

Universidad de Costa Rica

Sede Rodrigo Facio

Trabajo Final de Graduación para optar por el Grado de Licenciatura en Microbiología y
Química Clínica

**Extractos de plantas para el tratamiento del cáncer: Revisión
bibliográfica y análisis del efecto citotóxico de extractos de la raíz de
la planta *Phyllanthus acuminatus* en una línea celular de cáncer de
mama murino**

Nombre: María Fernanda Alfaro Díaz

Carné: B60198

Julio del 2023

Los que aquí firmamos damos fe que este trabajo posee todas las correcciones indicadas al día de la presentación oral de este Trabajo Final de Graduación:



Dr. Javier Mora Rodríguez

Tutor



M.Sc. Silvia Castro Piedra

Lectora



Dr. Ariel Brenes Glenn

Lector



Dra. Tatiana Murillo Corrales

Presidente del Tribunal



Dr. Julián Fernández Ulate

Profesor asignado

Índice General

Dedicatorias	3
Lista de abreviaturas	5
Justificación	6
Hipótesis	7
Objetivos	8
Resumen	9
Antecedentes	10
Cáncer	10
Cáncer de mama.....	14
Tratamiento convencional del cáncer de mama.....	16
Plantas como nuevas terapias.....	18
Estudios del efecto citotóxico de extractos de plantas.....	20
Tipos de muerte celular.....	23
Caracterización de la muerte celular.....	26
Línea celular PyMT.....	28
Metodología	30
Cultivo celular.....	30
Determinación de curva de letalidad de extractos de <i>P. acuminatus</i>	30
Cuantificación de muerte celular.....	31
Análisis de datos.	31
Resultados	32
Viabilidad celular.....	32
Determinación de la subrutina de muerte celular.....	33
Discusión	36
Conclusiones	40
Referencias	42

Dedicatoria

A mis padres y familiares, quienes me han apoyado siempre en estos años educativos.

A todas las personas que de una manera u otra colaboraron en la realización de este proyecto.

Lista de abreviaturas

Abreviatura	Definición
ANOVA	Análisis de la varianza
CAD	ADNasa activada por caspasas
DISC	Complejo de señales inductoras de muerte
DSREs	Degradadores selectivos del receptor de estrógenos
Fas-L	Fas ligando
IA	Inhibidores de aromatasa
MSREs	Moduladores selectivos del receptor de estrógenos
ROS	Especies reactivas del oxígeno
TAM	Tamoxifeno
TNF	Factor de necrosis tumoral
TNFR1	Receptor tipo 1 de TNF
TRAIL	Ligando inductor de apoptosis relacionada con el factor de necrosis tumoral

Justificación

Actualmente a nivel global el cáncer es un problema de salud de gran importancia, así como una de las principales causas de muerte en el mundo. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), ocurren alrededor de 10 millones de muertes anuales debido al cáncer. Se habla de que incluso, en los próximos años es de esperarse que conforme la población envejezca, aumenten las cifras relacionadas a esta enfermedad, lo cual tiene potencial de convertirse en un gran problema de salud pública si no se toman las medidas necesarias (World Health Organization [WHO], 2019).

Las opciones de tratamiento o terapia contra el cáncer en su mayoría presentan la desventaja de generar diversos efectos adversos sobre los pacientes; además de ser invasivos. Por otro lado, a pesar de que los tratamientos existentes son en su mayoría efectivos, no siempre se logra tener éxito en tratar todo tipo de cáncer o a la enfermedad en sus diversas etapas. Asimismo, opciones como la radioterapia y ciertos agentes quimioterapéuticos pueden aumentar el riesgo de presentar algún cáncer secundario o daño orgánico importante. Sumado a esto, los tratamientos son sumamente costosos, implicando problemas económicos para los sistemas de salud e inclusive a los pacientes directamente (Lin, et al., 2020).

Los extractos de ciertas plantas se han vuelto de gran interés como tratamiento alternativo o complementario contra el cáncer. Estas presentan ventajas como ser fuentes de compuestos bioactivos, presentar menores efectos adversos en comparación a tratamientos convencionales, poseer propiedades anticancerígenas y ser menos costosas en el sentido económico, que las terapias convencionales existentes (Uğur, Güneş, & Mammadov, 2017).

Debido a todo lo expuesto anteriormente es que surge la necesidad de investigar y desarrollar nuevas terapias innovadoras o alternativas contra el cáncer que brinden un panorama favorecedor para los pacientes, minimizando posibles efectos adversos y que a la vez sean económicamente más accesibles para los sistemas de salud; siendo el estudio del efecto citotóxico de los extractos de ciertas plantas de gran relevancia para lograrlo.

Hipótesis

Los extractos de la raíz de la planta *Phyllanthus acuminatus* ejercen un efecto citotóxico sobre una línea celular de cáncer de mama murino denominada PyMT.

Objetivos

Objetivo general

Analizar el efecto citotóxico de extractos de la raíz de la planta *Phyllanthus acuminatus* en la línea celular de cáncer murino PyMT y la literatura disponible sobre el efecto anti cancerígeno de extractos de plantas.

Objetivos específicos

- a. Realizar una revisión bibliográfica acerca del uso de extractos de plantas en el tratamiento antitumoral.
- b. Analizar la viabilidad celular de la línea murina PyMT en respuesta a diferentes extractos de la raíz de la planta *Phyllanthus acuminatus* mediante citometría de flujo.
- c. Determinar la subrutina de muerte celular inducida por los extractos de la raíz de la planta *Phyllanthus acuminatus* con efecto citotóxico, mediante la tinción de yoduro de propidio y annexina V por citometría de flujo.

Resumen

El cáncer es una importante causa de muerte a nivel global. Específicamente el cáncer de mama es la malignidad más frecuente en mujeres, es altamente heterogéneo en su presentación y las estrategias terapéuticas varían según características moleculares del subtipo de cáncer. Los efectos secundarios inducidos por la quimioterapia, el alto costo de las terapias y el aumento de resistencia a las mismas hace necesario desarrollar nuevas tecnologías o terapias derivadas de plantas medicinales las cuales presentan varias ventajas. El presente trabajo buscó realizar una revisión bibliográfica sobre extractos de plantas con potencial función de tratamiento antitumoral. Además, se tuvo como objetivo identificar el efecto citotóxico de tres extractos (plántulas cultivadas in vitro, plantas de campo y de raíz pilosa) de *Phyllanthus acuminatus* sobre PyMT, la cual es una línea celular de cáncer de mama murino. Para los diferentes extractos se empleó las concentraciones 100, 200 y 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Con el extracto de Campo a la concentración de 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$, por medio de la técnica de citometría de flujo, fue posible observar el menor porcentaje de viabilidad celular, así como células en apoptosis y en necrosis/apoptosis tardía. En el caso de los demás extractos no fue posible obtener un efecto citotóxico deseable. Por otro lado, existen gran cantidad de plantas que han mostrado citotoxicidad prometedora ante líneas celulares cancerígenas.

Antecedentes

Cáncer

En la actualidad, el cáncer es de las enfermedades más comunes y letales que afectan a los seres humanos (Uğur, Güneş, & Mammadov, 2017). El cáncer comprende un amplio grupo de enfermedades que pueden tener inicio en casi cualquier órgano o tejido del cuerpo cuando células anormales crecen sin control, invaden sitios corporales contiguos y/o diseminan a otros órganos mediante un proceso denominado metástasis. El cáncer es la segunda causa de muerte a nivel global. En hombres los tipos más comunes son de pulmón, próstata, colorrectal, estomacal y de hígado, mientras que en mujeres corresponden a cáncer de mama, colorrectal, pulmonar, cervical y de tiroides (World Health Organization [WHO], 2019).

Weinberg & Hanahan proponen diez “hallmarks” del cáncer para caracterizarlo. El primero corresponde al mantenimiento de las señales de proliferación. Las células normales controlan la producción y liberación de señales promotoras de crecimiento. Las células de cáncer desregulan dichas señales conformadas por factores de crecimiento que anclan receptores de superficie celular que emiten señales que regulan la progresión a través del ciclo celular y crecimiento celular (Hanahan & Weinberg, 2011).

Estas células pueden adquirir la capacidad de mantener señales de proliferación a través de varios mecanismos. El primero de estos, produciendo ligandos de factores de crecimiento. De manera alterna, las células cancerosas pueden enviar señales que estimulan células normales del estroma asociado al tumor, las cuales les proveen de factores de crecimiento. También se pueden elevar los niveles de proteínas receptoras en la superficie de la célula cancerosa, haciéndolas hipersensibles a cantidades limitadas de ligandos de factores de crecimiento (Hanahan & Weinberg, 2011).

El segundo hallmark involucra la evasión de supresores del crecimiento como *TP53*, *PTEN* o *RB*, que pueden llevar al arresto del ciclo celular o a la inducción de senescencia y hasta apoptosis en células. Para evadir estos genes la célula cancerosa los pierde por completo o acumula mutaciones que los inactiva. Más del 50% de tumores humanos contienen una mutación o delección del gen *TP53*. Por otro lado, los genes supresores de tumores pueden

adicionalmente unirse a otras proteínas expresadas en células tumorales, inactivarse o degradarse rápidamente (Gutschner & Diederichs, 2012).

El tercer hallmark trata sobre la inmortalidad replicativa. En contraste a células normales, que poseen un número limitado de ciclos de división celular, las células tumorales muestran una replicación casi ilimitada. Los extremos cromosomales, telómeros, son cruciales para la replicación limitada, acortándose después de cada división. Las células tumorales poseen una enzima especializada denominada telomerasa, la cual es capaz de agregar repeticiones teloméricas al final de los cromosomas. Otras también emplean alargamiento alternativo de telómeros (Gutschner & Diederichs, 2012).

La activación de la invasión y metástasis se refieren al cuarto hallmark. La malignidad se asocia a la habilidad de invadir el tejido circundante y sitios distantes para formar crecimiento secundario. La metástasis es responsable de más del 90% de las muertes asociadas a cáncer. Para que ocurra las células deben invadir a través de la matriz extracelular, intravasarse en la vasculatura tumoral, sobrevivir el transporte en la circulación, extravasarse en el parénquima de distintos órganos y sobrevivir y manipular microambientes que pueden formar macrometástasis y así colonizar (Fouad & Aanei, 2017).

La inducción de la angiogénesis es el quinto hallmark del cáncer. Los tumores no pueden aumentar su tamaño más de 2-3 mm³ ni hacer metástasis sin vasculatura nueva. La angiogénesis es el proceso de germinación, división celular, migración y ensamblaje de células endoteliales de vasos preexistentes. En eventos normales, la angiogénesis “se apaga” o es autolimitante, sin embargo, esto no sucede con malignidades, donde hay una activación continua del proceso. La regulación de la angiogénesis se realiza con factores pro- y anti-angiogénicos, donde su balance determina el estado del “switch angiogénico”. En casos de malignidad ocurre inclinación hacia los factores pro-angiogénicos (Fouad & Aanei, 2017).

