

# Metabolitos secundarios presentes en extractos herbales promisorios para el tratamiento del cáncer cervical: una revisión sistemática de estudios *in vitro*.

*Secondary metabolites present in herbal extracts show promise for the treatment of cervical cancer: a systematic review of in vitro studies.*

*Ángela Verónica López Castellanos\**

*\* Programa de Bioquímica. Facultad de Ciencias. Universidad Antonio Nariño.*

*Dirigido por:*

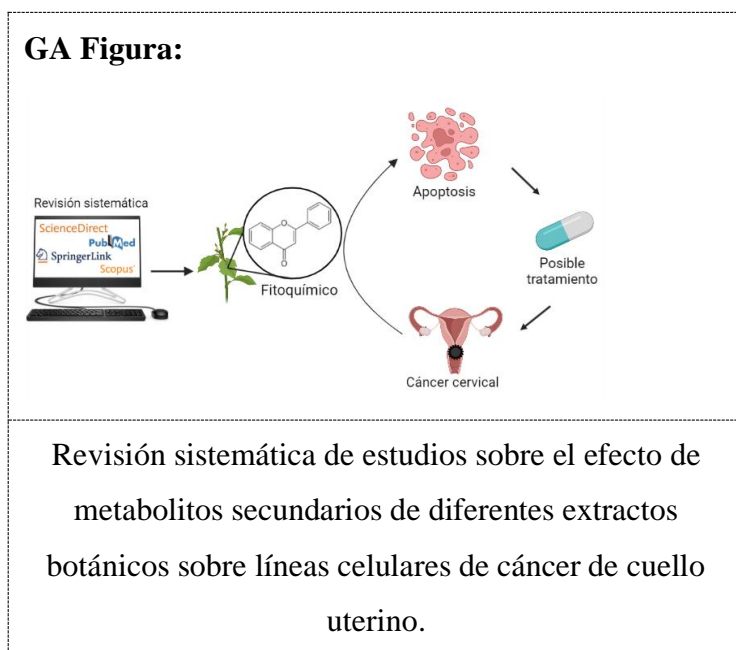
*PhD. Orlando Alfredo Torres García. Universidad Antonio Nariño.*

*MSc. Yuly Elien Bernal Rosas. Universidad Antonio Nariño.*

*Asesorado por:*

*MSc. Diego A. Bonilla. Universidad Distrital Francisco José de Caldas.*

## Graphical Abstract (GA)



## **Metabolitos secundarios presentes en extractos herbales promisorios para el tratamiento del cáncer cervical: una revisión sistemática de estudios *in vitro*.**

*Secondary metabolites present in herbal extracts show promise for the treatment of cervical cancer: a systematic review of in vitro studies.*

### **Resumen**

A nivel mundial, el cáncer de cuello uterino (CCU) es el cuarto cáncer más común y la tercera causa de mortalidad en mujeres. Actualmente, los tratamientos están limitados y presentan efectos secundarios; sin embargo, las terapias naturales con menor actividad invasiva y efecto residual, presentan un gran potencial. De esta manera, se hace necesario investigar los principales metabolitos secundarios de los extractos herbales con potencial efecto en el tratamiento del CCU. El objetivo del presente estudio fue realizar una revisión sistemática de los metabolitos secundarios que muestren regular las rutas apoptóticas intrínseca y extrínseca en líneas celulares del CCU. Se utilizó una metodología estandarizada basada en las guías PRISMA, ejecutando un algoritmo Booleano de búsqueda en diferentes bases de datos especializadas. Un total de 16 estudios cumplieron los criterios de inclusión de esta revisión sistemática con un riesgo de sesgo bajo-medio. Para la evaluación del efecto anticancerígeno de extractos herbales y metabolitos secundarios se emplearon como modelos celulares HeLa, SiHa, ME-180 y CaSki. Luego del análisis de convergencia, se encontró que varios metabolitos secundarios con efecto antioxidante (terpenoides, flavonoides, alcaloides y ácidos cafeicos), presentan efectos reguladores sobre vías apoptóticas (intrínseca como extrínseca) en diferentes modelos celulares del CCU. Se requiere más investigación traslacional para evaluar su posible uso como tratamiento del CCU.

**Palabras clave:** revisión sistemática, metabolito secundario, cáncer cervical, in vitro, vías apoptóticas, mecanismo de acción.

## **Metabolitos secundarios presentes en extractos herbales promisorios para el tratamiento del cáncer cervical: una revisión sistemática de estudios *in vitro*.**

### ***Secondary metabolites present in herbal extracts show promise for the treatment of cervical cancer: a systematic review of in vitro studies.***

#### **Abstract**

Uterine cervical cancer (UCC) is the fourth most common cancer and the third leading cause of mortality in women worldwide. Currently, treatments are limited and/or have side effects; however, natural therapies, with less invasive activity and residual effect, have great potential. It is necessary to investigate the main secondary metabolites of herbal extracts with potential in the treatment of UCC. The aim of this study was to perform a systematic review of the secondary metabolites that show regulate the intrinsic and extrinsic apoptotic pathways in UCC cell lines. A standardized methodology based on PRISMA guidelines was used, executing a Boolean search algorithm in different specialized databases. A total of 16 studies met the inclusion criteria of this systematic review with a low-to-medium risk of bias. For the evaluation of the anticancer effect of herbal extracts and secondary metabolites were used as cell models HeLa, SiHa, ME-180 and CaSki. After convergence analysis, several secondary metabolites with antioxidant effect (terpenoids, flavonoids, alkaloids and caffeic acids) were found to exhibit regulatory effects on apoptotic pathways (intrinsic as well as extrinsic) in different HCC cell models. Further translational research is required to evaluate their potential use as a treatment for HCC.

