock térmico, disociándose de HSP 90, 70, 40 y asociándose con HSP27, de ésta manera se permite la translocación nuclear del RA (Figura 5). Dentro del núcleo el RA forma un homodímero con otro RA que se unirá a los elementos de respuesta a andrógenos; tras la unión al ADN, el homodímero forma un complejo con proteínas coactivadoras y correguladoras en las regiones AF-1 y AF-2. El RA regula la expresión de genes con diversas funciones localizados río debajo de los ERA, incluyendo proteínas secretoras (KLK3, KLK2), estimuladores de crecimiento (IGF1R, APP), factores de transcripción (NKX3.1, FOXP1), enzimas metabólicas (CAMKK2), genes involucrados con migración (MMP) así como la fusión de genes (TMPRSS2-ERG) (Cai *et al.*, 2018; Fujita y Nonomura, 2019; Messner *et al.*, 2020).

## **2.5 Diagnóstico del CaP.**

El CaP es una enfermedad asintomática en las etapas de bajo riesgo, por ello es necesario un diagnóstico temprano antes de que los síntomas inicien, con esa finalidad se han desarrollado algunos métodos para el diagnóstico del CaP (Sooriakumaran, 2020).

Las herramientas de diagnóstico más comunes incluyen el examen rectal digital (ERD), medición de antígeno prostático específico (PSA) en sangre y biopsia dirigida por ultrasonido transrectal (Correas *et al.*, 2020).

El ERD se realiza de manera rutinaria como parte de una evaluación clínica urológica en pacientes con sospecha de CaP. Un ERD anormal es indicativo para biopsia; sin embargo, el valor de este examen ha sido cuestionado, pues su valor es limitado cuando existen niveles de PSA < 3 ng/mL. El uso del ERD tiene una sensibilidad y especificidad por debajo del 60%, por lo tanto, no se recomienda para excluir un CaP (Tan *et al.*, 2021; Mottet *et al.*, 2021).

La Administración de Drogas y Alimentos de los E.E.U.U. (FDA, por sus siglas en inglés, Food and Drug Administration) aprobó en 1984 el PSA como un marcador de CaP, ya que esta proteína solo es secretada por la glándula prostática y se considera muy específica de la próstata. Su función normal es licuar el semen, pero

en CaP es secretado en exceso; una concentración  $> 4$  ng/mL en suero es considerada positiva para CaP. Sin embargo, otras condiciones como la HPB o la prostatitis pueden elevar los niveles de PSA y aumenta la probabilidad de falsos positivos. Además, se ha observado que en varios pacientes con CaP, los niveles de PSA pueden estar por debajo de los 4 ng/mL, debido a que, aunque es específico de próstata no lo es de CaP; aunado a ello esta herramienta no distingue el cáncer en las fases proliferativas, de lento crecimiento o invasiva. A pesar de las desventajas de este marcador, se continúa considerando como un estándar de oro para identificar pacientes con CaP (Dejous y Krishnan, 2020).

La biopsia dirigida por ultrasonido transrectal ha sido el enfoque de diagnóstico estándar para el CaP en los últimos 30 años. Se realiza para obtener de 10 a 12 muestras de tejido en un patrón en forma de cuadrícula; un patólogo examina estas muestras y emite su puntaje de Gleason (Moe y Hayne, 2020; Litwin y Tan, 2017; Mottet *et al.*, 2021).

La agresividad del CaP se ha clasificado con el puntaje de Gleason, en el que las características histológicas se utilizan para clasificar el tejido tumoral como bien diferenciado (el grado más bajo) a poco diferenciado (el grado más alto). El puntaje de Gleason se determina por la suma del primer y segundo patrón histológico más destacado, lo que da como resultado una puntuación de Gleason bajo ( $\leq 6$ ), intermedio (7) o alto (8-10). Cada patrón se puntúa desde el 1 al 5, siendo 5 el más pobremente diferenciado. Por ejemplo, si el grado 4 es el patrón más común y el siguiente patrón más común es 3, entonces el puntaje de Gleason sería 7 (4 + 3). Un puntaje de 6 identifica tumores con histología bien diferenciada, uno de 7 tiene diferenciación intermedia, y es asociado a un CaP más agresivo si la suma es 4 + 3 que 3 + 4; los puntajes de 8 a 10 tiene una diferenciación pobre y son indicativos de un CaP con mal pronóstico (Brawley *et al.*, 2018; Rebello *et al.*, 2021).

Tabla 2. Clasificación de Gleason del CaP. Se presentan los grados según el puntaje de Gleason, siendo el grado 1 el de menor riesgo y el grado 5 el de mayor riesgo (Mottet *et al.*, 2021).

Puntaje de Gleason	Grado
1 – 6	1
7 (3 + 4)	2
7 (4 + 3)	3
8 (4 + 4, 3 + 5, 5 + 3)	4
9, 10	5

## 2.6 Tratamientos

Aproximadamente el 90% de los casos de CaP está confinado al órgano o localmente avanzado al momento del diagnóstico; dependiendo de diversos parámetros como el estado clínico y los niveles de antígeno prostático específico, se puede optar por la vigilancia activa, radioterapia o prostatectomía radical (Nevedomskaya *et al.*, 2018).

La vigilancia activa es un programa estructurado para rastrear la progresión del CaP mediante los niveles de PSA y repetidas biopsias; este enfoque se puede considerar para pacientes con grado Gleason de 1 o 2. Los pacientes bajo este tratamiento deben estar conscientes del riesgo de dolor, hemorragia e infección por las constantes biopsias, además deben entender que el CaP puede avanzar y hacer metástasis, momento en el cual se requiere de una intervención (Brawley *et al.*, 2018).

La prostatectomía radical es mínimamente invasiva, hoy en día se realiza con laparoscopia y tiene la finalidad de curación cuando el CaP está localizado. Sin embargo, los pacientes que se someten a este tipo de tratamiento son más propensos a presentar incontinencia urinaria, problemas para mantener o tener una erección e

infertilidad; otros posibles efectos adversos de la cirugía son uretra cicatrizada, hernia y disminución de la longitud del pene (Brawley *et al.*, 2018).

La radioterapia de haz externo se administra, generalmente, por ocho o nueve semanas con el objetivo de erradicar el CaP antes de que avance o haga metástasis. Si bien, evita los efectos adversos del tratamiento quirúrgico, es más difícil realizar la cirugía si el cáncer reincide después de la radiación. En pacientes con CaP de bajo riesgo, la braquiterapia, un tipo de radioterapia interna, con implante de yodo 125 o paladio 103 se puede usar como monoterapia y existe menor riesgo de presentar incontinencia urinaria y disfunción eréctil. En caso de CaP de riesgo intermedio se puede usar la braquiterapia en combinación con la radioterapia externa. Los pacientes tratados con radioterapia tienen mayor probabilidad de presentar efectos adversos gastrointestinales como diarrea, incontinencia fecal, heces con sangre, dolor rectal, y se incrementa el riesgo a desarrollar cáncer de vejiga (Brawley *et al.*, 2018).

Si la enfermedad se disemina fuera de la próstata, se usa con frecuencia la terapia de privación de andrógenos, por castración quirúrgica (orquiectomía) o química (antagonistas de LHRH, fármacos antiandrógenos) para disminuir los niveles de testosterona (tratamiento también se utiliza en CaP localizado de riesgo intermedio). Desafortunadamente, la respuesta solo es transitoria y muchos pacientes crean resistencia a la terapia de privación de andrógenos y progresan al CaP resistente a castración (CPRC) (Nevodomsкая *et al.*, 2018; Maitland, 2021).

Aún en el CPRC el eje del RA es un elemento esencial, por lo que las opciones terapéuticas siguen siendo el bloqueo de la función del RA directamente con antagonistas competitivos del ligando con mayor afinidad, DHT, o mediante la reducción de síntesis de andrógenos intratumorales inhibiendo al citocromo P450 que interviene en la síntesis de testosterona (McCrea *et al.*, 2018; Nevodomsкая *et al.*, 2018).

Finalmente, el tratamiento por el que se opta son las quimioterapias, menos específicas y más tóxicas, en combinación con otras terapias o sola, los fármacos

usados comúnmente son docetaxel y cabazitaxel. Algunas esperanzas de nuevos quimioterapéuticos específicos como **olaparib**, que se dirigen a la proporción de CaP con defectos en la reparación del daño al ADN se muestran prometedores. Sin embargo, en este punto, el oncólogo poco puede hacer y el pronóstico de supervivencia es muy bajo; por lo que se está dando énfasis principal en buscar una terapia medicinal alternativa natural, que pueda aumentar la eficacia de los tratamientos actuales contra el cáncer (Gupta *et al.*, 2017; McCrea *et al.*, 2018; Maitland, 2021).

## **2.7 Mecanismos de resistencia en cáncer de próstata**

Se conocen cinco mecanismos de resistencia que permiten el desarrollo del CPRC:

- 1) Mutación puntual en el receptor de andrógenos, se encuentra entre un 15% – 30% de los casos de CPRC, dichas mutaciones confieren promiscuidad al receptor, permitiendo que otras hormonas activen al RA.
- 2) Amplificación del receptor de andrógenos, se ha encontrado entre un 15% – 30% de los pacientes con CPRC y representa la sobreexpresión del RA.
- 3) Producción intracrina de andrógenos a partir de los precursores DHEA y androstenediona provenientes de las glándulas suprarrenales. Las células prostáticas normales pueden convertir estos precursores en testosterona y dihidrotestosterona gracias a la acción de las enzimas convertidoras AKR1C3, en CPRC estas enzimas se encuentran sobreexpresadas.
- 4) Variantes del receptor de andrógenos, existen más de 20 y la mayoría carecen del dominio de unión a ligando lo que las hace funcionalmente activas sin los andrógenos.
- 5) Finalmente el entrecruzamiento de vías de señalización donde el receptor de andrógenos puede ser activado por otras vías de señalización como PI3K/Akt/MTOR, JAK/STAT3 o MAPK sin necesidad de unirse con el andrógeno u otra hormona (Fujita y Nonomura, 2019).

Se ha demostrado que la activación de la vía de las MAPK aumenta la expresión del gen PSA a través de la intercomunicación con la vía del RA. Además, se ha observado que la actividad de MAPK aumenta en el CPRC donde la activación del RA es posible gracias a la fosforilación del RA en su dominio amino terminal. Otros

hallazgos sobre las MAPK encontrados por Butler y colaboradores en el 2017, es que tiene un efecto compensatorio cuando la vía PI3K/Akt/mTOR es inhibida permitiendo la proliferación de las células prostáticas cancerígenas (Butler *et al.*, 2017).

## **2.8 Productos naturales**

La investigación, desarrollo y uso de productos naturales como agentes terapéuticos ha ido incrementando en los últimos años. Dichos productos naturales se han utilizado en el tratamiento de diversas enfermedades, incluyendo el cáncer; aproximadamente el 74% de los nuevos compuestos anticancerígenos son productos naturales o derivados de ellos, sin embargo, otros agentes anticancerígenos no tan actuales siguen en uso hasta el día de hoy como el paclitaxel (taxol), docetaxel, vincristina y vinblastina (Gupta *et al.*, 2017; Habtemariam y Lentini, 2018).

Los productos naturales, también pueden utilizarse como adyuvantes efectivos de la quimioterapia convencional, reduciendo los efectos adversos como fatiga, náuseas o anemia. Un ejemplo de producto natural con potencial terapéutico es la *Stevia rebaudiana*, la especie más relevante de su género y cuyo uso popular ha tomado gran fuerza gracias a su comercialización como edulcorante natural. A partir de extractos de *Stevia rebaudiana* y otras especies de *Stevia* se han podido aislar compuestos con actividad antioxidante, antiinflamatoria e incluso actividad antiproliferativa (Mitra y Dash, 2018; Borgo *et al.*, 2021).