En tumores, esta inclinación es impulsada principalmente por el ambiente de hipoxia. En estos, los vasos se encuentran dilatados y tortuosos y las células endoteliales no forman monocapas regulares. Además, el flujo sanguíneo es “caótico”, por lo que hay áreas de hipoxia y acidosis. Estas condiciones de estrés implican efectos como la potenciación de angiogénesis, la disminución de la efectividad terapéutica y la expansión clonal resistente (Fouad & Aanei, 2017).

En cuanto a la evasión de la muerte celular, para evadir la apoptosis, alrededor de 50% de cánceres humanos han perdido el gen *TP53* (que induce la expresión de proteínas pro-apoptóticas) o lo tienen mutado. Lo anterior las hace más resistentes al estrés celular. Además, los tumores presentan expresión incrementada de factores de sobrevivencia o reguladores apoptóticos como Bcl-2 y Bcl-xL (Gutschner & Diederichs, 2012). En la evasión del proceso apoptótico, las células tumorales adquieren la capacidad de evadir su mecanismo intrínseco de autodestrucción. La inducción de la apoptosis se controla al contrarrestar a los miembros pro y anti apoptóticos de la familia Bcl-2 de proteínas reguladoras (Saha, Solomon, Samson & Gil-Henn, 2021).

En resumen, las células cancerígenas llevan a cabo varios métodos para prevenir la muerte celular, incluyendo la desregulación de la vía intrínseca de la apoptosis. La sobreexpresión de proteínas Bcl-2, anti-apoptóticas, y la pérdida de proteínas BH3, pro-apoptóticas. De manera similar, niveles aumentados de Bcl-x y MCL-1 han mostrado promover la tumorigénesis. Otros factores pro-apoptóticos como *BAX* y *BAK* también se han visto desregulados en múltiples tumores (Sharma, Boise & Shanmugam, 2019). En el contexto del cáncer de mama, los genes anti-apoptóticos típicamente promueven el crecimiento tumoral y a la vez incrementan la resistencia a la terapia. *BCL2* corresponde a un gen anti-apoptótico (pro sobrevivencia) (Saha, Solomon, Samson & Gil-Henn, 2021).

Sin embargo, a pesar de una evasión exitosa de la apoptosis, las células cancerígenas generalmente son más susceptibles a la apoptosis que las células normales, esto como resultado de su complejidad genética, microambiente (hipoxia, escasez de nutrientes, competencia, pH) y estrés relacionado a la terapia. Por ende, estas células generalmente expresan niveles aumentados de proteínas BH3. Para secuestrar factores pro-apoptóticos no unidos, las células de cáncer contienen niveles más elevados de activadores pro-apoptóticos que se unen a dichas proteínas pro-apoptóticas; dichas células se consideran preparadas para la apoptosis (Sharma, Boise & Shanmugam, 2019).

Las células cancerosas crecen y proliferan espontáneamente de manera más rápida de lo que puede manejar el sistema inmune. Esto lo hacen por medio de estrategias que engañan al sistema inmune y previenen su ataque de manera que logran su evasión. Para lograrlo,

estas células construyen un microambiente, el cual dificulta que el sistema inmune elimine de forma eficiente a las células cancerosas (Kim & Cho, 2022).

Otro hallmark del cáncer tiene que ver con inestabilidad genómica y mutación. El supresor tumoral *TP53* posee un rol crítico en proliferación celular, sobrevivencia, apoptosis y en la integridad del genoma. Se le considera guardián del genoma cuando las células experimentan condiciones de estrés como daño al ADN, hipoxia y activación de oncogenes. Por ende, la deficiencia de *TP53* puede llevar a la proliferación descontrolada de células dañadas. El hecho de presentar mutaciones o deleciones en el gen *TP53* se ha reportado como un marcador pronóstico de relevancia en cáncer de seno específicamente (Dai, Xiang, Li & Bai, 2016).

La reprogramación metabólica es un hallmark importante caracterizado por el aumento en glicólisis, glutaminólisis, metabolismo de lípidos, en la vía de las pentosas fosfato, biogénesis mitocondrial, así como otras vías bioenergéticas y de biosíntesis. Estos programas metabólicos en cáncer proveen a las células tumorales no solo con la energía necesaria, sino también con materiales que promueven la biosíntesis a gran escala, la rápida proliferación, sobrevivencia, invasión, metástasis e incluso la resistencia a terapias anticáncer (Phan, Yeung & Lee, 2014).

Para algunos tipos de cánceres, los agentes anticancerígenos son considerados como la primera línea de tratamiento. Existen varias drogas anticancerígenas con distintos orígenes y mecanismos de acción que se encuentran disponibles para tratar diversos tipos de cánceres, sin embargo, la mayor parte de estas drogas implican efectos adversos serios para quienes son tratados con las mismas (Sergazy, et al., 2022).

Es de suma dificultad prevenir la incidencia de efectos adversos generados por drogas quimioterapéuticas. Por ejemplo, la doxorubicina, un agente quimioterapéutico ampliamente utilizado, con frecuencia induce cardiomiopatías e insuficiencia cardíaca crónica. Asimismo, con el cisplatino, empleado en quimioterapia, ha habido reportes de nefrotoxicidad e inmunosupresión en pacientes durante el tratamiento (Lin, et al., 2020).

Las terapias contra el cáncer pueden llevar a un amplio espectro de complicaciones cardiovasculares, dentro de las cuales, la cardiotoxicidad es la principal de ellas que genera

preocupación. Sin embargo, los efectos tóxicos a nivel vascular han emergido como la segunda causa más comúnmente reportada relacionada a terapia de tratamiento contra el cáncer. Estos efectos tóxicos vasculares se pueden presentar generalmente como vasoespasmos, trombosis aguda y aterosclerosis acelerada (Herrmann, 2020).

Por otro lado, no solamente se tienen una serie de efectos adversos con drogas anticáncer, sino que además existe la posibilidad de que las células cancerígenas puedan llegar a desarrollar cierto tipo de resistencia ante estas drogas durante el tratamiento con quimioterapia (Lin, et al., 2020).

Cáncer de mama

El cáncer de mama ha superado al cáncer de pulmón como el diagnóstico de cáncer más común a nivel mundial. En el 2020, se alcanzó un estimado de 2.3 millones de casos nuevos de cáncer de mama diagnosticados, comprendiendo un 11.7% de todos los nuevos casos de cáncer y un total de 684 996 casos que resultaron en muerte (Sung, et al., 2021).

La incidencia de este cáncer ha incrementado desde el aumento de la evaluación de pacientes por medio de mamografías y además continúa aumentando conforme envejece la población. Los principales factores de riesgo incluyen factores de riesgos reproductivos y hormonales (menarquía temprana, menopausia tardía, edad avanzada en primer parto, bajo número de hijos, menor lactancia, terapia hormonal en menopausia y anticonceptivos orales). También se tienen factores asociados a estilo de vida (sobrepeso, inactividad física e ingesta de alcohol). Además, existe predisposición genética (genes *BRCA1* y *BRCA2*) (Hong & Xu, 2022).

En cuanto a su clasificación histológica se tienen dos subtipos: preinvasivo e invasivo (Harbeck, et al., 2019). Los cánceres de seno invasivos comprenden tumores de amplio espectro con gran variación en su comportamiento, presentación y morfología. El carcinoma mamario invasivo de tipo no especial (carcinoma ductal invasivo) es el subgrupo más frecuente. Alrededor del 25% de los carcinomas de seno invasivos presentan patrones de crecimiento distintivos y características citológicas, por lo que se dividen en subtipos en

carcinoma lobular invasivo, carcinoma tubular, mucinoso A, mucinoso B y neuroendocrino (Łukasiewicz, et al., 2021).

El tipo no invasivo es el que no se extiende lejos del lóbulo o de los ductos donde se sitúa. Un ejemplo es el carcinoma ductal *in situ*, el cual aparece cuando células atípicas se desarrollan en los conductos lácteos y no se extienden a tejidos proximales. Por otro lado, el carcinoma lobular *in situ* es otro ejemplo del tipo no invasivo (Akram, Iqbal, Daniyal & Khan, 2017).

El cáncer de seno triple negativo se describe como la deficiencia del receptor de progesterona, receptor del factor de crecimiento epidérmico humano (HER-2) y deficiencia en expresión del receptor de estrógenos. Este tipo es principalmente destructivo, observado generalmente en mujeres premenopáusicas (Akram, Iqbal, Daniyal & Khan, 2017). Presenta un comportamiento clínico relativamente agresivo, comparado con otros subtipos de cáncer de mama. Adicionalmente, presentan patrones metastásicos y un mal pronóstico. El riesgo de recurrencia tumoral y muerte son altas en este tipo de cáncer y se ha mostrado un aumento en su incidencia en los últimos años (Almansour, 2022).

Aproximadamente un 70% de los tumores de cáncer de mama humanos expresan receptores hormonales. El receptor de estrógenos (ER) y el receptor de progesterona (PR) son los factores de transcripción primarios de oncogénesis en cáncer de mama receptor de hormonas positivo (HR+). A diferencia de otros subtipos de cáncer de mama, el HR+ se asocia comúnmente con recurrencias tardías (6 o más años post-diagnóstico). Este subtipo tiende a crecer más lentamente que los negativos para receptor de hormonas. Asimismo, existe considerable heterogeneidad clínica y molecular en este tipo de cáncer de mama (Lim, Metzger & Winer, 2012).

El uso de inhibidores de aromatasas y la adición de quimioterapia a regímenes de estrógenos puede ser de beneficio en algunos casos (Lim, Metzger & Winer, 2012). Los casos con receptor de estrógenos positivo responden a terapia endocrina. Por ende, la positividad del RE puede asociarse a un mejor pronóstico. Al contrario, los tumores negativos para el RE son de naturaleza más agresiva y además son metastásicos (Hua, Zhang, Kong & Jiang, 2018).

Alrededor de un 15-20% de los cánceres de mama poseen positividad para la proteína HER2, donde esta se encuentra sobre expresada (Loibl & Gianni, 2017). Tejidos normales tienen baja expresión de la proteína de membrana HER2. La sobreexpresión de HER2 en cáncer de seno confiere un comportamiento biológico negativo y agresividad clínica. Los tipos de cáncer de mama HER2+ tienen sensibilidad aumentada a ciertos agentes citotóxicos como doxorubicina y son propensos a hacer metástasis a cerebro y vísceras. Estos tumores tienen altas tasas de proliferación y se asocian a un pronóstico más pobre para los pacientes, dicho pronóstico mejora con quimioterapia combinada con Trastuzumab (dirigido contra HER2) (Gutierrez & Schiff, 2011).

El mecanismo exacto por el cual inicia el cáncer de mama aún se desconoce. A nivel de la célula de origen, se tiene al modelo de evolución clonal (donde se acumulan mutaciones, se dan cambios epigenéticos en células tumorales y sobreviven las más aptas) y el modelo de célula madre cancerosa (en el cual solo las células cancerosas precursoras inician y sostienen progresión). A nivel morfológico se da un continuo de lesiones y modificaciones genéticas de glándulas normales a cáncer, mientras que a nivel molecular hay evidencia de que el cáncer de mama evoluciona en dos vías moleculares divergentes de progresión, asociadas principalmente a expresión del receptor de estrógenos, el grado tumoral y proliferación (Harbeck, et al., 2019).

