



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Química

Caracterización del extracto acuoso de flor de *Stevia pilosa* y evaluación de su efecto anticancerígeno sobre células de cáncer de mama y en un modelo de embrión de pollo

Tesis

Que como parte de los requisitos
para obtener el grado de

Maestra en Ciencias Químico Biológicas

Presenta

Ing. Mayra Lizbeth Vitela Ramos

Dirigido por:

Dra. Jesica Esther Escobar Cabrera.

Querétaro, Qro. a Diciembre 2023



Dirección General de Bibliotecas y Servicios Digitales
de Información



Caracterización del extracto acuoso de flor de Stevia
pilosa y evaluación de su efecto anticancerígeno sobre
células de cáncer de mama y en un modelo de
embrión de pollo

por

Mayra Lizbeth Vitela Ramos

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

Clave RI: FQMAC-248724



Universidad Autónoma De Querétaro
Facultad De Química
Maestría En Ciencias Químico Biológicas

Caracterización del extracto acuoso de flor de *Stevia pilosa* y
evaluación de su efecto anticancerígeno sobre células de
cáncer de mama y en un modelo de embrión de pollo

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de

Maestra en Ciencias Químico Biológicas

Presenta

Mayra Lizbeth Vitela Ramos

Dirigida por:

Dra. Jesica Esther Escobar Cabrera

Dra. Jesica Esther Escobar Cabrera
Presidente

Dra. Raquel Cariño Cortés
Secretario

Dra. María Guadalupe García Alcocer
Vocal

Dra. Laura Cristina Berumen Segura
Suplente

M. en C. Alejandra Ramírez Muñoz
Suplente

Centro Universitario, Querétaro, Qro.
Diciembre 2023
México

Dedicada a mis grandes amores, mis abuelitos.
Hasta que nos volvamos a encontrar.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al posgrado en Ciencias Químico-Biológicas de la Universidad Autónoma de Querétaro por tantas enseñanzas y apoyo.

Al Consejo Nacional de Humanidades Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT) por el financiamiento de la beca No. 1144985 otorgada para realizar la maestría.

Expreso mi enorme gratitud a la Dra. Jesica Escobar por volver a ser mi directora, quien siempre fue muy comprensiva, paciente, dispuesta a apoyarme. Gracias por creer en mí y ser tan buena conmigo, tiene todo mi cariño.

A la Dra. Raquel Cariño, que, aún sin conocerme en persona, aceptó ser parte de este proyecto. En cada correo y tutorial tenía palabras hermosas, que me hacían creer que mi trabajo valía la pena.

A la querida Dra. Lupita Alcocer, quien siempre estuvo al pendiente de mí y con grandes palabras de cariño. Gracias por aceptar ser parte de este proyecto.

A la Dra. Laura Berumen, siempre paciente, amable y dispuesta a apoyar. Tiene toda mi admiración y cariño.

A la Dra. Alejandra Ramírez, por estar al pendiente, brindarme tu ayuda, tus valiosas aportaciones, su ayuda experimental y aceptar ser parte de mi sínodo.

Al laboratorio de Biomolecular y a todas las personitas que lo conforman, fue un segundo hogar del cual solo tengo palabras de cariño.

Agradezco a todas mis amistades que estuvieron al pendiente del desarrollo de mi tesis, lo cuales me escucharon tantas veces, sus palabras fueron abrazos a mi agobiado ser. Especialmente a Steph, Marian, Lau, Jaz, Citlali, mi querida maestra de piano Mireya y mi pequeña Cindy.

Agradezco a mi familia, que a la distancia me apoyaron y me dieron espacio para lograr esto.

Finalmente, agradezco a mis abuelitos que aunque no alcanzaron a ver este proyecto terminado, fueron y serán mi razón para seguir y quienes me convirtieron en lo que soy.

ÍNDICE

RESUMEN.....	13
ABSTRACT	14
1. INTRODUCCIÓN.....	15
2. ANTECEDENTES.....	17
2.1 Cáncer	17
2.2 Factores de riesgo.....	17
2.3 Estadísticas del cáncer.....	18
2.4 Carcinogénesis.....	19
2.4.1 Migración e invasión	19
2.4.2 Angiogénesis.....	21
2.4.3 Metástasis.....	22
2.5 Cáncer de mama	23
2.5.1 Anatomía de la mama femenina	23
2.5.2 Clasificación del cáncer de mama.....	24
2.5.3 Tratamientos.....	26
2.6 Plantas medicinales.....	27
2.7 Género <i>Stevia</i>	28
2.7.1 Metabolitos presentes en el género <i>Stevia</i>	29
2.7.2 <i>Stevia pilosa</i>	29
3. JUSTIFICACIÓN	32
4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	33
5. HIPÓTESIS.....	34
6. OBJETIVOS.....	35
6.1 Objetivo general.....	35
6.2 Objetivos específicos.....	35
7. MATERIALES Y MÉTODOS.....	

7.1	Materiales	36
7.2	Métodos	36
7.2.1	Cultivo celular	36
7.2.2	Identificación de metabolitos secundarios por Cromatografía de gases acoplada a masa (CG-MS)	36
7.2.4	Análisis de ciclo celular por tinción con yoduro de propidio	37
7.2.3	Evaluación de apoptosis	37
7.2.5	Evaluación de metástasis y angiogénesis en un modelo de embrión de pollo	38
7.2.5.1	Incubación de huevos de pollo	38
7.2.5.2	Implantación de las células de cáncer de mama	39
7.2.5.3	Evaluación de la angiogénesis en el modelo de embrión de pollo	39
7.2.5.4	Evaluación de metástasis en el modelo de embrión de pollo	39
7.3	Análisis estadístico	39
8.	RESULTADOS	41
8.1	Identificación de metabolitos por cromatografía de gases acoplada a masas	41
8.2	Curvas de proliferación	43
8.2.1	Curvas de proliferación de la línea celular MCF-7	43
8.2.2	Curvas de proliferación de la línea celular MDA-MB-231	44
8.3	Análisis de ciclo celular por tinción con yoduro de propidio	46
8.3.1	Citometría de flujo en la línea celular MCF-7	46
8.3.2	Citometría de flujo en la línea celular MDA-MB-231	48
8.4	Evaluación de apoptosis	50
8.4.1	Citometría de flujo con Anexina V en la línea celular MCF-7	50
8.4.2	Citometría de flujo en la línea celular MDA-MB-231	53
8.5	Ensayo de Invasión	56
8.5.1	Evaluación invasión en MCF-7	56
8.5.2	Evaluación invasión en MDA-MB-231	57

8.6 Evaluación de angiogénesis.....	59
8.6.1 Ensayo de angiogénesis con el extracto de <i>Stevia pilosa</i>	59
8.6.2 Ensayo de angiogénesis con MCF-7.....	62
8.6.3 Ensayo de angiogénesis con MDA-MB-231.....	64
9. DISCUSIÓN.....	68
10. CONCLUSIONES.....	77
11. REFERENCIAS.....	78

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla	Página
1. Compuestos volátiles de <i>Stevia pilosa</i> mediante CG/MS.....	42

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1. Etapas y características del desarrollo de cáncer.....	19
2. Representación del proceso de invasión.....	20
3. Angiogénesis en células tumorales.....	21
4. Transición epitelio-mesénquima.....	22
5. Anatomía de la mama femenina.....	24
6. Diferentes estadios del cáncer de mama.....	25
7. Marcadores para clasificación del cáncer de mama.....	26
8. <i>Stevia pilosa</i>	29
9. Cromatograma de compuestos en <i>Stevia pilosa</i>	41
10. Efecto de <i>Stevia pilosa</i> en la proliferación de MCF-7.....	43
11. Comparación de las concentraciones en MCF-7.....	44
12. Efecto de <i>Stevia pilosa</i> en la proliferación de MDA-MB-231...45	
13. Comparación de concentraciones en MDA-MB-231.....	46
14. Arresto del ciclo celular en células MCF-7.....	47
15. Gráfica de arresto del ciclo celular en células MCF-7.....	48
16. Arresto del ciclo celular en células MDA-MB-231.....	49
17. Gráfica de arresto del ciclo celular en MDA-MB-231.....	50
18. Inducción de apoptosis en células MCF-7.....	51
19. Gráfica de inducción de apoptosis en células MCF-7.....	52
20. Inducción de apoptosis en células MDA-MB-231.....	54
21. Gráfica de inducción de apoptosis en MDA-MB-231.....	55
22. Micrografías del ensayo de invasión en células MCF-7.....	56
23. Gráfica del ensayo de invasión en células MCF-7.....	57
24. Micrografías del ensayo de invasión en MDA-MB-231.....	58
25. Gráfica del ensayo de invasión en MDA-MB-231.....	59

26. Fotografías de los embriones de pollo modelo CAM.....	61
27. Ensayo de angiogénesis <i>Stevia pilosa</i>.....	62
28. Fotografías del ensayo de angiogénesis con MCF-7.....	63
29. Gráfica del ensayo de angiogénesis con MCF-7.....	64
30. Fotografías ensayo de angiogénesis con MDA-MB-231.....	65
31. Gráfica del ensayo de angiogénesis con MDA-MB-231.....	66
32. Comparación en ensayo de angiogénesis.....	67

ACRÓNIMOS

CAM	Membrana corioalantoidea de pollo
MDA-MB-231	Línea celular de cáncer de mama triple negativo
HDFn	Línea celular de fibroblastos humanos
CG/MS	Cromatografía de gases- Acoplada a Masas
IC	Concentración inhibitoria
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular

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.



Ing. Mayra Lizbeth Vitela Ramos

RESUMEN

A nivel mundial, el cáncer de mama es la neoplasia maligna más frecuentemente diagnosticada y la primera causa de muerte por cáncer en mujeres. En México, también ocupa el primer lugar dentro de las neoplasias malignas más diagnosticadas en mujeres. En etapas tempranas no es invasivo, pero cuando se encuentra en etapas más avanzadas adquiere la capacidad de migrar e infiltrarse localmente dentro de la mama así como hacer metástasis a otros tejidos, estos procesos están sujetos a gran variedad de investigaciones. Las formas más comunes de tratar este cáncer incluyen la cirugía, radioterapia y/o quimioterapia. Las células de cáncer tienden a volverse resistentes a los tratamientos, por lo que la búsqueda de nuevas alternativas de tratamiento que aumenten la efectividad de los fármacos empleados, es de gran interés en la investigación. Estudios previos han detectado la presencia de algunos compuestos con potencial terapéutico en el género *Stevia*. *In vitro*, *Stevia pilosa* inhibe la proliferación y migración de líneas celulares de cáncer de próstata y mama. Sin embargo, aún no se ha estudiado que compuestos están presentes en este extracto, tampoco se ha reportado el uso de otros modelos. En el presente trabajo de investigación se planteó la identificación de metabolitos secundarios presentes en el extracto acuoso de flor de *Stevia pilosa* utilizando cromatografía de gases, se estudió el efecto del extracto de flor de *Stevia pilosa* en la apoptosis, ciclo celular e invasión celular en líneas celulares MCF-7 y MDA-MB-231; y se estudió el efecto en angiogénesis en un modelo de embrión de pollo con ovoscopía. Se logró identificar diferentes compuestos presentes en el extracto entre los que destacan la cumarina, butirolactona, D-limoneno, o-cimeno, maltol y piperonal. El extracto de *Stevia pilosa* demostró tener efectos antiproliferativos en líneas celulares de cáncer de mama, obteniendo una IC₅₀ de 91 µg/ml en MCF-7 y de 149 µg/ml en MDA-MB-231, el extracto logró aumentar los porcentajes de apoptosis en MCF-7 hasta 52% y en MDA-MB-231 hasta 47.2%; y causar arresto del ciclo celular en la fase G₀/G₁ en ambas líneas celulares; adicionalmente, disminuye la capacidad de hasta 44.43% y 52%, en MCF7 y MDA-MB-231, respectivamente, y disminuyó la angiogénesis en modelo de embrión de pollo en el cual no se observó un cambio significativo en la cantidad de vasos sanguíneos cuando eran tratados con el extracto. Se concluye que el extracto acuoso de flor de *Stevia pilosa* contiene compuestos con efecto anticancerígeno. El extracto de *Stevia pilosa* efecto antiproliferativo, promueve la apoptosis, causa arresto del ciclo celular, inhibe la invasión celular y es capaz de inhibir la angiogénesis.

Palabras clave:

Stevia pilosa, Cáncer de mama, Angiogénesis, Apoptosis

ABSTRACT

Breast cancer is the most frequently diagnosed malignancy in women worldwide and the leading cause of cancer death in women. In Mexico, it also ranks first among malignant neoplasms in women. In the early stages, it is non-invasive, when cancer progresses it acquires the ability to migrate and infiltrate locally into the breast and metastasize to other tissues, this ability to migrate is subject to a variety of research. Cancer cells tend to become resistant to conventional treatments as they advance in their stage, so the search for new treatment alternatives that increase the effectiveness of the drugs used, is of great interest to study. Some studies have detected the presence of some compounds with therapeutic potential in the genus *Stevia*; however, secondary metabolites present in the flower extract *Stevia pilosa* have not been identified. *In vitro*, *Stevia pilosa* has been shown to inhibit the proliferation and migration of prostate and breast cancer cell lines. However, important processes in carcinogenesis such as angiogenesis and metastasis have not been studied. The models in which *Stevia pilosa* has been studied are in cell lines, but the use of other models that allow having an approach to what happens at the *in vivo* level has not been reported. In the present research study the identification of secondary metabolites present in the extract using gas chromatography was studied the effect of aqueous extract of *Stevia pilosa* flower in apoptosis, cell cycle and cell invasion in cell lines MCF-7 and MDA-MB-231; and the effect on angiogenesis in a chicken embryo model with ovoscopy was studied. It was possible to identify different compounds present in the aqueous extract of *Stevia pilosa*, including coumarin, butyrolactone, D-limonene, o-cymene, maltol and piperonal. *Stevia pilosa* extract demonstrated antiproliferative effect in breast cancer cell lines, obtaining 91 $\mu\text{g/ml}$ IC_{50} in MCF-7 and 149 $\mu\text{g/ml}$ in MDA-MB-231, the extract was able to increase apoptosis percentages in MCF-7 to 52% and in MDA-MB-231 to 47.2%; and cause cell cycle arrest in the G0/G1 phase in both cell lines; additionally, it decreases the capacity of up to 44.43% and 52%, in MCF7 and MDA-MB-231, respectively, and decreased angiogenesis in chicken embryo model in which no significant change was observed in the amount of blood vessels when treated with the extract. It is concluded that the aqueous flower extract of *Stevia pilosa* contains compounds with anticancer effect. *Stevia pilosa* extract antiproliferative effect, promotes apoptosis, causes arresto of the cell cycle, inhibits cell invasion and is able to inhibit angiogenesis.

Keywords:

Breast cancer, *Stevia pilosa*, angiogenesis, apoptosis

1. INTRODUCCIÓN

El cáncer engloba un conjunto de enfermedades que se caracterizan por el crecimiento acelerado de células, carente de una regulación normal, como en el caso de células sanas. Las etapas de desarrollo del cáncer son conocidas como carcinogénesis. El desarrollo del cáncer, generalmente, se inicia con una o varias mutaciones, esta primera etapa es llamada iniciación; la siguiente etapa es la promoción, donde comienza la expansión clonal de las células mutadas inicialmente y comienzan a acumularse por ese crecimiento descontrolado. El proceso continúa con la proliferación o progresión. En esta etapa se induce el crecimiento de una masa tumoral y la angiogénesis juega un papel importante, debido a que favorece el microambiente tumoral, las células que continúan proliferando necesitan obtener oxígeno y nutrientes por lo que son necesarios nuevos vasos sanguíneos, para cumplir con las necesidades de las células tumorales (Botzer y col., 2016; Hernández y col., 2017). Posteriormente, están los procesos de invasión y metástasis, que dan como resultado un crecimiento tumoral en tejidos alejados del sitio inicial (Hernández y col., 2017; Occhiuto y col., 2023).

La metástasis es un proceso presente en el desarrollo tumoral, se define como la formación de tumores en un órgano o tejido diferente al sitio de origen. Para que el tumor pueda llegar a otro lugar es necesario que esas células migren e invadan esos tejidos. Durante la metástasis, las células tumorales sufren un cambio en específico llamado transición epitelio-mesénquima, donde las células pierden adherencia, se degrada la matriz e invaden la membrana basal (Botzer y col., 2016; Jung-Garcia y col., 2023).

Un tipo de cáncer de gran relevancia es el cáncer de mama. En mujeres, es la neoplasia con mayor incidencia y la primera causa de muerte por cáncer a nivel mundial. Actualmente, se emplea la quimioterapia, radioterapia y terapias focalizadas con anticuerpos monoclonales para el tratamiento de cáncer de mama. Sin embargo, estos tratamientos presentan efectos adversos en los pacientes y en estados avanzados de la enfermedad son poco eficaces (Dornelles y col., 2015; Martín y col., 2019; OMS, 2021). En vista de lo anterior, resulta crucial identificar nuevas moléculas con potencial terapéutico para tratar el cáncer de mama. Los compuestos naturales, las plantas y extractos de plantas se han considerado como posibles alternativas en el tratamiento del cáncer. Uno de los géneros que ha presentado actividad biológica es el género *Stevia*. Este género contiene alrededor de 250 especies. Varias especies de *Stevia* se usan en la medicina tradicional como antiinflamatorios, diuréticos,

agentes analgésicos, antihipertensivos y para tratar dolores estomacales (Khare y Chandra, 2019; Villágozmez y col., 2018; Zhao y col., 2009).

Stevia pilosa es una especie del género *Stevia* que presenta actividad biológica en la lucha contra el cáncer. En un estudio *in vitro* realizado por nuestro grupo de trabajo, se demostró que un extracto metanólico de *Stevia pilosa* disminuye la proliferación en líneas celulares de cáncer de próstata (Martínez y col., 2020). Además, en otra investigación de nuestro grupo se ha observado que extractos acuosos de flor y de hoja de esta especie, disminuyen la proliferación y migración en líneas celulares de cáncer de mama, y se ha registrado en un trabajo anterior realizado por nuestro grupo de trabajo que el extracto proveniente de flor es más eficaz y menos dañino para las células sanas (fibroblastos humanos) en comparación con el extracto de hoja. Aunque ambos extractos son de la misma especie, se observaron diferencias en el efecto sobre células de cáncer de mama. Por lo tanto, es necesario realizar más investigaciones para comprender los mecanismos de acción y es conveniente estudiar que metabolitos secundarios están presentes en el extracto acuoso de flor de *Stevia pilosa*, que contribuyen a la actividad antitumoral de esta planta. Es por esto es que se decidió continuar con esta investigación sobre el extracto acuoso de flor de *Stevia pilosa*.

Los estudios realizados hasta ahora se han centrado en evaluar la proliferación y migración de las células cancerosas (Martínez y col., 2020), sin embargo, no se han investigado procesos críticos en la carcinogénesis como la invasión y angiogénesis. Hasta el momento no se tiene registros de qué tipo de muerte podría inducir el extracto, si pudiera promover la apoptosis o provocar arresto del ciclo celular, información relevante para comprender los mecanismos moleculares involucrados en la actividad del extracto. En el presente trabajo de investigación se propone identificar algunos metabolitos secundarios presentes en el extracto acuoso de flor de *Stevia pilosa*, y estudiar el efecto del extracto en la apoptosis y ciclo celular en líneas celulares MCF-7 y MDA-MB-231. Además, estudiar el efecto en angiogénesis, utilizando un modelo de embrión de pollo, un sistema más complejo que se asemeja a las condiciones en el cuerpo humano.

2. ANTECEDENTES

2.1 Cáncer

El término cáncer engloba un gran número de enfermedades que se caracterizan por presentar un desarrollo acelerado, descontrolado e invasión a otros tejidos y órganos, así como la capacidad de generar metástasis (Gu y col., 2023; Hernández y col., 2017). Las células cancerosas, generalmente, presentan mutaciones genéticas que les confieren señales de crecimiento activadas y les permiten la capacidad de evadir controles normales de proliferación y muerte celular (Maman y col., 2018); debido a sus altas tasas de proliferación la demanda para lograr abastecer a las células aumenta, por lo que se requiere de una angiogénesis sostenida que permita la creación de nuevos vasos sanguíneos que ayudarán a proporcionar los nutrientes que estas nuevas células necesitan (Hernández y col., 2017).

2.2 Factores de riesgo

Existen factores que incrementan las posibilidades de padecer algún tipo de cáncer, como los relacionados con el estilo de vida como la alimentación, falta de actividad física, el consumo de alcohol y tabaco (OMS, 2021). Los factores ambientales como la exposición a radiación ultravioleta, la contaminación y el uso en exceso de productos químicos. Mientras que algunos otros factores de riesgo como lo son la predisposición genética, edad, etnia y sexo, que no se pueden cambiar (Gu y col., 2023).

Los factores heredables tienen que ver con cambios genéticos en diferentes tipos de genes. Por ejemplo, en los proto-oncogenes que en condiciones normales participan en crecimiento, diferenciación celular y regulación de la división celular. Los proto-oncogenes al sufrir de alguna mutación modifican su función convirtiéndose en oncogenes, en cuyo caso pierden la regulación y permiten que las células puedan proliferar y sobrevivir cuando no deberían hacerlo (Isacaz, 2018).

Otros tipos de genes son los supresores de tumores; que regulan la división celular, evitando que las células proliferen sin control. Las células con mutaciones en estos genes tienden a dividirse sin regulación. Finalmente, pero no menos importantes, se encuentran los genes reparadores de DNA, que como su nombre lo indica, se encargan de supervisar y arreglar DNA dañado; sin su función reparadora, las células tienden a adquirir mutaciones adicionales y pueden llegar a derivar en células cancerosas (Isacaz, 2018).

2.3 Estadísticas del cáncer

El cáncer ha logrado posicionarse como una de las principales causas de muerte a nivel mundial y un grave problema de salud pública (OMS, 2021). Los tipos de cáncer con mayor incidencia reportados en el 2020 fueron cáncer de mama, próstata, de pulmón, colorrectal, cervicouterino y de estómago; mientras que los tipos de cáncer que ocasionaron una mayor cantidad de muerte en ese mismo año fueron cáncer de pulmón, mama, colorrectal, de hígado, estómago y próstata; se estima que en los próximos años, aumenten los casos de cáncer a nivel mundial. La importancia de estudiar y comprender el desarrollo del cáncer se ve acentuada por las estadísticas alarmantes asociadas con esta enfermedad (GLOBOCAN, 2021).

2.4 Carcinogénesis

El desarrollo del cáncer, llamado carcinogénesis, consta de diferentes etapas (Figura 1) (Botzer y col., 2016). La primera etapa es la iniciación, en la que llegan a suceder mutaciones, provocando un daño en el DNA resultando en una transformación celular (Occhiuto y col., 2023). En la siguiente etapa, la promoción, esa célula con la mutación comienza una expansión clonal; debido al crecimiento acelerado las probabilidades de adquirir nuevas mutaciones incrementan (Hernández y col., 2017) y la capacidad de apoptosis decrece (Botzer y col., 2016; Occhiuto y col., 2023).

La progresión es la etapa que continúa con este proceso, en esta etapa se favorece el crecimiento de una masa tumoral. Durante proceso de progresión, la angiogénesis juega un papel importante, dando lugar a la formación de nuevos vasos sanguíneos y favoreciendo el microambiente tumoral (Botzer y col., 2016). Posteriormente, están las etapas de invasión y metástasis, que dan como resultado el crecimiento de un tumor secundario, en tejidos alejados del tumor inicial (Hernández y col., 2017).

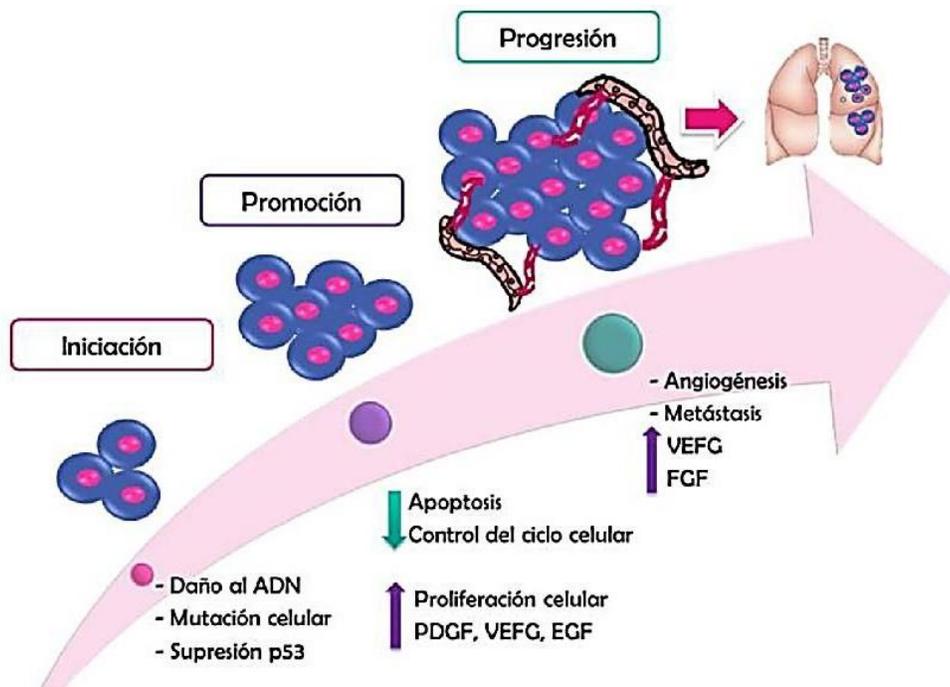


Figura 1. Etapas y características del desarrollo de cáncer (Rojas y Herrera, 2017).

2.4.1 Migración e invasión

La migración e invasión de células cancerosas, son procesos intrínsecamente relacionados con la formación de metástasis. La migración consta de diferentes pasos que incluyen extravasación de células tumorales hacia el torrente sanguíneo, estimulando la circulación de las células, hasta la identificación del tejido donde se desarrollará el tumor secundario (Wang y col., 2019). Estos procesos tienen gran importancia en las investigaciones que buscan nuevas alternativas terapéuticas para el cáncer (Jung-García y col., 2023; Yang y col., 2020).

La migración es el movimiento de la célula de un lugar a otro, dicha migración se puede clasificar en dos tipos: el movimiento unicelular y un movimiento colectivo. El movimiento unicelular se puede a su vez subdividir en ameboide, esto es cuando la célula no presenta adhesión, y en migración mesenquimal cuando la célula tiene adhesión involucrada. Este último está relacionado con la transición epitelio-mesénquima, que se ha considerado un punto importante para la invasividad de células transformadas. La migración colectiva consiste en la progresión de un grupo grande de células que no sufren una transición epitelio-mesénquima y mantienen la unión célula-célula. Esta migración celular está involucrada en procesos fisiológicos como la morfogénesis y la regeneración de tejidos (Albuquerque y col., 2021).

Bajo condiciones normales, la migración celular participa en procesos fisiológicos y del desarrollo como en la cicatrización de heridas, gastrulación, formación de órganos, y en función inmune. La migración celular puede contribuir en la progresión del cáncer (Jung-García y col., 2023; Rojas y Herrera, 2017).

Los procesos de invasión forman parte de la carcinogénesis. La invasión se refiere a la migración celular que ocurre cuando hay una penetración a través de la membrana basal y la matriz extracelular de manera destructiva (Figura 2). Este proceso implica no solamente que la célula tenga capacidad para migrar, sino que pueda ser capaz de adherirse y modificar los tejidos metastásicos, y es mediado por una variedad de factores, incluyendo proteasas, adhesión celular, factores de crecimiento y citocinas (Albuquerque y col., 2021; Nakayama y col., 2021).