## **2.9 *Stevia rebaudiana* Bertoni**

*Stevia rebaudiana* Bertoni es un arbusto perenne de la familia *Asteraceae*, nativa de Sudamérica (Paraguay y Brasil), comúnmente conocida como “la hierba dulce de Paraguay”, tiene gran valor económico por su alto contenido de edulcorantes naturales presentes en sus hojas (Geuns, 2003; Wölwer-Rieck, 2012).

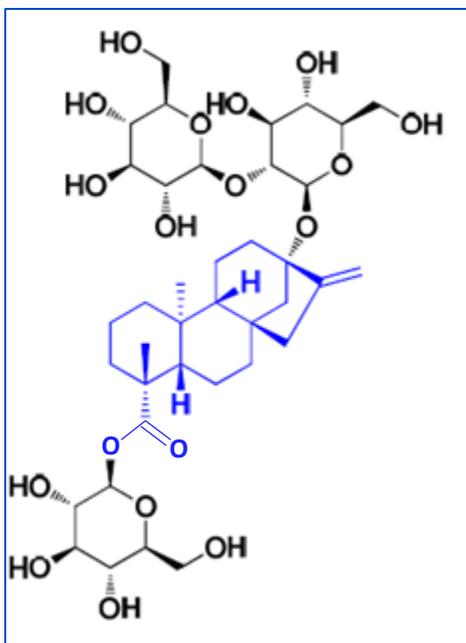
Se han identificado más de 100 compuestos en *S. rebaudiana*, siendo los más conocidos los glucósidos de esteviol. Durante 45 años, el esteviósido fue

considerado como el único glucósido de esteviol presente en las hojas de *S. rebaudiana*, hasta que investigadores de la Universidad de Hiroshima obtuvieron rebaudiósido A y B de un extracto metanólico de las hojas de *S. rebaudiana*. Para inicios del siglo XXI ya se tenían identificados nueve glucósidos de esteviol: esteviósido, rebaudiósido A, B, C, D, E y F, dulcósido A y esteviolbíosido (Ceunen y Geuns, 2013).

La concentración de estos compuestos varía dependiendo del genotipo y las condiciones de cultivo, pero la composición más común en la variedad silvestre, calculada con base al peso seco es de: 5 – 10% de esteviósido, 2 – 5% de rebaudiósido A y 1% de rebaudiósido C, 0.5% de dulcósido A, 0.2% de rebaudiósido D, E, y F y 0.1% de esteviolbiosido (Ceunen y Geuns, 2013; Wölwer-Rieck, 2012).

### **2.9.1 Esteviósido**

El esteviósido se extrae de *Stevia rebaudiana*, es un compuesto complejo formado por esteviol y tres moléculas de glucosa (Figura 6). Es un edulcorante natural comercial, considerado un sustituto de azúcar no calórico. Lo usan los pacientes diabéticos y aquellos con fenilcetonuria, también para personas obesas en determinadas dietas para bajar de peso. Su sabor dulce es 250 a 300 veces mayor que el de la sacarosa, por ello se usa en diversos alimentos y productos como mariscos secos, verduras encurtidas, bebidas, salsa roja, chicles, dulces, helados y yogurt, incluso en la pasta de dientes o enjuague bucal. Además de la dulzura, el esteviósido ofrece otros beneficios terapéuticos como antihiperoglucemiante, antihipertensivo, antiinflamatorio, antitumoral e inmunomoduladora principalmente (Wang *et al.*, 2018).



**Figura 6.** Estructura del estevisido. Se muestra en color azul el esteviol y en negro las estructuras de la glucosa que componen al estevisido (Wang *et al.*, 2018).

El estevisido es un buen compuesto líder en la química farmacéutica para el descubrimiento de otros fármacos puesto que puede hidrolizarse para formar esteviol e isosteviol, para los cuales ya han investigado algunos de sus efectos farmacológicos. Los pesos moleculares del esteviol e isosteviol son ambos de 318.2 g/mol, lo que los hace adecuados para una mayor optimización estructural, de acuerdo con los criterios de las cinco reglas de Lipinski. Las estructuras de esteviol e isosteviol presentan algunos grupos funcionales como carbonilo, carboxilo e hidroxilo que proporcionan buena accesibilidad sintética, está disponible comercialmente y se han realizado pruebas de toxicidad, sin mostrar daño especialmente a dosis bajas (Wang *et al.*, 2018).

### 2.9.2 Metabolismo del estevisido

Los glicósidos de esteviol se eliminan a través de reacciones metabólicas, tanto en humanos como en animales (Figura 7). La vía predominante es la del rebaudisido A, el cual se metaboliza primero a estevisido por la microbiota del colon humano, después el estevisido se hidroliza a glucosa y esteviol. La glucosa resultante se

consume por las bacterias del colon y no se absorbe dentro del sistema circulatorio. El primer paso del metabolismo de los glicósidos de esteviol es más rápido que la transformación de esteviósido a esteviol (Momtazi-Borojeni *et al.*, 2017). La vía menor indica que el rebaudiósido A se metaboliza a través del rebaudiósido B, y finalmente a esteviol (Koyama *et al.*, 2002).

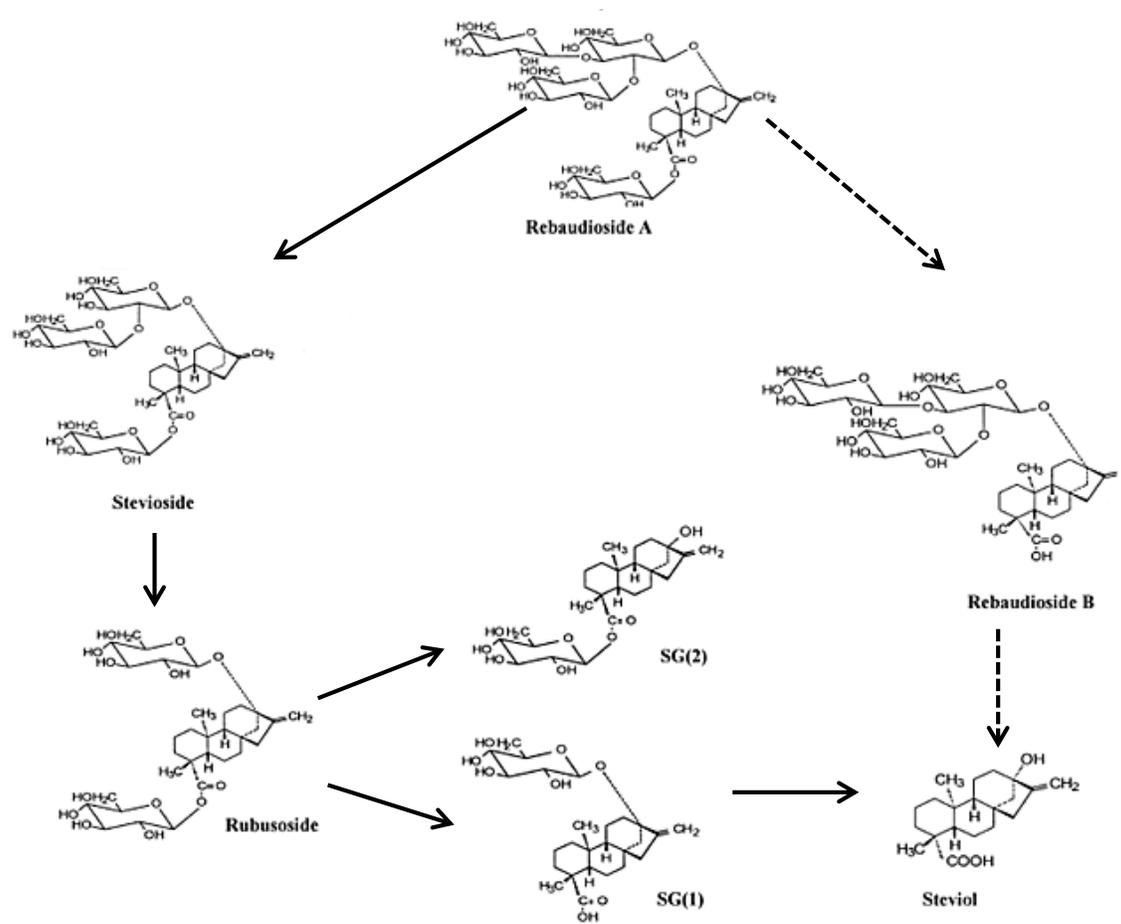
Una vez que es absorbido en el tracto gastrointestinal, el esteviol se conjuga con ácido glucurónico en el hígado para formar glucurónido de esteviol. En ratas, el esteviol libre y el conjugado se excreta en las heces a través de la bilis (generalmente dentro de las 48 horas), aunque pequeñas cantidades aparecen en la orina (menos del 3 %). En humanos, el esteviol se elimina principalmente en la orina como glucurónido de esteviol (Roberts *et al.*, 2016).

### **2.9.3 Toxicología del esteviósido y sus derivados**

La seguridad del esteviósido se ha confirmado con diversos estudios toxicológicos, donde se incluye genotoxicidad y carcinogenicidad (Momtazi-Borojeni *et al.*, 2017).

Las pruebas de toxicidad aguda determinan la dosis letal media, LD<sub>50</sub>, (aquella donde la mitad de los animales muere); se ha encontrado que dosis de 15 g/kg de peso corporal de esteviósido, no son letales para ratones, ratas o hamsters por ingestión oral. En cuanto a uno de sus derivados, el isosteviol, la LD<sub>50</sub> en perros, ratas y ratones, es de 0.5 g/kg de peso corporal (Momtazi-Borojeni *et al.*, 2017).

En cuanto a pruebas de toxicidad subaguda, se determina la concentración máxima del esteviósido, donde no se presenta ningún efecto adverso, el cual se denomina NOEL (por sus siglas en inglés, *No Effect Level*). En estudios crónicos de toxicidad subaguda, donde se evaluaron ratas durante 3 meses o hamsters por varias generaciones, se encontró un NOEL superior a 2.5 g/kg de peso corporal (Genus, 2003; Momtazi-Borojeni *et al.*, 2017).



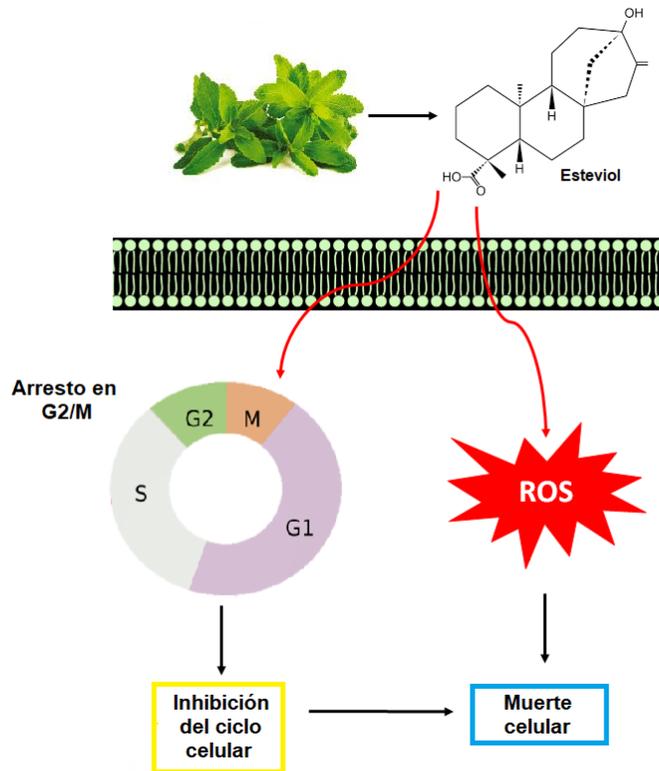
**Figura 7.** Vías metabólicas del esteviósido en la microbiota intestinal humana. La vía principal se muestra con flechas continuas, mientras que la vía menor se presenta con flechas punteadas (Koyama *et al.*, 2002).