Tratamiento convencional del cáncer de mama

El tratamiento depende del estadio y tipo de cáncer de mama del que se trate. Cada plan de tratamiento es individualizado. En el caso de pacientes con estadios del I al III, el objetivo del tratamiento es curar el cáncer. Usualmente se lleva a cabo cirugía para remover el tumor, medicamentos y posiblemente terapia de radiación a la mama. Para pacientes en estadio IV, que se ha diseminado a partes distales del cuerpo, el objetivo del tratamiento es controlar el cáncer el mayor tiempo posible, este tratamiento consiste principalmente en la toma de medicamentos (Waks & Winer, 2019).

La terapia de radiación ha reducido la necesidad de realizar mastectomías. Afecta solamente a las células siendo tratadas y se puede llevar a cabo posterior a cirugía para

destruir las células remanentes en el área del pecho (Akram, et al., 2017). Actualmente el tratamiento de quimioterapia incluye la aplicación simultánea de carboplatino, ciclofosfamida, 5-fluorouracil, taxanos (paclitaxel, docetaxel) y antraciclinas (doxorubicina, epirubicina) (Łukasiewicz, et al., 2021).

Este tipo de drogas atacan a las células en crecimiento, incluyendo a células inmunes, lo que disminuye la respuesta inmunológica. Uno de los mecanismos más importantes de la quimioterapia es la muerte celular inmunogénica. Se ha documentado que estas drogas pueden cambiar la composición de poblaciones de células inmunes en el microambiente tumoral. Varios estudios han demostrado que las antraciclinas podrían aumentar la infiltración de linfocitos T citotóxicos en el tumor, lo que promueve un tratamiento exitoso en pacientes de cáncer de mama (Barzaman, et al., 2020).

Adicionalmente, la antraciclina y ciclofosfamida pueden aumentar el número de linfocitos T citotóxicos, en comparación a células T reguladoras, mostrando efectos beneficiosos en los pacientes. La ciclofosfamida suprime a las células T reguladoras al disminuir la expresión de *FOXP3* y de TNF inducido por glucocorticoides en estas. La terapia combinada de paclitaxel y cisplatino en bajas dosis ha mostrado una respuesta fuerte de linfocitos T citotóxicos. Además, se ha reportado que 5-fluorouracil podría aumentar la respuesta de células T. La combinación de fluorouracil y cisplatino aumenta la infiltración de linfocitos/células TCD4+ y CD8+ en el sitio del tumor. Mientras que la doxorubicina aumenta el número de células T y NK (Barzaman, et al., 2020).

El mecanismo de acción de los agentes alquilantes, que incluye a drogas como cisplatino, carboplatino, doxorubicina, epirubicina, ciclofosfamida, entre otras, consiste en la interferencia de la formación de la doble cadena de ADN. Esto sucede al transferir un grupo alquilo a la base de guanidina en el ADN. El entrecruzamiento de ácidos nucleicos con proteínas o péptidos puede también afectar la geometría del ADN, causar un emparejamiento de bases erróneo y la ruptura de hebras de ADN, lo que eventualmente lleva a la prevención de la división celular y senescencia irreversible. Los agentes alquilantes en sus formas electrofílicas interactúan con el ADN de células cancerígenas y forman aductos covalentes (Anand, et al., 2022).

Los agentes quimioterapéuticos tradicionales afectan la síntesis de macromoléculas y la función de células neoplásicas al interferir con el ADN, ARN, o la síntesis proteica, o afectando la función de estos. Cuando la interferencia en la síntesis macromolecular o en la función es la suficiente, se llega a muerte celular debido al efecto directo del agente quimioterapéutico o porque se promueve la apoptosis. La toxicidad de estas drogas es de mayor magnitud durante la fase S, puesto que es la fase de síntesis en el ciclo celular. Se da además una interferencia en la replicación y transcripción, previniendo la división y proliferación de células del cáncer (Amjad, Chidharla & Kasi, 2023).

La terapia hormonal o endocrina se puede usar como terapia adyuvante o neoadyuvante y es efectiva en casos de recurrencia de cáncer de mama o metástasis. Una de las modalidades de tratamiento en este caso es bloquear el receptor de estrógenos, debido a que el objetivo es disminuir los niveles de estrógenos. Se tienen en esta categoría drogas como tamoxifeno, toremifeno, fulvestrant e inhibidores de aromatasa como letrozole (Łukasiewicz, et al., 2021).

Los tumores que expresan el receptor de estrógenos son tratados con inhibidores de aromatasa (IA), moduladores selectivos del receptor de estrógenos (MSREs) o degradadores selectivos del receptor de estrógenos (DSREs). La terapia con IA disminuye los niveles de estrógenos mientras que los MSRE/DSREs compiten con el estrógeno en los receptores o estimulan la degradación del receptor de estrógenos. El tamoxifeno (TAM) es un anti estrógeno que se une al receptor de estrógenos causando su dimerización. El TAM bloquea la transcripción génica y afecta la señalización del receptor de estrógenos. En el tratamiento de cáncer de mama ha mostrado tener un efecto anti-proliferativo (antagonista). Los inhibidores de aromatasas de tercera generación, como el letrozole, bloquean la producción de estrógeno sin tener efecto sobre otras vías esteroideogénicas (Rasha, Sharma & Pruitt, 2021).

Plantas como nuevas terapias

Ante lo expuesto previamente, surge la necesidad de desarrollar nuevos agentes anticancerígenos que conlleven una menor cantidad de efectos adversos para las personas en

tratamiento (Sergazy, et al., 2022). Sin embargo, se debe hacer salvedad de que los derivados de plantas no están libres de riesgos, es de suma relevancia tomar en cuenta que pueden existir efectos adversos a hierbas o interacciones entre hierbas y drogas, las cuales deben ser consideradas a detalle (Lin, et al., 2020).

Las plantas medicinales han sido una fuente valiosa de agentes terapéuticos, como lo es el caso de drogas anticáncer (Sergazy, et al., 2022). Incluso se estima que aproximadamente un 60% de todos los agentes quimioterapéuticos aprobados por la FDA, incluyendo vincristina, vinblastina y taxol tienen origen a partir de productos naturales o sus derivados (Katz & Baltz, 2016).

Asimismo, se ha postulado que la combinación de drogas y productos naturales lleva a la obtención de efectos similares a los observados con drogas quimioterapéuticas convencionales, pero con el beneficio de generar menos efectos adversos (Lin Fu, Tsai, Cheng, & Weng, 2017). Tres metaanálisis sobre la medicina natural tradicional han encontrado que dichos productos empleados como adyuvantes quimioterapéuticos en tratamientos contra cáncer nasofaríngeo, pancreático y de mama han brindado resultados satisfactorios (Lin, et al., 2020).

En conjunto, los mecanismos a través de los cuales estos compuestos naturales actúan como adyuvantes quimioterapéuticos se pueden reducir en tres: potenciando directamente un efecto tumoricida (al sensibilizar a células cancerosas para responder mejor ante drogas quimioterapéuticas), revirtiendo la quimio resistencia (disminuyendo el eflujo de drogas o aumentando el acúmulo de drogas quimioterapéuticas en células cancerosas) y reduciendo la toxicidad inducida por dichas drogas (al promover mecanismos de reparación en células normales, ante el daño de drogas quimioterapéuticas) (Lin, et al., 2020).

En el estudio de plantas, según la parte de la planta de la que se trate, se van a encontrar distintos metabolitos secundarios en diferentes composiciones. Adicionalmente, el uso medicinal que se le dé a dichas plantas también es específico a la parte de la planta en cuestión (Uğur, Güneş, & Mammadov, 2017).

Las plantas del género *Phyllanthus* destacan debido a que poseen gran cantidad de metabolitos secundarios. Se ha aislado más de 510 compuestos a partir de *Phyllanthus*, dentro

de los que se destacan en su mayoría lignanos, triterpenoides, flavonoides y taninos. Las ligninas y taninos se consideran los compuestos biológicamente activos de este género. Estos compuestos son una potencial fuente de recursos terapéuticos (Mao, et al., 2016).

Algunas investigaciones han mostrado que los metabolitos presentes en este género poseen actividad antibacteriana, antioxidante, antiviral, antidiabética y antidiarreica. En el caso de la especie *Phyllanthus acuminatus*, se le atribuye gran capacidad antitumoral, anticáncer, antimalárica, anti-hepatotóxica y antimicrobiana. Sumado a esto, en la raíz de *P. acuminatus* se descubrieron compuestos anticancerígenos, que pueden ser utilizados por ejemplo en el cáncer de mama (Pérez, Jiménez, & Garro, 2022).

Asimismo, en el trabajo de investigación de Alvarado et al. 2013, se logró identificar filantósidos, lignanos como compuestos no fenólicos en conjunto con compuestos fenólicos en extractos de la raíz de *P. acuminatus*. Los filantósidos y lignanos son los responsables de la actividad antineoplásica (Alvarado, Rodríguez, & Madrigal, 2013). Estudios han demostrado que la mayoría de fitoquímicos actúan al interferir con ciertas vías de señalización celular y llevan al arresto del ciclo celular y/o la inducción de la diferenciación; esto aparte de su potencial para inducir apoptosis (Uğur, Güneş, & Mammadov, 2017).

Estudios de efecto citotóxico de extractos de plantas

La planta *Eclipta alba* es conocida por sus propiedades antimicotóxicas, analgésicas, antibacterianas, inmunomoduladoras y anti hepatotóxicas, entre otras. Se determinó el efecto anticáncer del extracto metanólico de *E. alba* sobre una línea celular de cáncer de colon (HCT-116), en comparación con una línea celular de cáncer de mama (MCF-7), cáncer prostático (PC-3) y cáncer renal (RCC-45). El extracto tuvo mayor citotoxicidad dosis-dependiente contra células HCT-116, comparado a las otras líneas celulares, mientras que células normales (WI-38) mostraron mucha menor sensibilidad, implicando no toxicidad a una concentración específica (Nelson, et al., 2020).

Las células cancerígenas poseen un nivel basal más alto de especies reactivas del oxígeno (ROS) debido a su alta tasa metabólica. Niveles elevados de ROS son esenciales para que las células cancerosas crezcan, proliferen y hagan metástasis. En contraste con

células normales, las células de cáncer poseen mecanismos antioxidantes limitados para eliminar ROS en exceso (Qian, et al., 2019). Se postula que la actividad anticáncer del extracto de *E. alba* se debe a la presencia de compuestos que alteran el balance redox esencial para la sobrevivencia de células HCT-116 (Nelson, et al., 2020).

El β -sitosterol, fitosterol aislado del extracto de *E. alba* posee actividad antioxidante y anticáncer, además induce apoptosis por la vía dependiente de caspasa-8 en células cancerígenas. El cumestano y la wedelolactona presentan actividad anticáncer e inducen apoptosis. Adicionalmente, se demostró que el extracto es capaz de bloquear dos propiedades esenciales requeridas por células cancerígenas para crecer y proliferar, las cuales son, la habilidad de crecer y proliferar formando colonias y la capacidad de migrar para realizar metástasis (Nelson, et al., 2020).