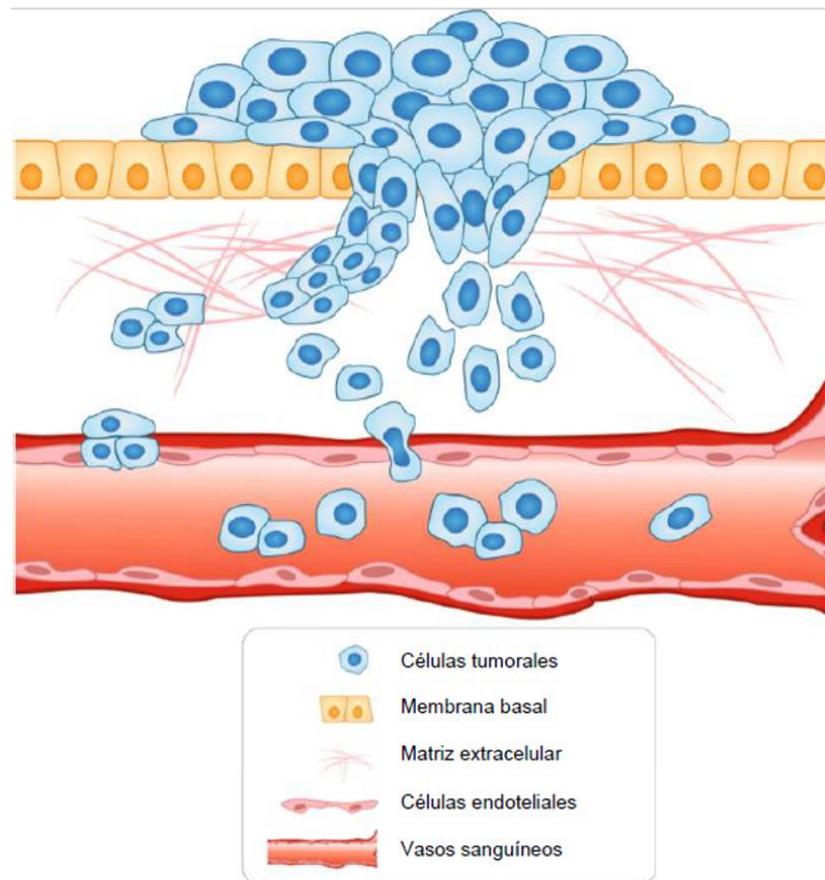


Figura 2. Representación del proceso de invasión (Novikov y col., 2020).

2.4.2 Angiogénesis

El proceso de angiogénesis es la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de otro preexistente, un proceso que ocurre tanto de manera fisiológica como patológica en el cáncer. Los vasos sanguíneos son esenciales en todos los tejidos para que se lleve el intercambio de nutrientes y metabolitos. Se ha caracterizado como un proceso esencial en la proliferación y viabilidad de las células tumorales. Durante la progresión del cáncer, se produce una angiogénesis patológica, estimulada por la sobreexpresión de los factores pro-angiogénicos. Esto crea un desequilibrio entre factores pro-angiogénicos y los anti-angiogénicos (Figura 3), dando lugar a la formación de nuevos vasos sanguíneos que continúan creciendo de forma anormal mientras el tumor se desarrolla (Chikezie y col., 2020). La angiogénesis se ha convertido en una diana terapéutica, utilizando anti-angiogénicos, los cuales interrumpen el suministro vascular y evitan que el tumor siga obteniendo nutrientes y oxígeno, lo que provoca la inanición del tumor. Una estrategia utilizada consiste en bloquear la señalización de VEGF/VEGFR (Ramjiawan y col., 2017).

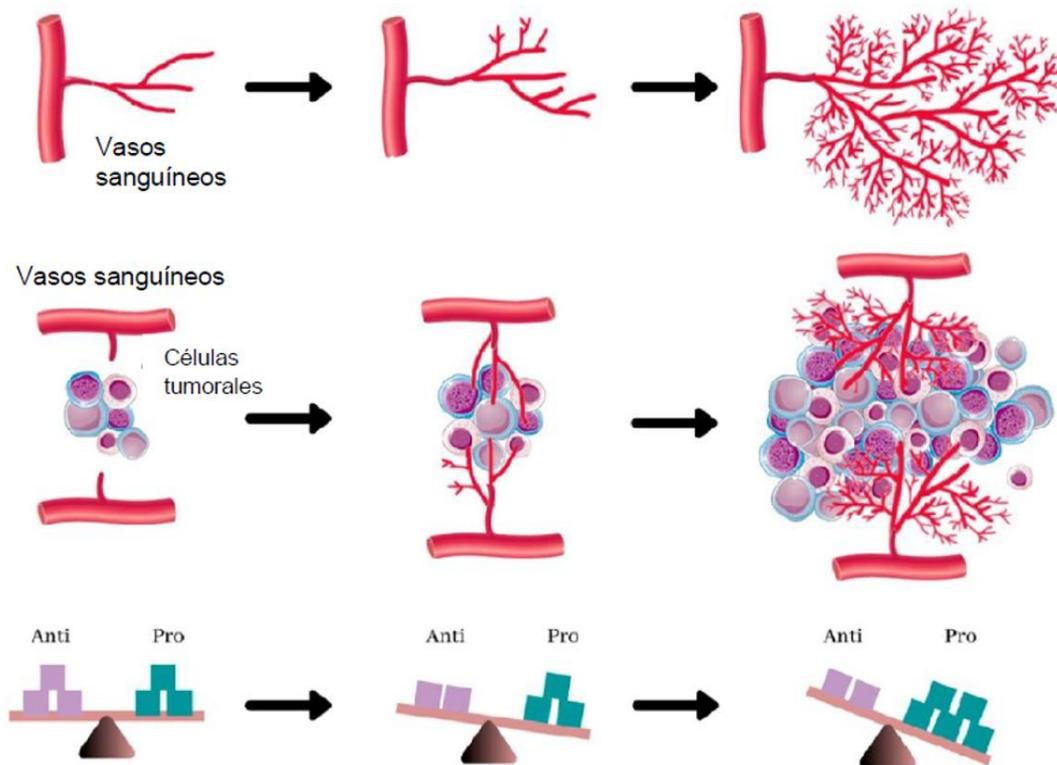


Figura 3. Angiogénesis en células tumorales y el desequilibrio de factores anti-angiogénicos y pro-angiogénicos (Chikezie y col., 2020).

2.4.3 Metástasis

La metástasis involucra tanto cambios a nivel genético como a nivel epigenético en la célula tumoral. Está relacionada con la invasión, intravasación y angiogénesis (Suhail y col., 2019). La metástasis es una etapa en la carcinogénesis en la cual las células cancerosas abandonan el tumor primario y se diseminan hacia otros tejidos (Figura 1). Durante este proceso, células transformadas sufren una transición epitelio-mesénquima (TEM), pérdida la adherencia célula-célula, degradación de la matriz extracelular e invasión en la membrana basal, lo que deriva en un incremento en la capacidad de migración. Posteriormente, existe un nuevo cambio en el fenotipo de células mesenquimales a células llamadas epiteliales (Figura 4), favoreciéndose la angiogénesis y la adhesión celular en un nuevo sitio (Yang y col., 2020).

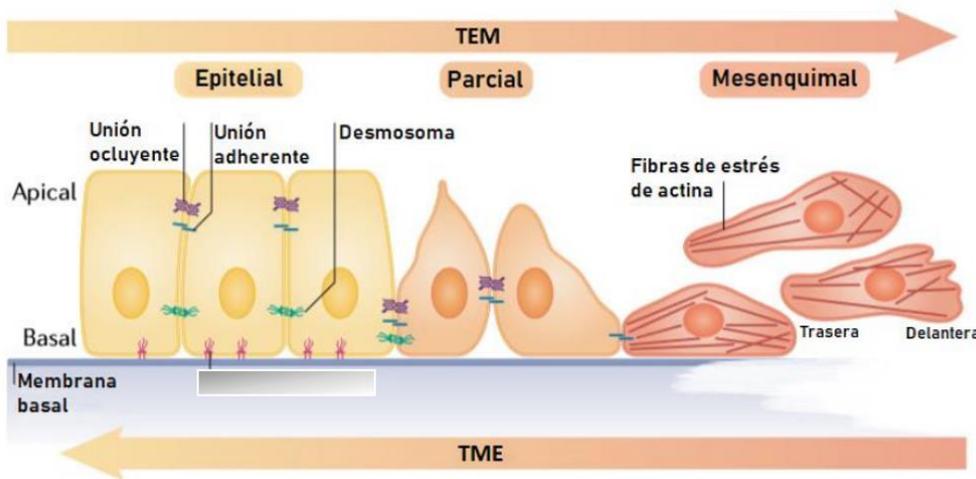


Figura 4. Transición epitelio-mesénquima (TEM) (Brasch y col., 2018).

Esta etapa se puede dividir en varias fases, esto es conocido como la cascada metastásica, consiste en el crecimiento e invasión progresivos en el tumor local, angiogénesis, formación de nichos pre-metastásicos, intravasación, supervivencia en la circulación, extravasación, formación de nichos metastásicos, micrometástasis y colonización metastásica. La metástasis del cáncer no es exactamente una cascada lineal, hay procesos concurrentes parcialmente superpuestos, ya que las células que sufren metástasis exitosamente, asumen nuevos fenotipos y descartan algunos comportamientos anteriores (Nakayama y col., 2021).

La metástasis es de gran importancia porque es la principal causa de mortalidad en pacientes con cáncer (Rojas y Herrera, 2017). Esto es debido a que cuando un tumor

hizo metástasis en ocasiones se vuelve poco susceptible a las terapias que se usaban para tratar el tumor primario (Ross y col., 2020).

2.5 Cáncer de mama

En los últimos años un tipo de cáncer que ha cobrado relevancia es el cáncer de mama; esta es una enfermedad caracterizada por el crecimiento descontrolado de células de la glándula mamaria. Este tipo de cáncer es considerado un tumor con buen pronóstico en la mayoría de los casos diagnosticados si son tratados de forma temprana (CDC, 2020; Dornelles y col., 2015).

El cáncer de mama es la neoplasia maligna más frecuentemente diagnosticada en mujeres a nivel mundial, siendo la segunda causa de muerte por cáncer en este grupo de la población (OMS, 2021). En México, también ocupa el segundo lugar de las neoplasias malignas en mujeres, representa el 15.3 % de todos los casos de cáncer (Globocan, 2021).

Su origen es de tipo multifactorial, en el que contribuyen tanto factores genéticos como ambientales. A nivel endocrino, niveles elevados de estrógenos se asocian a un mayor riesgo. El incremento de estrógenos puede ser por la menarquia precoz, menopausia tardía, la nuliparidad o por un primer embarazo en una edad avanzada (Dornelles y col., 2015; Nolan y col., 2023).

Existen factores genéticos que hacen al paciente más vulnerable al desarrollo de esta neoplasia. Una mutación de pérdida de función en un alelo en BRCA1 y BRCA2, incrementa el riesgo de padecer en algún momento de su vida cáncer de mama (Govindan y Morgenszlern, 2001), el de tipo hereditario corresponde a alrededor de un 10-15% de todos los tumores malignos de mama (NIH, 2019).

Los factores nutricionales, la obesidad posmenopáusica, historia y duración de la lactancia materna; factores conductuales como falta de actividad física, fumar, consumo de alcohol; la exposición a radiación de la pared torácica en niñas y jóvenes, y la exposición a radiación ionizante, aumentan las probabilidades de aparición de cáncer de mama (CDC, 2020).

2.5.1 Anatomía de la mama femenina

Las mamas o glándulas mamarias están formadas por conductos lobulillares rodeados de un epitelio secretor de leche, estos conductos en la pubertad cuando se inicia la secreción estrogénica, crecen y aumentan el área alrededor del pezón, es decir la

areola (Figura 5). Los conductos pequeños convergen y drenan en los conductos más grandes, para luego converger en el pezón. Estas estructuras están inmersas en tejido adiposo (Constanzo, 2018).

El cáncer de mama generalmente tiene su origen en los conductos mamarios y en algunas ocasiones en los lóbulos mamarios. En etapas tempranas no es invasivo pero el cáncer en etapas avanzadas, posee la capacidad de infiltrarse localmente dentro de la mama y hacer metástasis a otros tejidos (Martín y col., 2019).

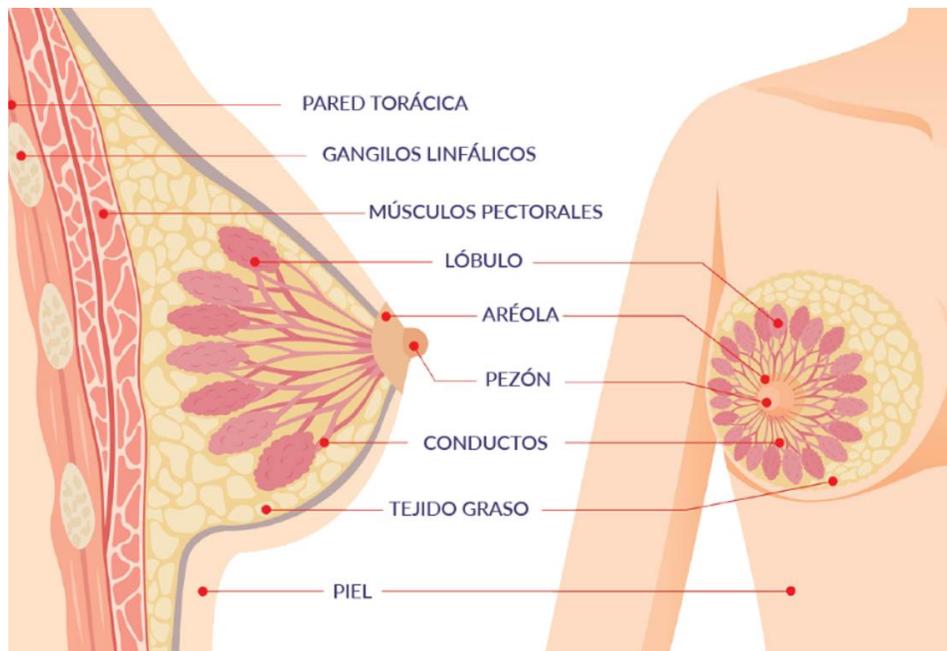


Figura 5. Anatomía de la mama femenina (BBCC, 2021).

2.5.2 Clasificación del cáncer de mama

El cáncer de mama puede agruparse de acuerdo a su extensión, usando la clasificación de UICC. Existen cuatro estadios (Figura 6), el estadio I es para tumores de tamaño reducido sin metástasis en axila. El estadio II agrupa tumores de más de 2 cm de diámetro o que tienen afectación metastásica en axila moderada. En el estadio III se encuentran los tumores de gran tamaño o con afectación en músculo pectoral, piel o afectación metastásica masiva en axila. Finalmente, en el estadio IV son los tumores que hicieron metástasis en órganos distantes como en hueso, pulmón o hígado (Martín y col., 2019).

En etapas tempranas el cáncer de mama es asintomático; hasta que la enfermedad está en una etapa posterior de desarrollo, aparecen signos como tumoración en la mama, cambios en la piel como enrojecimiento, un color anaranjado, eccema del pezón que es una condición inflamatoria irritativa del área del pezón y la areola, bultos en axilas, hinchazón en el brazo, retracción del pezón o secreciones en el pezón (Cardiff y col., 2018).

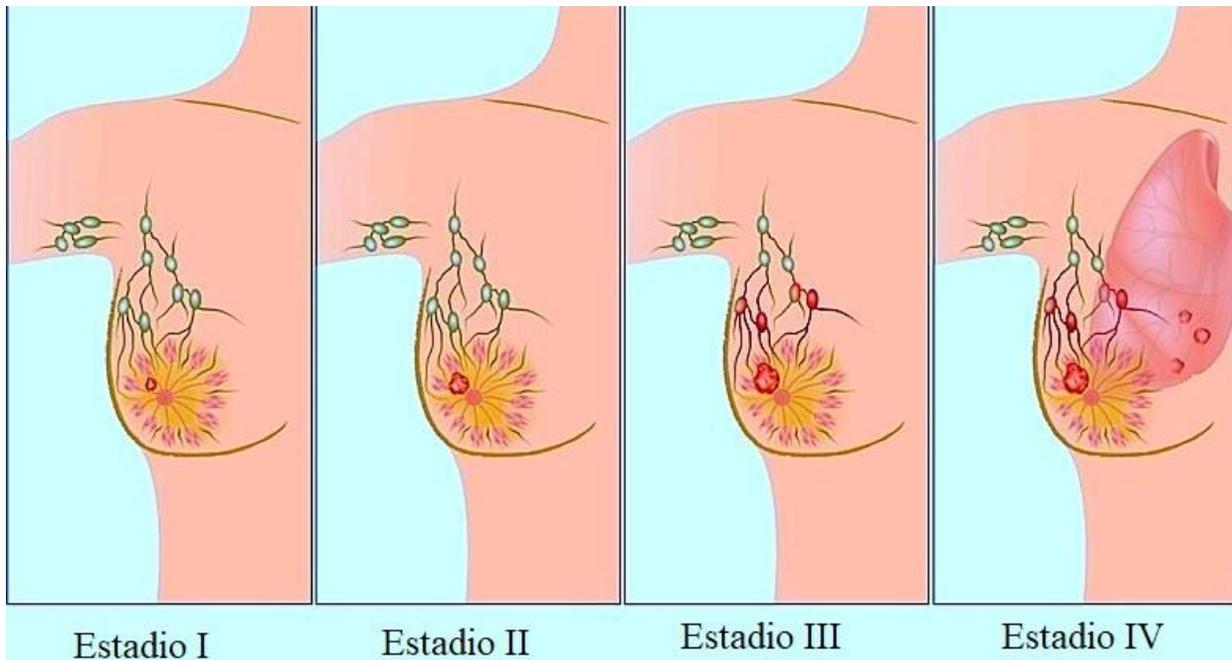


Figura 6. Diferentes estadios del cáncer de mama, el primer cuadro a la izquierda representa el estadio I, el siguiente a la muestra el estadio II, se continua con el estadio III y finalmente el último a la derecha representa como se ve el estadio IV (NIH, 2019).

Están los tumores hormono-dependientes o también llamados luminales, los tumores que tienen una amplificación en el receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2) y los tumores triples negativos (HER2 negativo con receptor hormonal negativo). La mayoría de los tumores se encuentran en el tipo hormono-dependientes (Figura 7) (Perou y col., 2000).

Las neoplasias malignas pueden clasificarse en cuatro tipos:

- Luminal A (expresión de receptor a estrógenos o al receptor de progesterona, o ambos, citoqueratinas luminales).

- Luminal B (expresión de receptor de estrógenos, citoqueratinas luminales más genes de proliferación).
- Tipo basal (expresión de genes de células mioepiteliales basales).
- Enriquecido para HER2 (genes ERBB2) y amplificación 17q23 (Perou y col., 2000).

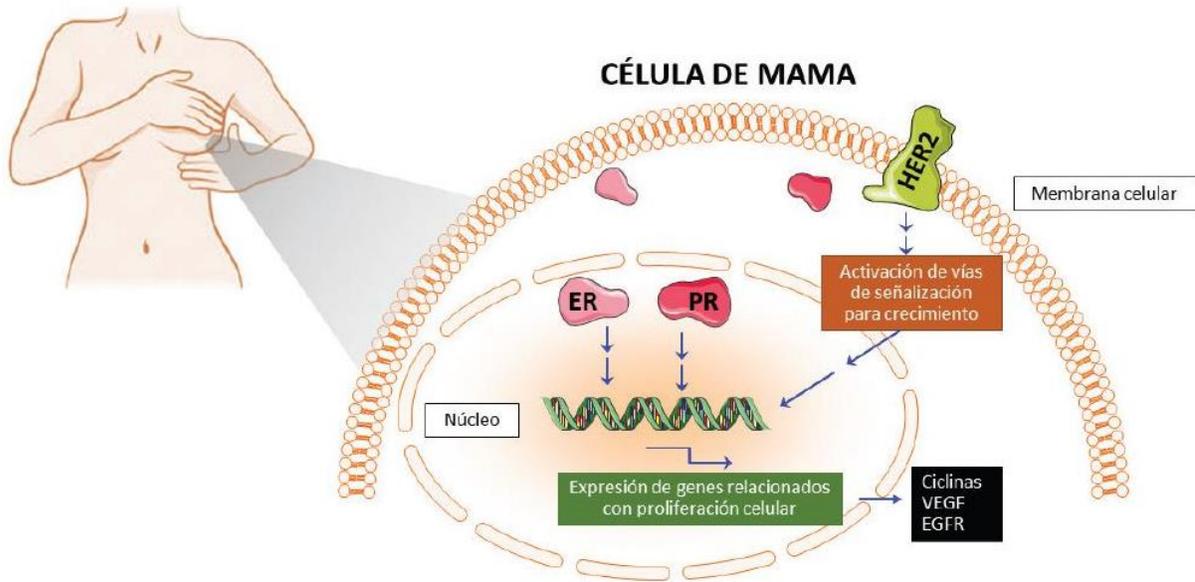


Figura 7. Principales marcadores usados para la clasificación del cáncer de mama (Arceo-Martínez y col., 2021).

2.5.3 Tratamientos

En general, los tratamientos contra el cáncer de mama abarcan cirugía, radioterapia, quimioterapia, tratamiento hormonal y plan terapéutico dirigido. Se pueden clasificar en tratamientos locales o sistémicos, la forma de tratar este cáncer dependerá del estadio en que se encuentre. Para los primeros tres estadios la terapia se basa en tratamientos locales como cirugía y radioterapia, complementada con tratamiento con medicamentos. Los tratamientos sistémicos son medicamentos en los que su alcance es mayor, es decir, puede llegar a cualquier parte del cuerpo. Estos abarcan a terapia hormonal, terapia dirigida, quimioterapia e inmunoterapia (ACS, 2020).

Por ejemplo, para pacientes con HER2 positivo el tratamiento se completa con anticuerpos monoclonales y moléculas pequeñas inhibidoras de tirosina cinasa. Uno de los fármacos más utilizados es trastuzumab, es un anticuerpo monoclonal

humanizado dirigido contra la proteína HER-2. Otros fármacos empleados son: lapatinib, pertuzumab y el ado-trastuzumab, conocido como T-DM-1 (Hernández y col., 2017). La terapia hormonal es usada cuando el cáncer de mama aún responde a los receptores hormonales, se utiliza como adyuvante después de la cirugía para evitar alguna recaída (ACS, 2020).

Los pacientes con tumores triple negativo tienen menos opciones de tratamientos, ya que es necesario someterse a quimioterapia, aunque se puede combinar con la administración de bevacizumab (Takada y col., 2023). Cuando el cáncer se disemina al cerebro, por lo general se trata con cirugía o radioterapia, o ambas (Dornelles y col., 2015; Takada y col., 2023).

Aunque hay varias opciones de tratamiento todas ellas pueden llegar producir efectos secundarios en el paciente en mayor o menor medida, esto debido a que algunos no son muy selectivos, ni específicos y llegan a afectar partes sanas del cuerpo (NIH, 2019).

2.6 Plantas medicinales

El desarrollo de resistencia y posibles riesgos de reincidencia ha llevado a la búsqueda de nuevos compuestos con potencial anticancerígeno, esta búsqueda incluye a las plantas medicinales. Así mismo, se buscan opciones de tratamiento que resulten menos agresivos, sean más selectivos y logren aminorar los efectos secundarios de los tratamientos usados actualmente (Haque y col., 2019).

El uso médico de la herbolaria tiene comienzos muy antiguos, desde que se tuvo noción de que ciertas plantas tienen la capacidad de producir efectos benéficos sobre el organismo (Katzung, 2007). La medicina herbolaria tiene su fundamento en el uso terapéutico de las plantas medicinales, para poder sustituir completamente medicinas farmacéuticas o bien usarlas en combinación para potenciar su efecto. Esta práctica combina conocimiento, creencias y experiencias indígenas de diversas culturas. Los medicamentos utilizados en la medicina tradicional abarcan las hierbas, material, preparaciones y productos provenientes de materiales vegetales. Una forma eficaz de uso es emplear extractos estandarizados (OMS, 2019).

Actualmente alrededor del 25 % de los fármacos tienen sus orígenes en las plantas, pero hoy en día, la mayoría de los tratamientos médicos son de fármacos sintéticos, siendo el uso de medicamentos de origen vegetal poco empleado (Gielecińska y col., 2023).

Estudios de todo el mundo han reportado que los fitoquímicos presentes en las plantas medicinales, tienen la capacidad de inhibir la proliferación celular e inducir apoptosis y, por tanto, retrasan el crecimiento de varios tipos de células de cáncer. En líneas celulares y en tejidos de animales, se ha demostrado que extractos de plantas usados en combinación con otras terapias, tienen ventajas sobre el uso único de la terapia (Ovadje y col., 2014). Unos de los compuestos estudiados de las plantas son los polifenoles, estos actúan como antioxidantes y anticancerígenos (Khare y Chandra, 2019).

Los polifenoles son capaces de eliminar radicales libres, regular la expresión génica, incluidos los oncogenes y los genes supresores de tumores; actuar sobre la proliferación y diferenciación celular; detener el ciclo celular e inducir apoptosis; regular el metabolismo hormonal; y tener efectos antivirales y antibacterianos (Vundru y col., 2013). Estos han mostrado resultados efectivos inhibiendo el cáncer de pulmón, estómago, ovario y cáncer de mama estrógeno-dependiente (Woyengo y col., 2009).

2.7 Género *Stevia*

Diferentes especies de *Stevia* son ampliamente utilizadas en la medicina tradicional para el tratamiento de diferentes malestares. Por ejemplo, remedio para dolores estomacales, como diurético, antiinflamatorio, agente analgésico y antihipertensivo (Cariño y col., 2007).

El género *Stevia* es miembro de la familia Asteraceae, cuenta con 250 especies que se pueden encontrar desde el sur de Estados Unidos hasta Brasil y Argentina. En México, el género es el tercero más diverso de la familia Asteraceae, con 116 especies y 107 de ellas son endémicas del país, siendo de los 18 géneros más diversos de plantas vasculares mexicanas (Villágozmez y col., 2018).

Hoy en día el género *Stevia* ha ganado bastante popularidad por la especie *S. rebaudiana* (Bertoni), de la cual se extraen edulcorantes bajos en calorías, mismos que son usados para sustituir el azúcar de caña. El uso de diferentes especies de *Stevia* como plantas medicinales se debe al contenido de sustancias con actividades biológicas importantes, tales como su capacidad antifúngica y antimicrobiana, además de otras con gran importancia farmacológica como la de antioxidante y acciones anticancerígenas (Cariño y col., 2007). Por ejemplo, el esteviósido, compuesto aislado de *S. rebaudiana*, ejerce una actividad antitumoral en líneas de cáncer de mama y restringe la proliferación en MDA-MB-231 (Khare y Chandra, 2019). Las especies de *Stevia* son muy diversas en cuanto a su crecimiento, es posible encontrarse con hierbas anuales, perennes, sufrútices o arbustos (Cariño y col., 2007). Este género

suele presentar flores conformadas por cinco floretes de colores morados, rosas o blancos, lo cual es muy útil para su identificación (Villagomez y col., 2018).

2.7.1 Metabolitos presentes en el género *Stevia*

Dentro del amplio género de *Stevia*, se han estudiado algunas especies y se ha logrado identificar metabolitos con propiedades terapéuticas. Por ejemplo, el esteviósido y el rebaudiósido A, ampliamente utilizados como edulcorantes naturales, identificados por primera vez en la especie *Stevia rebaudiana*. También se han identificado flavonoides en *Stevia*, como la quercetina y la rutina, que tienen propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y anticancerígenas (Borgo y col., 2021).

De los compuestos representativos presentes en *Stevia* se encuentran los derivados del longipinano (Álvarez, 2005). En menor proporción se han aislado bisabolanos, clerodanos y labdanos y de las partes aéreas de algunas especies se han encontrado varios flavonoides (Pérez, 2006).

Los miembros de la familia Asteraceae son una fuente rica en agliconas flavonoides. A través de estudios fitoquímicos se han encontrado metabolitos tales como aceites esenciales y constituyentes volátiles, como aquilina, campesterol, diterpenos, acetofenona, benzofurano y cromeno, sesquiterpenos funcionalizados, triterpenos, olenanos y esteroides. La diversidad en la composición química de las especies de *Stevia* hace importante el estudio de los metabolitos presentes para comprender sus posibles efectos terapéuticos (Álvarez, 2005; Pérez, 2006).

2.7.2 *Stevia pilosa*

Es una planta erecta, perenne, de 3-5 dm de altura, tiene una inflorescencia terminal de color rojizo-púrpura (Figura 8).



Figura 8. Planta de *Stevia pilosa* (Naturalista, 2015).

Presenta un tallo ramoso desde la base, hojoso y piloso hirsuto, hojas alternas, lineares o angostamente oblanceoladas, obtusas, de 2- 3 cm de largo. En México, es posible encontrarla en Guanajuato, Hidalgo, Ciudad de México, Puebla y Estado de México (Martínez, 1958; Romero y col., 2020; Villavicencio y Pérez, 2006).