**Keywords:** systematic review, secondary metabolite, cervical cancer, in vitro, apoptotic pathways, mechanism of action.

## 1. Introducción

El cáncer, para las personas menores de 70 años, es la principal causa de muerte según la Organización Mundial de la Salud (OMS) (World Health Organization, 2020). En los países subdesarrollados, el cáncer presenta una incidencia tanto en hombres como en mujeres, dos a tres veces mayor en comparación con los países desarrollados (Sung et al., 2021). El cáncer de cuello uterino (CCU), es la tercera causa de mortalidad y el cuarto cáncer más común en las mujeres a nivel mundial, presentando 600 mil casos y 300 mil muertes por año (Asociación Española Contra el Cáncer, 2020; Stelzle et al., 2021; van der Horst et al., 2017). Según estimaciones de GLOBOCAN (herramienta empleada para pronosticar la incidencia y mortalidad futura mundial del cáncer), el número de casos reportados del CCU incremento en los últimos años, reportando 471 mil en el año 2000 a 570 mil en el año 2018; no obstante, la mortalidad ha pasado del 8.2% a un 7.5% para los años 2008 y 2018, respectivamente (M Arbyn et al., 2011). Entre los factores de riesgo se encuentra la ausencia o poca frecuencia de la toma de muestras para la prueba de papanicolaou (herramienta médica utilizada para prevenir cualquier anomalía precancerosa), la falta de aplicación de la vacuna del VPH (grupo del virus del papiloma humano), el bajo nivel socioeconómico, la inasequible o deficiente atención médica (Tewari & Monk, 2019), los hábitos sexuales (mayor exposición de la mujer), las infecciones de transmisión sexual o infecciones directas con el VPH, principalmente en los países subdesarrollados (e.g., Sudamérica), en los que se manifiestan índices superiores de mortalidad y frecuencia de estadios avanzados de esta neoplasia maligna (Sung et al., 2021; Tewari & Monk, 2019; Benitez-Restrepo et al., 2020; Carrasco et al. 2020).

En Colombia, la epidemiología muestra que el CCU, se la principal causa de mortalidad y la segunda causa de incidencia en Cali, Manizales, Bucaramanga y Pasto (Muñoz & Bravo, 2012). El factor sociodemográfico es una causal de las elevadas tasas de mortalidad, asociada a la desigualdad educativa y muerte prematura de las jóvenes colombianas entre 20 a 49 años (Bermedo-Carrasco & Waldner, 2016; de Vries et al., 2018). Estimaciones del CCU registradas en el Instituto Nacional de Cancerología de Colombia, comparado con patrones internacionales, refleja una pobre supervivencia de las pacientes sin mejoras con el tiempo, debido a diagnósticos tardíos (Pardo & de Vries, 2018).

Actualmente, los tratamientos del CCU se limitan a la radioterapia, cirugía y quimioterapia;

utilizados de forma individual al implementar una serie de pasos de atención, dependiendo del estadio cancerígeno diagnosticado en la paciente (Cohen et al. 2019). Por ejemplo, el tratamiento con radioterapia basado en el uso de radiación ionizante, resulta ser menos eficaz a medida que avanza el fenotipo cancerígeno (Serkies & Jassem, 2018). De hecho, cuando los tumores malignos empiezan a adquirir resistencia a los medicamentos implementados en la quimioterapia, se combinan medicamentos como el cisplatino (inhibidor del ciclo celular) y el paclitaxel (inhibidor de la división celular), para poder combatir el crecimiento tumoral (Liu et al. 2018). Teniendo en cuenta lo mencionado anteriormente, la comunidad científica continúa en la búsqueda de nuevas estrategias o compuestos con pocos efectos secundarios (e.g., metabólicos o psicológicos) y que además sean accesibles económicamente al momento de tratar el CCU (Serkies & Jassem, 2018).

A falta de tratamientos eficientes y eficaces contra el CCU, las terapias naturales o complementarias han llamado la atención por su baja actividad invasiva y/o efectos residuales. Recientemente, son varios los estudios que han mostrado beneficios potenciales del uso de compuestos activos (metabolitos secundarios), presentes en las plantas medicinales con actividad anti-infecciosa, anti-parasitaria, anti-viral, anti-inflamatoria, anti-microbiana y antioxidantes (Parham et al. 2020; Shahzad et al. 2020). De hecho, algunos de estos metabolitos secundarios han evidenciado efecto antitumoral contra el cáncer de pulmón (Chunthorng-Orn et al., 2016), cáncer de próstata (Jemilamary.V.A, 2016) y cáncer de cuello uterino (Paul & Kundu, 2018). Al parecer, ciertas familias de metabolitos presentes en diferentes plantas medicinales favorecen la apoptosis en las células cancerosas, por lo que llegan a ser considerados como agentes quimioterapéuticos (Oyenihi et al. 2021). Se ha evidenciado inhibición del crecimiento celular provocado por inducción apoptótica o restricción del ciclo celular (Goyal et al., 2017; Meiyanto et al., 2012). Esto se ha demostrado al evaluar la movilización del citocromo C, la escisión de las caspasas-3 y -9, la presencia del marcador apoptótico fosfatidilserina y la activación en general de la vía apoptótica mitocondrial (Fiorentino & Urueña, 2018).