Solowey et al. (2014) investigaron las propiedades anticancerígenas de extractos de las plantas *Urtica membranacea*, *Artemisia monosperma* y *Origanum dayi*. Diversos compuestos aislados de *A. monosperma* como terpenoides, flavonoides, cumarinos, esteroides, entre otros, han demostrado actividad anticáncer específica in vitro, contra líneas celulares de cáncer colorrectal y cáncer de mama. Sumado a esto, se ha mostrado que la capillina induce apoptosis en líneas celulares tumorales como la HT29 de colon, MIA PaCa-2 (pancreática), carcinoma epidermoide de la laringe (HEp-2) y en células de carcinoma de pulmón (A549) (Solowey, et al., 2014).

En el caso de *Origanum dayi*, esta contiene compuestos asociados con la supresión del crecimiento en la línea celular de leucemia humana Molt 4B y la línea celular HL-60 (células de leucemia promielocítica humana) por medio de la inducción de la apoptosis. *U. membranacea* por su parte, fue efectiva eliminando células humanas tumorales, al igual que cultivos humanos primarios, donde la muerte fue causada por la vía apoptótica. Asimismo, el extracto de esta planta inhibió el crecimiento in vivo tumoral en un modelo de cáncer de mama murino (Solowey, et al., 2014).

Sergazy et al. (2022) probaron la actividad anti proliferativa y citotóxica de extractos de plantas de la familia Geraniaceae sobre cinco líneas celulares tumorales. Dentro de esta familia, se ha reportado que los géneros *Geranium* y *Erodium* muestran diversas actividades biológicas. Los resultados obtenidos demostraron que extractos de *G. glaberrimum*, *G.*

asphodeloides, *E. birandianum* y *E. leucanthum*, con distinta potencia inhibieron la proliferación celular de células de cáncer de mama (MCF-7), células de músculo de sarcoma de Ewing (A-673), carcinoma epitelial cervical (DoTc2 4510), carcinoma hepatocelular (HUH-7) y células malignas de melanoma (A-375).

Análisis fitoquímicos de la planta *E. birandianum* realizados por este mismo grupo de investigadores llevaron a la identificación de fenoles como quercetina siendo el principal componente. Otros compuestos identificados en la planta incluyen ácido gálico, ácido cafeico, ácido quínico, catequina, epicatequina, entre otros. Por lo tanto, los autores concluyen que la actividad anti proliferativa del extracto de dicha planta muy probablemente se asocia con uno o varios de estos compuestos. Se demostró que la quercetina es citotóxica ante células MCF-7 y, en combinación con ácido micofenólico inhibieron de manera sinérgica el crecimiento de células de cáncer de mama (Sergazy, et al., 2022).

Numerosos compuestos bioactivos se han aislado de plantas de la familia Annonaceae. Se ha visto que alcaloides como jerantinina B, liriodenina y vinorelina poseen la capacidad de inducir apoptosis y bloquear el ciclo celular en la fase G1. Pumiputavon, et al. 2017, emplearon tres líneas celulares cancerígenas: carcinoma cervical humano, carcinoma hepatocelular humano y líneas hematopoyéticas humanas para evaluar la actividad anti-cáncer de *Uvaria longipes*, *Dasymaschalon* sp., *Artabotrys burmanicus* y *Marsypopetalum modestum*. Los resultados mostraron que los extractos metanólicos de las hojas de estas especies de plantas indujeron la muerte celular apoptótica dosis-dependiente y tipo celular-dependiente (Pumiputavon, et al., 2017).

Según los investigadores, las evidencias anteriores implican que los extractos crudos pueden tener algunos compuestos activos que funcionen contra líneas celulares de cáncer humano. Además, observaron que taninos y flavonoides se encontraron presentes en todos los extractos, dichos fitoquímicos han sido previamente reportados por su actividad anticáncer (Pumiputavon, et al., 2017).

Tabla I. Resumen de citotoxicidad de extractos de plantas sobre distintas líneas celulares.

Planta	Compuestos	Línea celular	Resultados
<i>Eclipta alba</i>	Extracto metanólico.	HCT-116, MCF-7, PC-3 y RCC-45.	Alteración del balance redox de las células HCT-116. Inducción de apoptosis por vía dependiente de caspasa-8.
<i>Artemisia monosperma</i>	Terpenoides, flavonoides, cumarinos, esteroides, capillina.	Líneas de cáncer colorrectal (HT-29) y de cáncer de mama.	Capillina induce apoptosis.
<i>Origanum dayi</i>	Aceite esencial (OOEO).	Línea celular de leucemia humana Molt 4B y la línea celular HL-60.	Inducción de la apoptosis.
<i>Geranium</i>	Extractos de etanol.	MCF-7, A-673, DoTc2 4510, HUH-7 y A-375.	Inhibición de proliferación celular.
<i>Erodium</i>	Fenoles (quercitina)	MCF-7.	Efecto citotóxico de quercitina. en combinación con ácido micofenólico inhibición del crecimiento de células de cáncer de mama.

Fuente: Elaboración propia.

Tipos de muerte celular

La apoptosis es una forma de muerte celular programada, la cual se encuentra mediada por vías de señalización intrínsecas y extrínsecas impulsadas por múltiples factores como estrés celular, daño al ADN y vigilancia inmunológica (Carneiro & El-Deiry, 2020).

Sin embargo, se debe resaltar que estudios recientes han demostrado la existencia de muerte celular programada, con mecanismos que no involucran la apoptosis. Por lo tanto, la muerte celular programada y la apoptosis no deben de ser consideradas como sinónimos (Jan & Chaudhry, 2019).

Una característica de la apoptosis es la liberación de citocromo c desde la mitocondria, que lleva a la activación de proteínas de la familia de las caspasas, las cuales pueden ser iniciadoras de la apoptosis, como las caspasas 8, 9 y 10, o efectoras de la apoptosis, como las 3, 6 y 7. El proceso de apoptosis también puede ocurrir cuando las células T y células NK liberan gránulos citotóxicos que contienen enzimas proteolíticas y perforinas. La consecuencia es la ruptura de la membrana nuclear, evaginaciones en la membrana y ruptura de ADN genómico en estructuras nucleosomales (Carneiro & El-Deiry, 2020). Se conoce también otro proceso denominado necroptosis, el cual también puede llevar a la activación de la apoptosis. Este implica la pérdida de la integridad de la membrana, en conjunto con la inhibición de la actividad de las caspasas (Green, 2019).

La señalización de apoptosis a través de la vía extrínseca ocurre cuando ligandos extracelulares tales como TNF, Fas ligando (Fas-L) y ligando inductor de apoptosis relacionada con el factor de necrosis tumoral (TRAIL) se unen al dominio extracelular de receptores de membrana como receptor tipo 1 de TNF (TNFR1), Fas, y receptores de TRAIL. Lo anterior resulta en la formación de un complejo de señales inductoras de muerte (DISC), el cual consiste en el dominio de muerte asociado a Fas, procaspasa 8, procaspasa 10 y las proteínas c-FLIPs. Seguidamente, la caspasa 8 se activa y se disocia de DISC para comenzar una cascada de activación de caspasas, que constituye la fase de ejecución de la apoptosis (Goldar, Khaniani, Derakhshan, & Baradaran, 2015).

Por su parte, la vía intrínseca de la apoptosis es principalmente mitocondrial. Es desencadenada por estrés oxidativo, irradiación y tratamiento con drogas citotóxicas. Esta vía es mediada por la inserción de Bax/Bak en la membrana de la mitocondria, donde posterior a esto se libera citocromo c al citosol. Bcl-2 y Bcl-xL son proteínas anti-apoptóticas que previenen la liberación del citocromo c. El citocromo c se combina con Apaf-1 y procaspasa-9 para producir el apoptosoma, que es un complejo multiproteico que activa a la

caspasa 9, seguido de la activación de la caspasa 3 y la cascada que termina en apoptosis (Yuan & Akey, 2013).

Finalmente, ambas vías mencionadas convergen en el mismo punto, el cual es la fase de ejecución, vía final de la apoptosis. Las caspasas 8 y 9 son iniciadoras, mientras que la caspasa 3, 6, 7, 10, la ADNasa activada por caspasas (CAD) y la Poly (ADP-ribosa) polimerasa (PARP) son clasificadas como caspasas efectoras. Las caspasas iniciadoras se activan al autoclirse lo cual activa a las caspasas ejecutoras. Estas últimas posteriormente proteolizan algunos sustratos llevando a apoptosis. Además, activan a la endonucleasa citoplasmática que causa la condensación de cromatina, formación de blebs citoplasmáticos y cuerpos apoptóticos. La endonucleasa citoplasmática, activada por la caspasa 3 (la más importante de las caspasas ejecutoras) degrada material nuclear y proteasas, seguido de la degradación de proteínas nucleares y de citoesqueleto (Goldar, Khaniani, Derakhshan, & Baradaran, 2015).

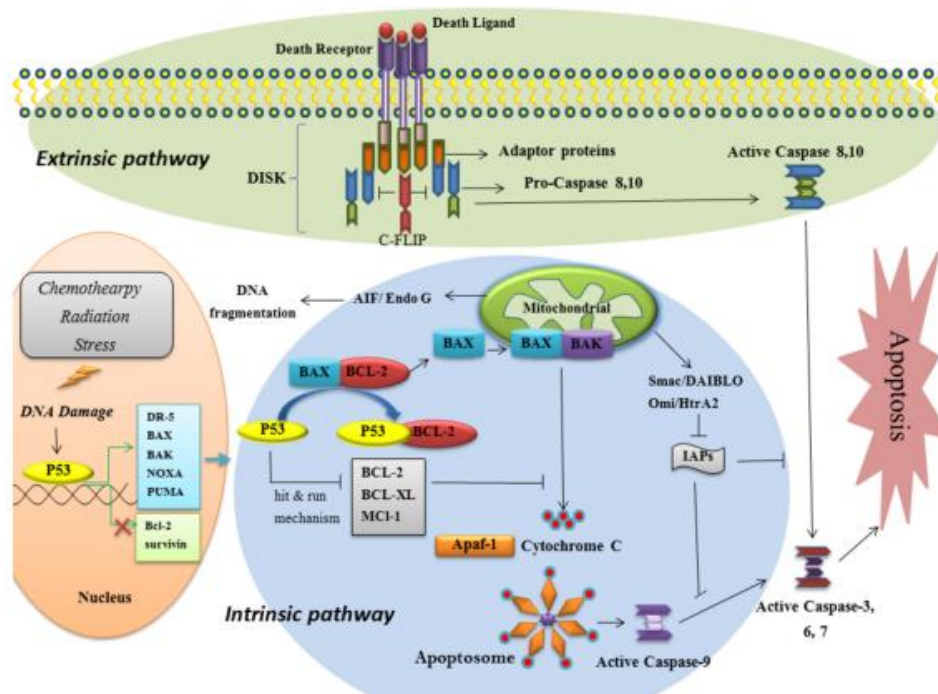


Figura 1. Vía intrínseca y extrínseca de la apoptosis. Fuente: Goldar, S., Khaniani, M. S., Derakhshan, S. M., & Baradaran, B. (2015).