Por su color llamativo se usa como planta ornamental en día de muertos en el estado de Hidalgo. En un estudio sobre la parte aérea de esta planta se logró aislar una lactona sesquiterpénica conocida como leukodina (Martínez, 1958). De un extracto de raíz de *Stevia pilosa* se aislaron β -sitoesterol, estigmasterol y derivados de longipineno (Pérez, 2006).

El β -sitoesterol, estigmasterol junto con el campesterol son los fitoesteroles más comunes consumidos en dieta. Como su nombre lo indica son los esteroides de las plantas. Su capacidad de reducir la absorción de colesterol, logrando protección contra enfermedades cardiovasculares, los vuelve un blanco de estudio (Zhao y col., 2009).

Otra vertiente en el estudio de los fitoesteroides está enfocada en las propiedades anticancerígenas que presentan; se ha reportado mayor actividad anticancerígena del β -sitoesterol en células de cáncer de mama comparada con células de cáncer de pulmón y de cáncer de piel (Vundru, 2013). El β -sitoesterol ha mostrado tener efectos antiproliferativos y tener la capacidad de inducir apoptosis en cáncer de colon, mama, y próstata (Zhao y col., 2009).

En células de cáncer de próstata andrógeno dependientes (LNCaP) y andrógenos independientes (PC-3), se observó que los extractos metanólicos de raíz de *Stevia pilosa* y *Stevia eupatoria*, disminuyeron la proliferación en estas líneas celulares. Respecto a la capacidad de migración de PC-3, disminuyó en presencia tanto de *Stevia pilosa* como *Stevia eupatoria* (Martínez, 2020). Estudios en nuestro grupo de trabajo se ha reportado que extractos acuosos de hoja y flor de *Stevia pilosa* mostraron tener efectos en la disminución de la proliferación y migración en líneas celulares de cáncer de mama, MCF-7 y MDA-MB-231; mientras que en la línea celular de fibroblastos humanos, HDFn, a las mismas concentraciones no tuvieron efecto en la proliferación celular.

El extracto acuoso de flor de *Stevia pilosa* aún no se ha caracterizado. En estudios previos en otros extractos de *Stevia pilosa*, se logró identificar algunos compuestos bioactivos que pueden tener efectos beneficiosos en la salud. Por lo cual, la identificación de metabolitos secundarios presentes en el extracto es fundamental

para comprender sus propiedades terapéuticas y así en un futuro diseñar productos naturales y medicamentos que puedan aprovechar esas propiedades.

3. JUSTIFICACIÓN

Los casos de cáncer de mama han ido aumentando hasta posicionarse como la primera causa de muerte en las mujeres a nivel mundial. El cáncer de mama se encuentra en el primer puesto de los tipos de cáncer con mayor incidencia (OMS, 2021). Los tratamientos actuales para combatir este tipo de cáncer presentan fuertes efectos secundarios y en muchos casos son inefectivos, en especial cuando se trata tumores en estados avanzados de la enfermedad (Dornelles y col., 2015). Es por esto que es relevante buscar nuevas alternativas de fuentes terapéuticas con potencial anticancerígeno, que sean más eficientes y tengan menos efectos secundarios. En particular, se ha prestado especial atención a sustancias de origen natural como objeto de estudio, por su uso en la medicina tradicional (Khare y Chandra, 2019). Generalmente, se utilizan extractos de diferentes partes de una planta para aprovechar las propiedades que poseen sus metabolitos secundarios. Un género que ha presentado diversas actividades biológicas es el género *Stevia*, muchas de las especies que lo conforman poseen actividad antiinflamatoria, antioxidante, incluso antiproliferativa y antimigratoria (Álvarez, 2005; Pérez, 2006; Martínez y col., 2020). Dentro de este género se encuentra la especie *Stevia pilosa*, que ha demostrado *in vitro* tener actividad antiproliferativa y antimigratoria en líneas celulares de cáncer de próstata y mama (Zhao y col., 2009; Martínez y col., 2020). Aunque se ha estudiado su capacidad para inhibir proliferación y migración celular, se sabe poco acerca de su mecanismo de acción, el tipo de muerte celular que induce, efectos en el ciclo celular, se desconoce si es capaz de disminuir o inhibir los procesos de angiogénesis y metástasis. El extracto acuoso de flor de *Stevia pilosa*, se había estudiado en líneas celulares, por lo que hacer estudios en otros modelos *in vivo* presentó un acercamiento más certero hacia lo que sucede en el cuerpo humano durante este proceso de carcinogénesis. Una alternativa ampliamente utilizada para observar angiogénesis es el ensayo de la membrana corioalantoidea (CAM) de embrión de pollo, el cual permite observar el progreso en el desarrollo de los vasos sanguíneos, indicadores del proceso angiogénico. El estudio de estos procesos contribuyó a entender posibles efectos del extracto de *Stevia pilosa* en procesos clave de la carcinogénesis. En este trabajo de investigación, se planteó la identificación de algunos metabolitos secundarios que nos ayudaron a explicar los efectos anticancerígenos del extracto. Para tener un mayor panorama de cómo es que actúa el extracto acuoso de *Stevia pilosa*, se propuso estudiar los posibles efectos del extracto en el ciclo celular, promoción de la apoptosis, así como evaluar el proceso de angiogénesis utilizando el ensayo de la membrana corioalantoidea (CAM).

4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Qué metabolitos secundarios están presentes en el extracto acuoso de flor de *Stevia pilosa* y cuál es su efecto sobre la apoptosis, ciclo celular, angiogénesis en líneas celulares de cáncer de mama y en un modelo de embrión de pollo?

5. HIPÓTESIS

El extracto acuoso de flor de *Stevia pilosa* contiene metabolitos secundarios que pueden promover apoptosis, provocar arresto del ciclo celular e inhibir la angiogénesis en líneas celulares de cáncer de mama y en un modelo de embrión de pollo.

6. OBJETIVOS

6.1 Objetivo general

Identificar metabolitos secundarios presentes en el extracto acuoso de flor de *Stevia pilosa* y evaluar el efecto anticancerígeno del extracto en líneas celulares de cáncer de mama y en un modelo de embrión de pollo.

6.2 Objetivos específicos

- Identificar metabolitos secundarios presentes en el extracto acuoso de flor de *Stevia pilosa*, por medio de cromatografía de gases acoplada a masas.
- Analizar mediante citometría de flujo el efecto del extracto acuoso de flor de *Stevia pilosa* en el arresto del ciclo celular en líneas celulares MCF-7 y MDA-MB-231.
- Evaluar el efecto del extracto acuoso de flor de *Stevia pilosa* en la promoción de la apoptosis, utilizando citometría de flujo en líneas celulares MCF-7 y MDA-MB-231.
- Determinar el efecto del extracto de *Stevia pilosa* en la capacidad de invasión de las células MCF-7 y MDA-MB-231.
- Evaluar el efecto antiangiogénico del extracto acuoso de flor de *Stevia pilosa* en un modelo de embrión de pollo mediante ovoscopia.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Materiales

Las líneas celulares de cáncer de mama dependientes de hormonas MCF-7 y células independientes de hormonas MDA-MB-231, fueron amablemente donadas por la Dra. Angelina Rodríguez Torres de la Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad Autónoma de Querétaro y Dra. Maura Cárdenas García, Facultad de Medicina de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, respectivamente.

7.2 Métodos

7.2.1 Cultivo celular

Los dos tipos celulares se cultivaron con medio de Cultivo Eagle Modificado de Dulbecco DMEM, suplementado con 10% de suero fetal bovino, al 1% de solución penicilina-estreptomicina. Se cultivaron a una temperatura constante de 37 °C y atmósfera al 5% de CO₂.

7.2.2 Identificación de metabolitos secundarios por Cromatografía de gases acoplada a masa (CG-MS)

Este análisis es versátil para separar, identificar y cuantificar sustancias desconocidas. Es la técnica más efectiva para el análisis de compuestos orgánicos volátiles de matrices complejas, en una amplia variedad de concentraciones, es por eso que se utilizó para identificar algunos metabolitos secundarios presentes en el extracto acuoso de flor de *Stevia pilosa*.

La cromatografía se llevó a cabo en el CICATA-IPN Querétaro, por el investigador Dr. Pedro A. Vázquez Landaverde, bajo las siguientes condiciones:

0.1 g de muestra se colocaron en un vial de 20 mL, con tapa de magnética y septum de teflón/silicón. La muestra fue agitada a 200 rpm y calentada a 50°C durante 1 hora, para su extracción con fibra de microextracción en fase sólida de 2 cm, compuesta por PDMS/DVB/CAR (Supelco, Sigma Aldrich, California, EUA). La fibra fue desorbida térmicamente a 250°C en el puerto de inyección en modo splitless de un cromatógrafo de gases 7890A (Agilent Technologies, Inc., California, EUA), acoplado a un detector de espectrometría de masas cuadrupolar modelo 5975C (Agilent Technologies, Inc., California, EUA). Se utilizó una columna capilar HP-5MS (60 m x 250 µm de diámetro, 0.25 µm de espesor de fase, Agilent Technologies Inc., California, EUA). El programa de temperatura del horno fue el siguiente: 40°C por 10 min, seguido de un incremento a 140°C con una velocidad de 3°C/min y tiempo de espera de 20min, seguido de un incremento a 220°C con una velocidad de 3°C/min y tiempo de espera de 5 min,

finalmente un incremento a 260°C con una velocidad de 10°C/min donde se mantuvo por 15 min.

El gas de arrastre utilizado fue Helio (pureza 99.999%), a flujo constante de 1 mL/min. El detector de espectrometría de masas se utilizó en modo de impacto electrónico a 70 eV, con un Gain Factor de 1, temperaturas de línea de transferencia, fuente de ionización y cuadrupolo de 280°C, 230°C y 150°C respectivamente, y un rango de masas de 33 a 600 uma.

7.2.3 Análisis de ciclo celular por tinción con yoduro de propidio

El análisis del ciclo celular se realizó en el citómetro BD FACSVers™ el kit Cell Cycle que utiliza yoduro de propidio para teñir las células. El citómetro detecta en cual fase del ciclo celular se encuentran las células.

Se sembraron 100,000 células de cáncer de mama, MCF-7 y MDA-MB-231, en placas de 12 pozos e incubadas durante 24 horas. Posteriormente, se aplicó las respectivas concentraciones IC₂₅ e IC₅₀ del extracto acuoso de flor de *Stevia pilosa* (MCF-7 de 46 µg/ml y 91 µg/ml; MDA-MB-231 de 75 µg/ml y 145 µg/ml) y se incubaron durante otras 24 horas. Las células posteriormente fueron recolectadas, se centrifugaron a 300 g durante 5 min, se sometieron a un lavado con PBS, se volvieron a centrifugar a 300 g por 5 min, y se fijaron con 250 µl de etanol frío al 70%, incubando durante 3 h. Transcurrido ese tiempo se centrifugó a 300 g por 5 min para retirar el etanol y se hicieron dos lavados con PBS. Posteriormente, se agregaron 150 µl del reactivo Cell Cycle en oscuridad y se incubaron durante 30 min. Finalmente, se leyeron en citómetro BD FACSVers™.

7.2.4 Evaluación de apoptosis

Se utilizó citometría de flujo para medir el porcentaje de células en apoptosis. El citómetro BD FACSVers™, detecta emisiones fluorescentes cuando se unen antígenos a un fluorocromo.

Se analizaron células de cáncer de mama MCF-7 y MDA-MB-231, fueron sembradas 100,000 células en placas de 12 pozos e incubadas durante 24 horas. Trascurrido ese tiempo se adicionaron las respectivas concentraciones IC₂₅ e IC₅₀ del extracto acuoso de flor de *Stevia pilosa* (MCF-7 de 46 µg/ml y 91 µg/ml; MDA-MB-231 de 75 µg/ml y 145 µg/ml). Después de 24 horas de tratamiento, las células fueron recolectadas, se centrifugaron a 300 g por 5 min, se sometieron a un lavado con PBS. Fueron transferidos 100 µl de la suspensión a un nuevo tubo donde se incubó con el

fluorocromo FITC anexina V por 20 minutos en oscuridad y a temperatura ambiente. Finalmente, se leyeron en el citómetro BD FACSVers™.

7.2.5 Evaluación de la Invasividad en cámaras Transwell

Para este ensayo se utilizaron cámaras Transwell a las cuales se les adicionó 100 μ l de Matrigel, para simular la matrix extracelular, se incubaron los insertos de cámaras Transwell con el matrigel durante 30 min a temperatura ambiente para que este último se polimerice. Posteriormente las células, se sembraron 50,000 células de las líneas celulares MCF-7 y MDA-MB-231, fueron tratadas con las respectivas concentraciones IC₂₅ e IC₅₀ del extracto acuoso de flor de *Stevia pilosa* (MCF-7 de 46 μ g/ml y 91 μ g/ml; MDA-MB-231 de 75 μ g/ml y 145 μ g/ml), para la preparación de ambas concentraciones, así como para el control se empleó medio sin suero fetal bovino. Se añadió medio con 10% de suero fetal bovino en el compartimiento inferior de la cámara y se incubaron durante 24 horas para permitir la invasión de las células desde la cara apical hacia la parte basal. Después del periodo de incubación, las células que lograron invadir se lavaron dos veces con PBS, se añadió metanol y se incubaron a temperatura ambiente por 20 min, se volvieron a lavar con PBS, se tiñeron con Giemsa stain y se incubaron en oscuridad por 20 min, y se lavaron con PBS. Se utilizaron hisopos para retirar las células que no lograron invadir y el matrigel. Una vez retiradas esas células se prosiguió a realizar el conteo celular en el microscopio y a la toma de fotografías.

7.2.6 Evaluación de metástasis y angiogénesis en un modelo de embrión de pollo

7.2.6.1 Incubación de huevos de pollo

Se adquirieron huevos fértiles tipo ALPES de 0-3 días, los cuales eran libres de patógenos. Los huevos fertilizados se transfirieron a una incubadora humidificadora a 37.5 °C con una humedad del 55%, equipada con un rotador automático. El movimiento cada 2 horas evitó que el embrión se adhiriera a las membranas. Al tercer día de incubación, se realizó un orificio, con ayuda de unas pinzas estériles, de aproximadamente 3 mm de diámetro en la cáscara del huevo y posteriormente se cubrió con papel Parafilm para evitar contaminaciones y/o deshidratación. El orificio ayudó a cambiar la presión dentro del huevo y evitar que la CAM se pudiera unir a la membrana de la cáscara. Una vez cubierto el orificio, los huevos regresaron a la incubadora.

7.2.6.2 Implantación de las células de cáncer de mama

En el día 5 de incubación, se extendió la perforación a 3 cm de diámetro en la parte superior de la cascara del huevo, para la visualización de la membrana corioalantoidea (CAM).

Se evaluó una n=5 para cada grupo. Los grupos con los que se trabajó fueron: Control sin células, un control con el extracto de *Stevia pilosa* (sin células), control células MCF-7(sin tratamiento), 46 µg/ml del extracto para MCF-7 (células + tratamiento), 91 µg/ml del extracto para MCF-7 (células + tratamiento), control células MDA-MB-231, 75 µg/ml del extracto para MDA-MB-231 y 149 µg/ml del extracto para MDA-MB-231.

Se utilizaron 1 millón de células en 30 µl de Matrigel para cada huevo. Se colocaron en la perforación del huevo, una gota que contenía las células y matrigel, y 45 µl de la concentración evaluada del extracto acuoso de flor de *Stevia pilosa*. Para terminar, se cubrió la perforación con papel Parafilm y los huevos se regresaron a la incubadora para terminar con los 11 días de incubación.

7.2.6.3 Evaluación de la angiogénesis en el modelo de embrión de pollo

Para este experimento se visualizó el área superficial de la membrana y se contaron los vasos sanguíneos en los días 0, 2, 4 y 6, a partir de la implantación de las células.

Se visualizaron por ovoscopia que es un método diafanoscópico que se basa en la translucidez de la cáscara y en las diferencias de transmisión lumínica. El huevo se puso delante de un foco luminoso en posición vertical y el interior del huevo quedó completamente iluminado. Esto permitió ver los vasos sanguíneos y llevar un registro a lo largo de los días en los que duró el experimento. Posterior a los 11 días de incubación, los huevos fueron expuestos a un cambio drástico de temperatura, colocándolos en el ultracongelador, esto con el fin de sacrificarlos; se detuvo el ensayo en este día debido a que el embrión en esta etapa aún es incapaz de sentir dolor.

7.3 Análisis estadístico

Para el tratamiento estadístico, los datos se analizaron mediante análisis de varianza ANOVA de una vía por medio del programa GraphPad Prisma 6. Posteriormente se realizó la prueba *post-hoc* de Tukey de 3 experimentos independientes con tres repeticiones cada uno. Los valores fueron expresados como la media ± desviación estándar.

7.4 Disposición de residuos

Los residuos que tuvieron contacto con los cultivos celulares fueron inactivados con una solución de cloro por 24 h y a continuación desechados en una bolsa roja para residuos para su posterior recolección por una empresa especializada. Los desechos biológicos, los embriones de pollo, fueron colocados en una bolsa amarilla, para residuos biológicos y puestos en congelación hasta su recolección por una empresa especializada. Según lo establecido por la sección 7.4 de la NOM-052-SEMARNAT-2005 que establece los requisitos para el manejo de residuos peligrosos biológicos-infecciosos (RPBI), generados en laboratorios y hospitales.

8. RESULTADOS

8.1 Identificación de metabolitos secundarios por Cromatografía de gases acoplada a masa (CG-MS)

Se analizó el extracto acuoso de flor de *Stevia pilosa* por medio de cromatografía de gases acoplado a masas (CG/MS) para la identificación de compuestos de tipo volátil que estuvieran presentes en el extracto. La figura 9 corresponde al cromatograma obtenido, en la que se puede observar los tiempos de retención y la abundancia.

Los compuestos registrados con esta técnica se muestran en la Tabla 1. En la tabla se indica el porcentaje de área en el cromatograma, el tiempo de retención (TR), número CAS, el porcentaje de parecido con la biblioteca en la que se identificaron y, en la última columna, se muestra su clasificación.

Se encontraron un total de 28 compuestos en el extracto. Se identificaron ácidos carboxílicos como el ácido hexanoico y el ácido n-decanoico, alcoholes como 2,3-butanodiol, compuestos fenólicos como la cumarina, cetonas, lactonas como la butirilactona y pantolactona, ésteres, aldehídos, así como también la presencia de diferentes terpenos como maltol, D-limoneno, O-cimeno y piperonal, entre otros.

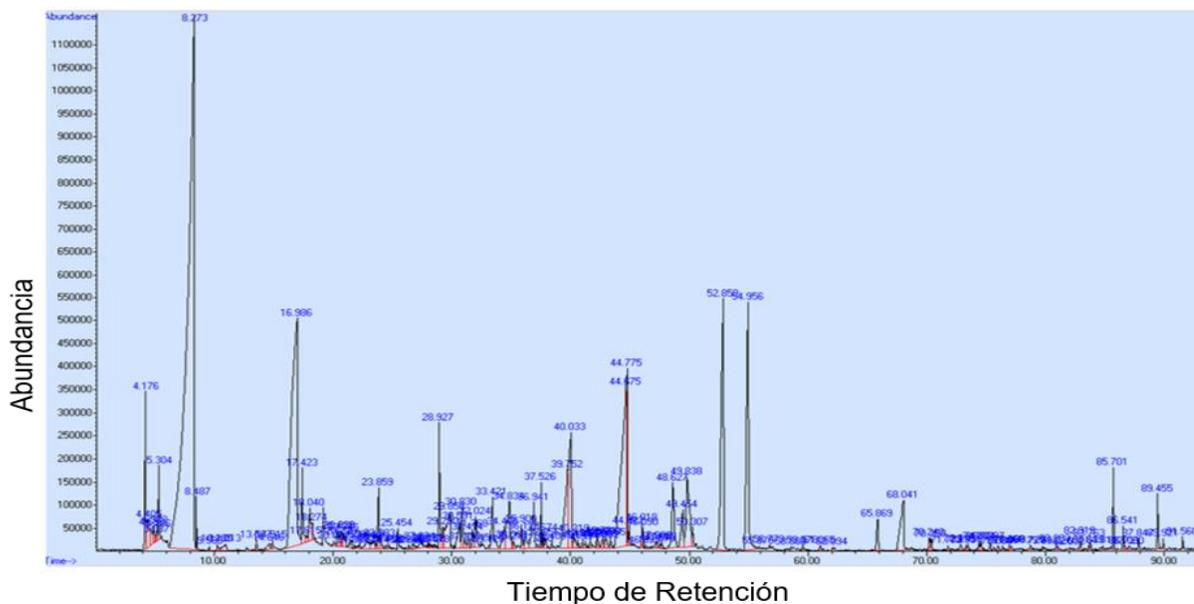


Figura 9. Cromatograma de los compuestos presentes en el extracto acuoso de *Stevia pilosa* obtenido por la técnica de cromatografía de gases.

Tabla 1. Identificación de compuestos volátiles en el extracto acuoso de flor de *Stevia pilosa* mediante CG/MS

COMPUESTO	% ÁREA	TR	NO. CAS	% PARECIDO BIBLIOTECA	CLASIFICACIÓN
Ácido acético	34.41	8.273	000064-19-7	90	Ácido carboxílico
2,3-Butanodiol	12.7	16.9826	000513-85-9	90	Alcohol
Ácido nonanoico	9.65	44.775	000112-05-0	90	Ácido carboxílico
2,4,7,9-Tetramethyl-5-decyne-4,7-diol	5.71	52.859	000126-86-3	91	Alcohol
Cumarina	5.06	54.954	000091-64-5	95	Compuesto fenólico
Ácido benzoico	3.08	40.031	000065-85-0	94	Ácido carboxílico
Ácido octanoico	2.49	39.753	000124-07-2	90	Ácido carboxílico
Hexyl isobutyrate	2.42	49.838	002348-07-7	78	Ácido carboxílico
Ácido hexanoico	1.77	29.856	000142-62-1	85	Ácido carboxílico
Ácido dodecanoico	1.64	68.04	000143-07-7	97	Ácido carboxílico
Ácido n-decanoico	0.74	49.456	000334-48-5	95	Ácido carboxílico
Ethanone, 1-(1H-pyrrol-2-yl)-	1.16	33.42	001072-83-9	91	Cetona
Butirolactona	0.66	23.86	000096-48-0	91	Lactona
O-cimeno	0.66	30.594	000527-84-4	86	Terpeno
D-limoneno	0.53	30.833	005989-27-5	90	Terpeno
Pantolactona	0.52	32.023	000599-04-2	72	Lactona
Mellein	0.52	65.867	000480-33-1	96	Éster
Dibutilftalato	0.48	89.452	000084-74-2	91	Éster
Alcohol fenético	0.36	36.176	000060-12-8	76	Alcohol
Maltol	0.24	35.898	000118-71-8	90	Lactona
Salicato de homomentilo	0.18	86.541	052253-93-7	89	Éster
Dietilftalato	0.18	70.24	000084-66-2	96	Éster
Farmeseno epoxido	0.13	3.568	083637-40-5	77	Terpeno
Ácido hexadecanoico,metil éster	0.1	87.847	000112-39-0	98	Éster
Piperonal	0.1	47.283	000120-57-0	74	Terpeno
Tributilfosfato	0.1	74.367	000126-73-8	72	Éster
Dimetilsulfuro	0.05	22.236	000067-71-0	80	Éster
2-metil-pental	0.04	28.019	000623-36-9	72	Aldehído

8.2 CURVAS DE PROLIFERACIÓN

8.2.1 Curva de proliferación línea celular MCF-7

La línea celular MCF-7 evaluada con el extracto de flor de *Stevia pilosa* presentó una disminución de células vivas, estadísticamente significativa en todos los grupos evaluados con respecto al control. En la concentración de 25 $\mu\text{g/ml}$, se obtuvo un porcentaje de viabilidad del 60%. En las siguientes concentraciones, 50, 75, 100 y 200 $\mu\text{g/ml}$, se obtuvieron porcentajes de 59, 52, 47 y 38, respectivamente (Figura 10). El porcentaje registrado para 300 $\mu\text{g/ml}$ fue de 35. Mientras que en la concentración de 500 $\mu\text{g/ml}$ las células vivas disminuyeron hasta llegar a 18.4%. Finalmente, a la mayor concentración evaluada, 1000 $\mu\text{g/ml}$, no se observaron células vivas en los conteos. La concentración inhibitoria 50 (IC_{50}) calculada para esta curva de proliferación en esta línea celular fue de 91 $\mu\text{g/ml}$ y la concentración inhibitoria 25 (IC_{25}) fue de 46 $\mu\text{g/ml}$.

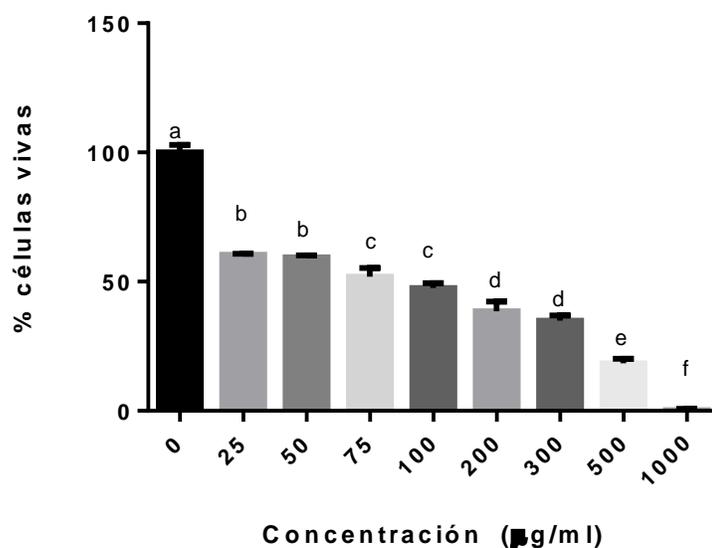


Figura 10. Efecto del extracto acuso de flor de *Stevia pilosa* en la proliferación de células MCF-7 con 24 horas de tratamiento. La gráfica representa la media \pm EE de tres experimentos independientes. Para el análisis estadístico se realizó un ANOVA con prueba *post hoc* de Tukey ($P < 0.05$).

En este trabajo de investigación, se llevó a cabo una comparación de los resultados obtenidos en años anteriores por nuestro grupo de trabajo y los actuales (Figura 11). El propósito de esta comparación fue verificar la variabilidad del efecto del extracto

cuando su elaboración se llevó a cabo en diferente año y las cosechas de la planta también fueron en años distintos. Para realizar la evaluación, se utilizó una prueba estadística de *t-student*. En ambos estudios el comportamiento dependiente de la concentración se mantuvo y estadísticamente solo las concentraciones de 25 µg/ml y 50 µg/ml fueron diferentes. La concentración inhibitoria 50 (IC₅₀) calculada para el estudio anterior fue de 96 µg/ml y la actual de 91 µg/ml.

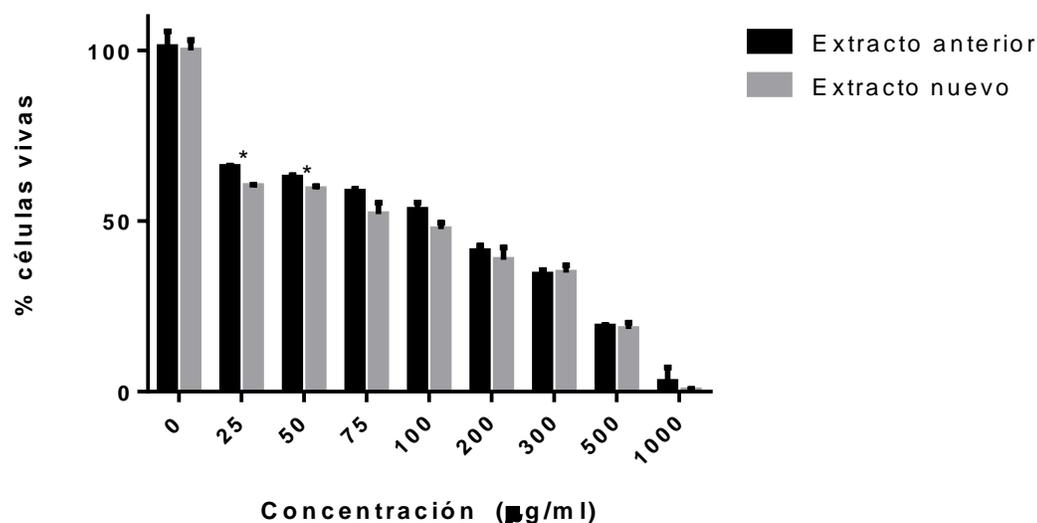


Figura 11. Comparación de las concentraciones actuales y las obtenidas en años anteriores con un extracto acuoso de *Stevia pilosa* de diferente año de cosecha, en la línea celular MCF-7. Los resultados se analizaron con una prueba *t-student* con un valor de $p < 0.05$.