Por todo lo anterior, la fitoquímica representa un área de la química con bastante interés para continuar evaluando especies de plantas, metabolitos y mecanismos de acción dentro del panorama de búsqueda de nuevas terapias adyuvantes para tratar el CCU (Espitia-Baena et al., 2014). Así, el objetivo de este estudio fue identificar los metabolitos secundarios presentes en los extractos herbales con

potencial coadyuvante regulatorio sobre las vías apoptóticas *in vitro*, expuestos ante diferentes líneas celulares del CCU, usando una metodología de revisión sistemática entre los años 2011 a 2022. Delimitando el estudio exclusivamente, a la pesquisa de la apoptosis por la vía intrínseca y la vía extrínseca, debido al interés que el grupo de investigación presenta sobre estas vías, lo que determina el alcance de esta investigación.

## 2. Estado del Arte

### 2.1. Marco Teórico

A continuación, se encuentra la base teórica indicada que permite abarcar la problemática del estudio y sus aspectos en detalle.

#### 2.1.1 *El Cáncer.*

En todo el mundo el cáncer es un problema de salud pública notable, que consiste en una desregulación generalizada de mecanismos metabólicos (Siegel et al., 2021). Se origina desde la irregularidad del ciclo celular habitual, en el que el sistema inmune no es capaz de reprimir la anomalía que la célula presenta, resultando en un crecimiento y descontrol en la proliferación celular, que lleva a un incremento en las células cancerígenas, hasta el punto de generar lo que se conoce como metástasis (American Cancer Society, 2020).

#### 2.1.2 *El Virus del Papiloma Humano (VPH).*

El VPH, son un grupo de virus icosaédricos y sin envoltura que pertenecen a la familia del virus del papiloma. Se caracterizan por poseer ADN bicatenario pequeño y se han dividido en cinco géneros, dependiendo de las variaciones que presentan en su secuencia de nucleótidos. Este grupo de virus se contagia por medio de un infectado, al tener contacto sexual o por contacto íntimo de piel con piel. Provoca la aparición de verrugas en partes distintas del cuerpo (National Center for HIV/AIDS, Viral Hepatitis, STD, and TB Prevention, 2017). Se presentan diversos tipos de VPH, reportándose más de 200 genotipos, de los cuales son pocos los que afectan las zonas genitales; sin embargo, solo una pequeña porción se ha reportado como oncogénico, entre estos se distinguen aproximadamente 14 genotipos de alto riesgo de mucosas (hrHVP), mientras que los genotipos de bajo riesgo de mucosas (lrHVP) no se encuentran relacionados con el cáncer (Instituto Nacional del Cáncer, 2021). Los cambios celulares

neoplásicos se presentan en infecciones recurrentes del VPH de genotipos de alto riesgo, siendo estos: VPH-16, VPH-18, VPH-31, VPH-33, VPH-35, VPH-39, VPH-45, VPH-51, VPH-52, VPH-56, VPH-58, VPH-59, VPH-66 y VPH-68 (Chacón et al. 2006), que convergen en carcinomas cervicales (Instituto Nacional del Cáncer, 2021; Kaliff et al., 2018). Así mismo dichos genotipos están asociados a un pronóstico de supervivencia deficiente, sobre todo el VPH-16 y el VPH-18, los cuales representan un 75% de los casos de esta neoplasia maligna a nivel mundial (Sharmin et al., 2021).

### ***2.1.3 El Cáncer de Cuello Uterino.***

El CCU, un tipo de cáncer ginecológico, ocasionado por cambios en la regulación del crecimiento celular, específicamente por mutaciones en diversos genes responsables de controlar distintas rutas metabólicas (Sharmin et al., 2021). Informa ser el segundo cáncer más común para las mujeres, presentando mayor mortalidad en los países subdesarrollados y posicionándose en cuarto lugar con una mortalidad del 8% sobre la totalidad de las pacientes con cáncer (Asociación Española Contra el Cáncer, 2020; Serkies & Jassem, 2018). Conjuntamente se resalta como la tercera razón de muerte en las mujeres por cáncer en todo el mundo (van der Horst et al., 2017), considerándose, por tanto, como una mortal neoplasia prevalente (Moreno-Acosta et al., 2017). Por consiguiente, recibir un diagnóstico pertinente y un tratamiento apropiado es determinante para mejorar las probabilidades de supervivencia (Liu et al., 2018).

### ***2.1.4 Mecanismos Apoptóticos.***

La muerte celular programada, es parte de un proceso de regulación homeostático normal del organismo, el cual implica una serie organizada de alteraciones genéticas y fisiológicas que convergen en la autodestrucción celular. La alteración de este proceso genera la aparición de patologías como el cáncer (Portt et al., 2011).