La supresión de la apoptosis en la carcinogénesis presenta un rol central en el desarrollo y la progresión de cáncer. Las células tumorales emplean una variedad de mecanismos moleculares para suprimir la apoptosis, por lo tanto, la inducción de la apoptosis en estas células es un enfoque terapéutico específico orientado a la quimioterapia (Uğur, Güneş, & Mammadov, 2017).

Caracterización de la muerte celular

Respecto a marcadores moleculares, en cultivos de líneas celulares se pueden detectar ciertas características de la apoptosis por medio de citometría de flujo, tales como el contenido de ADN fragmentado o ADN en fase sub-G1, la externalización de fosfatidilserina (que se encuentra en la parte interna de la membrana celular de células sanas) o el corte de caspasas (Carneiro & El-Deiry, 2020).

La citometría de flujo es una herramienta con la habilidad para medir propiedades ópticas y de fluorescencia de una célula u otras partículas como microorganismos, núcleos, entre otros. El principio de esta técnica se asocia a la dispersión de la luz y la emisión de fluorescencia, la cual ocurre a través de una fuente de excitación, generalmente un láser, que incide sobre partículas en movimiento. La dispersión de luz se asocia a características estructurales y morfológicas de la célula (Adan, Alizada, Kiraz, Baran, & Nalbant, 2017).

Con la citometría de flujo se puede hacer una medición cuantitativa de las células apoptóticas. Mediante un análisis de viabilidad celular se puede obtener información sobre las células vivas y las células muertas. La diferenciación entre células vivas y muertas en citometría de flujo se puede llevar a cabo mediante el uso de distintos tipos de fluorocromos como yoduro de propidio (PI) o el caso de annexina V unida al fluorocromo FITC (isotiocianato de fluoresceína) (Adan, Alizada, Kiraz, Baran, & Nalbant, 2017).

La annexina V es un miembro de las proteínas calcio dependientes que anclan fosfolípidos. Esta se adhiere específicamente a residuos de fosfatidilserina. Como fue mencionado anteriormente, en células sanas, la fosfatidilserina se localiza en la parte citosólica de la membrana citoplasmática. En etapas tempranas de apoptosis, la

fosfatidilserina se transloca a la capa externa de la membrana y esto es detectable empleando sondas fluorescentes de annexina V mediante citometría de flujo (Banfalvi, 2016).

En el caso del PI, este corresponde a una molécula fluorescente que se une al ADN, pero no es capaz de atravesar células con una membrana plasmática intacta (células vivas). Es por lo anterior que el yoduro de propidio se puede emplear para diferenciar entre células viables y células muertas, donde en las últimas, la membrana se permeabiliza, permitiendo el ingreso de dicho compuesto fluorescente, lo cual también es detectable con citometría de flujo (Crowley, et al., 2016).

La tinción con annexina V-FITC, en conjunto con PI permite examinar el posible tipo de muerte que fue inducida (necrosis y/o apoptosis). Los porcentajes de células analizadas mediante citometría de flujo se pueden clasificar dentro de cuatro categorías. La población de células ubicada en el cuadrante annexina V+/PI- y en el de annexina V+/PI+ corresponden a células en apoptosis temprana y apoptosis tardía respectivamente. Los cuadrantes annexina V-/PI- y annexina V-/PI+ encierran poblaciones de células vivas y necróticas respectivamente (Pumiputavon, et al., 2017).

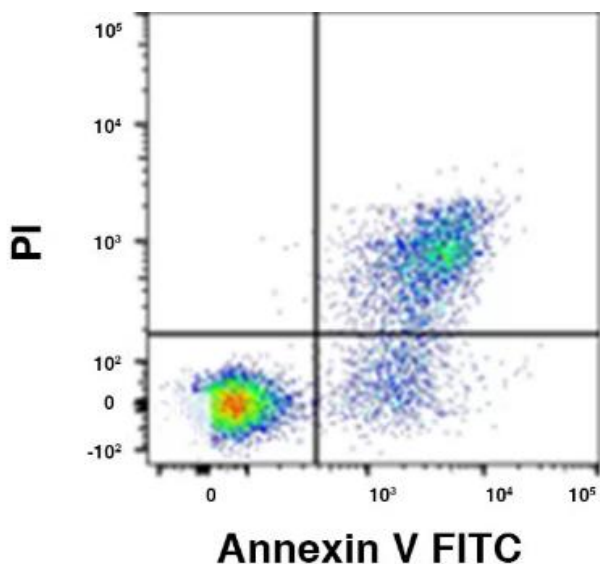


Figura 2. Representación de poblaciones celulares mediante tinción con annexina V-FITC y PI. Fuente: Leinco Technologies, Inc. <https://www.leinco.com/p/annexin-v-fitc-apoptosis-detection-kit/#toc-kit-details>.

Línea celular PyMT

La línea celular MMTV-PyMT (tumor mamario murino) es una plataforma muy bien establecida para el estudio de cáncer de mama humano (Ionkina, et al., 2021). Los ratones transgénicos MMTV-PyMT desarrollan tumores mamarios de manera espontánea, que se asemejan en gran medida a la progresión y morfología del cáncer de mama humano (Christenson, et al., 2017).

La expresión de la oncoproteína PYMT del poliomavirus está controlada por las secuencias terminales repetidas largas (o LTR por sus siglas en inglés) del virus del tumor mamario y está restringido al epitelio mamario. El hecho de compartir características morfológicas y transcripcionales con la enfermedad humana hace que estos ratones transgénicos sean un modelo confiable para cáncer de mama. Los tumores primarios desarrollados en estos ratones pasan por cuatro fases de progresión de cáncer: hiperplasia, adenoma/neoplasia mamaria intraepitelial, carcinoma temprano y tardío; mientras progresa de un tumor premaligno a maligno (Cai, et al., 2017).

Metodología

A. Cultivo celular

Se cultivó la línea celular murina PyMT en monocapa en medio RPMI (Roswell Park Memorial Institute). Este medio se suplementó con suero fetal bovino al 10%, glutamax (glutamina) al 1%, Hepes, aminoácidos, piruvato y anti-anti (antimicrobiano-antimicótico incluyendo penicilina, estreptomycin y anfotericina B) al 1%. Las células fueron mantenidas en frascos de cultivo celular de 25 cm² en una incubadora a 37 °C con CO₂ al 5%. El medio suplementado fue cambiado cada 3 a 4 días, hasta alcanzar confluencia, donde se realizó el pasaje.

B. Determinación de curva de letalidad de los extractos de *Phyllanthus acuminatus*

Se determinó la muerte celular en la línea PyMT empleando distintos extractos de la planta *Phyllanthus acuminatus* denominados: raíz pilosa, planta in vitro y planta de campo, a distintas concentraciones. Para esto se sembraron dos placas de 24 pocillos, a las cuales se añadió la suspensión de células en RPMI a 16 pozos por placa y se incubó durante 24 horas.

La cantidad de células a sembrar se determinó realizando recuento en cámara de Neubauer empleando el colorante azul Tripán. Se contó la cantidad de células en cuatro cuadrantes y se calculó el volumen de suspensión por pocillo tomando en cuenta llegar a obtener 30 000 células en cada pocillo.

Pasadas las 24 horas, de inocular las células en los pocillos, a partir de los tres extractos se prepararon soluciones de distintas concentraciones, se utilizaron las concentraciones de 100, 200 y 300 µg/mL para los tres extractos denominados: Raíz de Campo, Pilosa e In vitro. Cada una de estas concentraciones se añadió al pocillo correspondiente diluida en el medio de cultivo. Además, se preparó cuatro controles conteniendo únicamente células y medio.

Una de las placas se incubó durante 48 horas y la otra por 72 horas. Al concluir estos tiempos se procedió a determinar el porcentaje de muerte celular por citometría de flujo.

C. Cuantificación de muerte celular

Se realizó mediante la tinción de yoduro de propidio y Annexina V-FITC por citometría de flujo. Para producir una suspensión de células óptima para el análisis las células de cada pocillo se centrifugaron a 160 g por 5 minutos y se les descartó el sobrenadante. Posteriormente fueron incubadas con TrypLE durante 5 minutos para remover aquellas adheridas a la placa. La tripsina fue neutralizada con PBS

Se realizó incubación durante 15 minutos a 4 °C y en la oscuridad con el mix de tinción compuesto por Annexin Buffer 1X, Annexin V-FITC y yoduro de propidio. Pasado este tiempo se centrifugó y descartó el sobrenadante, seguidamente se añadió Annexin Buffer 1X seguido de una centrifugación, después de la cual se añadió nuevamente Annexin Buffer 1X.

La lectura y medición se llevó a cabo en el citómetro de flujo Cytotflex LX (Beckman Coulter).

D. Preparación de extractos

Los extractos empleados en el experimento fueron suministrados por la Escuela de Biología del Tecnológico de Costa Rica.

El extracto de Campo corresponde a la raíz sometida a un proceso de astillado, secado a 105 °C durante 24 horas, para culminar siendo molida hasta obtener un polvo fino. Por su parte, las raíces In Vitro se sometieron a un proceso continuo de secado en dos fases, primero a temperatura ambiente por 24 horas, seguida de 2 horas a 50 °C y finalmente siendo molida. Para la preparación de Pilosa, se realizó su desecación y posteriormente un tratamiento de agroinfección con *Agrobacterium rhizogenes*, colocando microestacas en placas con medio M&S. Estas estacas se expusieron a 16 horas de luz y 8 de oscuridad, las raíces pilosas recolectadas se secaron durante 48 horas a temperatura ambiente y seguidamente a 70 °C, para ser molidas y utilizadas en la elaboración de extractos crudos (Monge, Quesada, Méndez, 2018).

E. Análisis de datos

Los datos se analizaron utilizando el programa de análisis del Cytoflex LX (Beckman Coulter) para lograr determinar los porcentajes de muerte celular. Los porcentajes de muerte celular obtenidos se graficaron y analizaron empleando el programa Graph Pad, en el cual se realizó un ANOVA de dos vías, seguido de una prueba de Tukey con un intervalo de confianza del 95% para determinar diferencias significativas entre los grupos experimentales.

Resultados

I. Viabilidad celular

Para la determinación de muerte en la línea celular murina PyMT se aplicó los extractos de la planta *P. acuminatus* denominados Pilosa, In Vitro y Campo, a concentraciones de 100, 200 y 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para cada uno. Una de las placas se incubó durante 48 horas y la otra por 72 horas. Por medio de citometría de flujo se determinó el porcentaje de muerte celular en ambos casos.

A las 48 horas, con la concentración de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ con todos los extractos, las células mostraron un porcentaje de viabilidad entre el 60 y 70%. Con la concentración de 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ el extracto de Campo presentó la menor viabilidad, la cual rondó el 50%, para dicho extracto, con esto, es evidente cómo al aumentar su concentración disminuye el porcentaje de células vivas. Los extractos In Vitro y Pilosa mantuvieron valores considerablemente similares entre concentraciones y con respecto al control, que consistió en células que no fueron tratadas con un extracto (Figura 3).