8.2.2 Curva de proliferación de la línea celular MDA-MB-231

Al evaluar las mismas concentraciones en células hormono-independientes, MDA-MB-231, se observó que el porcentaje de células vivas disminuyó de forma dependiente de la concentración. Se presentó una disminución significativa de la proliferación con respecto al control desde los 75 µg/ml (Figura 12). Las concentraciones de 25 y 50 µg/ml no presentan diferencias estadísticamente significativas comparadas con el control obteniendo un porcentaje de 91 y 89.9%, a concentración de 75 µg/ml mostró un 71.74% de células vivas, esta concentración es estadísticamente diferente a la de 100 µg/ml, donde se obtuvo un porcentaje de 51.72. Por medio del análisis estadístico se obtuvo la concentración media inhibitoria de 149 µg/ml y concentración inhibitoria

25 (IC₂₅) fue de 74.5 µg/ml. En la concentración de 200 µg/ml, se obtuvo un porcentaje de células vivas de 35.26%, la concentración de 300 µg/ml es de 31.54%, esta no es significativamente diferente a la concentración de 200 µg/ml. En 500 µg/ml, se obtuvo 11.56%. Para la concentración de 1000 µg/ml no se registraron células vivas.

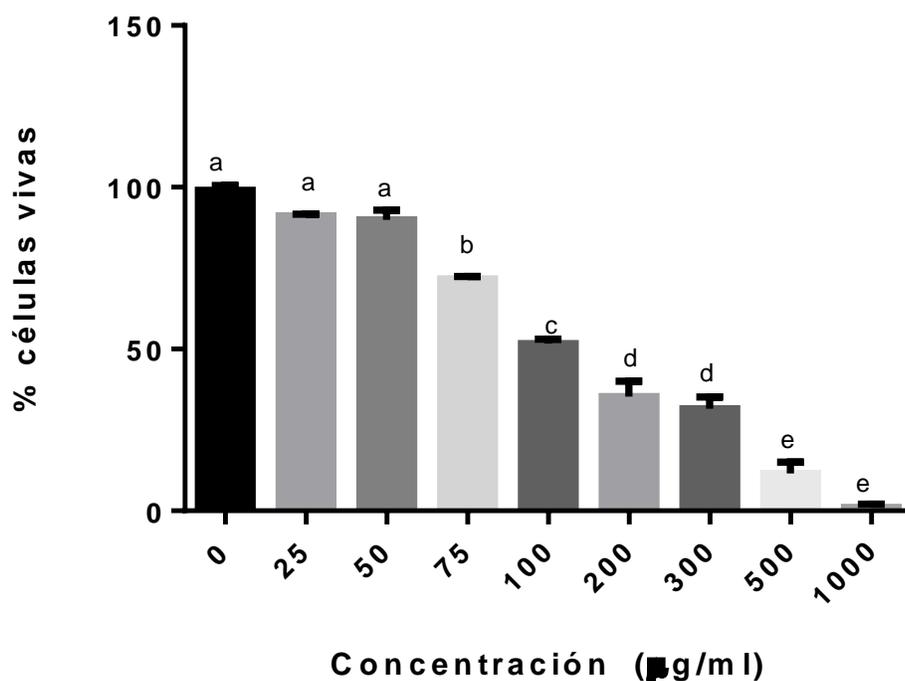


Figura 12. Efecto del extracto acuso de flor de *Stevia pilosa* en la proliferación de células MDA-MA-2321 con 24 horas de tratamiento. La gráfica representa la media ± EE de tres experimentos independientes. Para el análisis estadístico se realizó un ANOVA con prueba *post hoc* de Tukey (P<0.05).

Se realizó la comparación de los resultados actuales en la línea celular MDA-MB-231 con los registrados en años anteriores con el extracto de flor de *Stevia pilosa*, se pudo observar que ninguna de las concentraciones evaluadas presenta una diferencia estadísticamente significativa (Figura 13). En esta línea celular se observó un comportamiento dependiente de la concentración, en el que a mayor concentración se registra un porcentaje menor de células vivas. La concentración inhibitoria 50 (IC₅₀) calculada para el estudio anterior fue de 152 µg/ml y la actual de 149 µg/ml.

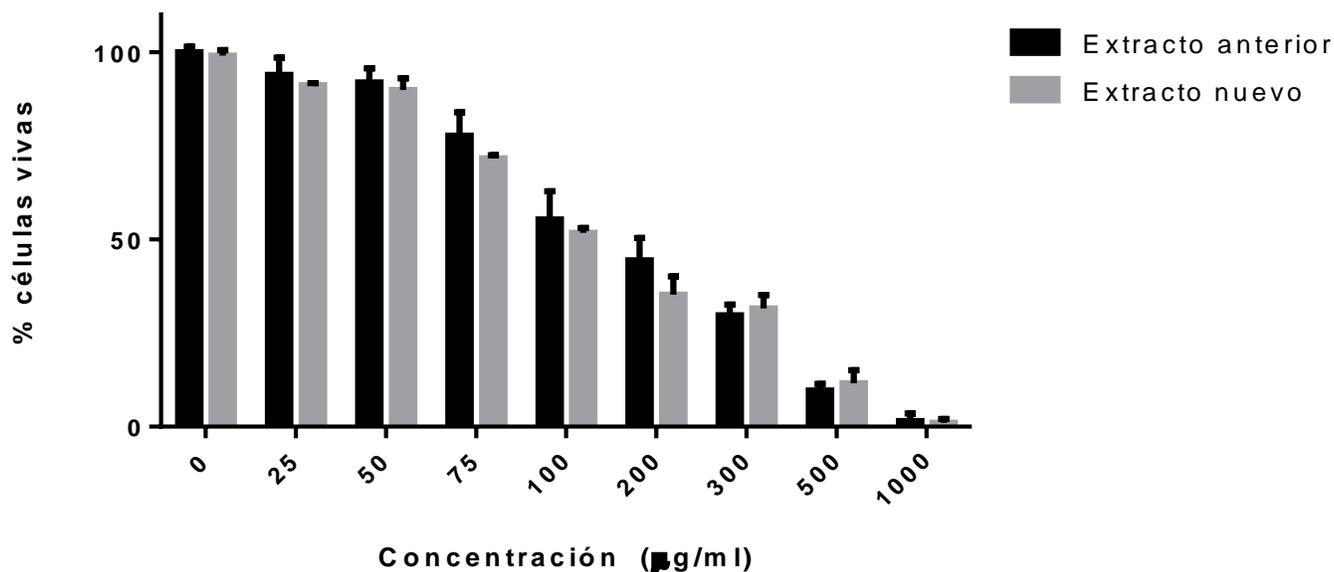


Figura 13. Comparación de las concentraciones actuales y las obtenidas en años anteriores con un extracto acuoso de *Stevia pilosa* de diferente año de cosecha, en la línea celular MDA-MB-231. Los resultados se analizaron con una prueba *t-student* con un valor de $p < 0.05$.

8.3 Análisis de ciclo celular por tinción con yoduro de propidio

8.3.1 Citometría de flujo en la línea celular MCF-7

Para determinar el efecto del extracto acuoso de flor de *Stevia pilosa* sobre el ciclo celular, se evaluaron las concentraciones 46 µg/ml y 91 µg/ml respectivamente, calculadas previamente con ayuda de las curvas de proliferación.

En la figura 14, se muestran los histogramas de ciclo celular o perfiles de ciclo celular (Figura 14a-c). En estas gráficas se representa el contenido de ADN de las células en el eje abscisas y la frecuencia de las células en el eje de las ordenadas. Con este análisis es posible observar las células que se encuentran en fase G_0/G_1 , en la fase S y G_2/M .

El primer histograma (Figura 14A) corresponde al control, el segundo (Figura 14B) a la concentración 46 µg/ml y el tercero (Figura 14C) a la concentración 91 µg/ml.

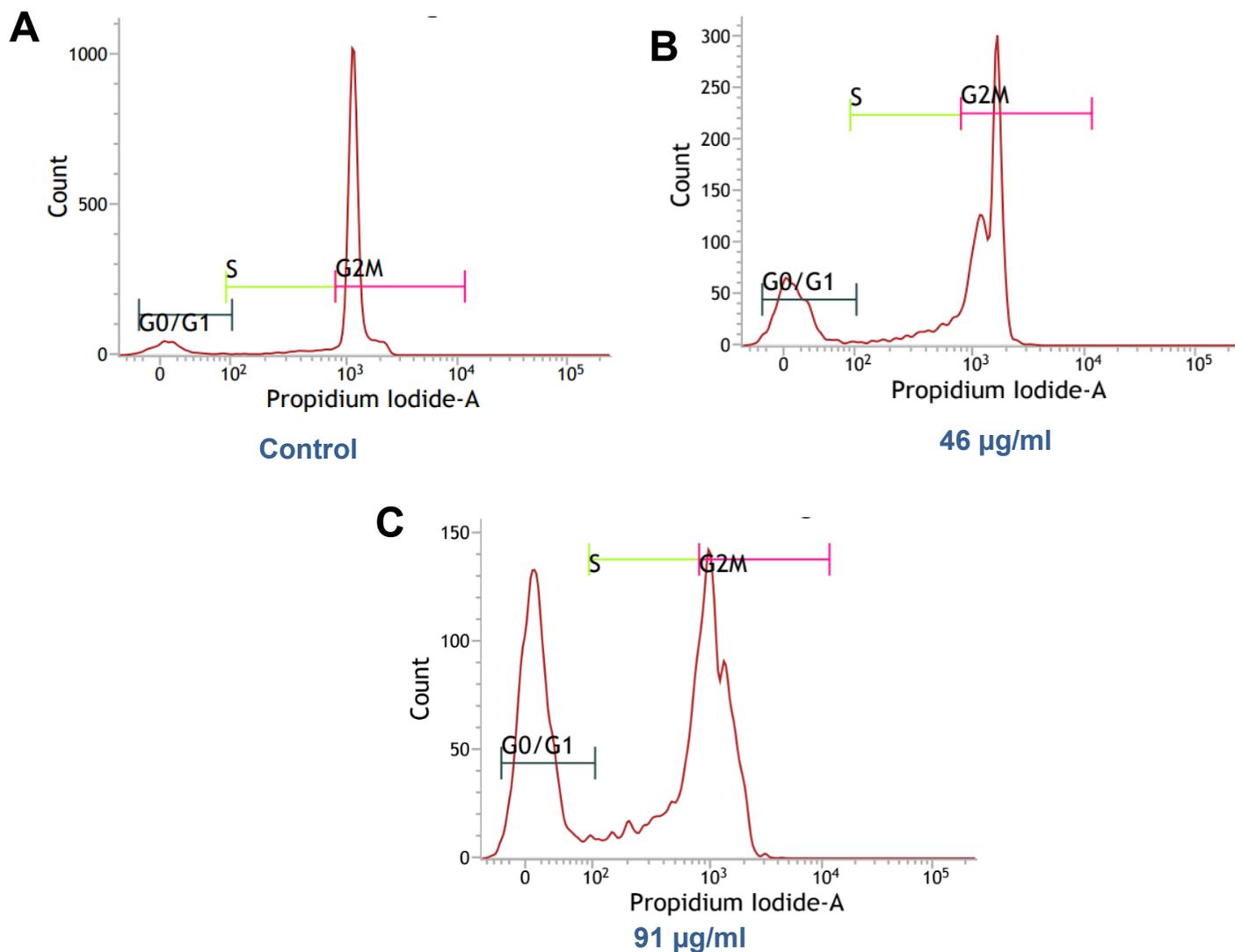


Figura 14. Arresto del ciclo celular en células de cáncer de mama MCF-7 causado por el extracto acuoso de flor de *Stevia pilosa* evaluado por medio de citometría de flujo con yoduro de propidio. Los histogramas representan la media de tres experimentos independientes.

En la gráfica (Figura 15), se puede observar que en el control las células se encuentran principalmente entre la fase S y G₂/M, con porcentajes de 8.85 y 89.85, respectivamente. En la primera concentración evaluada, 46 µg/ml, la distribución cambia, las células en G₂/M disminuyen obteniendo 49.23%, las células en la fase

G₀/G₁ y fase S registran un aumento significativo llegando a un 26.96% y 24.3%, respectivamente. Con la concentración 91 µg/ml, se presenta un comportamiento similar en el que disminuyen los porcentajes de células en G₂/M con 36.32%, y se observa un incremento en la cantidad de células en fase G₀/G₁ hasta 40.36%. Indicando un arresto del ciclo celular en la fase G₀/G₁ en ambas concentraciones evaluadas.

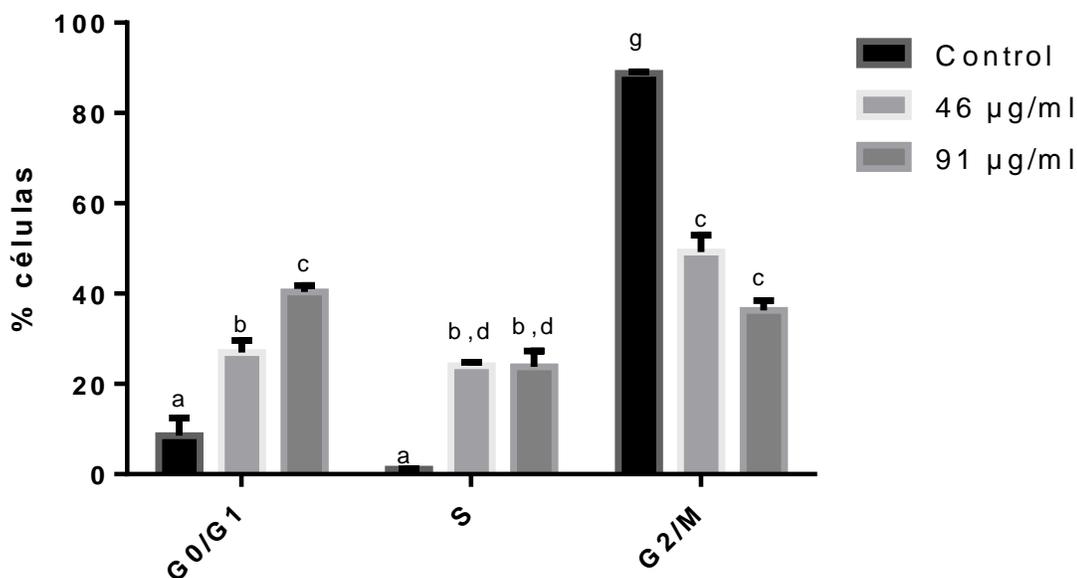


Figura 15. Arresto del ciclo celular en MCF-7 causado por el extracto acuso de *Stevia pilosa*. La gráfica representa la media \pm EE de tres experimentos independientes. Para el análisis estadístico se realizó un ANOVA con prueba *post hoc* Tukey ($P < 0.05$).

8.3.2 Citometría de flujo en la línea celular MDA-MB-231

Para la línea celular MDA-MB-231 también se evaluaron las concentraciones 75 µg/ml y 149 µg/ml (Figura 16 A-C). En la figura 16A, correspondiente al control se registró que el 78.28% de las células se encontraban en la fase G₂/M, 11.72% en la fase G₀/G₁ y 12.08% en fase S, en el segundo histograma observamos que al tratar las células con la concentración de 75 µg/ml (Figura 16B) disminuye el porcentaje de células en fase G₂/M llegando al 24.31%, en fase G₀/G₁ aumentaron hasta 23.26 % y en la fase S se registró un porcentaje de 55.65%. Al evaluar la siguiente concentración, 149 µg/ml, (Figura 16C) el porcentaje de células en fase S desciende

hasta el 40.85% y se registra un aumento en las células en fase G₀/G₁ hasta llegar a un porcentaje de 53.93%. Demostrando se promueve el arresto del ciclo celular en la fase G₀/G₁ cuando se trata a las células con las concentraciones del extracto acuoso de flor de *Stevia pilosa*. Los resultados obtenidos se presentan de forma gráfica en la Figura 17.

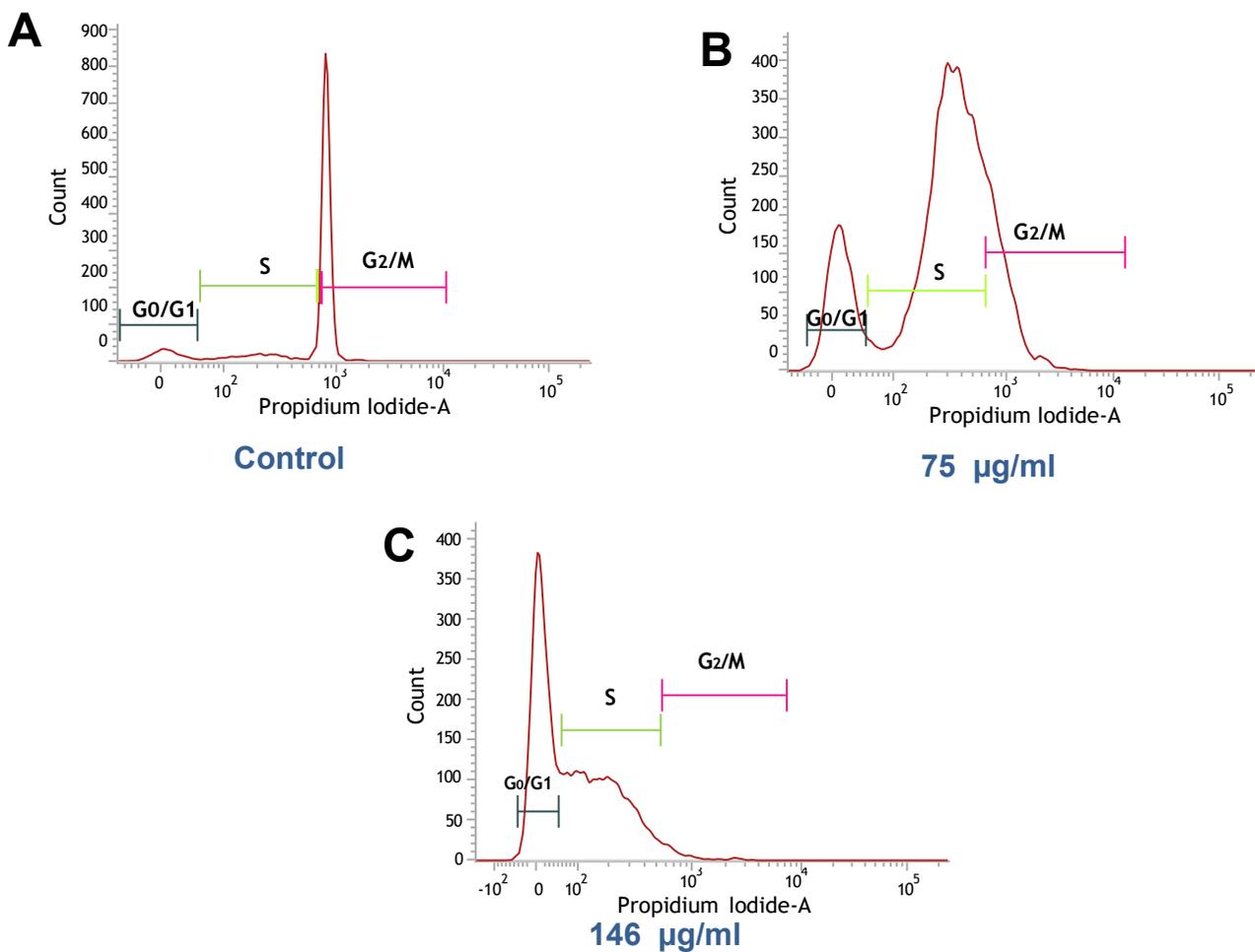


Figura 16. Arresto del ciclo celular en células de cáncer de mama MDA-MB-231 causado por el extracto acuoso de flor de *Stevia pilosa* evaluado por medio de citometría de flujo con yoduro de propidio. Los histogramas representan la media de tres experimentos independientes.

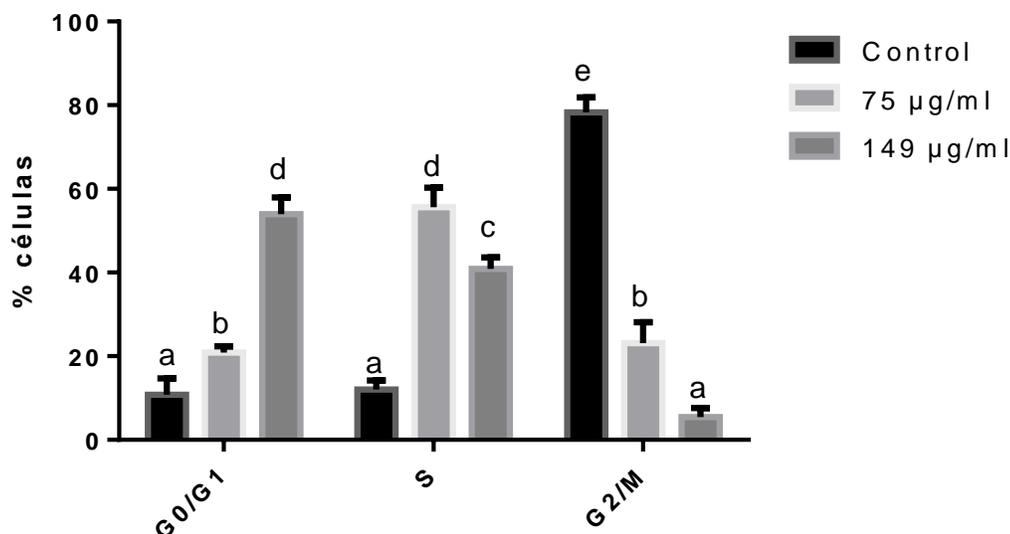


Figura 17. Arresto del ciclo celular en células de cáncer de mama MDA-MB-231 causado por el extracto acuoso de flor de *Stevia pilosa* evaluado por medio de citometría de flujo con yoduro de propidio. La gráfica representa la media \pm EE de tres experimentos independientes. Para el análisis estadístico se realizó un ANOVA con prueba *post hoc* Tukey ($P < 0.05$).

8.4 Evaluación de apoptosis

8.4.1 Citometría de flujo con Anexina V en MCF-7

Para identificar la inducción de apoptosis causada por el extracto acuoso de *Stevia pilosa* se realizó citometría de flujo usando Anexina V. En Figura 18, se muestran los resultados obtenidos. El primer cuadrante identificado con la letra Q1 corresponde a las células que sufrieron necrosis, el cuadrante Q2 corresponde a las células con apoptosis tardía, Q3 son células que presentan apoptosis temprana y Q4 representa a las células vivas. Se presentan los resultados del control positivo, en cual se le adicionó H_2O_2 para promover la apoptosis (Figura 18A), el control de células MCF-7 las cuales no se les adicionó ningún tratamiento (Figura 18B), finalmente se presentan las dos concentraciones a evaluar 46 µg/ml y 91 µg/ml (Figura 18 C-D).

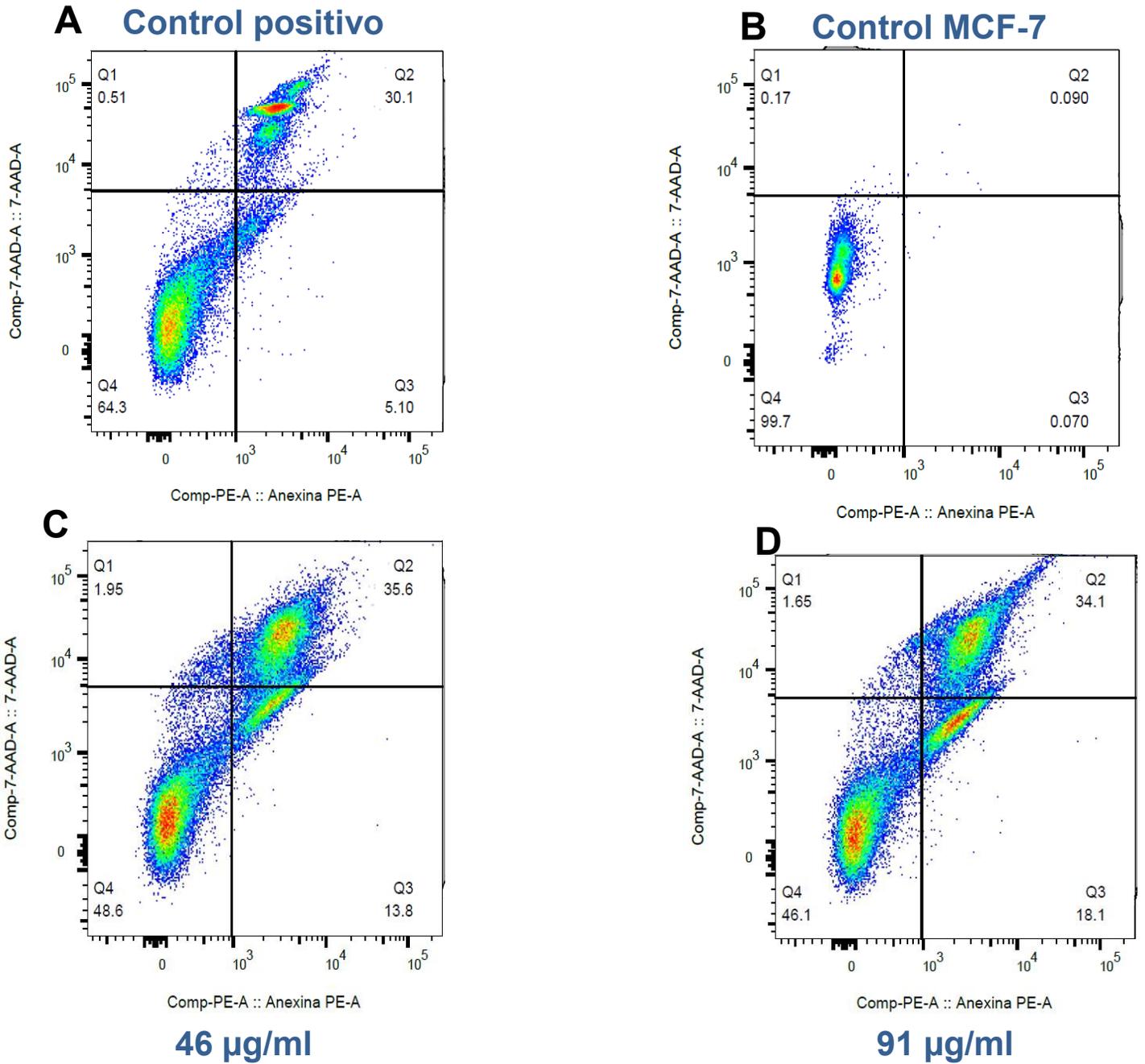


Figura 18. Inducción de apoptosis en células de cáncer de mama MCF-7 causado por el extracto acuoso de flor de *Stevia pilosa* evaluado por medio de citometría de flujo con Anexina V. Los resultados representan la media de tres experimentos independientes.

En la figura 19 A, se muestra la gráfica con los porcentajes obtenidos tomando en cuenta las células en apoptosis temprana y apoptosis tardía. El control positivo tuvo un porcentaje de apoptosis de 36.2%, en el control el porcentaje fue de 1.5%, para la concentración 46 $\mu\text{g/ml}$ fue de 47% finalmente hubo un incremento hasta 52% en la concentración 91 $\mu\text{g/ml}$. Ambas concentraciones evaluadas presentaron diferencia estadísticamente significativa con respecto al control positivo y al control de las células MCF-7. En la figura 21 B se muestran los porcentajes de células vivas, células en apoptosis temprana, células en apoptosis tardía y las células con necrosis.