**2.9.4 Actividad anticancerígena del esteviósido y sus derivados**

La actividad anticancerígena del esteviósido y sus derivados se ha estudiado en células de cáncer de colón, HT-29, donde se observó un aumento en la actividad de la caspasa-9 y caspasa-3, así como arresto en el ciclo celular en la fase G<sub>2</sub>/M. (Ren *et al.*, 2017).

En células MCF-7, uno de los derivados del esteviósido, el esteviol, induce apoptosis y arresto en el ciclo celular en la fase G<sub>2</sub>/M (Figura 8), implicando vías de señalización con ROS; mayor concentración de ROS está asociada generalmente con activación de oncogenes, que es un evento temprano de la transformación

maligna, en el estudio realizado por Gupta y colaboradores, se observó una disminución significativa en los niveles de ROS, lo que indicó que el esteviol induce apoptosis mediante ROS (Gupta *et al.*, 2017).



**Figura 8.** Mecanismo de acción propuesto para esteviol en células de cáncer de mama, MCF-7. Se presenta el arresto en ciclo celular y la apoptosis como respuesta a la producción de ROS (Gupta *et al.*, 2017).

## 2.10 Acoplamiento molecular.

El acoplamiento molecular es un proceso mediante el cual se acoplan pequeñas moléculas en estructuras macromoleculares para calificar sus valores complementarios en los sitios de unión. Desde que esta técnica apareció a mediados de 1970, el acoplamiento ha sido una herramienta que ayuda a entender como los compuestos químicos interactúan con sus dianas moleculares, así como para el descubrimiento y desarrollo de fármacos. Además de estas aplicaciones, el acoplamiento molecular, también se puede emplear para identificar series de dianas para las que algunos ligandos presentan una buena complementariedad (*target*

*fishing* y elaboración de perfiles), para la identificación de ligandos que se unen simultáneamente a un grupo de dianas de interés (polifarmacología), y para identificar nuevos usos de compuestos químicos con perfiles de seguridad ya optimizados (reposicionamiento de fármacos) (Saikia y Bordoloi, 2019; Pinzi y Rastelli, 2019).

Los glicósidos de esteviol, como el esteviósido, han sido evaluados mediante acoplamiento molecular, los estudios que se han llevado a cabo están dirigidos a sus propiedades endulzantes y como este compuesto interactúa con los receptores del sabor dulce pertenecientes a la clase C de la familia de receptores acoplados a proteínas G; mostrando que la energía de unión del esteviósido está relacionada con la intensidad de la dulzura que se puede percibir (Acevedo *et al.*, 2018).

En este proyecto haremos uso del acoplamiento molecular para evaluar la interacción del esteviol e isosteviol con el receptor de andrógenos, e identificar los posibles sitios de unión dentro del receptor.

### 3 JUSTIFICACIÓN

El cáncer de próstata (CaP) es la segunda neoplasia maligna a nivel mundial, con aproximadamente un millón de nuevos casos diagnosticados cada año, de los cuales un tercio resultan letales. En México, el CaP es la causa más frecuente de mortalidad por tumores malignos, estos datos son reportados por el Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS, 2018). Cuando un paciente es diagnosticado con CaP, se administra como primera elección un tratamiento hormonal, aunque también existen otras opciones como la prostatectomía, radioterapia o quimioterapia; sin embargo, no existe un tratamiento que no genere resistencia, sea específico y no tóxico para las células normales.

Para superar las limitaciones presentes en los anticancerígenos actuales, se ha propuesto la búsqueda de nuevos compuestos que tengan mejores propiedades fisicoquímicas y biológicas que los actualmente disponibles. Aproximadamente el 74 % de los nuevos compuestos anticancerígenos provienen de productos naturales o sus derivados. Entre los cuales destacan el esteviósido, que se produce en las hojas de *Stevia rebaudiana* y sus metabolitos esteviol e isosteviol, que han sido estudiados sugiriendo su efecto benéfico como antihiper glucemiante, antihipertensivo, antiinflamatorio, diurético, propiedades inmunomoduladoras y anticancerígeno. Este último efecto se ha observado en diferentes tipos de cáncer como el de mama y pulmón, entre otros, donde induce la apoptosis, pero no en cáncer de próstata. Además, no se ha evaluado el efecto sobre la migración en ningún tipo de linaje celular canceroso como parte de la elucidación del mecanismo de acción anticancerígeno.

#### **4 PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN**

¿El efecto inhibitor de la proliferación y migración del esteviol sobre células de cáncer de próstata podría estar asociado a la inhibición de la vía de las MAPK?

#### **5 HIPÓTESIS**

El esteviol presenta efectos antiproliferativo y antimigratorio a través de la inhibición de la vía las MAPK en células de cáncer de próstata.

## **6 OBJETIVOS**

### **6.1 Objetivo general**

Evaluar el efecto del esteviol sobre la proliferación y migración de células de cáncer de próstata e identificar si su mecanismo de acción involucra la inhibición de la vía de las MAPK.

### **6.2 Objetivos específicos**

- 1) Analizar la interacción del receptor de andrógenos con el esteviol por acoplamiento molecular.
- 2) Examinar la interacción de las proteínas ERK1/2 con el esteviol mediante acoplamiento molecular.
- 3) Evaluar la actividad antiproliferativa del esteviol en células de cáncer de próstata, mediante la técnica de exclusión con azul tripano.
- 4) Examinar el efecto del esteviol sobre la migración de células de cáncer de próstata, mediante el ensayo de la cámara de Boyden.

## **7 METODOLOGÍA**

### **7.1 Acoplamiento molecular**

#### **7.1.1 Preparación de la estructura cristalográfica del RA.**

Se realizó la búsqueda de la estructura cristalográfica del receptor de andrógenos (código PDB: 2AMA ) en la base de datos “Protein Data Bank” (PDB <https://www.rcsb.org/>) para obtener la estructura 3D del receptor y preparar la estructura usando el Protein Preparation Wizard de Schrödinger Maestro 10.4. Esta preparación consistió en la remoción de ligandos adicionales, agua y iones, así como completar los aminoácidos incompletos.

#### **7.1.2 Obtención de las estructuras y modelado por homología para ERK1 y ERK2.**

Las secuencias de ERK1 y ERK2 se obtuvieron de la base de datos publica UniProt (código UniProt P27361 y P28482, respectivamente). Las estructuras presentes en la base de datos PDB de ERK1 y ERK2 no están completas, por lo que se realizó un modelado por homología para completar la estructura proteica cargando la secuencia de cada proteína en el módulo general del servidor público I-TASSER. Para el caso de ERK1 se tomó como plantilla 2ZOQ y para ERK2 la platilla fue 2Y9Q. La calidad de los modelos fue evaluada mediante el servidor público Molprobitry para obtener los residuos favorecidos en el diagrama de Ramachandran y el Z-score, mientras que el C-score y el TM-score fueron datos proporcionados por I-TASSER.

#### **7.1.3 Preparación de la estructura de los ligandos.**

Se realizó la búsqueda monográfica de distintos ligandos (dihidrotestosterona, esteviol, isosteviol, enzalutamida) en PubMed (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>) y ZINC (<https://zinc.docking.org/>). Una vez seleccionados los ligandos se realizó una búsqueda de su estructura 3D en PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>). Posteriormente, se corrigieron las conformaciones de las estructuras de los ligandos mediante de Schrödinger Maestro 10.4.

#### **7.1.4 Elaboración de los *dockings* de los ligandos elegidos en tres proteínas distintas: Autodock 4.2.**

Para el RA se construyó la gridbox centrado en el sitio de unión de la dihidrotestosterona (coordenadas grid center 31.121, 8.557, 4.98 con número de puntos 50, 50, 50) con un espaciado de 0.375 Å. Primero se preparó el receptor y los ligandos, corrigiendo las cargas eléctricas, convirtiéndolos en archivos pdbqt. Después se realizó un docking flexible en el programa AutoDock 4.2.6, utilizando una población de 150 confirmaciones, evaluando 500,000 de cambios energéticos y un número máximo de 2,700 repeticiones con un algoritmo genético-Lamarckiano y un método de búsqueda local Solis-Wets. Se obtuvo un archivo con las puntuaciones energéticas de cada ligando.

Para las proteínas ERK 1/2 se realizó un acoplamiento molecular ciego, para encontrar el posible sitio de unión de esteviol e isostevioly posteriormente un redocking utilizando las coordenadas de isostevioly para hacer una primera validación del sitio de unión. Se construyó una Grid para ERK1 de 151X140X196 Å y un espaciado de 0.375 Å, para ERK2 la Grid se construyó usando 145X134X200 Å y un espaciado de 0.375 Å, ambos Grid se calcularon en el programa AutoGrid 4.2.6.

El acoplamiento molecular fue realizado también con el programa AutoDock 4.2.6 optimizado para GPU, utilizando un total de 50 corridas y 25,000,000 de evaluaciones con un algoritmo genético-Lamarckiano y un método de búsqueda local Solis-Wets. Utilizando el sitio de unión de isostevioly se calculó un nuevo Grid de 60X60X60 Å y un espaciado de 0.375 Å. El segundo acoplamiento molecular se realizó utilizando un total de 50 corridas y 25,000,000 de evaluaciones con un algoritmo genético-Lamarckiano y un método de búsqueda local Solis-Wets.

#### **7.1.5 Simulaciones de dinámica molecular.**

Utilizando el complejo proteína-ligando obtenido del segundo acoplamiento molecular, se realizaron simulaciones de dinámica molecular de 50 ns para validar el sitio y conformación de unión de los ligandos en ERK1, ERK2 y AR. Todos los

sistemas para las simulaciones de dinámica molecular se construyeron en el módulo *System Setup* de la aplicación *Desmons*, utilizando el campo de fuerza OPLS-2005, una caja cúbica de 10 Å, adicionando NaCl 0.15M para neutralizar el sistema y moléculas de agua de tipo TIP3. El volumen de las cajas y número de átomos totales de los complejos se presenta en la Tabla 3. Las simulaciones de 50 ns se realizaron en el módulo *Molecular Dynamics* de la aplicación *Desmond* en un ensamble NPT a 310.15 K y 1,01325 bar.

Tabla 3. Datos de los sistemas para la simulación de dinámica molecular.

Grupo	Compuesto	Volumen de la caja	# de átomos del sistema
ERK1	38Z	575781 Å	54173
	Esteviol	575553 Å	54041
	Isosteviol	575567 Å	54053
ERK 2	FRZ	543567 Å	50985
	Esteviol	543567 Å	54024
	Isosteviol	543567 Å	51021
AR	DHT	377239 Å	35521
	Enzalutamida	366103 Å	28730
	Esteviol	377239 Å	35516
	Isosteviol	377239 Å	35509

### 7.1.6 Simulaciones de *Umbrella Sampling*

Utilizando el último frame de la simulación de dinámica molecular, se construyeron los sistemas bajo las mismas condiciones de los sistemas previamente construidos. Se utilizó el frame como la conformación más estable del complejo Ligando-Proteína, la Tabla 4 presenta el volumen de las cajas y número de átomos totales involucrados en las simulaciones de *Umbrella Sampling*.

Tabla 4. Datos de los sistemas para la simulación de dinámica molecular de tipo *Umbrella Sampling*

Grupo	Compuesto	Volumen de la caja	# de átomos del sistema
ERK1	38Z	534847 Å	50001
	Esteviol	711730 Å	66840
	Isosteviol	594227 Å	55672
ERK 2	FRZ	549354 Å	51222
	Esteviol	528511 Å	54732
	Isosteviol	584553 Å	49292
AR	DHT	418515 Å	38840
	Enzalutamida	331614 Å	31056
	Esteviol	428289 Å	38815
	Isosteviol	401654 Å	38023

Una vez obtenido el sistema, se realizó una simulación de dinámica molecular de 25 ns en el módulo *Metadynamics* de *Desmond*, utilizando como variable colectiva en centro de masa de las proteínas y los diferentes ligandos, 0.3 kcal/mol heigh y 0.1 kcal/mol width en parámetros Gaussianos para el protocolo de *Umbrella Sampling*, en un ensamble NPT a 310.15 K y 1.01325 bar.