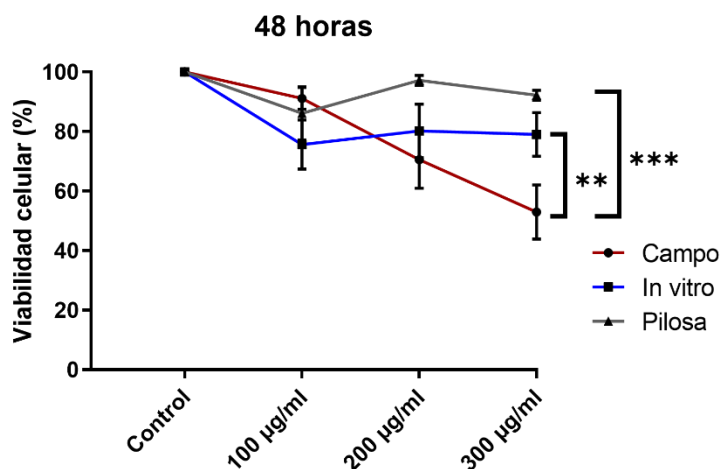


Figura 3. Curva de letalidad de la línea celular murina PyMT a las 48 horas tras tratamiento con extractos de *Phyllanthus acuminatus*. Se muestran los resultados como promedio y error estándar (n=6). Los datos se analizaron mediante ANOVA de dos vías seguido de una prueba de Tukey. **p<0.01, ***p<0.001.

En el ensayo de 72 horas fue evidente un comportamiento muy similar para los extractos In vitro y Pilosa, en el caso de las tres diferentes concentraciones empleadas (Figura 4). Por su parte, el extracto Campo presentó un menor porcentaje de viabilidad celular estando a la concentración de 300 $\mu\text{g/mL}$, comportamiento similar al sucedido a las 48 horas, con la diferencia de que, a las 72 horas, a dicha concentración y para el extracto mencionado, la viabilidad celular fue mayor (aproximadamente del 70%) en comparación a las 48 horas.

A la vez, es notorio un comportamiento muy similar al de las células control; esto para células tratadas con cada uno de los extractos con excepción de aquellas tratadas con el extracto de Campo a 300 $\mu\text{g/mL}$. Las diferencias entre el control y las concentraciones de 100 y 200 $\mu\text{g/mL}$ no fueron significativas.

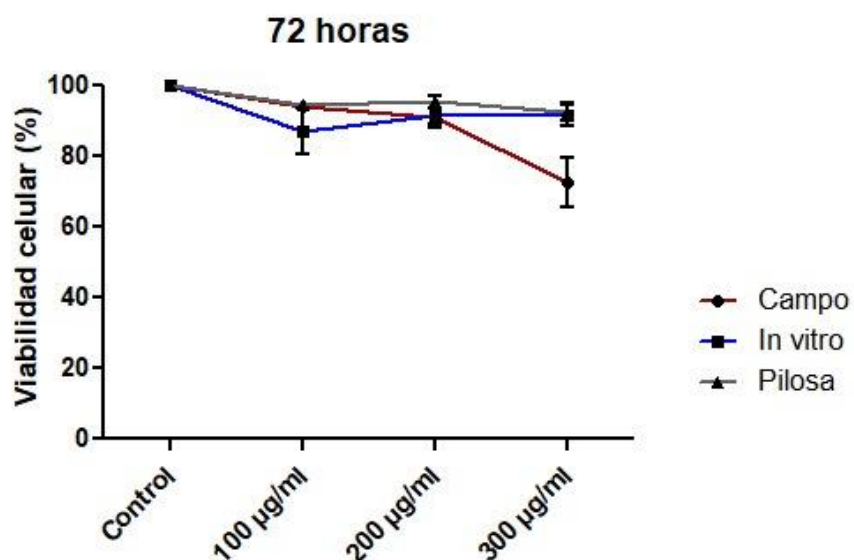


Figura 4. Curva de letalidad de la línea celular murina PyMT a las 72 horas tras tratamiento con extractos de *Phyllanthus acuminatus*. Se muestran los resultados como promedio y error estándar (n=6). Los datos se analizaron mediante ANOVA de dos vías seguido de una prueba de Tukey.

II. Determinación de la subrutina de muerte celular

Se realizó la determinación de la subrutina de muerte celular inducida por los extractos de la raíz de la planta *P. acuminatus* mediante citometría de flujo empleando una tinción con yoduro de propidio y Annexina V-FITC. Como se muestra en la Figura 5, a las 48 horas, el porcentaje de células vivas para el control (células no tratadas) fue del 75%. Por otro lado, con los distintos extractos en sus diversas concentraciones, el porcentaje de células vivas rondó entre el 40 y 75%. El porcentaje restante para cada caso correspondió a células en apoptosis o apoptosis tardía y/o necróticas.

De estos resultados se puede destacar de nuevo al extracto de Campo a 300 $\mu\text{g/mL}$, donde bajo estas condiciones experimentales se obtuvo el menor porcentaje de células viables, con una cifra de aproximadamente 40%. Adicionalmente, bajo esta condición de estudio específica, el porcentaje de células en apoptosis fue el más alto, rondando poco menos del 25%. El restante 35%, aproximadamente, correspondió a células que sufrieron apoptosis tardía o necrosis.

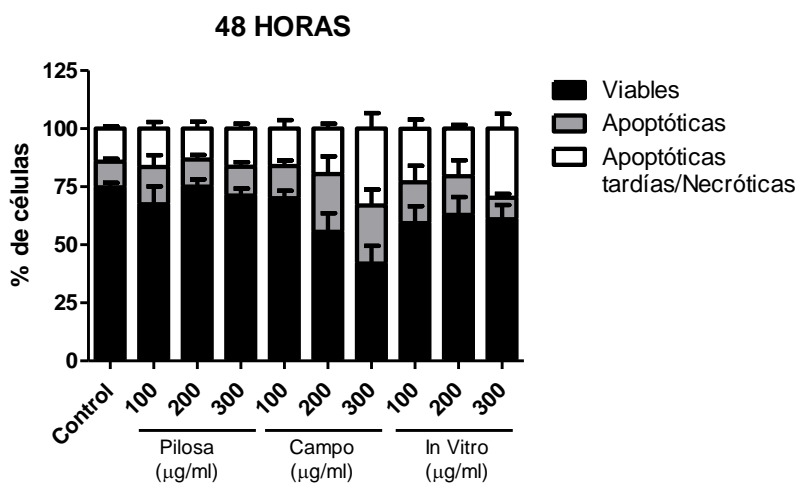


Figura 5. Tipo de muerte celular inducida en la línea celular PyMT por extractos de la raíz de *Phyllanthus acuminatus* a las 48 horas. Se muestran los resultados como promedio y error estándar (n=6). Los datos se analizaron mediante ANOVA de dos vías seguido de una prueba de Tukey.

En el caso del ensayo llevado a cabo a las 72 horas (Figura 6), en el control el porcentaje de viabilidad alcanzó el 75%. En general, la tendencia anterior pudo ser observada prácticamente en las demás condiciones experimentales, con los extractos a sus diferentes concentraciones. En estos casos, las células en apoptosis se mantuvieron en aproximadamente un 5%, mientras que las células en apoptosis tardía/necrosis estuvieron entre un 15-20% del total.

Para el extracto de Campo a 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ se pudo evidenciar una diferencia. En este las células viables fueron menos y el porcentaje de células apoptóticas aumentó respecto a los demás extractos, e incluso el mismo extracto en sus demás concentraciones.

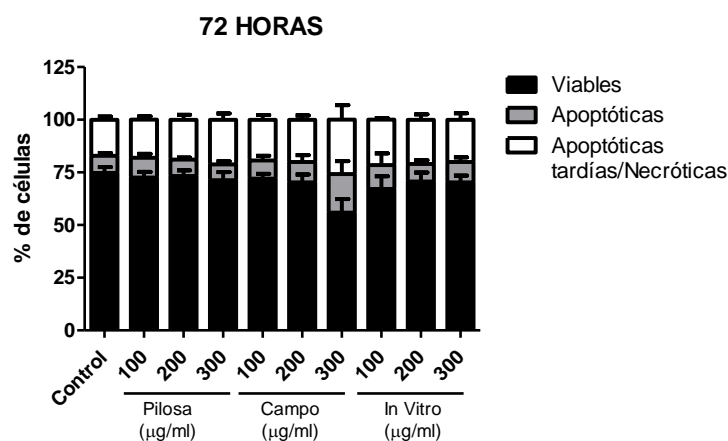


Figura 6. Tipo de muerte celular inducida en la línea celular PyMT por extractos de la raíz de *Phyllanthus acuminatus* a las 72 horas. Se muestran los resultados como promedio y error estándar (n=6). Los datos se analizaron mediante ANOVA de dos vías seguido de una prueba de Tukey.

Discusión

Los fitoquímicos presentes en ciertas plantas muestran actividad anticáncer a través de varias vías que producen especies reactivas del oxígeno (generando así estrés oxidativo), inducción de apoptosis, la reducción de la proliferación celular (mediante el arresto del ciclo celular), inhibición de la angiogénesis e invasión de tejidos y metástasis. Asimismo, algunos compuestos incluso presentan distintos mecanismos de acción anticáncer dosis dependiente de tipo citotóxica (Omara, Odero & Obakiro, 2022).

Las plantas del género *Phyllanthus* poseen gran cantidad de metabolitos secundarios. Se ha aislado más de 510 compuestos a partir de *Phyllanthus*, dentro de los que se destacan en su mayoría lignanos, triterpenoides, flavonoides y taninos. Las ligninas y taninos se consideran los compuestos biológicamente activos de este género. Estos compuestos son una potencial fuente de recursos terapéuticos (Mao, et al., 2016). A *Phyllanthus acuminatus*, se le atribuye gran capacidad antitumoral y anticáncer, entre otras. En la raíz de *P. acuminatus* se han descubierto compuestos anticancerígenos, que pueden ser utilizados por ejemplo en el cáncer de mama (Pérez, Jiménez, & Garro, 2022).

Asimismo, se ha logrado identificar filantósidos, lignanos como compuestos no fenólicos en conjunto con compuestos fenólicos en extractos de la raíz de *P. acuminatus*. Los filantósidos y lignanos son los responsables de la actividad antineoplásica (Alvarado, Rodríguez, & Madrigal, 2013). Estudios han demostrado que la mayoría de fitoquímicos actúan al interferir con ciertas vías de señalización celular y llevan al arresto del ciclo celular y/o la inducción de la diferenciación; esto aparte de su potencial para inducir apoptosis (Uğur, Güneş, & Mammadov, 2017).

La muerte celular se clasifica generalmente como necrosis, apoptosis y autofagia. La apoptosis es un tipo de muerte programada, mientras que la autofagia y la necrosis se consideran como muertes repentinas. Estas últimas ocurren cuando las células son expuestas a condiciones de estrés celular por largos periodos de tiempo (Uğur, Güneş, & Mammadov, 2017).

En el presente trabajo, para detectar el tipo de muerte celular después del tratamiento de células de cáncer de mama de ratón de la línea PyMT con distintas concentraciones de

tres extractos de la planta *P. acuminatus*, se llevó a cabo un análisis mediante citometría de flujo. Se estudió cómo el tiempo de tratamiento, en conjunto con variaciones en las concentraciones de los extractos afectaba la viabilidad celular y se determinó el tipo de muerte celular asociada al tratamiento.