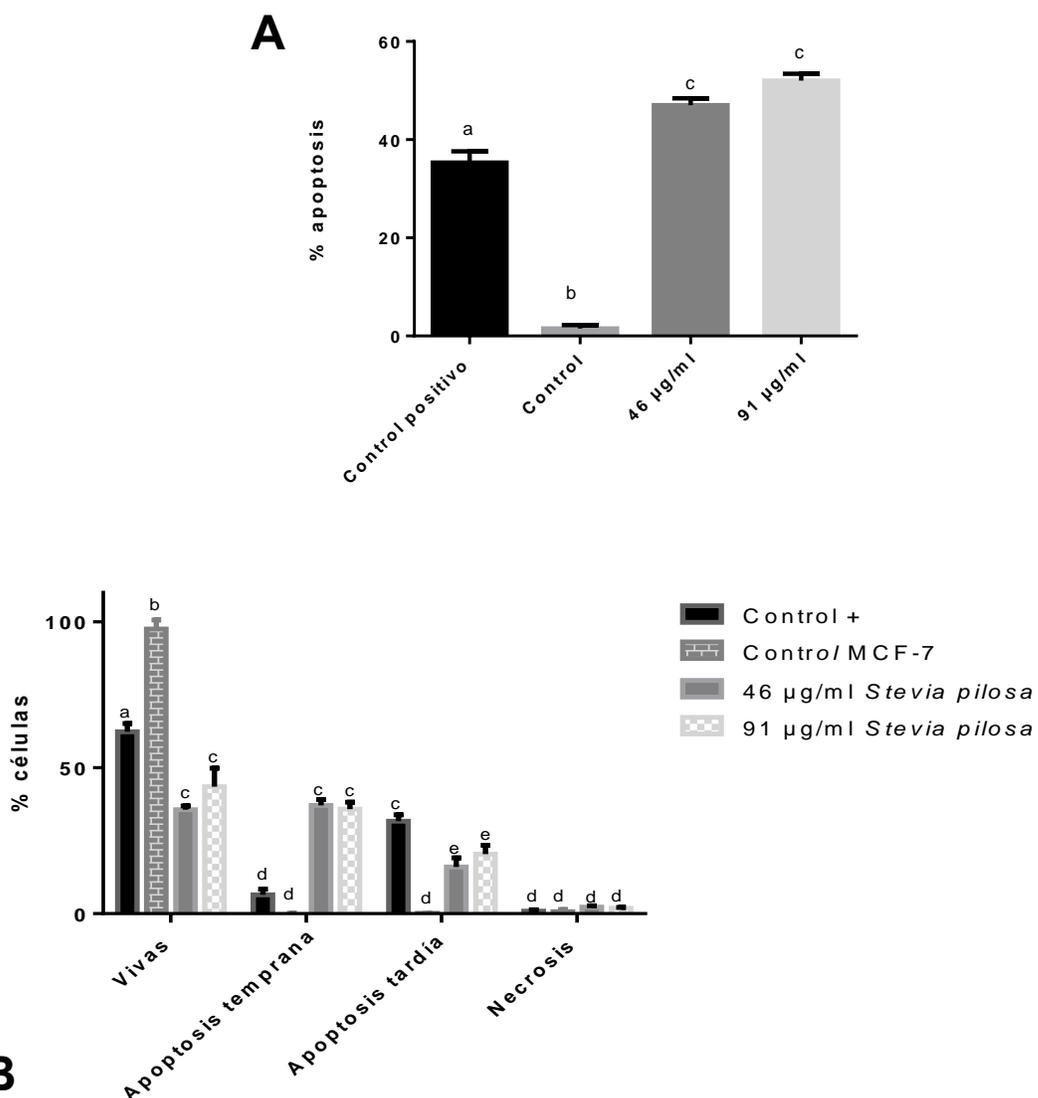


Figura 19. Inducción de apoptosis en células de cáncer de mama MCF-7 causado por

el extracto de *Stevia pilosa* evaluado por medio de citometría de flujo con Anexina V. A. Porcentaje de células en apoptosis. B. Porcentajes de células vivas, en apoptosis temprana, apoptosis tardía y necrosis. Las gráficas representan la media \pm EE de tres experimentos independientes. Para el análisis estadístico se realizó un ANOVA con prueba *post hoc* Tukey ($P < 0.05$).

8.4.2 Citometría de Anexina V en la línea celular MDA-MB-231

Al evaluar la línea celular MDA-MB-231 se obtuvieron los resultados mostrados en la figura 20. Se presenta el control positivo, el control de MDA-MB-231 y las concentraciones 75 $\mu\text{g/ml}$ y 149 $\mu\text{g/ml}$. En la figura 21 A, se muestra la gráfica con los porcentajes obtenidos en los cuales se tomaron en cuenta tanto las células en apoptosis temprana como las de apoptosis tardía para calcular el % de apoptosis. En la figura 21 B se muestran los porcentajes de células vivas, células en apoptosis temprana, células en apoptosis tardía y las células con necrosis. Se registró en el control positivo un porcentaje de apoptosis de 46.25%, en el control el porcentaje fue de 2%, para la concentración 75 $\mu\text{g/ml}$ fue de 28% finalmente hubo un incremento hasta 45.7% con la concentración de 149 $\mu\text{g/ml}$. Ambas concentraciones evaluadas presentaron diferencia estadísticamente significativa con respecto al control (Figura 21 A-B).

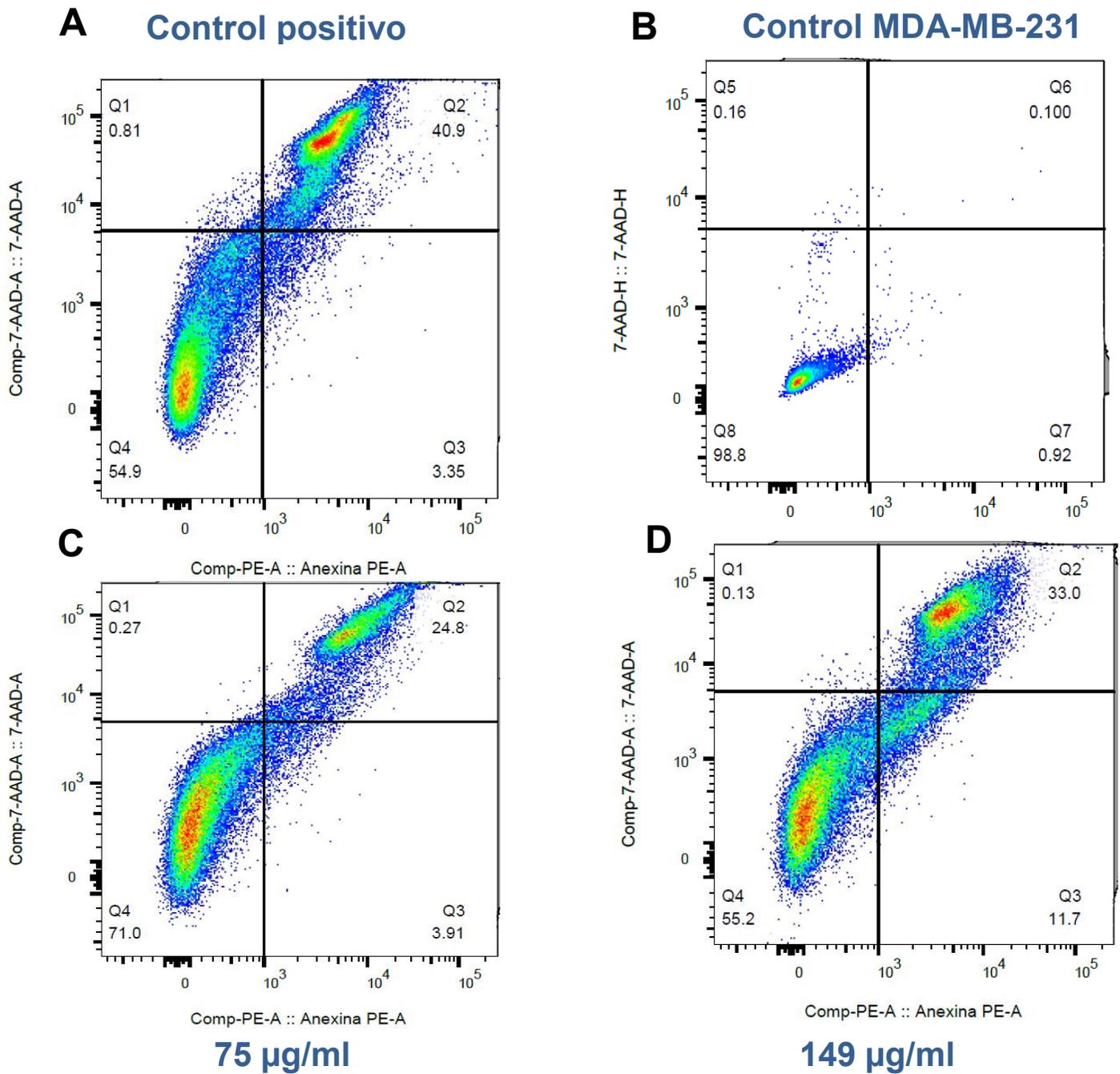


Figura 20. Inducción de apoptosis en células de cáncer de mama MDA-MB-231 causado por el extracto acuoso de flor de *Stevia pilosa* evaluado por medio de citometría de flujo con Anexina V. Los resultados representan la media de tres experimentos independientes.

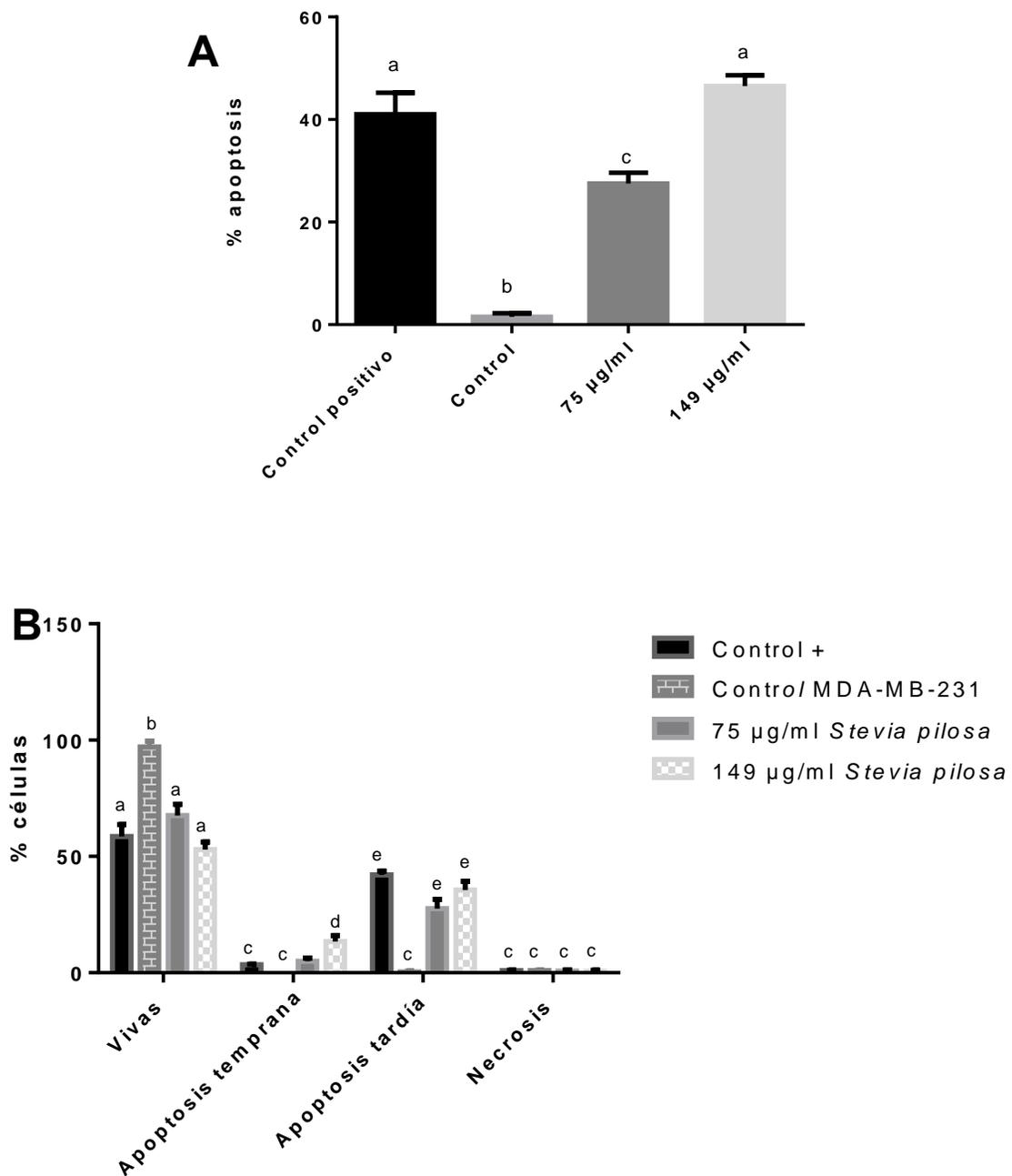


Figura 21. Inducción de apoptosis en células de cáncer de mama MDA-MB-231 causado por el extracto acuoso de flor de *Stevia pilosa* evaluado por medio de citometría de flujo con Anexina V. A. Porcentaje de células en apoptosis. B. Porcentajes de células vivas, en apoptosis temprana, apoptosis tardía y necrosis. La

gráfica representa la media \pm EE de tres experimentos independientes. Para el análisis estadístico se realizó un ANOVA con prueba *post hoc* Tukey ($P < 0.05$).

8.5 Evaluación invasión en MCF-7

En el ensayo de invasión con cámaras Transwell de la Figura 22 A-C, se observan las células de la línea celular MCF-7 que lograron atravesar la membrana del inserto recubierta de matriz extracelular tipo gelatina (Matrigel) que permite simular la matriz extracelular. Para este ensayo, se probaron dos concentraciones del extracto acuoso de *Stevia pilosa* de 46 $\mu\text{g/ml}$ y de 75 $\mu\text{g/ml}$, así como un control en el cual se utilizó medio DMEM sin suero fetal bovino. Para la parte inferior de la cámara se colocó medio DMEM suplementado con suero fetal bovino. Las micrografías mostradas en las figuras 22 A-C fueron tomadas a las 24 horas de tratamiento después de ser teñidas con colorante *Giemsa Strain*.

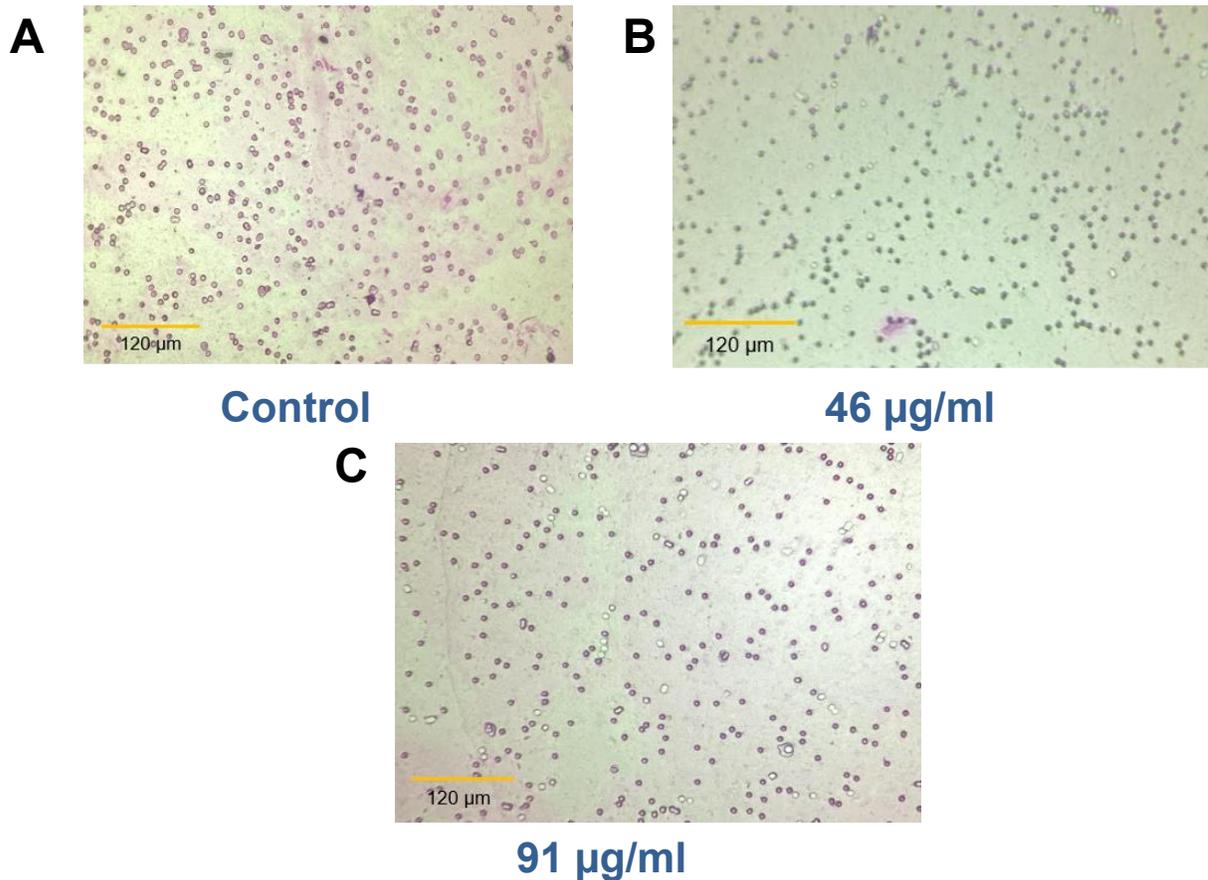


Figura 22. Micrografías del ensayo de invasión con cámaras Transwell en la línea celular MCF-7 tratadas por 24 horas con el extracto acuoso de flor de *Stevia pilosa*. **A-C** se muestra los grupos evaluados control y las concentraciones 46 µg/ml y 91 µg/ml . Las micrografías representan la media de tres experimentos independientes.

En la figura 23, se muestra de forma gráfica el promedio de los porcentajes de células invasivas obtenidas en el ensayo. El control representa el 100% de las células invasivas de la línea celular MCF-7, al evaluar la concentración 46 µg/ml el porcentaje de células disminuye hasta 52%, con la segunda concentración se observa que el porcentaje llega a 44.43%.

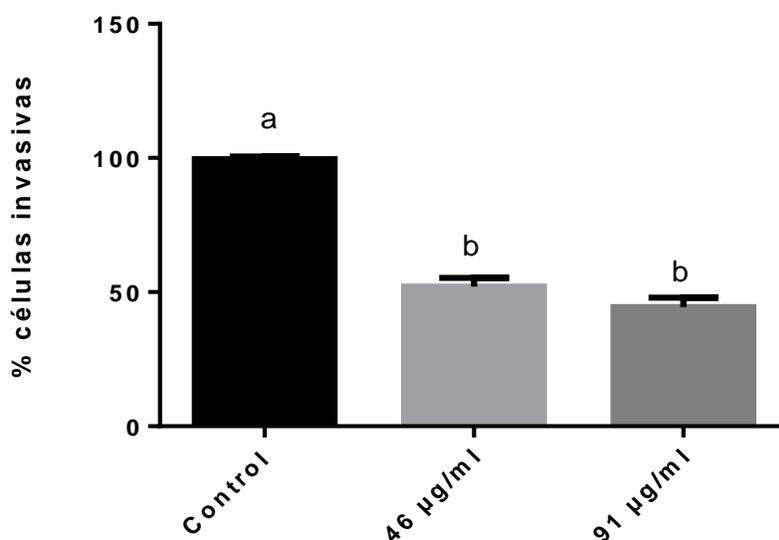


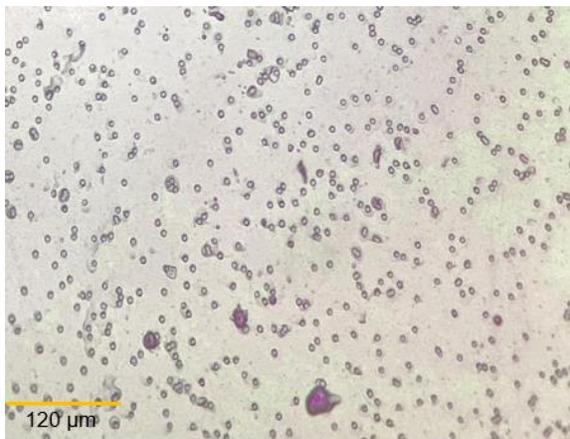
Figura 23. Ensayo de invasión con cámaras Transwell en la línea celular MCF-7 tratadas con las concentraciones de 46 µg/ml y de 91 µg/ml del extracto acuoso de *Stevia pilosa*. La gráfica representa la media \pm EE de tres experimentos independientes. Para el análisis estadístico se realizó un ANOVA con prueba *post hoc* Tukey ($P < 0.05$).

8.5.1 Evaluación invasión en MDA-MB-231

En la figura 24 A-C, se presentan las fotografías correspondientes al ensayo de invasión en cámaras Transwell de la línea celular MDA-MB-231, la figura 24A corresponde al control, la 24B a la concentración de 75 µg/ml y la figura 24C a la

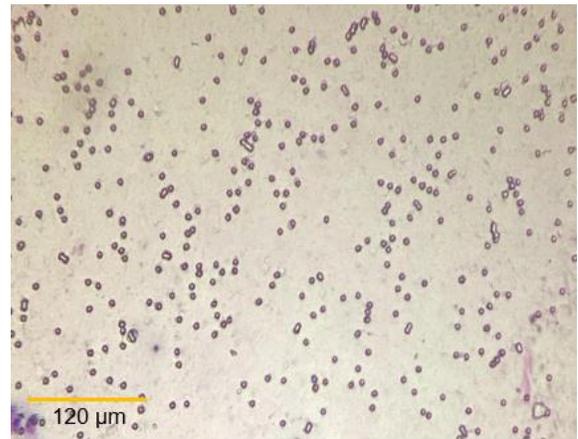
concentración de 149 $\mu\text{g}/\text{ml}$. La figura 25 muestra de forma gráfica los porcentajes obtenidos después de realizar 3 experimentos independientes. El control corresponde al 100%, en la concentración de 75 $\mu\text{g}/\text{ml}$ se obtuvo un porcentaje de 68.7% y con la de 149 $\mu\text{g}/\text{ml}$ se registró una disminución en el porcentaje de células invasivas de 51.09%. Se presenta un comportamiento dependiente de la concentración en la que a una concentración más elevada el porcentaje de células invasivas decrece. Mostrado ambas concentraciones una diferencia estadísticamente significativa tanto con control como entre ellas. Observándose así un efecto en la invasión dependiente de la concentración.

A



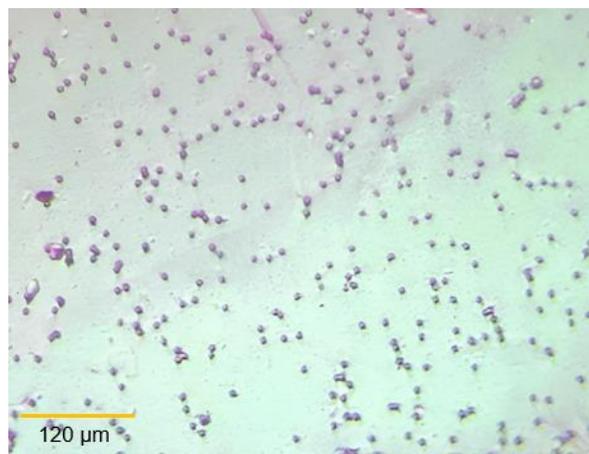
Control

B



75 $\mu\text{g}/\text{ml}$

C



149 $\mu\text{g}/\text{ml}$

Figura 24. Micrografías del ensayo de invasión con cámaras Transwell en la línea celular MDA-MB-231 con el extracto acuoso de *Stevia pilosa*. Las micrografías representan los grupos evaluados, el A corresponde al control de MDA-MB-231, el B y C muestran los resultados de las células tratadas con las concentraciones de 75 $\mu\text{g/ml}$ y 149 $\mu\text{g/ml}$. Las micrografías representan la media de tres experimentos independientes.

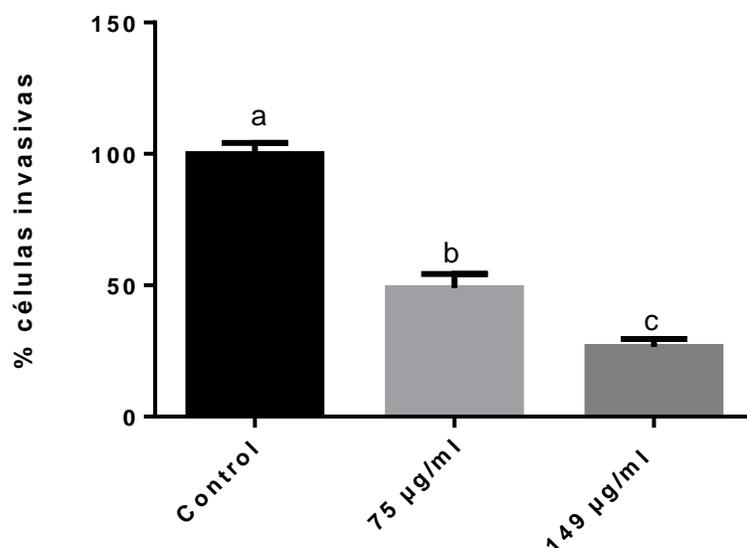


Figura 25. Ensayo de invasión con cámaras Transwell en la línea celular MDA-MB-231 con el extracto acuoso de *Stevia pilosa*. La gráfica representa la media \pm EE de tres experimentos independientes. Para el análisis estadístico se realizó un ANOVA con prueba *post hoc* Tukey ($P < 0.05$).

8.6 Evaluación de angiogénesis

8.6.1 Ensayo de angiogénesis con el extracto de *Stevia pilosa*

Para probar el posible efecto del extracto acuoso de flor de *Stevia pilosa* se evaluaron dos concentraciones del extracto, 75 $\mu\text{g/ml}$ y 149 $\mu\text{g/ml}$, así como un control sano. En la Figura 26, se muestran las fotografías tomadas en el día 0 que correspondiente al día en el que se inició el experimento, igualmente se muestra el día 2, 4 y 6. El día 6 corresponde al día 11 de la incubación de los embriones de pollo.

En la figura 27, se presenta de forma gráfica el conteo de número de vasos a través de los días que duró el experimento. En el día 0 ninguna de las concentraciones evaluadas ni el control presentaron diferencia estadísticamente significativa. En el grupo control se registraron en promedio 11.66 vasos sanguíneos, en el grupo de la concentración de 75 $\mu\text{g/ml}$ se observaron 12.33 vasos sanguíneos y en el grupo con la concentración de 149 $\mu\text{g/ml}$ se observaron 10.33 vasos sanguíneos. En el día 2, el control tuvo 15.33, en la concentración de 75 $\mu\text{g/ml}$ fueron 14 vasos sanguíneos y 11.33 vasos con la concentración de 149 $\mu\text{g/ml}$. En el día 4 del ensayo, el control sano y la concentración de 75 $\mu\text{g/ml}$ no presentan diferencia estadística con 20.33 vasos sanguíneos y 16.66, respectivamente. Sin embargo, la concentración de 149 $\mu\text{g/ml}$ tiene un conteo de 12 vasos sanguíneos y presenta una diferencia estadísticamente significativa con respecto al control y a la concentración de 75 $\mu\text{g/ml}$. El último día del ensayo, el día 6, el número de vasos sanguíneos continua aumentando en el control hasta llegar a 25, para la concentración de 75 $\mu\text{g/ml}$ se registraron 18.33 vasos sanguíneos y con 149 $\mu\text{g/ml}$ presenta 12.66 vasos. Ambas concentraciones presentaron una diferencia estadística con respecto al control y entre ellas. Mientras que en el control sano el conteo de número de vasos sanguíneos aumenta significativamente al pasar de los días, en las concentraciones evaluadas a partir del día 4 podemos observar que el número de vasos sanguíneos se mantienen hasta el final del experimento.