Existen tres tipos de procesos principales de regulación: apoptosis, autofagia y necrosis. El principal tipo de muerte celular programada es la apoptosis, el cual es un mecanismo genéticamente regulado que permite destruir las células defectuosas, dañadas o las que son una amenaza potencial, impidiendo un inadecuado funcionamiento celular y que favorece la supervivencia del organismo multicelular (Portt et al., 2011). La muerte celular apoptótica, actúa bajo dos mecanismos diferentes de acción, que ocurren bajo las vías extrínseca e intrínseca, ambas rutas generan un aumento en la actividad de las caspasas y

posterior escisión de proteínas específicas que conducen a la autodestrucción celular (Estaquier et al., 2012). La vía intrínseca, no precisa de estímulos externos para activarse, estos se originan en la mitocondria, y generan una señalización intracelular que puede ser positiva (radiación, toxicidad y virus) o negativa (citocinas, hormonas o factores de crecimiento), junto con la detección del daño al ADN (no se admite continuar con la proliferación celular, al detectar secuencias imperfectas). Son estímulos que generan una alteración en el potencial de membrana mitocondrial, dando apertura a los poros mitocondriales, liberando hacia el citoplasma proteínas proapoptóticas como el citocromo C, además de activar moléculas como la endonucleasa G, la familia Bcl-2 y la proteína supresora de tumores p53 (Estaquier et al., 2012). La vía extrínseca, se activa mediante estímulos en la señalización de los receptores de muerte localizados en la membrana celular, los cuales hacen parte de la super-familia del gen del factor de necrosis tumoral (TNF). Iniciando la señalización con ligandos específicos (Fas/FasR, TNF/TNF R1, Apo2L/DR4 o TRAIL R1), que se unen a los receptores de muerte, provocando la activación de diferentes moléculas. La interacción ligando-receptor Fas, ocasiona la unión del dominio de muerte FADD y la unión del dominio TRADD (asociado a TNFR), reclutando a la procaspasa-8 con el apoyo del complejo de señalización que induce la muerte (DISC). Una vez que se encuentre activa la caspasa-8, involucra a la vía intrínseca, activando a la caspasas efectoras-3, -6 y -7, convergiendo finalmente ambas vías, como lo demuestra gráficamente la **Figura S1** en el **Anexo** (Alberts et al. 2017).

### **2.1.5 Histología.**

El CCU se clasifica en cuatro tipos histológicos diferentes (G del Carmen & O Schorge, 2011). El más frecuente es el carcinoma de células escamosas en un 70%; el adenocarcinoma cervical invasivo presenta una frecuencia de 25% (evidenciando un incremento contundente de su incidencia, en las décadas recientes). Finalmente, el 5% restante lo comprenden dos tipos histológicos, las células raras y los carcinomas neuroendocrinos de células pequeñas poco diferenciadas.

### **2.1.6 Líneas Celulares.**

Para el estudio del CCU a nivel de laboratorio, la línea celular HeLa es la más empleada, la cual presenta una morfología epitelial adherente y una acelerada tasa de crecimiento, comportamiento característico de un adenocarcinoma cervicouterino. El nombre de la línea se dio, en honor a Henrietta Lacks, una paciente que padecía un agresivo carcinoma cervicouterino y propietaria de



esta primera línea celular inmortal, quien falleció en 1951 por causa de este cáncer (Iwasa & Marshall, 2020; Solé Medina, 2020). En estas células también se reporta la presencia de secuencias de VPH-18 (virus del papiloma humano tipo oncogénico número 18) (Jones et al., 2021). Entre las características distintivas que poseen las células HeLa, y que han brindado importantes avances en la investigación de este cáncer a nivel mundial por más de 50 años, es debido a su rápido crecimiento, agresividad cancerígena y resistencia apoptótica (Carrera Páez, 2015). A su vez, para el estudio del CCU en el laboratorio, también se emplean las siguientes líneas celulares SiHa, ME-180, CaSki, entre otras. Donde la línea celular SiHa, proviene de una paciente de origen Japones con carcinoma de células escamosas, que en su genoma integra el virus del papiloma humano tipo 16 (VPH-16) (Yee et al. 1985). En el caso de las células ME-180, derivan de un carcinoma epidermoide, siendo células escamosas altamente invasivas que presentan infección del VPH-68 (Pater and Pater 1985). Finalmente, la línea celular CaSki, parte de un carcinoma epidermoide, donde su genoma está integrado con el virus del papiloma humano tipo 16 y 18 (VPH-16 Y VPH-18) (Baker et al. 1987).

### ***2.1.7 Tratamiento.***

Los tratamientos disponibles varían de acuerdo al estadio en el que se encuentra el carcinoma y de los estudios que determinen su eficiencia y eficacia. El recibir un tratamiento adecuado es clave para que la probabilidad de recurrencia disminuya, actualmente el tratamiento anticancerígeno (medicamento que obstruye el crecimiento de células tumorales malignas) aun poseen gran relevancia, por lo que cumple un rol primordial al controlar la supervivencia de la paciente (Liu et al., 2018). La radioterapia junto con la cirugía son las principales modalidades de métodos médicos contra el CCU, pero la quimioterapia tiene fines paliativos y complementarios, evidenciando significativos beneficios de supervivencia al implementarla en las terapias curativas. Es muy usual combatir el CCU combinando diferentes tratamientos, como lo indica la quimioterapia neoadyuvante seguida de una cirugía. Del mismo modo la combinación de medicamentos como el cisplatino (detiene o enlentece el crecimiento canceroso) y el paclitaxel (fármaco de quimioterapia anticanceroso) son los métodos más usualmente utilizados en el intento de combatir este carcinoma. Generalmente se recurren a estas combinaciones terapéuticas cuando la terapia primaria fracasa, de lo contrario se continua con tratamientos paliativos (Serkies & Jassem, 2018).