Con los resultados obtenidos a las 48 horas se pudo observar un efecto citotóxico dosis dependiente en el caso del extracto de Campo, con el cuál se requirió una concentración de 300 $\mu\text{g/mL}$ para que murieran aproximadamente menos de un 50% de las células. Existió una considerable diferencia entre la citotoxicidad generada por el extracto de Campo, a la concentración de 300 $\mu\text{g/mL}$ respecto a los demás extractos, incluso a la misma concentración lo cual es estadísticamente significativo.

Por otro lado, los resultados obtenidos a las 72 horas fueron menos prometedores en cuanto a la citotoxicidad alcanzada. Para los extractos de Pilosa e In Vitro, a sus tres concentraciones, se evidenció prácticamente la misma viabilidad celular que la observada en los controles, dando con esto la impresión de que la gran mayoría de células no murieron a causa de un efecto citotóxico inducido por extractos de *P. acuminatus*. Únicamente el extracto de Campo, específicamente a 300 $\mu\text{g/mL}$ mostró una disminución en la viabilidad.

Ante lo destacado anteriormente, es posible decir que sucedió un mayor efecto citotóxico a las 48 horas en comparación a las 72 horas. A las 72 h se detecta una muy baja cantidad de células en proceso de muerte, esto se puede explicar mediante la teoría de que probablemente las células que permanecen vivas posterior al tratamiento debido a que no son afectadas por los extractos comienzan a multiplicarse de nuevo, lo que se traduce en un menor porcentaje de muerte observado, esto implicaría una posible adaptación o tolerancia a los extractos al pasar el tiempo.

Cabe mencionar que experimentos similares han sido llevados a cabo por investigadores del Tecnológico de Costa Rica, con la diferencia de que se empleó líneas celulares humanas de cáncer de mama, donde fue posible obtener mejores resultados en cuanto a citotoxicidad inducida por los extractos, en comparación a los obtenidos en el presente estudio (resultados aún no publicados). La disparidad entre ambos experimentos podría radicar en que la línea celular PyMT está constituida por células primarias de un

tumor, es decir, no son una línea celular adquirida comercialmente, y esto hace que sea más complicado inducir citotoxicidad, pero resulta ser una condición más apegada a la realidad.

En el contexto del experimento con las células PyMT, existe una mayor diversidad de clones celulares, por lo que se asemeja más al entorno o ambiente en un tumor. Esto podría explicar los resultados obtenidos, donde algunos de estos clones celulares no fueron afectados por los extractos y son estos mismos los que se multiplicaron y proliferaron, habiendo menor muerte celular a las 72 horas, respecto a las 48 horas. Es decir, con la mayor cantidad de tiempo de experimento, se dio paso o permisividad para que dichos clones no afectados pudieran multiplicarse, disminuyendo así el porcentaje de citotoxicidad a las 72 horas.

Los tumores de mama se componen de múltiples subclones relacionados genéticamente. Por definición, todos los subclones poseen un ancestro común, pero subclones individuales se pueden distinguir por la existencia de cambios genéticos privados. Subclones genéticos distintos pueden tener fenotipos diferentes (Nathanson, et al., 2022). Nathanson et. al., y otros investigadores han demostrado que características que posee un cáncer agresivo, tales como invasión, metástasis y resistencia al tratamiento (de interés para este trabajo) se pueden deber a subclones presentes de manera temprana en la enfermedad.

El comprender cómo los subclones con destino fatal se relacionan y difieren de sus clones hermanas aparentemente “bien comportadas”, dentro del mismo tumor primario, actualmente es una gran prioridad en la investigación sobre cáncer. A futuro se requiere caracterizar más a fondo estos distintos subclones presentes en el cáncer de mama (Nathanson, et al., 2022).

Otra evidencia obtenida fue respecto al tipo de muerte celular que fue inducida en cada condición de estudio. En resumen, tanto a las 48 horas como a las 72 horas, la mayoría de las muertes ocurridas fueron por apoptosis tardía/necrosis y en menor cantidad debido a apoptosis temprana. Para dicho trabajo, de interés era el porcentaje de muerte inducido por apoptosis.

En un estudio del 2021, Khan, et al. estudiaron el potencial citotóxico de fitoquímicos como fenoles, flavonoides y terpenoides presentes en *Phoenix dactylifera* sobre células de cáncer de mama triple negativo de la línea celular MDA-MB-231, esta inhibición resultó ser

dependiente de dosis, similar a lo sucedido en el presente estudio. Además, estos investigadores observaron entre otros mecanismos, la inducción de apoptosis tanto tardía como temprana en estas células, semejándose también a los resultados obtenidos en los experimentos llevados a cabo en este trabajo. Adicionalmente, un estudio previo reportó que el extracto metanólico de *P. dactylifera* induce apoptosis en células MCF-7 de cáncer de mama al aumentar el porcentaje de células en apoptosis tardía.

Los resultados de Khan, et al. demostraron que los efectos se dieron mediante la vía intrínseca de la apoptosis. El efecto inhibitorio se asoció a la generación de ROS, arresto del ciclo celular y sobreexpresión del supresor p53, Bax (pro-apoptótico) y desregulación de la proteína Bcl-2 (anti-apoptótica), además de la proteína de señalización p-mTOR (Khan, et al., 2021).

En la evasión del proceso apoptótico, las células tumorales adquieren la capacidad de evadir su mecanismo intrínseco de autodestrucción. La inducción de la apoptosis se controla al contrarrestar a los miembros pro y anti apoptóticos de la familia Bcl-2 de proteínas reguladoras (Saha, Solomon, Samson & Gil-Henn, 2021).

Las células cancerígenas llevan a cabo varios métodos para prevenir la muerte celular, incluyendo la desregulación de la vía intrínseca de la apoptosis. La sobreexpresión de proteínas Bcl-2, anti-apoptóticas, y la pérdida de proteínas BH3, pro-apoptóticas. De manera similar, niveles aumentados de Bcl-x y MCL-1 han mostrado promover la tumorigénesis. Otros factores pro-apoptóticos como BAX y BAK también se han visto desregulados en múltiples tumores (Sharma, Boise & Shanmugam, 2019). En el contexto del cáncer de mama, los genes pro apoptóticos típicamente promueven el crecimiento tumoral y a la vez incrementan la resistencia a la terapia. *BCL2* corresponde a un gen anti apoptótico (pro sobrevivencia) (Saha, Solomon, Samson & Gil-Henn, 2021).

Sin embargo, a pesar de una evasión exitosa de la apoptosis, las células cancerígenas generalmente son más susceptibles a apoptosis que células normales, esto como resultado de su complejidad genética, microambiente (hipoxia, escasez de nutrientes, competencia, pH) y estrés relacionado a la terapia. Por ende, estas células generalmente expresan niveles aumentados de proteínas BH3. Para secuestrar factores pro-apoptóticos no unidos, las células de cáncer contienen niveles más elevados de activadores pro-apoptóticos que se unen a dichas

proteínas pro-apoptóticas; dichas células se consideran preparadas para la apoptosis (Sharma, Boise & Shanmugam, 2019).

Conclusiones

La literatura existente demuestra que existen gran cantidad de plantas que han sido estudiadas por poseer compuestos químicos con una capacidad anticancerígena notablemente prometedora. Las características citotóxicas de estos importantes fitoquímicos conllevan la expresión de vías que culminan en la inducción de la muerte celular, generalmente apoptosis o apoptosis tardía, así como la inhibición de la proliferación celular y de otros mecanismos que requiere un tumor para su sobrevivencia y diseminación.

Autores previos ya habían investigado a *Phyllanthus acuminatus* y descubierto así los compuestos biológicamente activos que esta posee, los cuales demostraron capacidad antitumoral y anticáncer como las más destacadas en el contexto de terapia contra cáncer. En el presente trabajo experimental, únicamente con uno de los tres extractos (Campo) y solamente en su más alta concentración (300 µg/mL) fue posible observar un efecto citotóxico considerable sobre células provenientes de un tumor de cáncer de mama murino. Sin embargo, con los demás extractos no fue posible obtener los resultados deseados en cuanto a citotoxicidad.

El estudio, actualmente no publicado, que fue realizado por investigadores del Tecnológico de Costa Rica empleando extractos de *P. acuminatus* sobre una línea de cáncer humana, aunque prometedores en este contexto, no correspondió con los resultados obtenidos al desarrollar la misma hipótesis empleando una línea celular de un modelo animal, como lo es la línea murina PyMT. Como se mencionó en la discusión esto puede atribuirse a complejidad de esta línea murina al ser aislada de tumores primarios y no tratarse de una línea comercial.

Aun así, lo anterior no debe ser un impedimento o un freno para continuar con la investigación del efecto citotóxico que poseen los extractos de esta planta. Podría resultar beneficioso llevar a cabo nuevos experimentos bajo condiciones experimentales distintas que excluyan completamente o en gran medida las limitaciones que pudieron presentarse en el presente trabajo, como por ejemplo el trabajar con una línea celular proveniente de un tumor primario, implicando gran heterogeneidad y variación.

Finalmente, es de suma importancia continuar con los esfuerzos en investigación de alternativas de terapias contra el cáncer, esto tomando en cuenta las implicaciones desfavorables que poseen los tratamientos actuales, y el gran potencial presente en compuestos derivados de productos naturales como plantas.

Bibliografía

- Adan, A., Alizada, G., Kiraz, Y., Baran, Y., & Nalbant, A. (2017). Flow cytometry: basic principles and applications. *Critical Reviews in Biotechnology*, 37(2). doi:10.3109/07388551.2015.1128876.
- Akram, M., Iqbal, M., Daniyal, M., & Khan, A. U. (2017). Awareness and current knowledge of breast cancer. *Biological research*, 50(1). doi:10.1186/s40659-017-0140-9.
- Almansour, N. (2022). Triple-Negative Breast Cancer: A Brief Review About Epidemiology, Risk Factors, Signaling Pathways, Treatment and Role of Artificial Intelligence. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 9. doi:10.3389/fmolb.2022.836417.
- Alvarado, D., Rodríguez, G., & Madrigal, S. (2013). Evaluación de la composición química (filantósidos y lignanos) de los extractos crudos del árbol de Chilillo (*Phyllanthus acuminatus* Vahl) procedente de diferentes sitios de Costa Rica. *Uniciencia*, 27(1).
- Amjad, M. T., Chidharla, A., & Kas, A. (2023). Cancer Chemotherapy. *Stat Pearls Publishing*.
- Anand, U., Dey., Chandel, A., Sanyal, R., Mishra, A., Pandey, D.,...de la Lastra, J. M. (2022). Cancer chemotherapy and beyond: Current status, drug candidates, associated risks and progress in targeted therapeutics. *Genes & Diseases*. doi:10.1016/j.gendis.2022.02.007.
- Banfalvi, G. (2016). Methods to detect apoptotic cell death. *Apoptosis*, 22. doi:10.1007/s10495-016-1333-3.
- Barzaman, K., Karami, J., Zarei, Z., Hosseinzadeh, A., Hossein, M., Moradi, S.,... Farahmand, L. (2020). Breast cancer: biology, biomarkers and treatments. *International Immunopharmacology*, 84.
- Cai, Y., Nogales, R., Zhang, Q., Lin, J., Zhang, W., O'Brien, K..., Zhang, Z. (2017). Transcriptomic dynamics of breast cancer progression in the MMTV-PyMT mouse model. *BMC Genomics*, 18. doi:10.1186/s12864-017-3563-3.