## 7.2 Actividad antiproliferativa

Las células LNCaP, DU-145 y PC-3 se sembraron en placas de cultivo de 24 pozos durante 48 horas a 37 °C y 5 % CO<sub>2</sub> en medio de cultivo RPMI-1640, DMEM y F-1K, respectivamente, suplementados con 10% de suero fetal bovino y una mezcla de antibióticos y antimicóticos. Pasadas las primeras 48 horas se agregó el tratamiento a cada pozo, las concentraciones a probar fueron 25, 50, 100, 200 y 300 µM, de esteviol o isosteviol; agregado el tratamiento, las células se incubaron por 48 horas a 37 °C y 5 % CO<sub>2</sub>. Después de 48 horas de tratamiento, las células fueron

tripsinizadas y se realizó una dilución 1:1 con azul tripano. Se hizo el conteo celular con apoyo de la cámara de Neubauer.

### **7.3 Actividad antimigratoria mediante cámara de Boyden**

Se incubaron las células de cáncer de próstata LNCaP, DU-145 y PC-3 por 12 horas en medio de cultivo libre de suero fetal bovino (RPMI-1640, DMEM y F-12K, respectivamente), pasado el tiempo se despegaron las células utilizando tripsina. Posteriormente, se colocarán  $5 \times 10^4$  células en los pozos superiores de la cámara de Boyden con filtros de  $8 \mu\text{m}$ , en los pozos inferiores se agregaron el medio de cultivo con suero fetal bovino, que funciona como quimioatrayente, más el tratamiento con esteviol o isosteviol; y se incubó por 24 horas a  $37^\circ\text{C}$  y  $5\% \text{CO}_2$ . Después de la incubación, los pozos se lavaron dos veces con buffer fosfato salino (PBS, por sus siglas en inglés, phosphate buffered saline) las membranas se fijaron sumergiendo el pozo superior en etanol al  $70\%$ . Después de que las membranas se secaron, se tiñeron con tinción de Giemsa por 30 minutos a temperatura ambiente. Pasada la incubación con el colorante se procedió a lavar con buffer fosfato salino y se eliminó el exceso de células en la parte superior de la membrana. Finalmente, la membrana fue observada en el microscopio invertido. Las células en la membrana representan el número de células que han migrado en presencia de quimioatrayentes.

### **7.4 Análisis estadístico**

Para encontrar diferencias significativas en las pruebas de proliferación y migración celular, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía con prueba *post hoc* Tukey para 3 experimentos independientes con 3 réplicas cada uno.

### **7.5 Procedimiento para desechar los residuos peligrosos biológico-infecciosos**

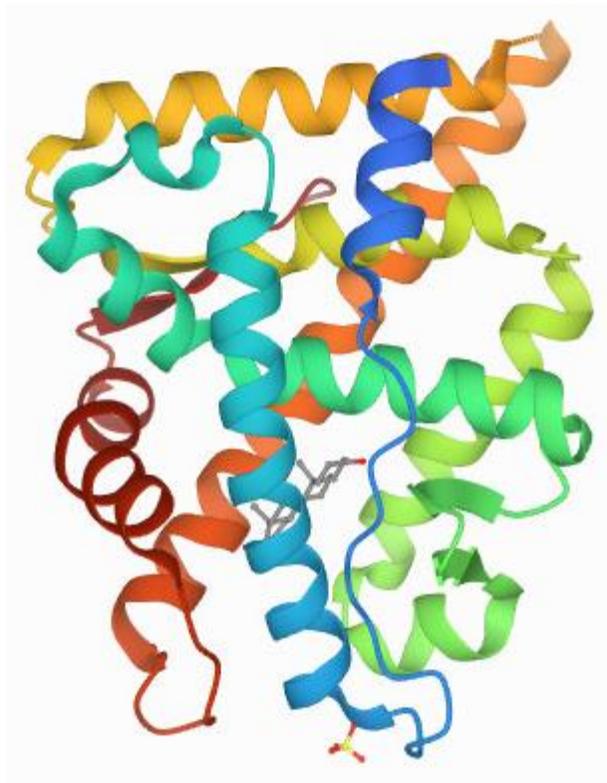
Según la NOM-087-ECOL-SSA1-2002 de Residuos Peligrosos Biológico Infecciosos (RPBI), los materiales utilizados en el cultivo celular, tanto en la preparación de los medios de cultivo, como en los tratamientos se desecharon en

bolsa de polietileno roja, sin rebasar el 80 % de la capacidad del contenedor y con un tiempo máximo de almacenamiento de 7 días, en un lugar ventilado y con la señal universal de RPBI.

## 8 RESULTADOS

### 8.1 Acoplamiento molecular

Se realizó la búsqueda de la estructura cristalográfica del RA; sin embargo, en las bases de datos no se cuenta con la estructura completa, por lo que optamos por usar el dominio de unión a ligando, sitio de gran importancia para la activación del receptor y zona de modificaciones postraduccionales o mutaciones que confieren resistencia a fármacos. La estructura utilizada recibe el código 2AMA (Figura 9) y pertenece a la especie humana, además de presentar DHT unida en su sitio de activación.

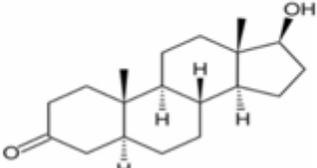
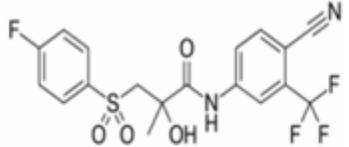
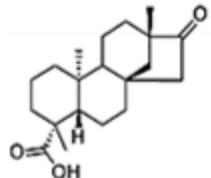
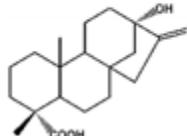


**Figura 9.** Estructura cristalográfica del dominio de unión a ligando del receptor de andrógenos. Imagen obtenida de la base de datos PDB con código 2AMA.

Teniendo la estructura del LBD, se realizó un acoplamiento molecular dirigido en el sitio de unión de DHT, para brindarnos un punto de comparación de los acoplamientos de enzalutamida, esteviol e isosteviol, obteniéndose las puntuaciones energéticas que se muestran en la Tabla 5, de cada ligando.

La enzalutamida, se usó como control positivo, dado que es un fármaco anti-andrógeno de segunda generación que inhibe la vía de señalización del RA, compitiendo con la DHT por el sitio de unión a ligando, además puede inhibir la traslocación del RA activado, al núcleo.

Tabla 5. Acoplamiento molecular dirigido al sitio de unión de DHT. Se muestran las energías de unión de los diferentes ligandos en comparación con la energía de unión de DHT.

Compuesto	Estructura	Energía de unión
<u>Dihidrotestosterona</u>		-10.08 kcal/mol
<u>Enzalutamida</u>		-6.17 kcal/mol
<u>Isosteviol</u>		-10.07 kcal/mol
Esteviol		-9.3 kcal/mol

La DHT, ligando natural del RA, mostró una energía de unión de -10.08 kcal/mol, mientras que los otros ligandos propuestos, enzalutamida, isosteviol y esteviol

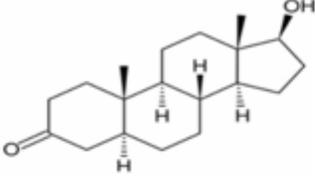
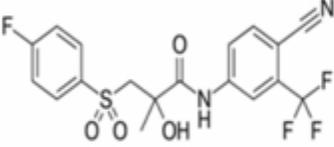
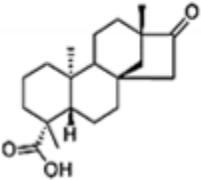
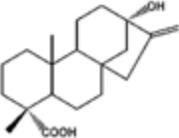
presentaron energías de unión de -6.17 kcal/mol, -10.07 kcal/mol y -9.3 kcal/mol respectivamente.

Esteviol e isosteviol, presentaron unas energías de unión cercanas a las del ligando natural DHT, mientras que enzalutamida, tratamiento que se utiliza actualmente para combatir el cáncer de próstata, presentó una energía de unión lejana a la de la DHT, y a pesar de ello se sabe que su sitio de unión está en el LBD del RA y se comporta como un antagonista. Estos resultados nos indican que los compuestos propuestos, esteviol e isosteviol, podrían unirse al RA con una energía de unión comparable a la de DHT.

Para complementar la parte computacional se realizaron dinámicas moleculares. Las dinámicas moleculares predicen como cada átomo en una proteína o en otro sistema molecular puede moverse con el paso del tiempo basado en relaciones interatómicas. Estas dinámicas son importantes para apoyar en la simulación de procesos biomoleculares importantes incluyendo cambios conformacionales o la unión de ligandos (Hollingsworth and Dror, 2018). En la Tabla 6, se pueden observar las energías de unión de la DHT, enzalutamida, isosteviol y esteviol, resultado de la dinámica molecular; siendo de -23.4175 kcal/mol, -24.4747 kcal/mol, -19.468 kcal/mol y -37.8702 kcal/mol, respectivamente. Antes de las dinámicas, parecía que las energías de unión de esteviol e isosteviol se acercaban más a la del ligando natural que la enzalutamida, posterior a las dinámicas las energías cambian, siendo enzalutamida la más cercana y esteviol mostró una energía de unión superior a la de la DHT. Con esta información podemos considerar que esteviol e isosteviol tienen la capacidad de unirse al RA.

Sin embargo, no se puede predecir si esta unión favorecería la activación o inhibición del RA, por lo que se necesitaron experimentos biológicos para poder obtener información complementaria.

Tabla 6. Energías de unión de los diferentes ligandos posteriores a una dinámica molecular.

Compuesto	Estructura	Energía de unión
<u>Dihidrotosterona</u>		-23.4175 kcal/mol
<u>Enzalutamida</u>		-24.4747 kcal/mol
<u>Isosteviol</u>		-19.468 kcal/mol
<u>Esteviol</u>		-37.8702 kcal/mol

Con el fin de demostrar, teóricamente, la relación que se pudiera dar entre el esteviol y proteínas de la cascada de señalización de las MAPK, se decidió realizar un análisis computacional del esteviol con las proteínas ERK1 y ERK2 (Tabla 7).

Las dinámicas moleculares se realizaron utilizando como controles a 38Z y forskolina (FRZ), ambos inhibidores de ERK1 y ERK2, respectivamente. Se pudo observar que no había una interacción entre el andrógeno (DHT) y el fármaco antiandrógeno (enzalutamida) con las proteínas ERK, pero sí se muestran energías de unión tanto para ERK1, como para ERK2, del esteviol e isosteviol, las cuales nos indican que sería el ligando con mayor capacidad de unión que incluso los mismos controles.

Tabla 7. Dinámicas moleculares y sus energías de unión para las proteínas ERK1/ERK2 en comparación con sus inhibidores.