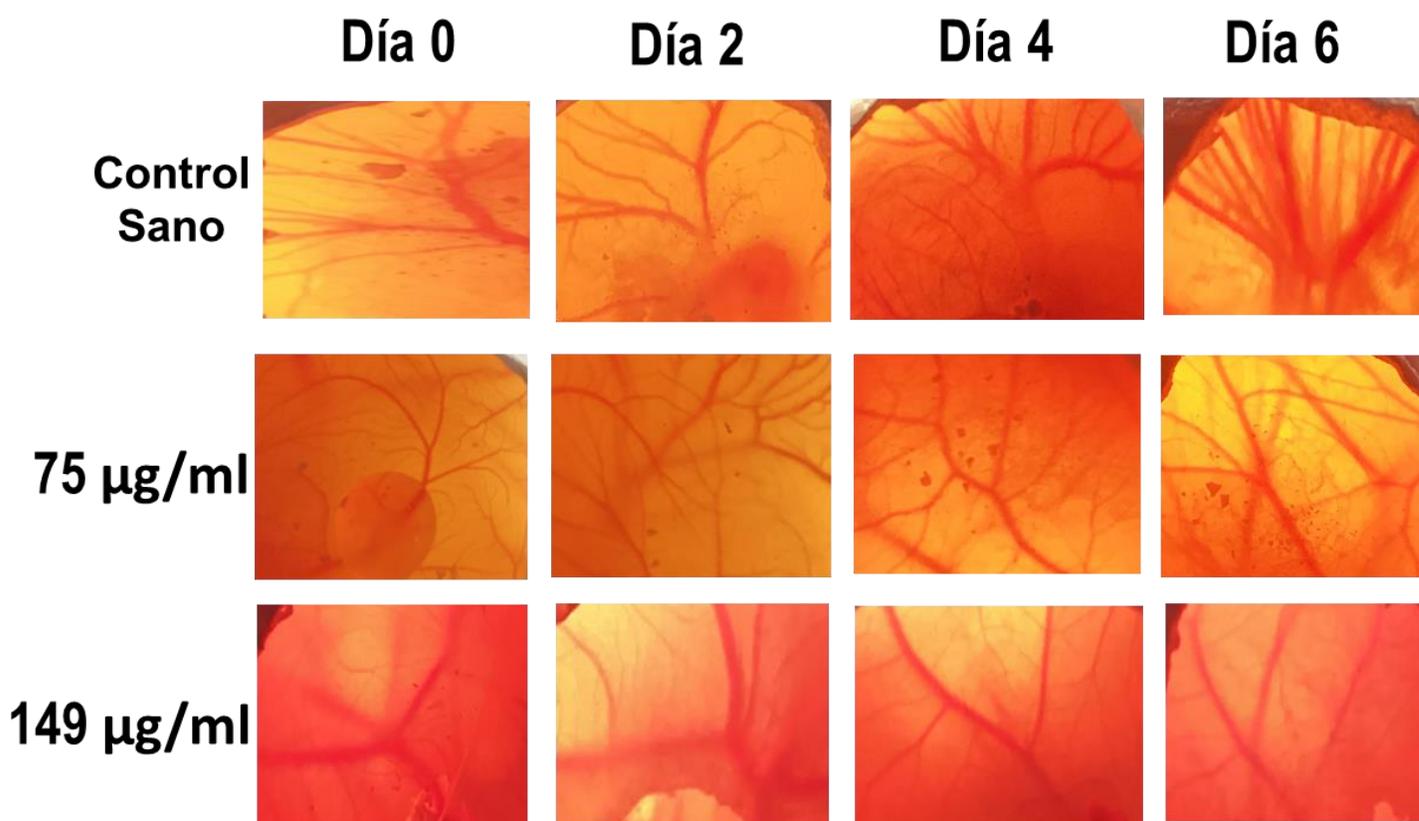


Figura 26. Fotografías de los embriones en el ensayo de angiogénesis. Las fotografías muestran la membrana corioalantoidea de los grupos evaluados a lo largo de los días que duro el experimento. Se evaluaron el control sano y las dos concentraciones del extracto acuoso de flor de *Stevia pilosa* 75 µg/ml y 149 µg/ml. Las fotografías representan la media de tres experimentos independientes.

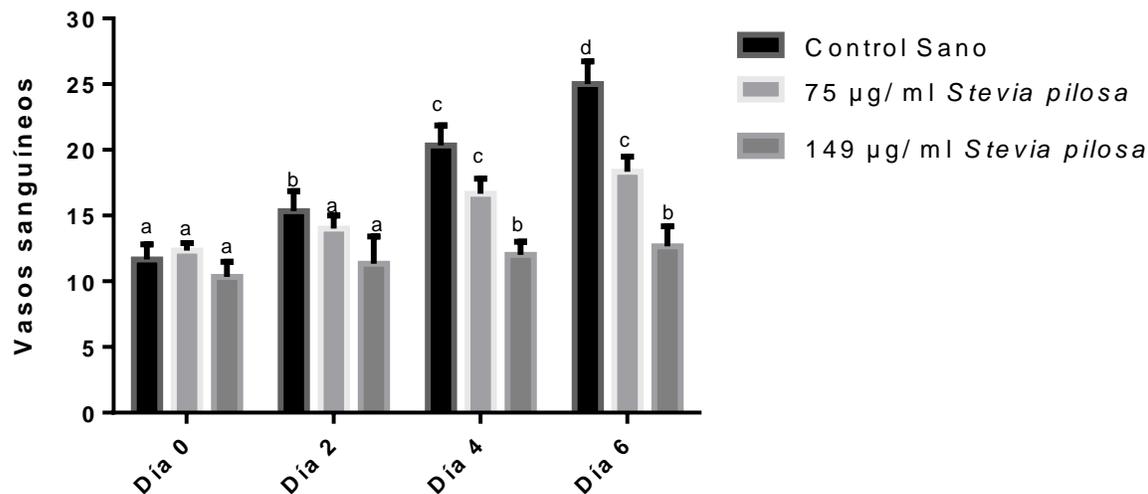


Figura 27. Ensayo de angiogénesis en embriones de pollo tratados con el extracto acuoso de flor de *Stevia pilosa*. La gráfica representa la media \pm EE de tres experimentos independientes.

8.6.2 Ensayo de angiogénesis en la línea celular MCF-7

En la figura 28 se muestran fotografías del ensayo de angiogénesis en embriones de pollo, a los cuales se les implantaron células MCF-7. En la primera fila se presenta el control sano, en la siguiente el control de MCF-7 en el que se le implantaron células de esta línea celular, la tercer fila corresponde a los embriones que se les implantaron células MCF-7 y adicionalmente la concentración 46 µg/ml del extracto de flor de *Stevia pilosa*. En la última fila se puede observar las fotografías de los embriones a los que se implantaron células y la concentración de 91 µg/ml del extracto.

En la figura 29, se muestra la gráfica con los resultados obtenidos del ensayo de angiogénesis. Los resultados se presentan como número de vasos sanguíneos en los diferentes días que duró el experimento.

Se obtuvieron los siguientes resultados, en el día 0 el control sano presentó en promedio 11.66 vasos sanguíneos, el control de MCF-7 10.34, con la concentración de 46 µg/ml 12.33 vasos y con 91 µg/ml 11 vasos sanguíneos. Ninguno de los valores mostró diferencia estadísticamente significativa. Para el día 2 se observa un aumento en el número de vasos sanguíneos en el control sano y el control con MCF-7 llegando a 15.33 y 21.66, respectivamente. En este mismo día en las

concentraciones evaluadas, se contaron 13.66 vasos para la concentración de 46 $\mu\text{g/ml}$ y 12 vasos sanguíneos para la concentración de 91 $\mu\text{g/ml}$. En el día 6 el control sano tuvo 25 vasos sanguíneos, en el control de MCF-7 29.66, para 46 $\mu\text{g/ml}$ 14 vasos y con 91 $\mu\text{g/ml}$ fue de 13 vasos sanguíneos. Se puede observar un aumento significativo del número de vasos en los diferentes días en ambos controles mientras que en las concentraciones evaluadas en ningún día se presenta un incremento de vasos que sea estadísticamente significativo. Al comparar el control sano y el control con células MCF-7 se muestra un aumento en el número de vasos sanguíneos al implantarles las células de cáncer de mama.

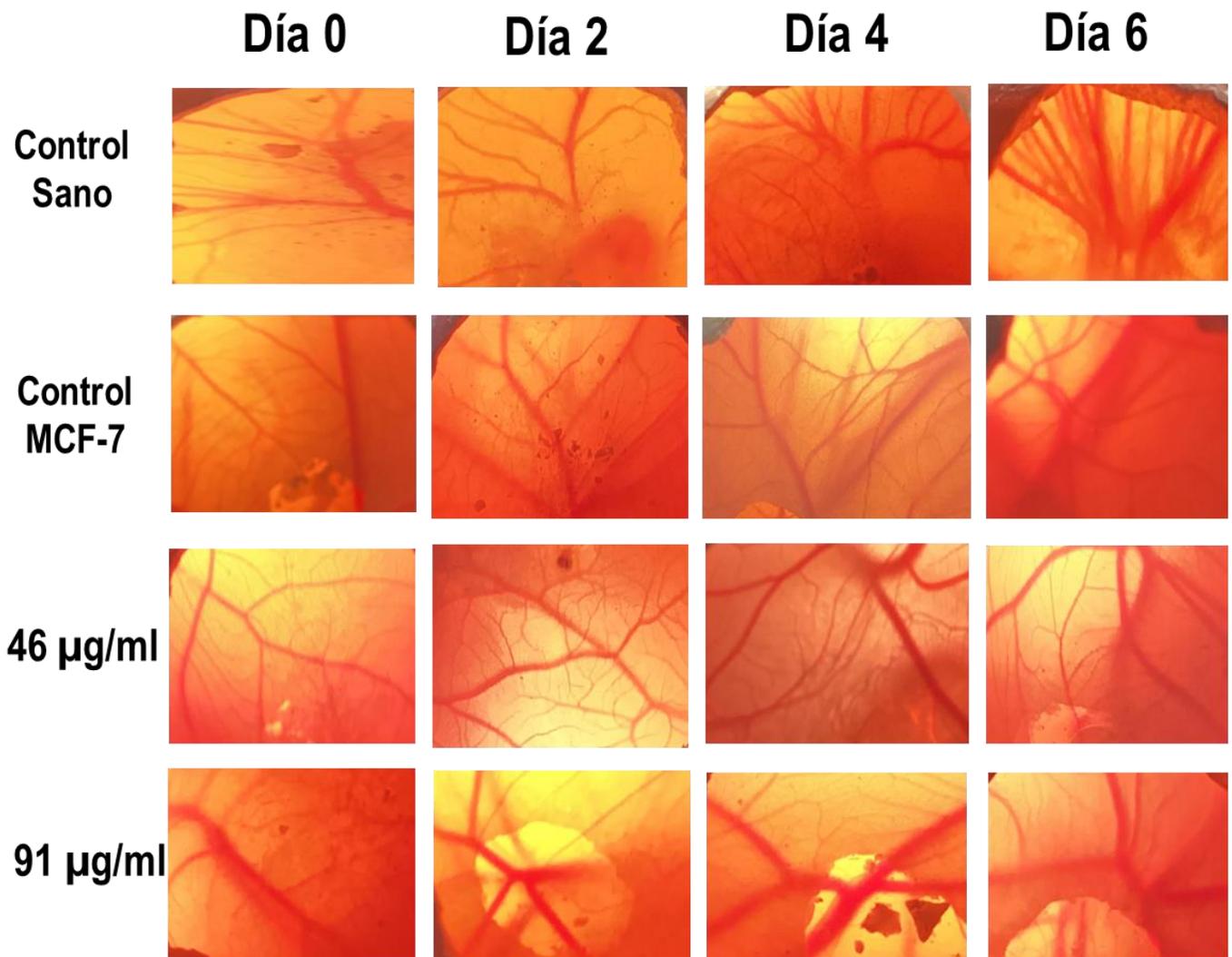


Figura 28. Fotografías del ensayo de angiogénesis con embriones de pollo implantados con células MCF-7 previamente tratadas con el extracto acuoso de flor de *Stevia pilosa*. Las fotografías muestran la membrana corioalantoidea a lo largo de los días que duró el experimento. Se evaluaron el control sano, control de MCF-7 y las dos concentraciones del extracto acuoso de flor de *Stevia pilosa* 46 $\mu\text{g/ml}$ y 91 $\mu\text{g/ml}$. Las fotografías representan la media de tres experimentos independientes.

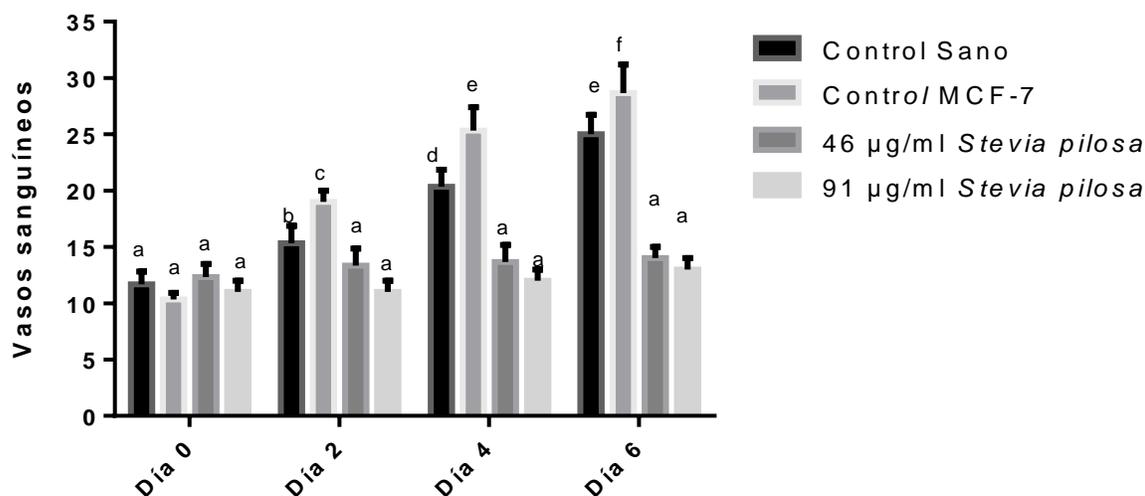


Figura 29. Ensayo de angiogénesis en embriones de pollo implantados con células de cáncer de mama MCF-7 tratadas con el extracto acuoso de flor de *Stevia pilosa*. La gráfica representa la media \pm EE de tres experimentos independientes.

8.6.3 Angiogénesis en la línea celular MDA-MB-231

Los resultados del ensayo de angiogénesis en embriones de pollos a los que se les implantaron células MDA-MB-231 se presentan en la Figura 30.

Se muestran las fotografías tomadas en los días 0, 2, 4 y 6 del ensayo de angiogénesis, se evaluaron el control sano, control con células MDA-MB-231, embriones de pollo con células MDA-MB-231 y la concentración de 75 $\mu\text{g/ml}$, y embriones con células MDA-MB-231 y la concentración de 149 $\mu\text{g/ml}$ (Figura 30).

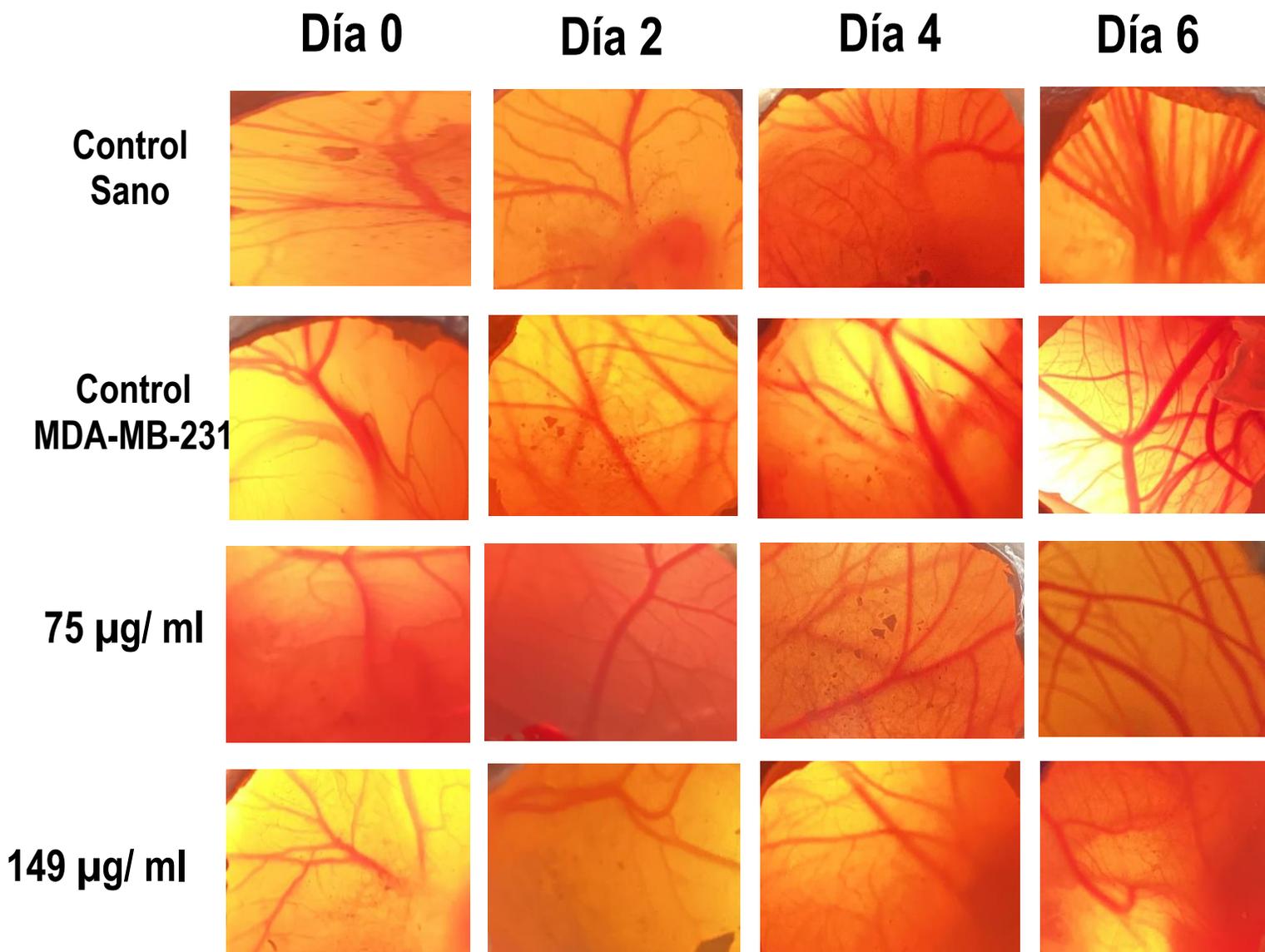


Figura 30. Fotografías del ensayo de angiogénesis con embriones de pollo implantados con células MDA-MB-231 previamente tratadas con las concentraciones de 75 µg/ml y 149 µg/ml del extracto acuoso de flor de *Stevia pilosa*. Las fotografías muestran la membrana corioalantoidea a lo largo de los días que duró el experimento 0,2, 4 y 6. Se evaluaron el control sano, control de MDA-MB-231 y las dos concentraciones del extracto acuoso de flor de *Stevia pilosa*. Las fotografías representan la media de tres experimentos independientes.

En la figura 31 se muestra gráficamente el número de vasos de los embriones de pollo a lo largo de los días del experimento, El número de vasos sanguíneos cuantificados para el día 0, no se presenta diferencia estadísticamente significativa en ninguno de los grupos evaluados. En el día 2, el control sano y el control de MDA-MB-231 mostraron un aumento en el número de vasos con 15.33 y 19.66, respectivamente. Para las concentraciones evaluadas de 75 $\mu\text{g/ml}$ y de 149 $\mu\text{g/ml}$, se registraron 12.33 y 11.33, respectivamente. Al llegar al día 4 del experimento, se obtuvieron los siguientes resultados, control sano tuvo 20.33 vasos sanguíneos, control MDA-MB-231 24.66, la concentración de 75 $\mu\text{g/ml}$ tuvo 13.33 y con la concentración de 149 $\mu\text{g/ml}$ se observaron 11.66 vasos. El día final del experimento se pudo observar un aumento en el número de vasos en el control y control MDA-MB-231. Este último día se presentó una diferencia estadísticamente significativa entre el control de MDA-MB-231 con 32.66 vasos y el control sano 25. Las concentraciones obtuvieron 14.65 vasos con 75 $\mu\text{g/ml}$ y 12.66 vasos con la de 149 $\mu\text{g/ml}$. En ninguna de las concentraciones evaluadas es posible observar una diferencia que sea estadísticamente significativa, durante los días que duró el ensayo; mientras que en los controles el incremento de vasos es visible cada uno de los días evaluados.

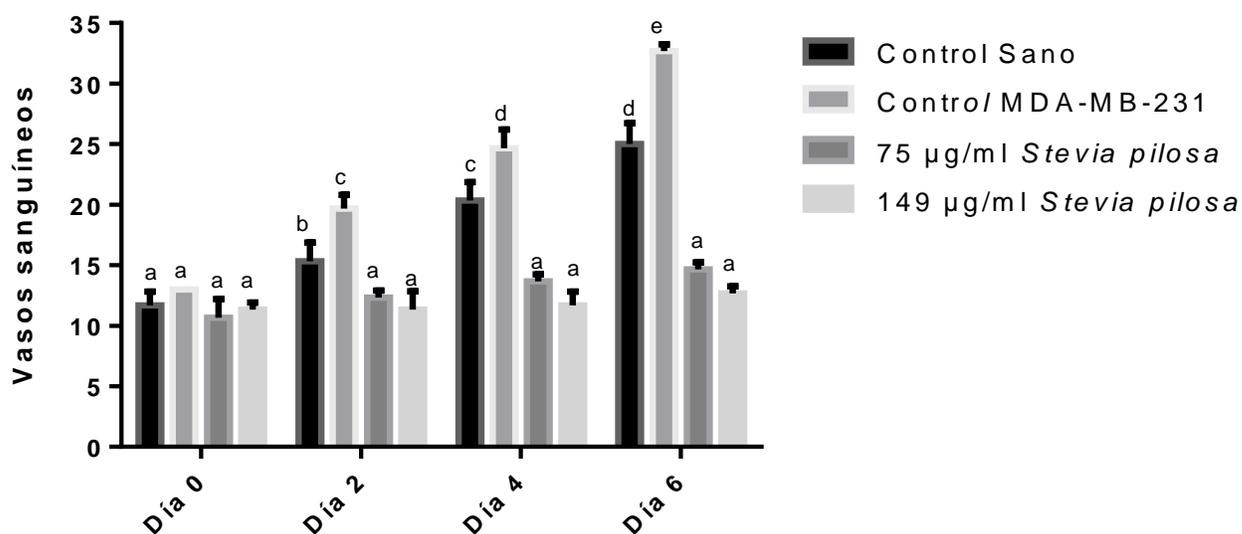


Figura 31. Ensayo de angiogénesis en embriones de pollo implantados con células de cáncer de mama MDA-MB-231 tratadas con el extracto acuoso de flor de *Stevia pilosa*. La gráfica representa la media \pm EE de tres experimentos independientes.

Finalmente, en la figura 32 se muestra de forma gráfica la comparación del conteo de número de vasos sanguíneos entre los resultados obtenidos cuando se adicionaba a los embriones de pollo con las concentraciones de 75 $\mu\text{g/ml}$ y 150 μl del extracto de *Stevia pilosa* (Figura 27-28) y los resultados del conteo de vasos sanguíneos cuando además de la concentración 75 $\mu\text{g/ml}$ y 150 μl , respectivamente, se implantaban células de cáncer de mama MDA-MB-231. La gráfica muestra que en la concentración de 75 $\mu\text{g/ml}$ no se observa una diferencia estadísticamente significativa, y con la concentración de 150 $\mu\text{g/ml}$ se observa diferencia entre el ensayo sin células y el ensayo con células MDA-MB-231.

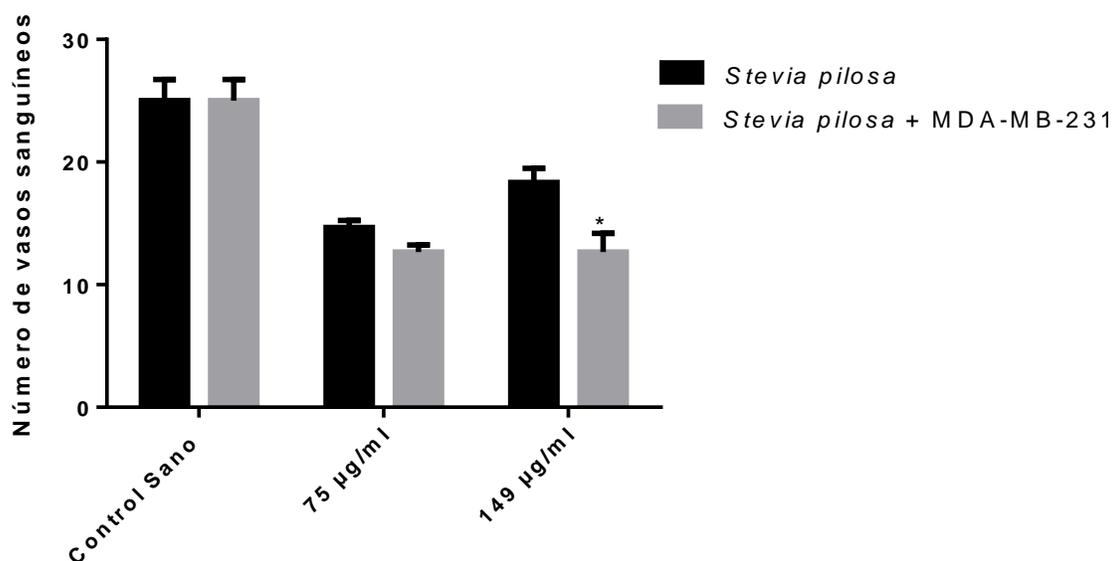


Figura 32. Comparación entre los resultado entre el extracto de flor de *Stevia pilosa* en embriones de pollo y los embriones de pollo implantados con células de cáncer de mama MDA-MB-231 tratadas con el extracto acuoso de flor de *Stevia pilosa*. La gráfica representa la media \pm EE de tres experimentos independientes.

9. DISCUSION

Para el extracto de la flor de *Stevia pilosa* en células MCF-7, todas las concentraciones evaluadas disminuyeron el porcentaje de células vivas y se obtuvo una IC₅₀ de 96.4 µg/ml en el ensayo de proliferación. En células MDA-MB-231, hasta la segunda concentración evaluada presentó una diferencia significativa con el control y tuvo una IC₅₀ de 152 µg/ml. Las células MCF-7 mostraron mayor sensibilidad al extracto que las células MDA-MB-231.

Otras especies del género *Stevia* también han mostrado efecto antiproliferativo en diversos tipos celulares, como cáncer de colon (Caco2), de pulmón (A-549), cáncer cervicouterino (HeLA), cáncer pancreático, en cáncer de mama (MDA-MB-231) y en células B16F1. En investigaciones anteriores, se reportó que el extracto etanólico de *Stevia rebaudiana*, la especie mejor estudiada de este género, presenta una concentración inhibitoria media de 230 µg/ml en células de cáncer de colon HCT116 y un extracto metanólico reporta una IC₅₀ de 228 µg/ml. En la línea celular MCF-7, un extracto hidroalcohólico tiene una IC₅₀ de 98.82 µg/ml, una concentración muy similar a la obtenida en este trabajo de investigación; adicionalmente, se ha reportado que el extracto metanólico de *Stevia eupatoria* disminuye significativamente las células de cáncer de próstata andrógeno-dependientes (LNCaP) y andrógeno-independientes (PC-3) a partir de 250 µg/ml (Borgo y col., 2021; Ibrahim y col., 2020; Kulkarni y col., 2021; López y col., 2016; Martínez y col., 2020; Schokrzadeh y col., 2018; Vasko y col., 2014).

Evaluaciones realizadas por nuestro grupo de trabajo muestran que el extracto metanólico de raíz de *Stevia pilosa* tiene efecto antiproliferativo a concentraciones mayores de 250 µg/ml en las líneas celulares de cáncer de próstata LNCaP y PC-3 (Martínez y col., 2020). Con base en nuestros resultados, podemos reconocer que el extracto acuoso de flor de *Stevia pilosa* muestra mayor poder antiproliferativo que la mayoría de los extractos anteriormente reportados en diferentes especies del mismo género, al tener efecto similar a concentraciones menores.