Para los estadios tempranos se han determinado opciones terapéuticas en las que se abordan diferentes estrategias. Entre estas se encuentra la histerectomía radical (resección quirúrgica del útero), combinada con linfadenectomía pélvica (cirugía que extrae los ganglios linfáticos de la pelvis). Para los tumores voluminosos de este mismo estadio, la opción terapéutica es la quimioterapia neoadyuvante, estando la cirugía citorreductora (cirugía con propósito paliativos que busca prolongar la vida de la paciente o facilitar la acción de agentes quimioterápicos) como tratamiento consecutivo. La cirugía es un procedimiento eficaz para tratar estadios tempranos, con la combinación de la braquiterapia (isótopos radioactivos colocados dentro o cerca de la zona a tratar) y de las radiaciones externas. Para los estados avanzados, la quimiorradiación (radiación administrada simultáneamente con quimioterapia) es el procedimiento terapéutico ideal, no siendo el procedimiento quirúrgico una decisión práctica en estos casos y si un riesgo para la paciente (Bourgioti et al., 2016).

### **2.1.8 Metabolitos Secundarios.**

Los componentes básicos de una planta son los carbohidratos, proteínas, lípidos, ácidos nucleicos, vitaminas, entre otros. Son moléculas conocidas como metabolitos primarios que constituyen la arquitectura, regulan el metabolismo, el crecimiento y desarrollo de la célula vegetal (Ali 2021). Se denominan metabolitos secundarios a los compuestos que no están directamente involucrados en los procesos metabólicos primarios de un organismo, pero tienen la función de proteger a la planta del estrés ambiental y de los depredadores (Srivastava et al. 2020). En los últimos años la creciente importancia de los metabolitos secundarios ha generado un gran interés, particularmente en la posibilidad de aumentar la producción de metabolitos bioactivos específicos, aplicables a la industria farmacéutica, alimenticia, entre otras (Bhattacharya 2019). Los metabolitos secundarios con actividades biológicas particulares son los compuestos fenólicos, los alcaloides, los terpenos/terpenoides y las estructuras que contienen azufre, presentando propiedades neuroprotectoras, antiinflamatorias, antimicrobianas, antioxidantes y cardioprotectoras (Fakhri et al. 2022). Siendo, los metabolitos secundarios una fuente en auge de fármacos basados en plantas, donde la intención principal de los investigadores es desarrollar agentes anticancerígenos. Evidenciando que los metabolitos secundarios de las especies herbales, ejercen un papel importante en el tratamiento cancerígeno, limitando varios factores tumorigénicos e inflamatorios *in vitro* e *in vivo* (Fakhri et al. 2022). A la par, se han registrado con éxito, el empleo de

los metabolitos secundarios en estudios clínicos, ante el tratamiento de varios tipos de cáncer, gracias a sus propiedades antitumorales y anticancerígenas. Observando que estos compuestos, extraídos de las plantas, están siendo reconocidos como fármacos altamente eficaces contra el cáncer (Shah et al. 2013).

## **2.2. Revisión de Literatura**

En esta sección se encuentra la metodología aplicada, los resultados alcanzados y las discusiones realizadas correspondientes al desarrollo del trabajo de grado.

### **2.2.1 Metodología**

**2.2.1.1 Protocolo.** El trabajo de grado se realizó de acuerdo a las pautas establecidas de los *Preferred Reporting Items for Systematic reviews and Meta-Analyses (PRISMA)*.

**2.2.1.2 Criterio de Elegibilidad.** Como criterios de inclusión para esta revisión sistemática se establecieron los siguientes: i) estudios publicados a partir del 2011; ii) artículos con texto completo disponible; iii) investigaciones redactadas únicamente en inglés; iv) artículos publicados en revistas indexadas en el *Journal Citation Reports (JCR)* y *Scimago Journal Ranking (SJR)* en cuartiles 1 y 2; v) estudios *in vitro* que evaluaron los efectos de extractos herbales sobre rutas apoptóticas en las diferentes líneas celulares para el estudio del CCU; vi) estudios que identificaron los metabolitos secundarios presentes en las especies de plantas y que, probablemente, actúan como principios activos contra el CCU. Se excluyeron los estudios que no corresponden a investigaciones originales como la literatura gris (p. ej., repositorios, tesis, libros, capítulos, etc.), artículos que no se encontraron en las bases de datos seleccionadas, estudios que no identificaron metabolitos secundarios en los extractos utilizados o ensayos que no especifican las moléculas reguladoras de apoptosis.

**2.2.1.3 Fuentes de Información.** Bases de datos de investigación científica seleccionadas con el fin de buscar y recopilar los estudios: ScienceDirect, SCOPUS, Springer Link y PubMed/MEDLINE.

**2.2.1.4 Métodos de Búsqueda.** Se utilizaron los siguientes algoritmos Booleanos según las diferentes bases de datos:

ScienceDirect: (*medicinal plant*) AND (*phytochemical OR active ingredient OR active substance*) AND (*cervical cancer*) AND (*apoptotic pathway*) AND (*action mechanism*) NOT reviews.