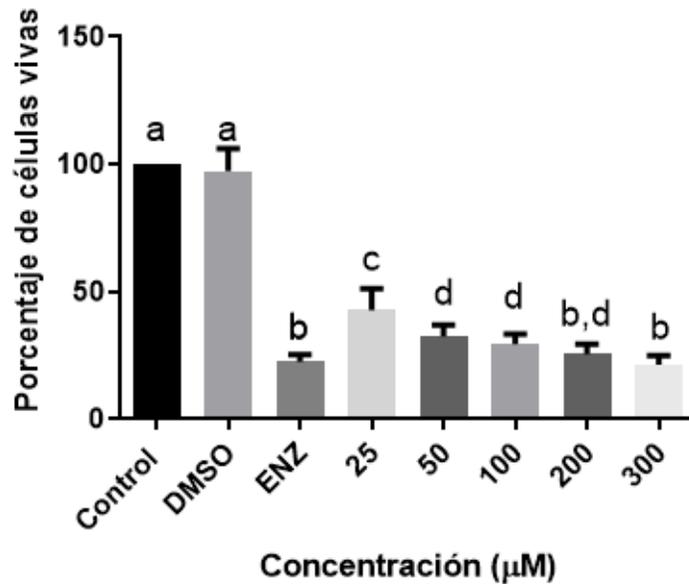
Compuesto	ERK1	ERK2
38Z	-63.5781 kcal/mol	-
FRZ	-	-21.6497 kcal/mol
DHT	-	-
<u>Enzalutamida</u>	-	-
<u>Esteviol</u>	-35.0276 kcal/mol	-46.2564 kcal/mol
<u>Isosteviol</u>	-17.8223 kcal/mol	-40.1694 kcal/mol

## 8.2 Proliferación celular

Se utilizaron líneas celulares andrógeno dependientes (LNCaP) y andrógeno independientes (PC-3, DU145) para evaluar el efecto de esteviol sobre la proliferación celular. Se utilizaron 3 controles: control negativo (solo medio de cultivo), control con 0.5% DMSO, y enzalutamida 50  $\mu$ M (control positivo), así como las concentraciones de esteviol 25 - 300  $\mu$ M.

En las células andrógeno dependientes, LNCaP, se pudo observar una disminución significativa en el número de células vivas desde la primera concentración utilizada de esteviol, donde solo el 42.5% permanecieron viables. Sin embargo, solo las concentraciones de 200 y 300  $\mu$ M presentaron un efecto parecido al mostrado por enzalutamida, reduciendo el porcentaje de células vivas en un 74.6 % y 78.7 % respectivamente (Figura 10).

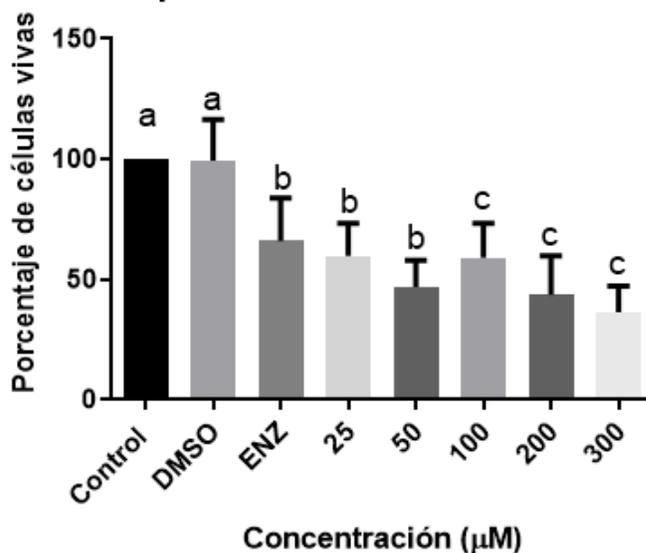
## Efecto antiproliferativo de esteviol en células LNCaP



**Figura 10.** Gráfica de proliferación celular para LNCaP tratadas con esteviol. Se muestran los porcentajes de células vivas que se mantuvieron después del tratamiento por 48 h con 25, 50, 100, 200 y 300 µM de esteviol. Experimentos realizados de manera independiente y por triplicado.

Con las células andrógeno independientes (PC-3) también se observó una disminución en el número de células vivas desde la primera concentración, con la diferencia que el porcentaje de células vivas aumentó en esta línea celular, manteniéndose 59.5% de las células viables, esto se debe a que las células PC-3 representan un estadio avanzado de la enfermedad. Por otro lado, comparando con la enzalutamida que redujo un 34.3% el número de células, el esteviol a partir de la concentración 100 µM, mostró disminución de más del 50% en la cantidad de células vivas (Figura 11).

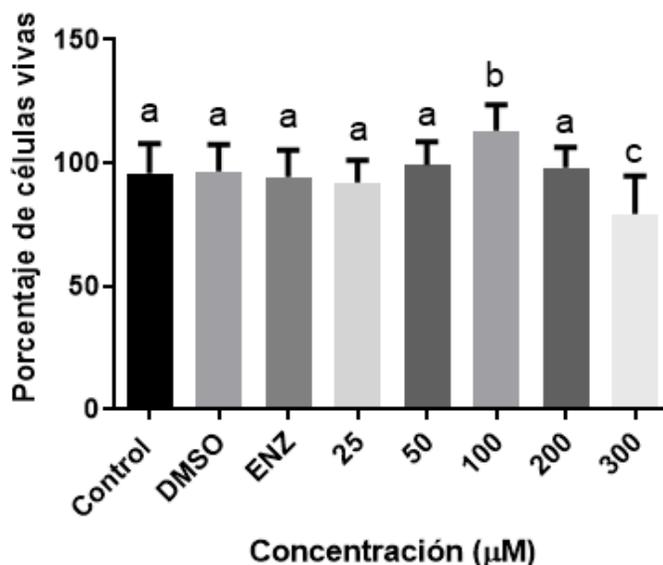
### Efecto antiproliferativo de esteviol en célula PC-3



**Figura 11.** Gráfica de proliferación celular para PC-3 con tratamiento de esteviol. Se presentan los porcentajes de células vivas que se mantuvieron después del tratamiento de 48 h con 25, 50, 100, 200 y 300 μM de esteviol. Los experimentos fueron realizados de manera independiente y por triplicado.

Otras células independientes de andrógenos utilizadas en este proyecto fueron las células DU-145, donde pudo observarse disminución significativa, únicamente, en la concentración más alta, 300 μM; a esta concentración sobrevivieron el 79.3% células DU-145 (Figura 12). Estos resultados podrían estar relacionados con las características de la propia línea celular.

## Efecto antiproliferativo de esteviol en células DU-145

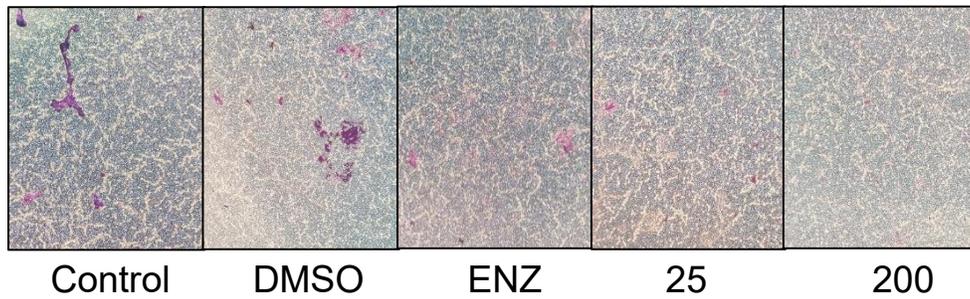


**Figura 12.** Gráfica de proliferación celular para DU-145 con tratamiento de esteviol. Se presentan los porcentajes de células vivas que se mantuvieron después del tratamiento de 48 h con 25, 50, 100, 200 y 300  $\mu\text{M}$  de esteviol. Los experimentos fueron realizados de manera independiente y por triplicado.

### 8.3 Migración celular

Para migración celular se utilizó la cámara de Boyden, también conocida como transwell, donde se colocaron células con medio sin SFB y el tratamiento con esteviol en la cámara que contiene un filtro de poro 8  $\mu\text{m}$  y en la parte inferior se colocó medio completo. Para este experimento se usaron las concentraciones de 25 y 200  $\mu\text{M}$ , y se mantuvo el control con ENZ.

Se pueden observar en la figura 13, la tinción de las células LNCaP con giemsa, después del tratamiento con esteviol. En el medio solo o con DMSO se puede identificar un área con mayor colorante que las que se observan con la ENZ, o las concentraciones determinadas de esteviol.



**Figura 13.** Imágenes de la cámara de Boyden para LNCaP. Tinción de giemsa para las células que pudieron migrar hacia la parte inferior del filtro.

En el pozo de la placa p24 se colocó medio suplementado con SFB, mientras que en la cámara de Boyden, que contiene el filtro se agregaron las células y medio libre de SFB, de esta manera el suero funcionó como quimioatrayente de las células. Las imágenes que se muestran son de la parte inferior de la cámara de Boyden, puesto que así se observan las células que tuvieron la capacidad de migrar hacia el lado contrario de donde fueron colocadas en un inicio.

## 9 DISCUSIONES

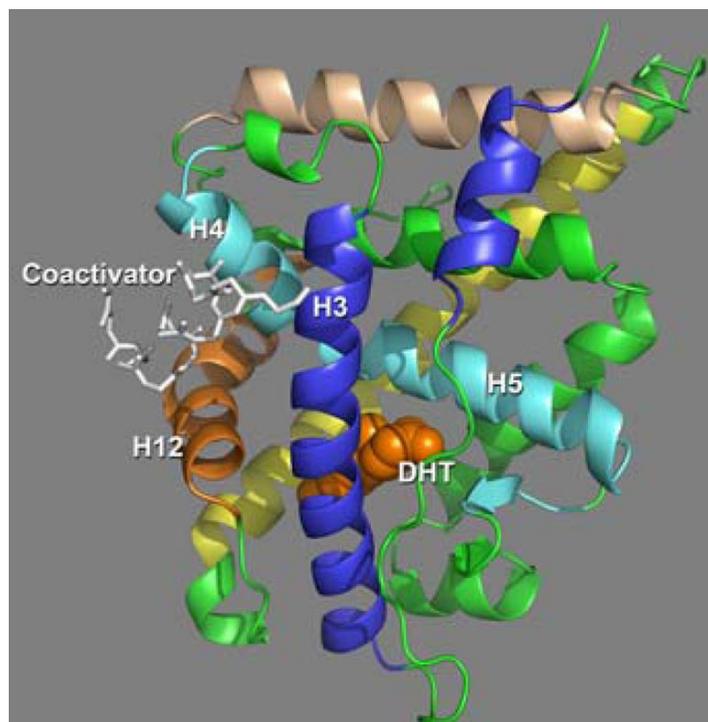
Los andrógenos, hormonas esteroideas, están involucrados en el desarrollo sexual masculino durante el periodo fetal y en la pubertad están estrechamente relacionadas con la aparición de las características sexuales secundarias, además cumplen una función durante la espermatogénesis y por ende en la fertilidad masculina. Además de estar relacionados con procesos fisiológicos naturales, los andrógenos y su vía de señalización están involucrados en el desarrollo de cáncer de próstata (Wang *et al.*, 2022; Lucas-Herald *et al.*, 2022)

La vía de señalización del receptor de andrógenos inicia cuando un andrógeno, principalmente DHT, se une al RA en el citosol, originando un cambio conformacional que permite la disociación de las proteínas de shock térmico unidas al receptor y la translocación al núcleo, donde se forma un homodímero que se unirá a los ERA para llevar a cabo la transcripción de genes diana del RA. El RA forma parte de los receptores nucleares y consta de cuatro dominios importantes, NTD, DBD, HR y LBD; este último es el sitio de mayor interés, pues es aquí donde además de unirse el ligando para activar al receptor, se unen cofactores y lo hacen una región importante en la búsqueda de nuevos fármacos.

Aunque no se cuenta actualmente con la cristalografía del RA, sí se cuenta con la estructura cristalina del LBD, el cual contiene once  $\beta$ -hélices, siendo H3, H4 y H12 quienes forman el dominio AF-2 y es sitio de unión de los co-activadores del RA (Figura 14). La estructura de AF-2 está regulada por la unión de los ligandos al RA, la unión de compuestos como DHT o R1881 (andrógeno sintético) induce la formación de la región AF-2 con la conformación adecuada para el reclutamiento de co-activadores y así, amplificar la actividad del RA; por otro lado, la unión de fármacos anti-andrógenos como bicalutamida o enzalutamida, producen una región AF-2 con diferente conformación (Liu *et al.*, 2018).