Con los ensayos con citometría de flujo de Anexina V, logramos determinar que el extracto acuoso de *Stevia pilosa* induce la apoptosis en ambas líneas celulares de cáncer de mama, MCF-7 y MDA-MB-23, se puede observar un incremento en el porcentaje de células apoptóticas con ambas concentraciones evaluadas (MCF-7 46 µg/ml y 91 µg/ml; MDA-MB-231 75 µg/ml y 150 µl) . En la línea celular MDA-MB-231, se observa mayor porcentaje de apoptosis con la concentración más alta (149 µg/ml).

La apoptosis se define como el proceso ordenado de muerte celular que, bajo condiciones normales, ayuda a eliminar células que han sufrido algún daño, han envejecido o que ya no son necesarias. La apoptosis es crucial para prevenir la proliferación descontrolada y su posterior acumulación. En cáncer, las células tienden a perder la capacidad de entrar en apoptosis. Por lo tanto, la promoción de la apoptosis es fundamental para controlar estas células cancerosas, eliminarlas y frenar la progresión tumoral. Este proceso está regulado por una amplia gama de proteínas, entre las que destacan la activación de caspasas, proteínas de la familia de Bcl-2 que controlan la permeabilidad de la membrana, la liberación del citocromo C, proteínas proapoptóticas como Bax. Diversos compuestos son capaces de regular positiva o negativamente todas estas proteínas, entre ellos se encuentran algunos de los compuestos que logramos identificar en el extracto de *Stevia pilosa* a los que se le puede atribuir su efecto antiapoptótico (Kari y col., 2022; Singh y col., 2019)

Al examinar los efectos del extracto acuoso de *Stevia pilosa* en el ciclo celular, se observó que en los controles de MCF-7 la mayoría de las células estaban en la fase G2/M, cuando se expusieron a ambas concentraciones del extracto hubo un cambio de distribución en la que las células se acumularon en la fase G0/G1. Con la línea celular MDA-MB-231, las mayoría de las células se encontraba en fase S, y con el extracto también se produjo un arresto del ciclo celular en fase G0/G1. La acumulación de células de ambas líneas celulares en fase G0/G1 nos indica que el extracto acuoso de flor de *Stevia pilosa* causa arresto del ciclo celular con las diferentes concentraciones evaluadas.

En el arresto en el ciclo celular la célula entra en un estado de “pausa” en el que se detiene la continuidad normal del ciclo, evitando así una proliferación desregulada. Durante la progresión del ciclo celular, es posible encontrar puntos de control que determinan si la célula es apta para continuar con el ciclo y si hay las condiciones necesarias para avanzar a la siguiente fase. Las fases principales son fase G1, S, G2 y M, así como fase G0, en la que las células entran en arresto. El ciclo celular es cuidadosamente regulado por diversas proteínas, como las ciclinas, las cinasas dependientes de ciclinas (Cdks), inhibidores de ciclinas (como p21, p16, p15 y p27) que aumentan su expresión en el arresto del ciclo celular, p53 y retinoblastoma, que detiene la división celular. El extracto de flor de *Stevia pilosa* tiene compuestos que ha reportado cambios en la expresión de estas proteínas del ciclo celular (Stallaert y col., 2022).

Los efectos en la proliferación, la promoción de la apoptosis y el arresto del ciclo celular causado por el extracto acuoso de flor de *Stevia pilosa*, pueden explicarse por los

distintos metabolitos que constituyen el extracto. En este trabajo de investigación, logramos identificar algunos de los compuestos presentes en el extracto acuoso de flor de *Stevia pilosa*; algunos de ellos han demostrado, en diversos estudios, tener propiedades anticancerígenas; los más destacables son la cumarina, D-limoneno, piperonal, 2-pentenal, o-cimeno, la butirolactona y el maltol. Los efectos en cáncer de estos compuestos, al evaluarlos de forma individual son consistentes con los resultados de este trabajo de investigación utilizando el extracto acuoso de flor de *Stevia pilosa*.

La cumarina es ampliamente estudiada debido a sus diversas actividades biológicas, desde su capacidad antioxidante hasta efectos en cáncer. Se ha comprobado que la cumarina induce apoptosis y causa arresto del ciclo celular en varias líneas celulares; se ha reportado que promueve la apoptosis en células de leucemia Jurkat y HL60. Se ha estudiado a la cumarina conjugada con ácido maslínico en las líneas celulares cancerosas B16-F10, HT29 y HepG2, en las cuales se presentó un efecto citotóxico, con una tasa de células en apoptosis de entre 40 y 85%; al evaluar la distribución en el ciclo celular, se encontró que aumentó el número de células que se encuentran en la fase G0/G1. En células HeLA de cáncer cervicouterino, la cumarina causó arresto del ciclo celular y apoptosis mediante la disminución del potencial de membrana, liberación de citocromo C, activación de caspasa 3, se observó una regulación negativa de NF- κ B y se registró la liberación del factor inductor de apoptosis (AIF), una proteína proapoptótica (Alvarez-Delgado y col., 2009; Annunziata y col., 2020; Appendino y col., 2004; Chuang y col., 2007; Vega-Granados y col., 2021; Widelski y col., 2017).

Ahmed y colaboradores reportaron que una cumarina sintetizada inhibía la proliferación en las líneas celulares de cáncer de mama MCF-7 y de próstata PC-3. En la línea celular PC-3, esta cumarina promovió la detención del crecimiento en la fase G2/M e indujo la apoptosis activando la caspasa-9. Sin importar el origen de la cumarina, ya sea de origen vegetal o sintetizada, se ha demostrado que conserva su efecto en células de cáncer desde muy bajas concentraciones (Ahmed y col., 2020; Wu y col., 2020).

Asimismo, se reportó que la cumarina regulaba la expresión de Mcl-1 en la línea celular CLL de leucemia linfocítica crónica. Mcl-1 es una proteína antiapoptotica de la familia de Bcl-2; esta proteína está sobreexpresada en muchos tumores y se asocia con un mal pronóstico, tumorigénesis y resistencia a quimioterapéuticos (Gholami, 2018; Wang y col., 2021).

Derivados de cumarina han demostrado mantener efectos significativos en la proliferación celular, apoptosis y regulación del ciclo celular. Algunos de estos incluyen a la clausenidina, la esculetina y TCH-5, estos derivados han sido probados en diferentes líneas celulares, como de cáncer de colon HT29, de laringe y de cáncer de

mama SK-BR-3. Los estudios revelan que estos derivados de cumarina tienen capacidad para inhibir la proliferación, promover la apoptosis por la vía intrínseca, inducir la detención del ciclo celular en la fase G0/G1, incrementar en la expresión de p21, Bax, liberación de Citocromo C, Apaf-1, caspasas 3 y 9. La cumarina también tiene efectos en la generación de especies reactivas de oxígeno; además, se ha demostrado que diferentes derivados de cumarina disminuyen los niveles de expresión de proteínas involucradas en la vía de señalización de PI3K/Akt/mTOR (Cui y col., 2019; Waziri y col., 2016; Wu y col., 2020; Zhang y col., 2019).

Por su parte, el D-Limoneno, uno de los compuestos que logramos identificar en el extracto acuoso de *Stevia pilosa*, se ha estudiado por sus propiedades anticancerígenas; al probarlo en células de carcinoma gástrico BGC-823, el D-limoneno logró inducir la formación de cuerpos apoptóticos y disminuir la expresión de las proteínas Bcl-2 y p53. En células de cáncer de pulmón, disminuye la proliferación celular y el crecimiento de tumores en ratones; aumentando la expresión de genes relacionados con la autofagia y apoptosis. El D-limoneno tiene efectos inhibidores de la proliferación en células de linfoma, aumenta los niveles de óxido nítrico (NO) y se reportó que induce la apoptosis por medio de la activación de la vía de ERK y la producción de H₂O₂. En células de vejiga humana T24, aumenta la expresión de las proteínas Bax y caspasa 3, y los niveles de Bcl-2 disminuyen. El D-limoneno, en combinación con el quimioteráutico 5-FU, aumentó el efecto inhibitor del 5-FU en solitario (Lu, 2004; Manuele y col., 2010; Ye y col., 2020; Yu y col., 2018).

En cuanto al ciclo celular, se indujo la detención del ciclo celular en la fase G2/M. En cáncer de mama, se identificaron niveles más bajos de la ciclina D1 al tratarlas con D-limoneno. Este metabolito es capaz de promover apoptosis y detención del ciclo celular en la fase G2/M en células de cáncer de mama MCF-7. A nivel proteico, se detectó una disminución en la ciclina B1 y en CDK1; este complejo es capaz de coordinar la progresión del ciclo celular en la fase G2/M. En esta fase, hay una mayor demanda de energía para para la transición G2/M, y el complejo permite a las células detectar y responder de manera adecuada a este requerimiento energético, promoviendo así la respiración mitocondrial (Chebet y col., 2021; Mandal y col., 2022; Wang y col., 2014; Xie y col., 2019; Ye y col., 2020).

El piperonal, también presente en el extracto de *Stevia pilosa*, ha sido estudiado en varias líneas celulares de cáncer, derivados de piperonal, por ejemplo, han reportado inhibir la proliferación en líneas de cáncer de pulmón A549, de cáncer de mama MCF-7, RD de rhabdomyosarcoma y de cáncer de colon HC116. Adicionalmente, Muhammad y colaboradores sintetizaron una chalcona sustituida con piperonal, que presenta una

actividad anti tumoral en modelos de ratas con tumores mamarios (MNU) (Aleksandra y col., 2019; Muhammad y col., 2023).

Por su parte, el 2-pentenal se ha identificado en extractos como *Nephelium lappaceum* el cual al probarlo sobre células MCF-7 muestra efectos citotóxicos; además, aumenta los niveles de expresión de la proteína proapoptótica, Bax (Cohen y col., 2020; Jantapaso y col., 2022).

El compuesto O-cimeno, identificado en el extracto acuoso de *Stevia pilosa*, se ha descrito que en células NK incrementa la expresión de ARNm de perforina, granzima B, CD56 y CD107, los cuales están relacionados con la promoción de apoptosis. Este compuesto también se ha identificado en diferentes aceites esenciales y extractos, como el aceite esencial de *Peucedanum dhana* A. Ham, *Annona Vepretorum* y *Melaleuca alternifolia*; estos últimos han mostrado tener efecto en la proliferación de diferentes líneas celulares de cáncer como SW480, A549, HeLa, de cáncer de pulmón y en células de melanoma B16-f10; promueven la apoptosis y causan arresto del ciclo celular. Mientras que un derivado del o-cimeno, disminuye la proliferación, causar arresto del ciclo celular en G0/G1, incrementa los niveles de p53, p21, PARP, Bax y caspasa 3 y 9 en células de cáncer de pulmón NSCLC (Bomfim y col., 2016; Di Martile y col., 2021; Jo y col., 2021; Khruengchai y col., 2021; Muhammad y col., 2019).

La butirrolactona I se ha reportado como un inhibidor de CDK1, CDK2 y CD5, afecta la vía de las MAPK, inhibe la fosforilación de la proteína retinoblastoma (pRB) y afecta la progresión del ciclo celular de G1 a S y en G2/M. La aspernolida A, un derivado de la butirrolactona, tiene efecto sobre las células Hep-2 y TU212, se observó que promovía apoptosis por medio de la vía mitocondrial, incrementaba los niveles de las proteínas Bax, PARP, y caspasas 3 y 9. Mientras que los niveles de Bcl-2 se vieron disminuidos (Amr y col., 2023; Ahn y col., 2020; Ghfar y col., 2021; Kitagawa y col., 1994; Liu y col., 2019; Zheng y col., 2018).

En cuanto al maltol, se ha comprobado que tiene efectos antiproliferativos y proapoptóticos en células B16f10 de melanoma, solo y en combinación con cisplatino; regula la producción de IL-2 y disminuye la expresión de PD-L1. En combinación con FeSO(4) promueve apoptosis en células HL60 de leucemia. También se ha reportado la capacidad del maltol para proteger a células de la toxicidad intestinal y nefrotoxicidad provocada por la administración de cisplatino. Este efecto protector puede ser beneficioso al utilizar el compuesto en combinación con quimioterapéuticos, contribuyendo así a disminuir estos efectos secundarios (Han y col., 2023; Mi y col., 2018; Murakami y col., 2006; Wen-ting y col., 2022).

Diversos componentes reportados con anterioridad en *Stevia pilosa* han demostrado tener actividades biológicas, como algunos fitoesteroides específicamente el β -sitosterol

y el estigmasterol, así como ciertos flavonoides tales como la quercetina y la luteolina (Cariño y col., 2007).

Estudios de Bouic y Lamprecht han reportado que el β -sitosterol tiene propiedades antiinflamatorias, angiogénicas e inmunoreguladoras (Bouic y Lamprecht, 1999). En células de cáncer induce arresto del ciclo celular, modifica el patrón de fosfolípidos de la membrana y favorece la apoptosis (Fink y Award, 2000). También se reporta que activa la vía de señalización de Fas en células de cáncer de mama (Awad, 2007).

En células de cáncer de mama MCF7, el β -sitosterol disminuye los niveles de PI3K y pAkt cuya vía puede estar involucrada en el efecto antiproliferativo que se ha encontrado en los extractos de *Stevia pilosa*. También se ha encontrado que activa la vía intrínseca de la apoptosis por medio del aumento del ratio Bax/Bcl-2, citocromo C, Apaf-1 y de las caspasas 3, 7 y 9 (Xu y col., 2018).

El β -sitosterol también ha mostrado efecto antiproliferativo en células de cáncer de mama MDA-MB-231, en las que disminuye CDK4 y ciclina D1 causando arresto celular en la fase G0/G1. Adicionalmente, este fitoesterol causa un aumento en p21/Cip1 y p27/Kip1. Además, se ha demostrado que produce un aumento en la fosforilación de Erk 1/2 y no produce cambios en AKt. Finalmente, induce la apoptosis al disminuir la expresión de la proteína anti-apoptótica Bcl-2 e incrementar moderadamente la proteína pro-apoptótica Bax (Vundru y col., 2013).

Otro fitoesterol presente en *Stevia pilosa* es el estigmasterol, este ha mostrado producir arresto celular en la fase G2/M e inducir la apoptosis en células de cáncer de hígado (HepG2) por medio del aumento de las caspasas 8 y 9, Bax y la disminución de la expresión de XIAP y Bcl2 (Kim y col., 2014). El efecto de arresto celular en G2/M también se reportó en células de cáncer gástrico (Li y col, 2018). En células de cáncer de ovario (OV90 y ES2), el estigmasterol tiene efecto proapoptótico actuando por la vía intrínseca, así mismo disminuye la proliferación celular e inhibe el ciclo celular por medio de la inhibición de PI3K y la supresión de MAPK (Bae y col., 2020). Adicionalmente, se reporta que disminuye la viabilidad celular en MCF-7 causando un aumento en los niveles de proteínas proapoptóticas (AmeliMojarad y col., 2022).

El flavonoide quercetina posee actividad antioxidante, antimicrobiana, antiinflamatoria, antitumoral, funciona como quimiopreventivo y antígenotóxico (Rather y col, 2020). Al ser estudiado sobre células de cáncer de mama hormono-dependientes MCF-7 se reportó disminución de Bcl-2 junto con el aumento de la expresión de caspasa 3 y Bax. Las células presentaron una baja en los niveles de viabilidad e inhibición de la proliferación mediante la activación de la apoptosis, así como un aumento en RIPK1 y RIPK3 factores de activación de la necrosis (Zhang y col., 2017).

Por otra parte, a la luteolina se le ha atribuido también actividad antioxidante, antiinflamatoria y antiproliferativa. La luteolina al administrarse en etapas tempranas del cáncer de colón disminuye considerablemente el número de tumores en ratas (Lu y col.,

2017). En células de cáncer de próstata DU145 y PC-3, presenta arresto celular en la fase S, este estudio reporta que la quercetina también ocasionó arresto de ciclo celular en la misma fase (Zhang y col., 2017). Además, la luteolina en células de cáncer cervical (HeLa), de hígado (SMMC7721) y de cáncer de colon (COLO205) causa arresto celular e induce la apoptosis (Lu y col., 2017).

Invasión y angiogénesis

En el presente trabajo, el extracto acuoso de flor de *Stevia pilosa* mostró efectos en la invasión celular en líneas celulares e inhibición de la angiogénesis en un modelo CAM de embrión de pollo. En el ensayo de invasión con cámaras Transwell, las dos concentraciones evaluadas en ambas líneas celulares disminuyeron el porcentaje de células invasivas. En el modelo CAM, se puede observar que a lo largo de los días del experimento el número de vasos sanguíneos se mantuvieron en los huevos tratados con el extracto acuoso de *Stevia pilosa*, mientras que los controles incrementaban los vasos sanguíneos con el paso de los días. Por lo que, se puede concluir la capacidad del extracto para inhibir la angiogénesis.

En nuestro grupo de trabajo, se había determinado que el extracto de *Stevia pilosa* presentaba capacidad para inhibir la migración en las líneas celulares de cáncer de mama MCF-7 y MDA-MB-231. Además, al medir los niveles E-cadherina se presentó un aumento en su expresión. Esos diferentes efectos en la invasión, migración y angiogénesis pueden explicarse por los metabolitos presente en el extracto. Debido a que se han estudiado por separado y presentan resultados similares a los obtenidos en este trabajo.

Se han investigado el potencial antiangiogénico y antimigratorio de derivados de cumarina como el TCH (trifeniletileno-cumarina) y el UMB-07. En células endoteliales EA.hy926, esos derivados reducen la migración celular, los niveles de expresión de VEGF e inhibe la formación de tubos. En modelos *in vivo*, se ha observado que suprimen la formación de tumores. Estos compuestos también disminuyen los niveles de la quimiocina CCL2, la cual participa en la neovascularización de los tumores al promover la secreción de VEGF (Cui y col., 2019; da Cruz y col., 2020).

Otros derivados de cumarina que se han sido estudiados por sus efectos en la invasión y angiogénesis son la esculetina, PMMB232 y psoralidina. La esculetina inhibe la migración e invasión de células de cáncer de laringe, además de reducir el crecimiento y el peso de los tumores en modelos *in vivo*. También se ha reportado que disminuye la fosforilación de STAT3 y su translocación al núcleo. STAT3 presenta una activación constante en diferentes tipos de cáncer y juega un papel muy importante para promover la migración, invasión, angiogénesis y metástasis en células cancerosas. Mientras que PMMB232, promueve la degradación de HIF-1 α y aumenta los niveles de expresión de

E-cadherina. Por su parte, la psoralidina, inhibe Notch-1 en líneas celulares de cáncer de mama. La vía de señalización de Notch está relacionada con procesos importantes como la proliferación, adhesión celular, la transición epitelio mesénquima, la capacidad invasiva de las células y la reducción de E-cadherina en cáncer de mama (Anusewicz y col., 2021; Bolós y col., 2013; Kamran y col., 2013; Pal y col., 2017; Wang y col., 2022).

En ensayos *in silico* de acoplamiento molecular, una cumarina sintetizada es capaz e interactuar en el sitio de unión del receptor VEGFR-2 (Ahmed y col., 2020).

Otro compuesto presente en el extracto de *Stevia pilosa* que se ha estudiado por su efecto en la angiogénesis es el D-limoneno. Se ha comprobado que reduce la densidad de los vasos sanguíneos, baja los niveles del factor de crecimiento endotelial vascular, VEGF y disminuye la invasión celular y metástasis, en ensayos con cáncer gástrico y células de vejiga T24. En el modelo CAM de embrión de pollo, el D-limoneno disminuye el número de vasos sanguíneos. Al evaluar el D-limoneno en ratones se reporta que el crecimiento tumoral fue menor (Lu, 2004; Shah y col., 2018; Ye y col., 2020).

En este trabajo de investigación se logró identificar al o-cimeno como parte del extracto acuoso de *Stevia pilosa*. Otras investigaciones también detectaron la presencia de este compuesto en su composición, por ejemplo, en el aceite esencial de *C. zeylanicum*, el extracto etanólico de *Acorus calamus* y el aceite esencial de *Alpiniae zerumbet*. Esos se ha probado en células de cáncer de mama MDA-MB-231 y células HUVEC, en donde presentan un decremento en los niveles de VEGF y CD24, e inhibición de la angiogénesis (Kubatka y col., 2020; Rahamooz y col., 2017; Yang y col., 2020).

Un derivado de O-cimeno, ruthenium(II)-cimeno, fue estudiado en las líneas celulares HepG2, MCF-7 y HeLa, en las cuales inhibe la metástasis, aumenta los niveles de E-cadherina y disminuye los niveles de Vimetina (He y col., 2017).

Varios derivados de la butirolactona han presentado efectos en la invasión y angiogénesis. Un ejemplo es el UTF, identificado como un inhibidor de la angiogénesis al reducir la secreción de VEGF en carcinoma cervical. El derivado de butirolactona, la Aspernolida A, induce cambios en la expresión de STAT3 fosforilada en líneas celulares de cáncer de laringe. Otro derivado es el α -metilen- γ -butirolactona, que regula la proteasa 7 específica de ubiquitina USP7, asociada con la activación de la vía Wnt/ β -catenina. También se ha reportado que es capaz de inhibir NF- κ B. La actividad de NF- κ B está relacionada con diversos procesos en cáncer, desde a la proliferación celular hasta la metástasis, incluyendo el aumento de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, la inhibición de apoptosis, promoción de la angiogénesis e inducir la

transición epitelio-mesenquima (Li X y col., 2020; Liu y col., 2019; Nagai y col., 2008; Oliveira y col., 2022; Rana y col., 2016; Xia y col., 2014; Zhang y col., 2021).

Otro de los compuestos con actividad antiangiogénica reportada es el maltol. En un modelo *in vivo* de hepatoma H22, el maltol detiene el crecimiento del tumor, incrementa la proteína Bax y disminuye Bcl-2, adicionalmente se reporta que disminuye los niveles de VEGF causando inhibición de angiogénesis (Wei y col., 2015).

La luteolina ha demostrado tener efecto sobre las metaloproteasas (MMPs), que cuando tienen una expresión incrementada son marcadores de TEM (Conacci y col., 2017). Las MMPs constituyen una familia de proteasas dependientes del zinc capaces de degradar los componentes proteicos mayoritarios de la matriz extracelular, están involucradas en la regulación del microambiente de las células neoplásicas, proliferación y diferenciación celular, apoptosis, migración celular, angiogénesis y evasión de la respuesta inmune. La actividad de estas enzimas se encuentra regulada, en parte, por los inhibidores tisulares de metaloproteasas (TIMPs). Estos últimos también se ven afectados por la luteolina (Craig y col., 2015; Wang y col., 2019).

En células de glioblastoma U87MG y U251MG, la luteolina incrementa los niveles de expresión de TIMP-1 y TIMP-2, en cambio, disminuye los niveles de MMP-2 y MMP-9; aumenta los niveles de E-cadherina y disminuye la expresión de marcadores mesenquimales como β -catenina, Vimentina y N-cadherina (Wang y col., 2019).

Por otro lado, el β -sitosterol y estigmasterol también tienen efectos sobre la migración, invasión y angiogénesis. En células de cáncer de próstata PC-3, tanto *in vitro* como *in vivo*, disminuyen la invasión y metástasis. En células de cáncer de ovario, el estigmasterol presenta un efecto antimigratorio mediante la disminución de los niveles de MMP9, MMP-14, PLAU y VEGFA (Bae y col., 2020; Fink y col., 2011).

10. CONCLUSION

El extracto acuoso de flor de *Stevia pilosa* contiene compuestos con efecto anticancerígeno como la cumarina, D-limoneno, butirolactona, piperonal, o-cimeno y maltol, entre otros compuestos. El extracto acuoso de flor de *Stevia pilosa* tiene efecto antiproliferativo en líneas celulares de cáncer de mama, MDA-MB-231 y MCF-7, promueve la apoptosis y causa arresto del ciclo celular en la fase G0/G1. Adicionalmente, disminuye la capacidad de invasión en ambas líneas celulares de cáncer de mama y disminuye la angiogénesis en modelo de embrión de pollo. El extracto acuoso de flor de *Stevia pilosa* tiene un gran potencial anticancerígeno.

11. REFERENCIAS

Albuquerque C, Manguinhas R, Costa J, Gil N, Castro M, Oliveira N. A narrative review of the migration and invasion features of non-small cell lung cancer cells upon xenobiotic exposure: insights from *in vitro* studies. *Translational Lung Cancer Research* **2021**; 10:2698-2714.

ACS, American Society of Cancer. Breast Cancer Treatment: Treatment Options for Breast Cancer [monografía de internet] **2020** [Consultado abril 2022]. Disponible en: <https://www.cancer.org/cancer/breast-cancer/treatment.html>

Ahmed EY, Abdel Latif NA, El-Mansy MF, Elserwy WS, Abdelhafez OM. VEGFR-2 inhibiting effect and molecular modeling of newly synthesized coumarin derivatives as anti-breast cancer agents. *Bioorg Med Chem.* **2020**; 1;28(5):115328.

Ahn, S.; Jang, D.M.; Park, S.C.; An, S.; Shin, J.; Han, B.W.; Noh, M. Cyclin-Dependent Kinase 5 Inhibitor Butyrolactone I Elicits a Partial Agonist Activity of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ . *Biomolecules* **2020**; 10, 275.

Amr K, Ibrahim N, Elissawy AM, Singab ANB. Unearthing the fungal endophyte *Aspergillus terreus* for chemodiversity and medicinal prospects: a comprehensive review. *Fungal Biol Biotechnol.* **2023**; 25;10(1):6.

Anusewicz D, Orzechowska M, Bednarek AK. Notch Signaling Pathway in Cancer-Review with Bioinformatic Analysis. *Cancers (Basel).* **2021**; 12;13(4):768.

Annunziata F, Pinna C, Dallavalle S, Tamborini L, Pinto A. An Overview of Coumarin as a Versatile and Readily Accessible Scaffold with Broad-Ranging Biological Activities. *Int J Mol Sci.* **2020**; 29;21(13):4618.

Aleksandra A. Moiseeva, Oleg I. Artyushin, Lada V. Anikina, Valery K. Brel, Synthesis and antitumor activity of daunorubicin conjugates with of 3,4-methylendioxybenzaldehyde. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters.* **2019**; 29:19.

Alvarez-Delgado C, Reyes-Chilpa R, Estrada-Muñiz E, Mendoza-Rodríguez CA, Quintero-Ruiz A, Solano J, Cerbón MA. Coumarin A/AA induces apoptosis-

like cell death in HeLa cells mediated by the release of apoptosis-inducing factor. *J Biochem Mol Toxicol.* **2009**;23(4):263-72.

Álvarez R. Estudio estereoquímico y conformacional de algunos metabolitos secundarios aislados de *Stevia pilosa* y *Stevia tomentosa*. México: Centro de Investigaciones Químicas UAEH, **2005**.

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

Appendino G, Bianchi F, Bader A, Campagnuolo C, Fattorusso E, Tagliatalata-Scafati O, Blanco-Molina M, Macho A, Fiebich BL, Bremner P, Heinrich M, Ballero M, Muñoz E. Coumarins from *Opopanax chironium*. New dihydrofuranocoumarins and differential induction of apoptosis by imperatorin and heraclenin. *J Nat Prod.* **2004**;67(4):532-6.

Arceo-Martínez, María T., López-Meza, Joel E., Ochoa-Zarzosa, Alejandra, & Palomera-Sanchez, Zoraya. Estado actual del cáncer de mama en México: principales tipos y factores de riesgo. *Gaceta mexicana de oncología*, **2021**; 20: 101-110.

Awad A, Chinnam M, Fink C, Bradford P: Beta-Sitosterol activates Fas signaling in human breast cancer cells. *Phytomedicine* **2007**; 14:747–754.

Bae H, Song G, Lim W. Stigmasterol Causes Ovarian Cancer Cell Apoptosis by Inducing Endoplasmic Reticulum and Mitochondrial Dysfunction. *Pharmaceutics.* **2020**; 28:12(6):488.

BBCC. The Babylon Breast Cancer Coalition. Breast cancer [monografía de internet] [Consultado abril 2022]. Disponible en: <https://babylonbreastcancer.org/>

Brasch J, Katsamba PS, Harrison OJ, Ahlsén G, Troyanovsky B, Indra I. Homophilic and Heterophilic Interactions of Type II Cadherins Identify Specificity Groups Underlying Cell-Adhesive Behavior. *Cell Rep* **2018**; 23:1840–52.