SCOPUS: (*medicinal AND plant*) AND (*phytochemical OR active AND ingredient OR active AND*

*compound) AND (cervical AND cancer) AND (apoptotic AND pathway) AND (action AND mechanism) NOT reviews.*

SpringerLink: *(phytochemical) AND (cervical cancer) AND (apoptotic pathway).*

PubMed/MEDLINE: *(medicinal plant) AND (phytochemical OR active compound) AND (cervical cancer) AND (apoptotic pathway) NOT reviews.*

**2.2.1.5 Selección de Estudios.** Se efectuó la búsqueda dentro las bases de datos de la literatura indagada, aplicando los criterios de inclusión en las opciones de filtro presentes en las bases de datos y revisando las investigaciones obtenidas por título y resumen. Posteriormente, se realizó el análisis de texto completo de las publicaciones potencialmente elegibles y se filtraron manualmente en una matriz de Excel, conteniendo título del artículo, año y país de publicación, nombre de la revista y objetivo. La selección de los estudios se realizó desde febrero hasta marzo del 2022.

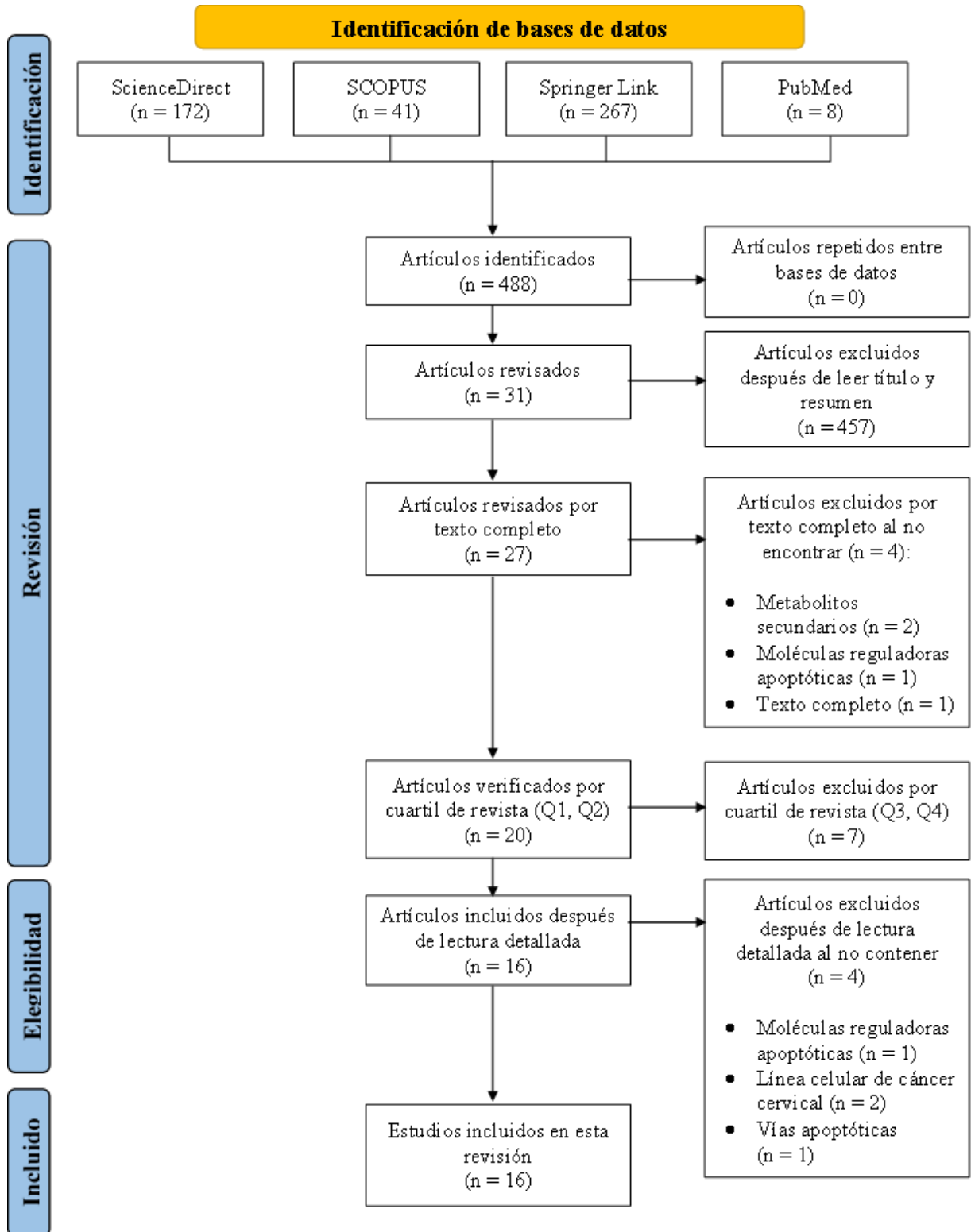
**2.2.1.6 Proceso y Elementos de Recopilación de Datos.** Se confirmó que los artículos seleccionados cumplieran con la totalidad de los criterios de inclusión durante la revisión del texto completo. De las investigaciones primarias escogidas se extrajo y analizó la siguiente información: i) compuesto o grupo de metabolitos secundarios; ii) ruta apoptótica involucrada; iii) efecto del metabolito sobre las rutas apoptóticas; iv) resultados principales u observaciones adicionales.