El tratamiento para CaP, en su mayoría, está dirigido a inhibir la vía del receptor de andrógenos, ya sea disminuyendo la producción de las hormonas androgénicas o inhibiendo la unión de los andrógenos con el RA; sin embargo, las células cancerígenas presentan sus mecanismos de resistencia, uno de ellos, las

mutaciones, que se presentan comúnmente en las hélices, H3 y H4 en los aminoácidos L702H, W742C, H875Y y T878A (Jamroze *et al.*, 2021).



**Figura 14.** Estructura cristalina del RA unido a DHT (naranja) y un co-activador. Después de ser activado el RA, se da un cambio conformacional que permite la formación de una hendidura formada por H3, H4 y H12, que resultan en el sitio AF-2 (Osguthorpe y Hagler, 2011).

No se han realizado estudios *in silico* del RA con el esteviol o *in vitro*, del esteviol con células de cáncer de próstata. Sin embargo, en 2017, Panagiotou *et al.*, evaluaron el efecto modulador del esteviol sobre el receptor a glucocorticoides en células mononucleares de sangre periférica y células Jurkat de leucemia; pudieron observar que el esteviol modificaba la expresión de genes diana (FKBP5 y GILZ) del receptor a glucocorticoides, además de estar relacionado con la localización subcelular de estos receptores. Estos resultados indican que el esteviol interactúa con los receptores a glucocorticoides (Panagiotou *et al.*, 2017).

Los receptores a glucocorticoides al ser parte de la familia de receptores nucleares como el RA, comparten la estructura multidominio, es decir constan del NTD, que

es sitio de unión a co-activadores; DBD, región de unión al ADN; la región bisagra, así como el LBD, sitio de unión al ligando; estas similitudes en estructura junto con los resultados de los acoplamientos y dinámicas moleculares, nos llevan a sugerir que el esteviol podría estar interactuando con el LBD del RA, inhibiendo la translocación al núcleo o modificando la conformación del AF-2 y disminuyendo así la actividad del RA.

Como ya se ha mencionado, existen mecanismos de resistencia a los fármacos que promueven el desarrollo de cáncer de próstata resistente a castración, un estadio con esperanza de vida corto.

Dentro de estos mecanismos de resistencia, también podemos encontrar el entrecruzamiento de vías, por ejemplo, con la vía de las MAPK. Se ha demostrado que la resistencia a fármacos anti-andrógenos de segunda generación como la enzalutamida, está relacionada con la activación de la vía de las MAPK, la cual tiene la capacidad de activar el RA (Butler *et al.*, 2017; Li *et al.*, 2020).

Por ello, se realizaron los acoplamientos moleculares con proteínas de la vía de las MAPK, ERK1/2; donde se pudo observar que esteviol e isosteviol mostraron tener mejores energías de unión para estas proteínas que sus respectivos inhibidores 38Z y FRZ. En células LNCaP que crearon resistencia a anti-andrógenos mediante un tratamiento constante con 1  $\mu$ M o 10  $\mu$ M de enzalutamida por tres meses, se mostró un aumento en la expresión y fosforilación de las proteínas ERK 1/2, además en estas células resistentes se pudo detectar proteína PSA, marcador específico de próstata cuya expresión está regulada por el RA, lo que comprueba el entrecruzamiento de la vía de las MAPK con la vía del RA; al haber obtenido las energías de unión de esteviol e isosteviol para las proteínas ERK 1/2 podemos considerar que ambos compuestos tienen la capacidad de unirse a ERK 1/2 y posiblemente evitar la cascada de señalización, inhibiendo la proliferación y migración de células de cáncer de próstata (Li *et al.*, 2020).

Nuestros experimentos demostraron que el esteviol puede inhibir la proliferación de células dependientes e independientes a andrógenos en concentraciones que van

desde los 25 hasta los 300  $\mu\text{M}$ , dicho efecto podría estar relacionado con la inhibición de la activación directa del RA o a través de la inhibición de la vía de las MAPK.

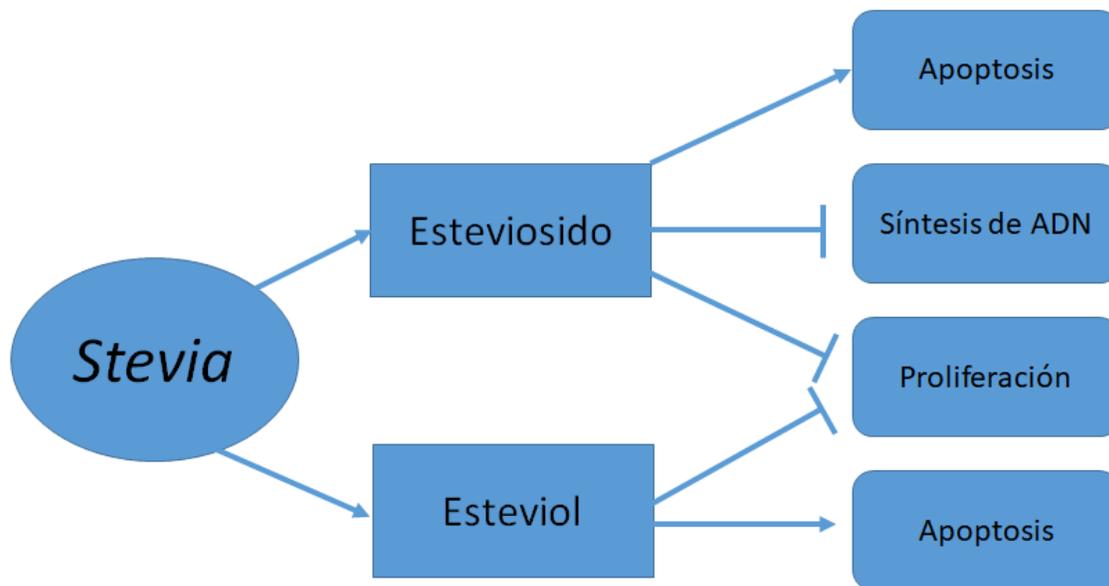
El esteviol es un compuesto que hoy en día está al alcance de todos por su uso en la industria alimentaria como edulcorante, es gracias a este ingreso en los alimentos que ha sido importante estudiar sus efectos en la salud. Se han realizado estudios demostrando los efectos del esteviol, así como del esteviósido completo como hipoglucemiante, antihipertensivo, antiinflamatorio y su actividad anticancerígena (Figura 15).

Dentro de los experimentos realizados con esteviósido, se ha observado su efecto anticancerígeno en células de cáncer de mama MCF-7, donde inhibe la síntesis de ADN y activa la vía mitocondrial de la apoptosis; en células de cáncer de colón, HT-29, causa arresto en el ciclo celular en la fase  $G_2/M$  y aumento en las caspasa-9 y caspasa-3, relacionadas con apoptosis (Paul *et al.*, 2012; Ren *et al.*, 2017).

Estudios realizados solo con esteviol han mostrado que tiene una capacidad para inhibir la proliferación en seis tipos de células de cáncer de estómago, a concentraciones de 100 – 200  $\mu\text{g/mL}$ , el esteviol disminuye el número de células viables similar a como lo hace 5-fluorouracilo, a concentraciones de 250  $\mu\text{g/mL}$  muestra un efecto de citotoxicidad mayor que el 5-fluorouracilo (Chen *et al.*, 2018).

El efecto observado en las células de cáncer de estómago, se atribuye al incremento en la expresión de las proteínas p21 y p53, así como la disminución de ciclina-D, todas ellas proteínas reguladoras del ciclo celular. Además, existe un efecto sobre la apoptosis vía mitocondrial (Chen *et al.*, 2018).

Se han demostrado que el esteviol puede disminuir la proliferación celular en diferentes tipos de cáncer, mediante activación de la apoptosis, inhibición de la síntesis de ADN o a través de arresto en ciclo celular; sin embargo, no se han analizado otras posibles vías de señalización como la que se propuso para este trabajo.



**Figura 15.** Efecto anticancerígeno de los glucósidos de esteviol y sus derivados. Imagen modificada de Peteliuk *et al.*, 2021.

Dentro de nuestros experimentos realizados, se utilizaron dos líneas celulares independientes de andrógenos, las cuales nos representan estadios avanzados del CaP, la primera en utilizarse fue PC-3, que presenta una baja expresión del RA, tanto a nivel de ARNm como de proteína, mientras que la segunda línea celular, DU-145, no presenta expresión del gen o de la proteína para el RA (Namekawa *et al.*, 2019). También se utilizó una línea celular dependiente de andrógenos LNCaP, la cual si expresa ARNm y proteína del RA y PSA. Al analizar las diferencias en las características de las líneas celulares, podríamos sugerir que la actividad antiproliferativa del esteviol es dependiente del RA, por ello en las células DU-145 negativas a RA no se observa un efecto en la inhibición de la proliferación importante si no hasta concentraciones más elevadas como los 300  $\mu\text{M}$ , donde probablemente el efecto se deba a la activación de la apoptosis o arresto en el ciclo celular; mientras que para las células LNCaP y PC-3 el efecto antiproliferativo se deba a la inhibición de la vía del receptor de andrógenos.

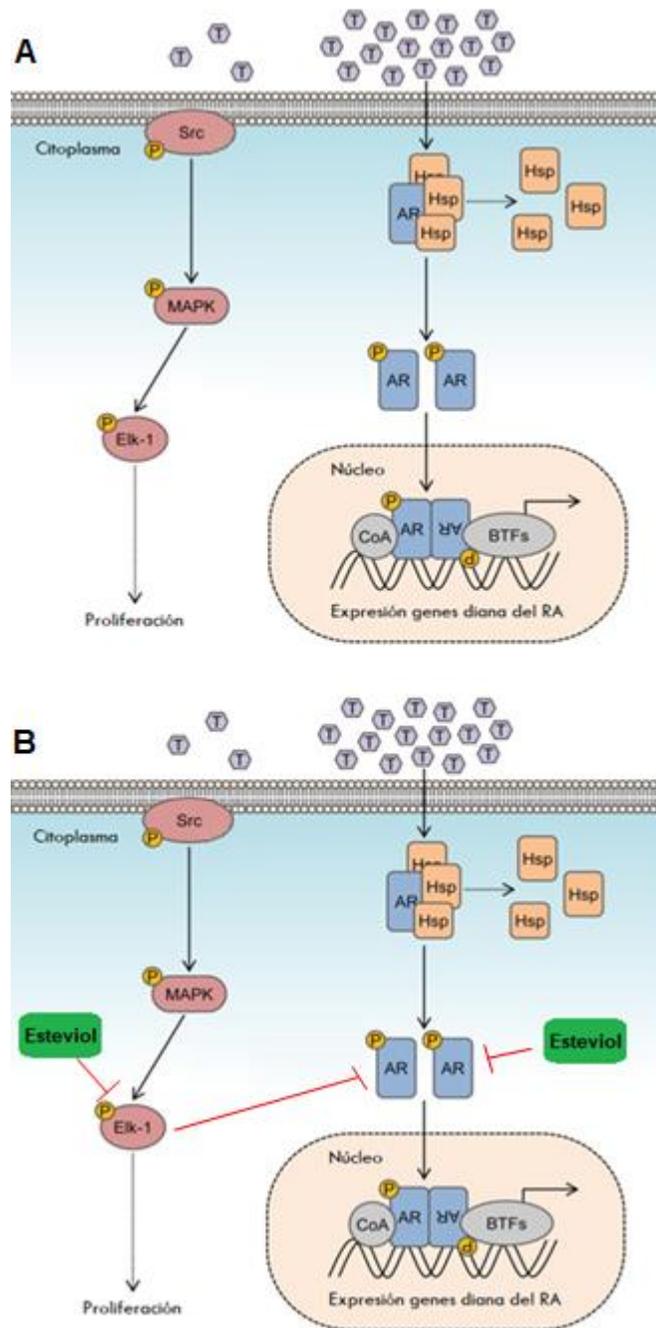
Se realizaron experimentos para determinar el efecto de esteviol sobre la migración, se utilizaron células LNCaP, las cuales no se caracterizan por su alta capacidad para migrar; es por ello que se observan muy pocas células dentro de los filtros de

la cámara de Boyden; sin embargo, si nos da información sobre el efecto que pueda tener esteviol en el proceso de migración.