Bolós V, Mira E, Martínez-Poveda B, Luxán G, Cañamero M, Martínez-A C, Mañes S, de la Pompa JL. Notch activation stimulates migration of breast cancer cells and promotes tumor growth. *Breast Cancer Res.* **2013**;15(4):R54.

Bomfim LM, Menezes LR, Rodrigues AC, Dias RB, Rocha CA, Soares MB, Neto AF, Nascimento MP, Campos AF, Silva LC, Costa EV, Bezerra DP. Antitumour Activity of the Microencapsulation of *Annona vepretorum* Essential Oil. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. **2016**; 118(3):208-13.

Borgo J, Laurella LC, Martini F, Catalán CAN, Sülsen VP. Stevia Genus: Phytochemistry and Biological Activities Update. *Molecules* **2021**; 6: 26:2733.

Botzer L, Maman S, Sagi-Assif O, Meshel T, Witz I. Hexokinase 2 is a determinant of neuroblastoma metastasis. *Br J Cancer* **2016**; 114:759-766.

Bouic P, Lamprecht J: Plant Sterols and Sterolins: A review of their Immune-modulating properties sterols & sterolins. *Altern Med Rev* **1999**; 4:170–177.

Cardiff R, Jindal S, Treuting P, Going J, Gusterson B, Thomson H. Mammary Gland. *Comparative Anatomy and Histology* **2018**; 487-509.

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

CDC, Centers for Disease Control. Breast Cancer [monografía de internet] **2020**. [Consultado abril 2022]. Disponible en: <https://www.cdc.gov/cancer/breast/index.htm>

Chebet JJ, Ehiri JE, McClelland DJ, Taren D, Hakim IA. Effect of d-limonene and its derivatives on breast cancer in human trials: a scoping review and narrative synthesis. *BMC Cancer*. **2021**; 6;21(1):902.

Cohen DT, Wales TE, McHenry MW, Engen JR, Walensky LD. Site-Dependent Cysteine Lipidation Potentiates the Activation of Proapoptotic BAX. *Cell Rep*. **2020**;10;30(10):3229-3239.e6

Chuang JY, Huang YF, Lu HF, Ho HC, Yang JS, Li TM, Chang NW, Chung JG. Coumarin induces cell cycle arrest and apoptosis in human cervical cancer HeLa cells through a mitochondria- and caspase-3 dependent mechanism and NF-kappaB down-regulation. *In Vivo*. **2007**;21(6):1003-9.

Chikezie O, Wang S, Madu C, Lu Y. Angiogenesis in Breast Cancer Progression, Diagnosis, and Treatment. *Journal of Cancer* **2020**; 11:4474-4494.

Conacci S, Zhurinsky J, Ben-Zeev A. The cadherin.catenin adhesion system in signaling and cancer. *JClin Invest* **2017**; 109:987-991

Constanzo L. Fisiología. 5a. edición. México: Elsevier Saunders, **2018**: 455-460.

Craig VJ, Zhang L, Hagood JS, Owen CA. Matrix metalloproteinases as therapeutic targets for idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol.* **2015** ;53(5):585-600.

Cui N, Lin DD, Shen Y, Shi JG, Wang B, Zhao MZ, Zheng L, Chen H, Shi JH. Triphenylethylene-Coumarin Hybrid TCH-5c Suppresses Tumorigenic Progression in Breast Cancer Mainly Through the Inhibition of Angiogenesis. *Anticancer Agents Med Chem.* **2019**;19(10):1253-1261.

da Cruz RMD, Batista TM, de Sousa TKG, Manguiera VM, Dos Santos JAF, de Abrantes RA, Ferreira RC, Leite FC, Brito MT, Batista LM, Veras RC, Vieira GC, Mendonca FJB Jr, de Araújo RSA, Sobral MV. Coumarin derivative 7-isopentenylcoumarin induces in vivo antitumor activity by inhibiting angiogenesis via CCL2 chemokine decrease. *Naunyn Schmiedeberg Arch Pharmacol.* **2020** ;393(9):1701-1714.

Di Martile M, Garzoli S, Sabatino M, Valentini E, D'Aguanno S, Ragno R, Del Bufalo D. Antitumor effect of Melaleuca alternifolia essential oil and its main component terpinen-4-ol in combination with target therapy in melanoma models. *Cell Death Discov.* **2021**; 31;7(1):127.

Dornelles C, Santos P, Oliveira C, Goldim J, Ashton P. Conocimiento del cáncer de mama y cáncer de mama hereditario en el personal de enfermería de un hospital público. *Latino-Am. Enfermagem* **2015**; 23:90-97.

Fink C, Awad A: Beta-Sitosterol activates the sphingomyelin cycle and induces apoptosis in LNCaP human prostate cancer cells. *Nutr Cancer* **2011**; 32:8–12.

Gallegos M. Las plantas medicinales: principal alternativa para el cuidado de la salud, en la población rural de Babahoyo, Ecuador. *Scielo* **2016**; 77:327-332.

Ghfar AA, El-Metwally MM, Shaaban M, Gabr SA, Gabr NS, Diab MSM, Aqel A, Habila MA, Al-Qahtani WH, Alfaifi MY, Elbehairi SEI, AlJumah BA. Production of Terretonin N and Butyrolactone I by Thermophilic *Aspergillus terreus* TM8 Promoted Apoptosis and Cell Death in Human Prostate and Ovarian Cancer Cells. *Molecules.* **2021**; 10;26(9):2816.

Gholami, Omid. 'Cytotoxicity and Apoptosis Induction by Coumarins in CLL'. *Cytotoxicity, InTech*, **2018**.

Gielecińska A, Kciuk M, Mujwar S, Celik I, Kolat D, Kałuzińska-Kolat Ź, Kontek R. Substances of Natural Origin in Medicine: Plants vs. Cancer. *Cells*. **2023**; 12:986.

GLOBOCAN. Cancer today [monografía de internet], **2021** [consultado 2021 septiembre 7] Disponible en:

<https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/20-Breastfact-sheet>

Govindan R, Morgensztern D. Manual Washington de oncología. 3a. edición. España: Editorial Wolters Kluwer **2001**; 260-264.

Gu K, Li Y, Jia X, Liu C. Multiple Impacts of Urban Built and Natural Environment on Lung Cancer Incidence: A Case Study in Bengbu. *J Healthc Eng*. **2023**: 4876404.

Han NR, Park HJ, Ko SG, Moon PD. Maltol has anti-cancer effects via modulating PD-L1 signaling pathway in B16F10 cells. *Front Pharmacol*. **2023**; 5;14:1255586.

Haque M.A.; Islam, M.; Ul, A. Pleurotus highking Mushroom Induces Apoptosis by Altering the Balance of Proapoptotic and Antiapoptotic Genes in Breast Cancer Cells and Inhibits Tumor Sphere Formation. *Medicina* **2019**; 55:716.

Harper K, Yatsyna A, Charbonneau M, Brochu-Gaudreau K, Perreault A, Jeldres C, McDonald PP, Dubois CM. The Chicken Chorioallantoic Membrane Tumor Assay as a Relevant *In Vivo* Model to Study the Impact of Hypoxia on Tumor Progression and Metastasis. *Cancers (Basel)* **2021**: 13:1093.

He, Y., Xue, H., Zhang, W., Wang, L., Xiang, G., Li, L., & Shang, X.. Discovery of a series of ruthenium(II) derivatives with α -dicarbonylmonoxime as novel inhibitors of cancer cells invasion and metastasis. *Journal of Organometallic Chemistry*. **2017**; 842, 82-92.

Hernández G, Herrera L, Hernández I, Vallejo D. Biología molecular y genómica del cáncer. 1a. edición. México: PyDSA, **2017**: 55-68.

Ibrahim E, Ragheb E, Yousef F, Abdel-Azizand M, Alghamdi B. Nutritional Value, Cytotoxic and Antimicrobial Activities of *Stevia reubadiana* leaf Extract. *J Biochem Tech*, **2020**; 11(12),108-115.

Iscaz N. Cambios genéticos y factores de riesgo del cáncer [monografía de internet]. España: Elsevier, **2018** [consultado 2021 septiembre 7] Disponible en:

<https://www.elsevier.com/es-es/connect/medicina/cancer-cambios-geneticos-factores-riesgo>

Jantapaso H, Mittraparp-Arthorn P. Phytochemical Composition and Bioactivities of Aqueous Extract of Rambutan (*Nephelium lappaceum* L. cv. Rong Rian) Peel. *Antioxidants* (Basel). **2022**; 12;11(5):956.

Jo H, Cha B, Kim H, Brito S, Kwak BM, Kim ST, Bin BH, Lee MG. α -Pinene Enhances the Anticancer Activity of Natural Killer Cells via ERK/AKT Pathway. *Int J Mol Sci*. **2021**; 11;22(2):656.

Jung-Garcia Y, Maiques O, Monger J, Rodriguez-Hernandez I, Fanshawe B, Domart MC, Renshaw MJ, Marti RM, Matias-Guiu X, Collinson LM, Sanz-Moreno V, Carlton JG. LAP1 supports nuclear adaptability during constrained melanoma cell migration and invasion. *Nat Cell Biol* **2023**: 25:108-119.

Kamran MZ, Patil P, Gude RP. Role of STAT3 in cancer metastasis and translational advances. *Biomed Res Int*. **2013**;2013:421821.

Kari S, Subramanian K, Altomonte IA, Murugesan A, Yli-Harja O, Kandhavelu M. Programmed cell death detection methods: a systematic review and a categorical comparison. *Apoptosis*. **2022**; 27(7-8):482-508.

Katzung B. *Farmacología básica y clínica*. 10a. edición. México: Manual moderno, **2007**:1097.

Khare N, Chandra. S. Stevioside mediated chemosensitization studies and cytotoxicity assay on breast cancer cell lines MDA-MB-231 and SKBR3. *Saudi J. Biol. Sci*. **2019**; 26:1596–1601.

Khruengsai S, Sripahco T, Rujanapun N, Charoensup R, Pripdeevech P. Chemical composition and biological activity of *Peucedanum dhana* A. Ham essential oil. *Sci Rep*. **2021**;27;11(1):19079.

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

Kitagawa M, Higashi H, Takahashi IS, Okabe T, Ogino H, Taya Y, Hishimura S, Okuyama A. A cyclin-dependent kinase inhibitor, butyrolactone I, inhibits phosphorylation of RB protein and cell cycle progression. *Oncogene*. **1994**; 9(9):2549-57.

Kubatka P, Kello M, Kajo K, Samec M, Jasek K, Vybohova D, Uramova S, Liskova A, Sadlonova V, Koklesova L, Murin R, Adamkov M, Smejkal K, Svajdlenka E, Solar P, Samuel SM, Kassayova M, Kwon TK, Zubor P, Pec M, Danko J, Büsselberg D, Mojzis J. Chemopreventive and Therapeutic Efficacy of *Cinnamomum zeylanicum* L. Bark in Experimental Breast Carcinoma: Mechanistic In Vivo and In Vitro Analyses. *Molecules*. **2020**; 19;25(6):1399.

Kulkarni, A.S.; Karkhanis, D.; Barve, S.S.; Sharma, S. Antioxidant and cytotoxic study of extract of vegetative and flowering stages leaves *Stevia rebaudiana*. *J. Pharmacogn. Phytochem*. **2021**, 10, 303–306.

Li K, Yuan D, Yan R, Meng L, Zhang Y y Zhu K. Stigmasterol exhibits potent antitumor effects in human gastric cancer cells mediated via inhibition of cell migration, cell cycle arrest, mitochondrial mediated apoptosis and inhibition of JAK/STAT signalling pathway. *JBUON* **2018**; 23: 1425.

Li X, Kong L, Yang Q, Duan A, Ju X, Cai B, Chen L, An T, Li Y. Parthenolide inhibits ubiquitin-specific peptidase 7 (USP7), Wnt signaling, and colorectal cancer cell growth. *J Biol Chem*. **2020**; 13;295(11):3576-3589.

Liu C, Liu H, Wen Y, Huang H, Hao J, Lv Y, Qin R, Yang X. Aspernolide A Inhibits the Proliferation of Human Laryngeal Carcinoma Cells through the Mitochondrial Apoptotic and STAT3 Signaling Pathways. *Molecules*. **2019**; 19;24(6):1074.

López V, Pérez S, Vinuesa A, Zorzetto C, Abian O. *Stevia rebaudiana* ethanolic extract exerts better antioxidant properties and antiproliferative effects in tumour cells than its diterpene glycoside stevioside. *Food Funct*. **2016**;7(4):2107-13.

Lu, X., Li, Y., Li, X., Aisa, H. A."Luteolin induces apoptosis in vitro through suppressing the MAPK and PI3K signaling pathways in gastric cancer". *Oncology Letters* **2017**; 14, 2:1993-2000.

Lu XG, Zhan LB, Feng BA, Qu MY, Yu LH, Xie JH. Inhibition of growth and metastasis of human gastric cancer implanted in nude mice by d-limonene. *World J Gastroenterol*. **2004**; 15;10(14):2140-4.

Maman S, Witz P. A history of exploring cancer in context. *Nature Reviews Cancer* **2018**; 359-376.

Mandal D, Patel P, Verma SK, Sahu BR, Parija T. Proximal discrepancy in intrinsic atomic interaction arrests G2/M phase by inhibiting Cyclin B1/CDK1 to

infer molecular and cellular biocompatibility of D-limonene. *Sci Rep.* **2022**; 28;12(1):18184.

Manuele MG, Barreiro Arcos ML, Davicino R, Ferraro G, Cremaschi G, Anesini C. Limonene exerts antiproliferative effects and increases nitric oxide levels on a lymphoma cell line by dual mechanism of the ERK pathway: relationship with oxidative stress. *Cancer Invest.* **2010**;28(2):135-45.

Martínez M. El género stevia en el valle de México y sus alrededores. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* **1958**; 23:55-83.

Martín M, Herrero A, Echavarría I. El cáncer de mama. *Arbor* **2019**; 191:773.

Martínez R, Cariño R, Berumen L, García G, Escobar J. Stevia Eupatoria and Stevia Pilosa Extracts Inhibit the Proliferation and Migration of Prostate Cancer Cells. *Medicina* **2020**; 56:90.

Mi XJ, Hou JG, Wang Z, Han Y, Ren S, Hu JN, Chen C, Li W. The protective effects of maltol on cisplatin-induced nephrotoxicity through the AMPK-mediated PI3K/Akt and p53 signaling pathways. *Sci Rep.* **2018** 29;8(1):15922.

Muhammad Zeeshan Bhatti, Amjad Ali, Hong-Quan Duong, Jiwu Chen, Faiz-Ur Rahman. Anticancer activity and mechanism of bis-pyrimidine based dimetallic Ru(II)(η^6 -p-cymene) complex in human non-small cell lung cancer via p53-dependent pathway, *Journal of Inorganic Biochemistry*, **2019**;194:52-64.

Murakami K, Ishida K, Watakabe K, Tsubouchi R, Naruse M, Yoshino M. Maltol/iron-mediated apoptosis in HL60 cells: participation of reactive oxygen species. *Toxicol Lett.* **2006**; 20;161(2):102-7.

Nagai N, Mukai K, Hirata E, Jin HH, Komatsu M, Yunokawa M. UFT and its metabolite gamma-butyrolactone (GBL) inhibit angiogenesis induced by vascular endothelial growth factor in advanced cervical carcinoma. *Med Oncol.* **2008**;25(2):214-21.

Nakayama J, Han Y, Kuroiwa Y, Azuma K, Yamamoto Y, Semba K. The *In Vivo* Selection Method in Breast Cancer Metastasis. *Molecular Sciences* **2021**; 22: 1886.

Naturalista. Gobernadora morada (*Stevia pilosa*) [monografía de internet]. **2021** [consultado octubre **2022**]. Disponible en: https://www.naturalista.mx/taxa/289380-Stevia-pilosa/browse_photos

NIH Instituto Nacional del Cáncer. Glándula mamaria [monografía de internet]. Estados Unidos: NIH Instituto Nacional del Cáncer, 2019 [consultado 2021 agosto 29]. Disponible en: <https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/def/glandula- mamaria>.

Nolan E, Lindeman GJ, Visvader JE. Deciphering breast cancer: from biology to the clinic. *Cell* **2023**; 186:1708-1728.

Novikov N, Zolotaryova S, Gautreau A. Mutational drivers of cancer cell migration and invasion. *Br J Cancer* **2020**; 124:102–114.

Occhiuto CJ, Moerland JA, Leal AS, Gallo KA, Liby KT. The Multi-Faceted Consequences of NRF2 Activation throughout Carcinogenesis. *Mol Cells*. **2023**; 46(3):176-186.

Oliveira RI, Guedes RA, Salvador JAR. Highlights in USP7 inhibitors for cancer treatment. *Front Chem*. **2022**; 15;10:1005727.

OMS Organización Mundial de la Salud. Cancer [monografía de internet]. 2021 [consultado octubre 2021]. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cancer>

OMS Organización Mundial de la Salud. Medicina tradicional: definiciones [monografía de internet] **2019** [consultado septiembre 2021]. Disponible en: http://www.who.int/topics/traditional_medicine/definiciones/es/

OVADJE P, Ma D, Tremblay P, Roma A, Steckle M, Guerrero J, Pandey S. Evaluation of the efficacy & biochemical mechanism of cell death induction by piper longum extract selectively in in-vitro and in-vivo models of human cancer cells. *PloS One* **2014**; 9:11.

Pal D, Kolluru V, Chandrasekaran B, Baby BV, Aman M, Suman S, et al. Targeting aberrant expression of Notch-1 in ALDH+ cancer stem cells in breast cancer. *Mol Carcinogenesis*. **2017**; 56(3):1127–36.

Perou C, Sorlie T, Eisen M, Jeffrey S, Rees M. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* **2000**; 406:747-752.

Pérez I. Metabolitos secundarios aislados de las raíces y las hojas de *Stevia jorullensis* H.B.K. México: Centro de Investigaciones Químicas UAEH, **2006**.

Rahamooz Haghighi S, Asadi MH, Akrami H, Baghizadeh A. Anti-carcinogenic and anti-angiogenic properties of the extracts of *Acorus calamus* on gastric cancer cells. *Avicenna J Phytomed.* **2017**; 7(2):145-156.

Ramjiawan R, Griffioen A, Duda D. Anti-angiogenesis for cancer revisited: Is there a role for combinations with immunotherapy? *HHS Public Access* **2017**; 20:185-204.

Rana S, Blowers EC, Tebbe C, Contreras JI, Radhakrishnan P, Kizhake S, Zhou T, Rajule RN, Arnst JL, Munkarah AR, Rattan R, Natarajan A. Isatin Derived Spirocyclic Analogues with α -Methylene- γ -butyrolactone as Anticancer Agents: A Structure-Activity Relationship Study. *J Med Chem.* **2016**; 26;59(10):5121-7.

Rather RA, Bhagat M. Quercetin as an innovative therapeutic tool for cancer chemoprevention: Molecular mechanisms and implications in human health. *Cancer Med.* **2020**;9(24):9181-9192.

Rojas F, Herrera L. La prolactina promueve migración en las células de cáncer de próstata LNCaP. *Neurobiología Revista electrónica* **2017**; 8:1-5.

Romero Figueroa, J, Rodríguez-Mendoza, Ma. de las Nieves, Gutiérrez-Castorena, Ma. del Carmen, Escalante-Estrada, José A. S., Peña-Valdivia, Cecilia B., & Cueto-Wong, José A.. Growth and secondary metabolites of *Stevia pilosa* Lag. in three edaphoclimatic conditions in the state of Hidalgo, Mexico. *Revista Chapingo serie ciencias forestales y del ambiente.* **2020**; 26(2), 173-187

Ross C, Szczepanek K, Lee M, Qiu T, Stanfors J, Hunter K. The genomic landscape of metastasis in treatment-naïve breast cancer models. *GENETICS* **2020**; 16(5): e1008743.

Shah BB, Baksi R, Chaudagar KK, Nivsarkar M, Mehta AA. Anti-leukemic and anti-angiogenic effects of d-Limonene on K562-implanted C57BL/6 mice and the chick chorioallantoic membrane model. *Animal Model Exp Med.* **2018**; 21;1(4):328-333.

Shokrzadeh M, Rajabali F, Habibi E, et al. Survey cytotoxicity and genotoxicity of hydroalcoholic extract of *Stevia rebaudiana* in breast cancer cell line (MCF-7) and human fetal lung fibroblasts (MRC-5). *J Cancer Res. Metastasis,* **2018**; 1, 12-17.

Singh R, Letai A, Sarosiek K. Regulation of apoptosis in health and disease: the balancing act of BCL-2 family proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **2019**; 20(3):175-193.

Stallaert W, Taylor SR, Kedziora KM, Taylor CD, Sobon HK, Young CL, Limas JC, Varblow Holloway J, Johnson MS, Cook JG, Purvis JE. The molecular architecture of cell cycle arrest. *Mol Syst Biol.* **2022**;18(9):e11087.

Suhail Y, Cain MP, Vanaja K, Kurywchak PA, Levchenko A, Kalluri R, Kshitiz. Systems Biology of Cancer Metastasis. *Cell Syst.* **2019**; 28;9 :109-127.

Takada K, Kashiwagi S, Imori N, Kouhashi R, Yabumoto A, Goto W, Asano Y, Tauchi Y, Ogisawa K, Morisaki T, Shibutani M, Tanaka H, Maeda K. Prognostic Impact of Smoking on Bevacizumab Combination Chemotherapy for Advanced Breast Cancer. *Anticancer Res.* **2023**; 43:849-856.

Vaško, L., Vašková, J., Fejerčáková, A., Mojžišová, G., & Poráčová, J. Comparison of some antioxidant properties of plant extracts from *Origanum vulgare*, *Salvia officinalis*, *Eleutherococcus senticosus* and *Stevia rebaudiana*. *In Vitro Cellular & Developmental Biology. Animal.* **2014**;50(7), 614–622.

Vega-Granados K, Medina-O'Donnell M, Rivas F, Reyes-Zurita FJ, Martinez A, Alvarez de Cienfuegos L, Lupiañez JA, Parra A. Synthesis and Biological Activity of Triterpene-Coumarin Conjugates. *J Nat Prod.* **2021**; 28;84(5):1587-1597.

Villágomez E, Hinojosa J, Villaseñor L. El género *Stevia* (Eupatorieae, Asteraceae) en el estado de Morelos, México. *Acta Botánica Mexicana* **2018**; 125: 7-36.

Villavicencio, M. A., & Pérez, E. B.. Plantas útiles del estado de Hidalgo (1.a ed.) Pachuca, México: Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. **2006**.

Vundru S, Kale R, Singh R. β -sitosterol induces G1 arrest and causes depolarization of mitochondrial membrane potential in breast carcinoma MDA-MB-231 cells. *BMC Complement. Altern. Med.* **2013**; 13,280–289.

Wang, H., Guo, M., Wei, H. et al. Targeting MCL-1 in cancer: current status and perspectives. *J Hematol Oncol.* **2021**; 14, 67.

Wang HQ, Man QW, Huo FY, Gao X, Lin H, Li SR, Wang J, Su FC, Cai L, Shi Y, Liu B, Bu LL. STAT3 pathway in cancers: Past, present, and future. *MedComm* (2020). **2022**; 23;3(2):e124..

Wang X-H, Wu H-Y, Gao J, Wang X-H, Gao T-H, Zhang S-F. IGF1R facilitates epithelial-mesenchymal transition and cancer stem cell properties in neuroblastoma via the STAT3/AKT axis. *Cancer Manag Res* **2019**; 11:5459–72.

Wang Z, Fan M, Candas D, Zhang TQ, Qin L, Eldridge A, Wachsmann-Hogiu S, Ahmed KM, Chromy BA, Nantajit D, Duru N, He F, Chen M, Finkel T, Weinstein LS, Li JJ. Cyclin B1/Cdk1 coordinates mitochondrial respiration for cell-cycle G2/M progression. *Dev Cell*. **2014**; 28;29(2):217-32.

Waziri PM, Abdullah R, Yeap SK, Omar AR, Kassim NK, Malami I, How CW, Etti IC, Abu ML. Clausenidin induces caspase-dependent apoptosis in colon cancer. *BMC Complement Altern Med*. **2016**; 29;16:256.

Wei Li, Xiao-min Su, Ye Han, Oi Xu, Jing Zhang, Zi Wang, Ying-Ping Wang. Maltol, a Maillard reaction product, exerts anti-tumor efficacy in H22 tumor-bearing mice via improving immune function and inducing apoptosis. *RSC Advances*. **2015**; 48: 123

Wen-ting Wang, Mei-ling Fan, Jun-nan Hu, Ji-yue Sha, Hao Zhang, Zi Wang, Jun-jie Zhang, Shi-Han Wang, Si-wen Zheng, Wei Li. Maltol, a naturally occurring flavor enhancer, ameliorates cisplatin-induced apoptosis by inhibiting NLRP3 inflammasome activation by modulating ROS-mediated oxidative stress. *Journal of Functional Foods*, **2022**;94:105127.

Widelski, Jarosław, Kukula-Koch, Wirginia, Baj, Tomasz, Kedzierski, Bartosz, Fokialakis, Nicolas, Magiatis, Prokopis, Pozarowski, Piotr, Rolinski, Jacek, Graikou, Konstantina, Chinou, Ioanna and Skalicka-Wozniak, Krystyna. "Rare Coumarins Induce Apoptosis, G1 Cell Block and Reduce RNA Content in HL60 Cells" *Open Chemistry*. **2017**; 15:1, 1-6.

Woyengo T, Ramprasath V, Jones P. Anticancer effects of phytosterols. *Eur. J. Clin. Nutr.* **2009**; 63,813–822.

Wu Y, Xu J, Liu Y, Zeng Y, Wu G. A Review on Anti-Tumor Mechanisms of Coumarins. *Front Oncol*. **2020**; 4;10:592853.

Xia Y, Shen S, Verma IM. NF- κ B, an active player in human cancers. *Cancer Immunol Res*. **2014**;2(9):823-30.

Xie B, Wang S, Jiang N, Li JJ. Cyclin B1/CDK1-regulated mitochondrial bioenergetics in cell cycle progression and tumor resistance. *Cancer Lett.* **2019**; 28;443:56-66.

Xu H, Li Y, Han B, Li Z, Jiang P, Zhang J, Ma W, Zhou D, Li X y Ye X. Anti-breast-Cancer Activity Exerted by β -Sitosterol-d-glucoside from Sweet Potato via Upregulation of MicroRNA-10a and via the PI3K–Akt Signaling Pathway. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2018**; 66: 9704-9718.

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

Ye Z, Liang Z, Mi Q, Guo Y. Limonene terpenoid obstructs human bladder cancer cell (T24 cell line) growth by inducing cellular apoptosis, caspase activation, G2/M phase cell cycle arrest and stops cancer metastasis. *J BUON.* **2020**;25(1):280-285.

Yu X, Lin H, Wang Y, Lv W, Zhang S, Qian Y, Deng X, Feng N, Yu H, Qian B. d-limonene exhibits antitumor activity by inducing autophagy and apoptosis in lung cancer. *Onco Targets Ther.* **2018**; 4;11:1833-1847.

Zhang G, Xu Y, Zhou HF. Esculetin Inhibits Proliferation, Invasion, and Migration of Laryngeal Cancer In Vitro and In Vivo by Inhibiting Janus Kinase (JAK)-Signal Transducer and Activator of Transcription-3 (STAT3) Activation. *Med Sci Monit.* **2019**; 20;25:7853-7863.

Zhang T, Ma C, Zhang Z, Zhang H, Hu H. NF- κ B signaling in inflammation and cancer. *MedComm.* **2021**;16;2(4):618-653.

Zhang Y, Su SS, Zhao S, Yang Z, Zhong CQ, Chen X, Cai Q, Yang ZH, Huang D, Wu R, Han J. RIP1 autophosphorylation is promoted by mitochondrial ROS and is essential for RIP3 recruitment into necrosome. *Nat Commun.* **2017** 8;8:14329.

Zhao Y, Chang S, Qu G, Li T, Cui H. β -Sitosterol Inhibits Cell Growth and Induces Apoptosis in SGC-7901 Human Stomach Cancer Cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2009**; 57: 5211–5218

Anexos