**2.2.1.7 Riesgo de Sesgo.** Para evaluar el riesgo de sesgo se empleó la herramienta *Science in Risk Assessment and Policy* (SciRAP), que mide la calidad metodológica que presenta los estudios *in vitro* seleccionados (**Figura S2**) (Beronius et al. 2014). En esta se logró estimar la calidad metodológica y la relevancia de la información presentada (directamente relacionadas con el riesgo de sesgo), presentando como opciones de evaluación: “cumplido”, “parcialmente cumplido” o “no cumplido” según los criterios establecidos por la herramienta. Lo anterior con el fin de reportar la calidad de la información presente en los artículos seleccionados. SciRAP incluye 16 criterios de evaluación en la sección de “calidad metodológica”, los que se dividen en cuatro dominios: Compuesto de prueba y controles, Sistema de prueba, Administración del compuesto de prueba, Recolección de datos y análisis, y Otros. En la sección de “relevancia” presenta cuatro dominios que incluyen: Sustancia, Sistema de prueba, Punto final y Concentraciones. Adicionalmente la herramienta arrojó un documento Excel descargable para cada estudio individual, en donde se reportan los resultados de los estudios,

evidenciando la información diligenciada en la plataforma web, plasmada en forma de tablas, diagramas de barras (calidad metodológica-riesgo de sesgo) (**Tabla 1**) y gráficos circulares (relevancia), los cuales se evidencian en **Anexos (Tablas S1-S32 y Figuras S3-S18)**. Cabe resaltar que SciRAP aplica criterios de Cochrane y del Departamento de Toxicología de Estados Unidos.

## **2.2.2 Resultados**

**2.2.2.1 Estudios Seleccionados.** La cantidad total de artículos encontrados con la estrategia de búsqueda fue de 488 referencias. Luego de filtrar con las opciones propias de las bases de datos y evaluar la idoneidad según el título y resumen, se escogieron los artículos que solamente cumplieran con los criterios de elegibilidad, encontrando información de otras áreas de estudio. Es por esto que la búsqueda se refinó a 31 artículos excluyendo 457 referencias. Posteriormente, al excluir las investigaciones que no presentaron la información requerida, se revisaron 27 estudios por texto completo. Los artículos se verificaron de acuerdo al cuartil de la revista, excluyendo siete referencias al estar publicadas en revistas de cuartil 3 o 4. Al finalizar el proceso de evaluación, se incluyen 16 artículos en esta revisión sistemática al cumplir con los criterios de elegibilidad: (Mahata et al. 2012); (Hwang et al. 2015); (Pal et al. 2021); (Ju et al. 2012); (Willig et al. 2019); (Thouri et al. 2019); (Silva et al. 2019); (Huang et al. 2018); (Lukhele and Motadi 2016); (Ramesh and Alshatwi 2013); (Kumar et al. 2016); (Zhang et al. 2018); (Zhang et al. 2017); (Zhang et al. 2014); (Chen et al. 2019); (Munagala et al. 2011). En la **Figura 1** se muestra el diagrama de flujo de la búsqueda sistemática de acuerdo a los parámetros establecidos de las guías PRISMA.



**Figura 1.** Diagrama de flujo *PRISMA* en el que se representa el protocolo de búsqueda sistemático y los productos obtenidos para la revisión sistemática.

**2.2.2.2 Riesgo de Sesgo Dentro de los Estudios.** La calidad metodológica reportada para las 16 publicaciones seleccionadas se evidencia en la **Tabla 1**, reportando el valor del cálculo del riesgo de sesgo en porcentaje (puntaje SciRAP). Para el análisis es preciso tener en cuenta que la puntuación proporcionada por la herramienta debe ser evaluada en conjunto con los diagramas de barras, para así evitar caer en malos juicios asegurando un nivel de certeza inexistente, pasando por alto información

relevante, simplificando la evaluación al omitir las fortalezas y debilidades halladas en las investigaciones. Los diagramas de barras representan en color verde los criterios cumplidos, en amarillo los parcialmente cumplidos y en rojo los criterios que no se cumplieron. Cabe resaltar que se excluyeron los siguientes criterios de la evaluación: Era probable que el compuesto de ensayo fuera soluble a las concentraciones utilizadas (número dos); La duración de la exposición era adecuado para el sistema de prueba y los puntos finales investigados (número ocho); y, por último, Las mediciones se recopilaron en puntos de tiempo adecuados para generar datos sensibles, válidos y confiables (número 13). Al ser criterios irrelevantes para este tipo de estudio. El criterio de evaluación número cuatro: “se incluyó un control de disolvente”, no fue tenido en cuenta, al encontrar que los artículos que evaluaron la exposición directa de los metabolitos secundarios sobre los modelos celulares, no aplicaron dicha metodología en los experimentos.