El RA, es un factor de transcripción que puede regular la expresión de varios genes, entre ellos las MMP (metaloproteinasas de matriz); las MMP son endopeptidasas dependientes de zinc, responsables de la degradación de matriz extracelular que facilitan la invasión y metástasis. La expresión, principalmente de MMP-2 y MMP-9, está regulada por el RA, estas dos MMP, también llamadas gelatinasas, destruyen las barreras que rodea al tumor, incluyendo colágeno IV y la matriz extracelular lo que permite la invasión a los tejidos circundantes. MMP-9, es una de las proteínas de su tipo que se han estudiado más, indicando que tiene un papel importante en procesos como la cicatrización de las heridas, la reparación de tejidos y la transición epitelio-mesénquima (Li *et al.*, 2020; Morales-Vásquez *et al.*, 2020; Kim *et al.*, 2022).

Debido a que el RA está relacionado con la expresión de proteínas involucradas en la invasión y metástasis de las células cancerígenas, podemos sugerir que el efecto observado en células LNCaP está relacionado a la inhibición de la vía del RA, inhibiendo así la transcripción de MMP-9 y MMP-2. Es importante mencionar que no se han realizado estudios previos sobre el efecto del esteviol o del esteviósido completo en migración celular, este sería el primer trabajo que se preocupa por el estudio de la actividad antimigratoria de esteviol.

Por los antecedentes del esteviol, y los resultados obtenidos tanto teórica como experimentalmente, proponemos que el efecto del esteviol en células de cáncer de próstata dependientes e independientes de andrógenos, está ligado a la inhibición de la activación del RA, a través de la vía de las MAPK (Figura 16).



**Figura 16.** Mecanismo de acción propuesto para estradiol e isoflavonas. A) Activación del RA por la vía canónica o por el entrecruzamiento de vías a través de MAPK. B) Inhibición de la activación del RA por unión directa con estradiol e isoflavonas y mediante la inhibición de las MAPK.

## **10 CONCLUSIONES**

El análisis de acoplamiento molecular muestra que existe una interacción entre el esteviol e isosteviol con el dominio de unión al ligando del receptor de andrógenos. Las dinámicas moleculares indicaron que el esteviol podría interactuar tanto con el receptor de andrógenos como con ERK 1/2.

Esteviol e isosteviol tienen la capacidad de unirse con ERK1, ERK2 y RA (preferentemente ERK2) y así podría evitar la cascada de señalización, ya sea mediante la inhibición del RA de manera directa o bloqueando la actividad de las proteínas de la vía de señalización de las MAPK, y ejercer su efecto sobre las células de cáncer de próstata.

El esteviol muestra efecto antiproliferativo sobre células dependientes e independientes de andrógenos, esta actividad tiene mayor efecto en células AR positivas.

En células andrógeno dependientes, el esteviol disminuye la capacidad migratoria, relacionada con la inhibición de la vía del RA.

## 11 REFERENCIAS

Acevedo W, Ramírez-Sarmiento CA, Agosin E. (2018) Identifying the interactions between natural, non-caloric sweeteners and the human sweet receptor by molecular docking. *Food Chemistry*, 264:164-171. doi: 10.1016/j.foodchem.2018.04.113.

Adame González C, Álvarez Romero JT, Morachel Y Rodríguez M, Félix Leyva A, Ponce Viveros M, Villavicencio Queijeiro MA, Bautista Hernández MYB, Gracia-Medrano Valdemar L. (2020) Biochemical relapse free survival rate in patients with prostate cancer treated with external radiotherapy: outcomes obtained at the CMN Siglo XXI Hospital de Oncología, CMN 20 de Noviembre and Hospital General de México of the México City. *Reports of Practical Oncology Radiotherapy*, 25(2):276-281. doi: 10.1016/j.rpor.2020.02.003.

Bastien, L., Fourcade, R.O., Makhoul, B., Meria, P., Desgrandchamps, F. (2012) *Hiperplasia benigna de la próstata*. *Urología*, 44(1): 1 – 14. doi:10.1016/S1761-3310(12)61066-4

Beltran-Ontiveros, S.A., Fernandez-Galindo, M.A., Moreno-Ortiz, J.M., Contreras-Gutierrez, J.A., Madueña-Molina, J., Arambula-Meraz, E., Leal-Leon, E., Becerril-Camacho, D.M., Picos-Cardenas, V.J., Angulo-Rojo, C., Velazquez, D.Z., Jimenez-Trejo, F., Gallardo-Vera, F., Diaz, D. (2022) Incidence, Mortality, and Trends of Prostate Cancer in Mexico from 2000 to 2019: Results from the Global Burden of Disease Study 2019. *Cancers (Basel)*, 14(13):3184. doi: 10.3390/cancers14133184.

Borgo J, Laurella LC, Martini F, Catalán CAN, Sülsen VP. (2021) *Stevia* Genus: Phytochemistry and Biological Activities Update. *Molecules*, 26(9):2733. doi: 10.3390/molecules26092733.

Brawley S, Mohan R, Nein CD. (2018) Localized Prostate Cancer: Treatment Options. *American Family Physician*, 97(12):798-805.

Butler DE, Marlein C, Walker HF, Frame FM, Mann VM, Simms MS, Davies BR, Collins AT, Maitland NJ. (2017) Inhibition of the PI3K/AKT/mTOR pathway activates autophagy and compensatory Ras/Raf/MEK/ERK signalling in prostate cancer. *Oncotarget*, 8(34):56698-56713. doi: 10.18632/oncotarget.18082.

Cai Z, Chen W, Zhang J, Li H. (2018) Androgen receptor: what we know and what we expect in castration-resistant prostate cancer. *International Urology Nephrology*. 50(10):1753-1764. doi: 10.1007/s11255-018-1964-0.

Ceunen, S., Geuns, J.M. (2013) Steviol glycosides: chemical diversity, metabolism, and function. *Journal of Natural Products*, 76(6):1201-1228. doi: 10.1021/np400203b.

Chen, J., Xia, Y., Sui, X., Peng, Q., Zhang, T., Li, J., Zhang, J. (2018) Steviol, a natural product inhibits proliferation of the gastrointestinal cancer cells intensively. *Oncotarget*, 9(41):26299 – 26308. doi:10.18632/oncotarget. 25233.

Correas JM, Halpern EJ, Barr RG, Ghai S, Walz J, Bodard S, Dariane C, de la Rosette J. (2020) Advanced ultrasound in the diagnosis of prostate cancer. *World Journal of Urology*, 39(3):661-676. doi: 10.1007/s00345-020-03193-0.

Cui K, Li X, Du Y, Tang X, Arai S, Geng Y, Xi Y, Xu H, Zhou Y, Ma W, Zhang T. (2017) Chemoprevention of prostate cancer in men with high-grade prostatic intraepithelial neoplasia (HGPIN): a systematic review and adjusted indirect treatment comparison. *Oncotarget*, 8(22):36674-36684. doi: 10.18632/oncotarget.16230.

Dejous C, Krishnan UM. (2020) Sensors for diagnosis of prostate cancer: Looking beyond the prostate specific antigen. *Biosensors & Bioelectronics*, 3;173:112790. doi: 10.1016/j.bios.2020.112790.

Eryilmaz IE, Aytac Vuruskan B, Kaygısız O, Egeli U, Tunca B, Kordan Y, Cecener G. (2019) RNA-based markers in biopsy cores with atypical small acinar proliferation: Predictive effect of T2E fusion positivity and MMP-2 upregulation for a subsequent prostate cancer diagnosis. *Prostate*, 79(2):195-205. doi: 10.1002/pros.23724.

Felgueiras, J. Silva, J.V., Fardilha, M. (2014). Prostate Cancer: the need for biomarkers and new therapeutic targets. *Journal of Zhejiang University Science B*, 15(1), 16 – 42. doi: 10.1631/jzus.B1300106.

Fujita, K., Nonomura, N. (2019). Role of Androgen Receptor in Prostate Cancer: A Review. *The World Journal of Men's Health*, 37(3), 288 – 295. doi: 10.5534/wjmh.180040.

Geuns JM. (2003) Stevioside. *Phytochemistry*, 64(5):913-21. doi: 10.1016/s0031-9422(03)00426-6.

Global Cancer Observatory (2020) *Estimated number of new cases and deaths in 2020, Mexico*. [https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-pie?v=2020&mode=cancer&mode\\_population=continents&population=900&populations=484&key=total&sex=1&cancer=39&type=0&statistic=5&prevalence=0&population\\_group=0&ages\\_group%5B%5D=13&ages\\_group%5B%5D=17&nb\\_items=7&group\\_cancer=1&include\\_nmsc=1&include\\_nmsc\\_other=1&half\\_pie=0&donut=0#collapse-group-0-1](https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-pie?v=2020&mode=cancer&mode_population=continents&population=900&populations=484&key=total&sex=1&cancer=39&type=0&statistic=5&prevalence=0&population_group=0&ages_group%5B%5D=13&ages_group%5B%5D=17&nb_items=7&group_cancer=1&include_nmsc=1&include_nmsc_other=1&half_pie=0&donut=0#collapse-group-0-1).

Górski, A., Jończyk-Matysiak, E., Łusiak-Szelachowska, M., Międzybrodzki, R., Weber-Dąbrowska, B., Borysowski, J., Letkiewicz, S., Bagińska, N., Sfanos, K.S. (2018) Phage Therapy in Prostatitis: Recent Prospects. *Frontiers in Microbiology*, 29(9), 1434 – 1447. doi: 10.3389/fmicb.2018.01434.

Gupta, E., Kaushik, S., Purwar, S., Sharma, R., Balapure, A.K., Sundaram, S. (2017). Anticancer potential of steviol in MCF-7 human breast cancer cells. *Pharmacognosy Magazine*, 13(51), 345 – 350. doi: 10.4103/pm.pm\_29\_17.

Habtemariam, S., Lentini, G. (2018). Plant-derived anticancer agents: lessons from the pharmacology of geniposide and its aglycone, genipin. *Biomedicines*, 6(39), 1 – 28. doi: 10.3390/biomedicines6020039.

Henry, G.H., Malewska, A., Joseph, D.B., Malladi, V.S., Lee, J., Torrealba, J., Mauck, R.J., Gahan, J.C., Raj, G.V., Roehrborn, C.G., Hon, G.C., MacConmara, M.P., Reese, J.C., Hutchinson, R.C., Vezina, C.M., Strand, D.W. (2018). A Cellular Anatomy of the Normal Adult Human Prostate and Prostatic Urethra. *Cell Reports*, 25(12), 3530 – 3542.e5. doi: 10.1016/j.celrep.2018.11.086.

Hollingsworth, S.A., Dror, R.O. (2018). Molecular Dynamics Simulation for All. *Neuron*, 19; 99(6), 1129 – 1143. doi: 10.1016/j.neuron.2018.08.011

Instituto Mexicano del Seguro Social (2018) *Cáncer de próstata en México*. <http://www.imss.gob.mx/salud-en-linea/cancer-prostata>.

Jamroze, A., Chatta, G., Tang, D.G. (2021) Androgen receptor (AR) heterogeneity in prostate cancer and therapy resistance. *Cancer Letters*, 518:1-9. doi: 10.1016/j.canlet.2021.06.006.