- Carneiro, B. A., & El-Deiry, W. S. (2020). Targeting apoptosis in cancer therapy. *Nature Reviews: Clinical Oncology*, 17. doi:10.1038/s41571-020-0341-y.
- Christenson, J., Buttefield, K., Spoelstra, N., Norris, J., Josan, J., Pollock, J..., Richer, J. (2017). MMTV-PyMT and Derived Met-1 Mouse Mammary Tumor Cells as Models for Studying the Role of the Androgen Receptor in Triple-Negative Breast Cancer Progression. *Hormones & cancer*, 8(2). doi:10.1007/s12672-017-0285-6.
- Crowley, L. C., Scott, A. P., Marfell, B. J., Boughaba, J. A., Chojnowski, G., & Waterhouse, N. J. (2016). Measuring Cell Death by Propidium Iodide Uptake and Flow Cytometry. *Cold Spring Harb Protocol*, 2016(7). doi:10.1101/pdb.prot087163.
- Dai, X., Xiang, L., Li, T., & Bai, Z. (2016). Cancer Hallmarks, Biomarkers and Breast Cancer Molecular Subtypes. *Journal of Cancer*, 7(10), 1281–1294. doi: 10.7150/jca.13141.
- Fouad, Y. A., & Aanei, C. (2017). Revisiting the hallmarks of cancer. *American journal of cancer research*, 7(5), 1016–1036.
- Garro, G., Jiménez, K., & Pérez, R. (2018). Desarrollo de un sistema de cultivo in vitro de raíces pilosas de *Phyllanthus acuminatus*, para la producción de compuestos con actividad biológica. *Tecnología en marcha*, 31(3). doi: 10.18845/tm.v31i3.3903.
- Goldar, S., Khaniani, M. S., Derakhshan, S. M., & Baradaran, B. (2015). Molecular mechanisms of apoptosis and roles in cancer development and treatment. *Asian Pacific journal of cancer prevention: APJCP*, 16(6). doi:10.7314/apjcp.2015.16.6.2129.
- Green, D. R. (2019). The coming decade of cell death research: five riddles. *Cell*, 177.
- Gutierrez, C., & Schiff, R. (2011). HER2: biology, detection, and clinical implications. *Archives of pathology & laboratory medicine*, 135(1), 55–62. doi:10.5858/2010-0454-RAR.1.
- Gutschner, T., & Diederichs, S. (2012). The hallmarks of cancer: a long non-coding RNA point of view. *RNA biology*, 9(6), 703–719. doi:10.4161/rna.20481.

- Hanahan, D., & Weinberg, R. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, *144*(5). doi:10.1016/j.cell.2011.02.013.
- Harbeck, N., Penault-Llorca, F., Cortes, J., Gnant, M., Houssami, N., Poortmans, P.,...Cardoso, F. (2019). Breast cancer. *Nature Reviews Disease Primers* *5*,(66). doi:10.1038/s41572-019-0111-2
- Herrmann, J. (2020). Vascular toxic effects of cancer therapies. *Nature Reviews Cardiol*, *17*. doi:10.1038/s41569-020-0347-2.
- Hong, R., & Xu, B. (2022). Breast cancer: an up-to-date review and future perspectives. *Cancer Commun*, *42*. doi:10.1002/cac2.12358.
- Hua, H., Zhang, H., Kong, Q., & Jiang, Y. (2018). Mechanisms for estrogen receptor expression in human cancer. *Experimental hematology & oncology*, *7*(24).
- Ionkina, A., Balderrama, G., Ibanez, K., Phan, S., Cortez, A., Mortazavi, A., & Prescher, J. (2021). Transcriptome analysis of heterogeneity in mouse model of metastatic breast cancer. *Biorxiv*. doi:10.1101/2021.05.04.442511.
- Jan, R., & Chaudhry, G. E. (2019). Understanding Apoptosis and Apoptotic Pathways Targeted Cancer Therapeutics. *Advanced pharmaceutical bulletin*, *9*(2), doi:10.15171/apb.2019.024.
- Katz, L., & Baltz, R. H. (2016). Natural product discovery: past, present, and future. *J. Ind. Microbiol. Biot*, *43*(2–3).
- Khan, M., Siddiqui, S., Ahmad, I., Singh, R., Mishra, D.P., Srivastava, A.N., & Ahmad, R. (2021). Phytochemicals from Ajwa dates pulp extract induce apoptosis in human triple-negative breast cancer by inhibiting AKT/mTOR pathway and modulating Bcl-2 family proteins. *Scientific reports*, *11*(1), 1-14.
- Kim, S. K., & Cho, S. W. (2022). The Evasion Mechanisms of Cancer Immunity and Drug Intervention in the Tumor Microenvironment. *Frontiers in pharmacology*, *13*. doi: 10.3389/fphar.2022.868695.

- Leinco Technologies. (2016-2018). *Annexin V – FITC Apoptosis Detection Kit*. Missouri, EU.: Leinco Technologies Inc. Recuperado de: <https://www.leinco.com/p/annexin-v-fitc-apoptosis-detection-kit/#toc-kit-details>.
- Lim, E., Metzger, O., Winer, E. P. (2012). The natural history of hormone receptor positive breast cancer. *Oncology*.
- Lin, S. R., Chang, C. H., Hsu, C. F., Tsai, M. J., Cheng, H., Leong, M. K.,...Weng, C. F. (2020). Natural compounds as potential adjuvants to cancer therapy: preclinical evidence. *British Journal of Pharmacology*. doi:10.1111/bph.14816.
- Lin, S. R., Fu, Y. S., Tsai, M. J., Cheng, H., & Weng, C. F. (2017). Natural compounds from herbs that can potentially execute as autophagy inducers for cancer therapy. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(7). doi:10.3390/ijms18071412.
- Loibl, S., & Gianni, L. (2017). HER2 positive breast cancer. *The Lancet*, 389(10087). 2415-2429. doi: 10.1016/S0140-6736(16)32417-5.
- Łukasiewicz, S., Czeczelewski, M., Forma, A., Baj, J., Sitarz, R., & Stanisławek, A. (2021). Breast Cancer—Epidemiology, Risk Factors, Classification, Prognostic Markers, and Current Treatment Strategies—An Updated Review. *Cancers*, 13(17). doi:10.3390/cancers13174287.
- Mao, X., Wu, L. F., Guo, H. L., Chen, W. J., Cui, Y. P., Qi, Q.,...Zhang, L. Z. (2016). The Genus *Phyllanthus*: An Ethnopharmacological, Phytochemical, and Pharmacological Review. *Evidence-based complementary and alternative medicine*. doi:10.1155/2016/7584952.
- Nathanson, S.D., Detmar, M., Padera, T.P., Yates, L., Welch, D.R., Beadnell, T.,...Cheung, K. (2022). Mechanisms of breast cancer metastasis. *Clinical & Experimental Metastasis*, 39, 117–137 doi:10.1007/s10585-021-10090-2.
- Nelson, V.K., Sahoo, N.K., Sahu, M., Sudhan, H., Pullaiah, C., & Muralikrishna, K. (2020). In vitro anticancer activity of *Eclipta alba* whole plant extract on colon cancer cell HCT-116. *BMC Complement Med Ther*,(20)355. doi: 10.1186/s12906-020-03118-9.

- Omara, T., Odero, M.P. & Obakiro, S.B. (2022). Medicinal plants used for treating cancer in Kenya: an ethnopharmacological overview. *Bulletin of the National Research Centre*, 46(148). doi:10.1186/s42269-022-00840-x.
- Pérez, R., Jiménez, K., & Garro, G. (2022). Cultivo in vitro de raíces pilosas del arbusto *Phyllanthus acuminatus* (Phyllanthaceae). *Revista de biología tropical*, (70). doi:10.15517/rev.biol.trop.2022.49227.
- Phan, L. M., Yeung, S. C., & Lee, M. H. (2014). Cancer metabolic reprogramming: importance, main features, and potentials for precise targeted anti-cancer therapies. *Cancer biology & medicine*, 11(1), 1–19. doi: 0.7497/j.issn.2095-3941.2014.01.001.
- Pumiputavon, K., Chaowasku, T., Saenjum, C., Osathanunkul, M., Wungsintaweekul, B., Chawansuntati, K.,...Lithanatudom, P. (2017). Cell cycle arrest and apoptosis induction by methanolic leaves extracts of four Annonaceae plants. *BMC Complementary Alternative Medicine*, 17(294). doi:10.1186/s12906-017-1811-3.
- Qian, Q., Chen, W., Cao, Y., Cao, Q., Cui, Y., Li, Y., & Wu, J. (2019). Targeting reactive oxygen species in cancer via Chinese herbal medicine. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*.
- Rasha, F., Sharma, M., & Pruitt, K. (2021). Mechanisms of endocrine therapy resistance in breast cancer. *Molecular and cellular endocrinology*, 532. doi:10.1016/j.mce.2021.111322.
- Saha, T., Solomon, J., Samson, A. O., & Gil-Henn, H. (2021). Invasion and Metastasis as a Central Hallmark of Breast Cancer. *Journal of clinical medicine*, 10(16), 3498. doi:10.3390/jcm10163498.
- Sergazy, S., Vetrova, A., Erdogan, I., Senol., F., Kahraman, A., Zhang, J., & Aljofan, M. (2022). Antiproliferative and cytotoxic activity of Geraniaceae plant extracts against five tumor cell lines. *Future Science OA*, 8(2). doi:10.2144/fsoa-2021-0109.
- Sharma, A., Boise, L. H., & Shanmugam, M. (2019). Cancer Metabolism and the Evasion of Apoptotic Cell Death. *Cancers*, 11(8), 1144. doi:10.3390/cancers11081144.

- Solowey, E., Lichtenstein, M., Sallon, S., Paavilainen, H., Solowey, E., & Lorberboum, H. (2014). Evaluating medicinal plants for anticancer activity. *The Scientific World Journal*. doi:10.1155/2014/721402.
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: a cancer journal for clinicians*, 71(3), 209–249. doi:10.3322/caac.21660.
- Uğur, D., Güneş, H., Güneş, F., & Mammadov, R. (2017). Cytotoxic Activities of Certain Medicinal Plants on Different Cancer Cell Lines. *Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences*, 14(3). doi:10.4274/tjps.80299.
- Waks, A. G. & Winer, E. P. (2019). Breast Cancer Treatment. *JAMA*, 321(3). doi:10.1001/jama.2018.20751.
- World Health Organization: WHO. (2019). *Cancer*. https://www.who.int/health-topics/cancer#tab=tab_1.
- Yuan, S., & Akey, C. W. (2013). Apoptosome structure, assembly, and procaspase activation. *Structure*, 21(4), 501–515. doi:10.1016/j.str.2013.02.024.