Kim, T., Jeong, K., Kim, E., Yoon, K., Choi, J., Park, J.H., Kim, J.H., Kim, H.S., Youn, H.D., Cho, E.J. (2022) Menin Enhances Androgen Receptor-Independent Proliferation and Migration of Prostate Cancer Cells. *Molecules and Cells*, 45(4):202 – 215. doi: 10.14348/molcells.2021.0206. PMID: 35014621; PMCID: PMC9001152.

Koyama, E., Kitazawa, K., Ohori, Y., Izawa, O., Kakegawa, K., Fujino, A., Ui, M. (2002). In vitro metabolism of the glycosidic sweeteners, stevia mixture and

enzymatically modified stevia in human intestinal microflora. *Food and Chemical Toxicology*, 41(3), 359 – 374. doi: 10.1016/s0278-6915(02)00235-1.

Lee TK, Ro JY. (2018) Spectrum of Cribriform Proliferations of the Prostate: From Benign to Malignant. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 142(8):938-946. doi: 10.5858/arpa.2018-0005-RA. PMID: 30040459.

Li, S., Fong, K.W., Gritsina, G., Zhang, A., Zhao, J.C., Kim, J., Sharp, A., Yuan, W., Aversa, C., Yang, X.J., Nelson, P.S., Feng, F.Y., Chinnaiyan, A.M., de Bono, J.S., Morrissey, C., Rettig, M.B., Yu, J. (2020) Activation of MAPK Signaling by CXCR7 Leads to Enzalutamide Resistance in Prostate Cancer. *Cancer Research*, 79(10):2580 – 2592. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-18-2812.

Li, Y., He, J., Wang, F., Wang, X., Yang, F., Zhao, C., Feng, C., Li, T. (2020) Role of MMP-9 in epithelial-mesenchymal transition of thyroid cancer. *World Journal of Surgical Oncology*, 18(1):181. doi: 10.1186/s12957-020-01958-w. PMID: 32698816; PMCID: PMC7376963.

Litwin MS, Tan HJ. (2017) The Diagnosis and Treatment of Prostate Cancer: A Review. *JAMA Network*, 317(24):2532-2542. doi: 10.1001/jama.2017.7248.

Lucas-Herald, A.K., Touyz, R.M. (2022) Androgens and Androgen Receptors as Determinants of Vascular Sex Differences Across the Lifespan. *The Canadian Journal of Cardiology*, 38(12):1854 – 1864. doi: 10.1016/j.cjca.2022.09.018.

Maitland NJ. (2021) Resistance to Antiandrogens in Prostate Cancer: Is It Inevitable, Intrinsic or Induced? *Cancers (Basel)*, 13(2):327. doi: 10.3390/cancers13020327.

McCrea, E.M., Lee, D.K., Sissung, T.M., Figg, W.D. (2018) Precision medicine applications in prostate cancer. *Therapeutic Advances in Medical Oncology*, 10, 1 – 15. doi: 10.1177/1758835918776920.

Messner, E.A., Steele, T.M., Tsamouri, M.M., Hejazi, N., Gao, A.C., Mudryj, M., Ghosh, P.M. (2020) The Androgen Receptor in Prostate Cancer: Effect of Structure, Ligands and Spliced Variants on Therapy. *Biomedicines*, 8(10), 422 – 441. doi: 10.3390/biomedicines8100422.

Mitra, S., Dash, R. (2018). Natural products for the management and prevention of breast cancer. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, 26, 1 – 23. doi: 10.1155/2018/8324696.

Moe A, Hayne D. (2020) Transrectal ultrasound biopsy of the prostate: does it still have a role in prostate cancer diagnosis? *Translational Andrology and Urology*, 9(6):3018-3024. doi: 10.21037/tau.2019.09.37.

Montazi-Borojeni, A.A., Esmaeili, S.A., Abdollahi, E., Sahebkar, A. (2017) A Review on the Pharmacology and Toxicology of Steviol Glycosides Extracted from *Stevia rebaudiana*. *Current Pharmaceutical Design*, 23(11), 1616 – 1622. doi: 10.2174/1381612822666161021142835.

Mottet N, van den Bergh RCN, Briers E, Van den Broeck T, Cumberbatch MG, De Santis M, Fanti S, Fossati N, Gandaglia G, Gillessen S, Grivas N, Grummet J, Henry AM, van der Kwast TH, Lam TB, Lardas M, Liew M, Mason MD, Moris L, Oprea-Lager DE, van der Poel HG, Rouvière O, Schoots IG, Tilki D, Wiegel T, Willemse PM, Cornford P. (2021) EAU-EANM-ESTRO-ESUR-SIOG Guidelines on Prostate Cancer-2020 Update. Part 1: Screening, Diagnosis, and Local Treatment with Curative Intent. *European Urology*,79(2):243-262. doi: 10.1016/j.eururo.2020.09.042.

Namekawa, T., Ikeda, K., Horie-Inoue, K., Inoue, S. (2019). Application of Prostate Cancer Models for Preclinical Study: Advantages and Limitations of Cell Lines,

Patient-Derived Xenografts, and Three-Dimensional Culture of Patient-Derived Cells, 8(1):74 – 101. doi: 10.3390/cells8010074.

Nevedomskaya, E., Baumgart, S.J., Haendler, B. (2018). Recent advances in prostate cancer treatment and drug discovery. *International Journal of Molecular Sciences*, 19, 1359 – 1384. doi: 10.3390/ijms19051359.

Panagiotou, C., Mihailidou, C., Brauhli, G., Katsarou, O., Moutsatsou, P. (2018) Effect of steviol, steviol glycosides and stevia extract on glucocorticoid receptor signaling in normal and cancer blood cells. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 460:189 – 199. doi: 10.1016/j.mce.2017.07.023.

Paul, S., Sengupta, S., Bandyopadhyay, T.K., Bhattacharyya, A. (2012) Stevioside induced ROS-mediated apoptosis through mitochondrial pathway in human breast cancer cell line MCF-7. *Nutrition and Cancer*, 64:1087–94. doi: 10.1080/01635581.2012.712735.

Peteliuk, V., Rybchuk, L., Bayliak, M., Storey, K.B., Lushchak, O. (2021) Natural sweetener *Stevia rebaudiana*: Functionalities, health benefits and potential risks. *EXCLI Journal*, 20:1412-1430. doi: 10.17179/excli2021-4211.

Pinzi L, Rastelli G. (2019) Molecular Docking: Shifting Paradigms in Drug Discovery. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(18):4331. doi: 10.3390/ijms20184331.

Rebello, R.J., Oing, C., Knudsen, K.E., Loeb, S., Johnson, D.C., Reiter, R.E., Gillissen, S., Van der Kwast, T., Bristow, R.G. (2021) Prostate cancer. *Nature Reviews Disease Primers*, 7(1):9. doi: 10.1038/s41572-020-00243-0.

Ren, H.P., Yin, X.Y., Yu, H.Y, Xiao, H.F. (2017). Stevioside induced cytotoxicity in colon cancer cells via reactive oxygen species and mitogen-activated protein kinase

signaling pathways-mediated apoptosis. *Oncology letters*, 13, 2337 – 2343. doi: 10.3892/ol.2017.5744.

Roberts, A., Lynch, B., Rogerson, R., Renwick, A., Kern, H., Coffee, M., Cuellar – Kingston, N., Eapen, A., Crincoli, C., Pugh Jr, G., Bhusari, S., Purkayastha, S., Carakosta, M. (2016). Chemical-specific adjustment factors (inter-species toxicokinetics) to establish the ADI for steviol glycosides. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 79, 91 – 102. doi: 10.1016/j.yrtph.2016.05.017.

Saikia S, Bordoloi M. (2019) Molecular Docking: Challenges, Advances and its Use in Drug Discovery Perspective. *Current Drug Targets*, 20(5):501-521. doi: 10.2174/1389450119666181022153016.

Shakur, A., Hames, K., O'Shea, A., Harisinghani, M.G. (2021) Prostatitis: imaging appearances and diagnostic considerations. *Clinical Radiology*, 76(6):416 – 426. doi: 10.1016/j.crad.2021.01.007.

Saranyutanon S, Deshmukh SK, Dasgupta S, Pai S, Singh S, Singh AP. (2020) Cellular and Molecular Progression of Prostate Cancer: Models for Basic and Preclinical Research. *Cancers (Basel)*, 12(9):2651. doi: 10.3390/cancers12092651.

Selman, S.H. (2011) The McNeal prostate: a review. *Urology*, 78(6):1224 – 1228. doi: 10.1016/j.urology.2011.07.1395

Sfanos KS, Yegnasubramanian S, Nelson WG, De Marzo AM. (2018) The inflammatory microenvironment and microbiome in prostate cancer development. *Nature Reviews Urology*, 15(1):11-24. doi: 10.1038/nrrol.2017.167.

Sooriakumaran P. (2020) Prostate cancer screening and the role of PSA: A UK perspective. *Cleveland Clinic Journal of Medicine*, 31;88(1):14-16. doi: 10.3949/ccjm.88a.20164.

Tan KN, Avery VM, Carrasco-Pozo C. (2020) Metabolic Roles of Androgen Receptor and Tip60 in Androgen-Dependent Prostate Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(18):6622. doi: 10.3390/ijms21186622.

Tan WS, Wong A, Mahmalji W, Raza A. (2021) Is there still a role for digital rectal examination in the prostate cancer diagnostic pathway in the COVID-19 and post COVID-19 era? *The Aging Male*, 24(1):92-94. doi: 10.1080/13685538.2020.1786047.

Tong, Y., Zhou, R.Y. (2020) Review of the Roles and Interaction of Androgen and Inflammation in Benign Prostatic Hyperplasia. *Mediators of Inflammation*. doi: 10.1155/2020/7958316.

Toivanen R, Shen MM. (2017) Prostate organogenesis: tissue induction, hormonal regulation and cell type specification. *Development*, 144(8):1382-1398. doi: 10.1242/dev.

Tsunemori, H., Sugimoto, M. (2021) Effects of inflammatory prostatitis on the development and progression of benign prostatic hyperplasia: A literature review. *International Journal of Urology*, 28(11):1086 – 1092. doi: 10.1111/iju.14644.

Tuong, Z.K., Loudon, K.W. Berry, B., Richoz, N., Jones, J., Tan, X., Nguyen, Q., George, A., Hor, S., Field, S., Lynch, A.G., Kania, K., Coupland, P., Babbage, A., Grenfell, R., Barrett, T., Warren, A.Y., Gnanapragasam, V., Massie, C., Clatworthy, M.R. (2021) Resolving the immune landscape of human prostate at a single-cell level in health and cancer. *Cell reports*, 37(12):110132. doi: 10.1016/j.celrep.2021.110132.

Wang, M., Li, H., Xu, F., Gao X., Li, J., Xu, S., Zhang, D., Wu, X., Xu, J., Hua, H., Li, D. (2018). Diterpenoid lead stevioside and its hydrolysis products steviol and

isostevio: biological activity and structural modification. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 156, 885 – 906. doi: 10.1016/j.ejmech.2018.07.052.

Wang, J.M., Li, Z.F., Yang, W.X. (2022) What Does Androgen Receptor Signaling Pathway in Sertoli Cells During Normal Spermatogenesis Tell Us? *Frontiers in Endocrinology (Lausanne)*, 13:838 – 858. doi: 10.3389/fendo.2022.838858.

Wölwer-Rieck, U. (2012). The leaves of *Stevia rebaudiana* (Bertoni), their constituents and the analyses thereof: a review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(4), 886 – 895. doi: 10.1021/jf2044907.

Yacoub, J.H., Oto, A. (2018). MR Imaging of prostate zonal anatomy. *Radiologic Clinics of North America*, 56(2), 197 – 209. doi: 10.1016/j.rcl.2017.10.003.

Zhou M. (2018) High-grade prostatic intraepithelial neoplasia, PIN-like carcinoma, ductal carcinoma, and intraductal carcinoma of the prostate. *Modern Pathology*, 31(S1):S71-79. doi: 10.1038/modpathol.2017.138.