**Tabla 1.** Recopilación del riesgo de sesgo evaluado en los estudios seleccionados.

Referencia	Calidad (%)	Anexo Calidad metodológica
Mahata et al. 2012	79.17	
Hwang et al. 2015	83.33	
Pal et al. 2021	87.50	
Ju et al. 2012	95.83	
Willig et al. 2019	95.83	
Thouri et al. 2019	87.50	

Silva et al. 2019	91.67	
Huang et al. 2018	100.00	
Lukhele and Motadi 2016	95.83	
Ramesh and Alshatwi 2013	90.91	
Kumar et al. 2016	68.18	
Zhang et al. 2018	90.91	
Zhang et al. 2017	100.00	
Zhang et al. 2014	90.91	
Chen et al. 2019	90.91	
Munagala et al. 2011	81.82	

En general, los artículos seleccionados, en su mayoría tuvieron un bajo riesgo de sesgo, lo que refleja una calidad metodológica alta. En detalle, un artículo se encuentra cerca al 70%, uno >70%, cuatro >80%, ocho >90% y dos presentan un 100% de calidad metodológica. Se debe resaltar que la



mayoría de artículos se encuentran dentro del rango de porcentaje aceptado al 90% de confiabilidad. Para los 16 artículos incluidos en esta revisión sistemática, se tendrá su correspondiente discusión en la siguiente sección, en la que se evidenciarán los metabolitos promisorios y estudiados en las rutas apoptóticas dentro de los modelos *in vitro* del CCU.

**2.2.2.3 Resultados de Estudios Individuales.** Los detalles metodológicos y resultados/conclusiones reportadas en los artículos seleccionados, se encuentran en las siguientes tablas. Se muestra para cada artículo la presencia de exposición de los extractos herbales (**Tabla 2**) y la evaluación directa del metabolito secundario (**Tabla 3**) en las líneas celulares del CCU para evaluar actividad apoptótica.

**Tabla 2.** Síntesis de los estudios seleccionados que usan extractos herbales.

Referencia	Especie (NCBI Taxonomy ID)	Extracto	Compuesto (PubChem CID)	Metabolitos Secundarios	Modelo celular	Ruta apoptótica	Resultados
Mahata et al. 2012	<i>Bryophyllum pinnata</i> (NCBI:txid80913)	Si (extracto de hojas en éter de petróleo y acetato de etilo 50:50)	Briofilina-A (5488801)	Glucósidos esteroideos.	HeLa	Vía intrínseca	Aumentó la expresión proteica de Bax y la actividad de la caspasa-3. Suprimió la expresión proteica de Bcl-2. Escindió la proteína PARP-1.
Hwang et al. 2015	<i>Petasites japonicus</i> (NCBI:txid186965)	Si (extracto de toda la planta en etanol)	Luteolina (5280445) Ácido fukinólico (6441059) Ácido cafeico (689043)	Flavonoides Fenilacetatos Ácidos cafeicos	HeLa	Vía de apoptosis intrínseca mitocondrial	Aumentó la expresión proteica de Bax y la actividad de las proteínas caspasa-9, -3 y PARP. Suprimió la expresión proteica de Bcl-2.
Pal et al. 2021	<i>Tiliacora racemosalas</i> (no se encontró la información requerida)	Si (extracto de hojas en metanol)	Bisbencilisoquinolina (22169421)	Alcaloide	SiHa	Vías apoptóticas extrínsecas e intrínsecas	Aumentó la actividad de las proteínas p53 y caspasa-3. Suprimió la expresión proteica de Bcl-2.
Ju et al. 2012	<i>Artemisia princeps</i> (NCBI:txid223870)	Si (extracto de partes aéreas en etanol)	Eupatilina (5273755) Jaceosidina (5379096)	Flavonoides	HeLa.	Vía de muerte mitocondrial	Aumentó la expresión proteica de Bak y Bax, junto la actividad de la caspasas-3, -9 y -8. Suprimió la expresión proteica de Bcl-xL. Escindió la proteína PARP. Liberó la proteína

Willig et al. 2019	<i>Heliopsis longipes</i> (NCBI:txid185653)	Si (extracto de raíz en n-hexano)	Espilantol (5353001)	Alcamidas poliinsaturadas	HeLa	Vías extrínsecas	Aumentó la actividad de las caspasas 3 y 8.
Thouri et al. 2019	<i>Phoenix dactylifera</i> (NCBI:txid42345)	Si (extracto de semillas de dátiles en metanol)	Ácidos gálico (370) Ácido cafeico (689043) Rutina (5280805)	Hidroxibenzoatos Ácidos cafeicos Flavonoide	HeLa	Vía intrínseca	Aumentó la actividad de la caspasa-9. Escindió la proteína PARP.
Silva et al. 2019	<i>Annona crassiflora</i> Mart (NCBI:txid508206)	Si (partición del extracto de hojas en hexano)	Goniotrocina (44559072) (1) Coriaheptocina (44566648) (2) Ácido palmitato (985) (3) Ácido octadecatrienoico (6506665) (4)	Flavonoides Alcaloides Lactonas (1) Acetogeninas (2) Ácidos grasos (3) (4)	SiHa	Vía intrínseca	Aumentó actividad de las caspasas-3 y -9. Escindió la proteína PARP.

**Tabla 3.** Síntesis de los estudios seleccionados con evaluación directa del metabolito secundario.

Referencia	Especie (NCBI Taxonomy ID)	Extracto	Compuesto (PubChem CID)	Metabolitos Secundarios	Modelo celular	Ruta apoptótica	Resultados
Huang et al. 2018	<i>Euphorbia sieboldiana</i> (NCBI:txid526202)	No (extraído de partes aéreas y aislado)	Ácido 1b,2a,3b,19b,23)-1,2,3,19,23-pentahydroxyolean-12-en-28-oico (No se encontró la información requerida)	Triterpenoides de tipo oleanano	HeLa	Vía intrínseca y extrínseca (No definido)	Aumentó la expresión proteica de Bax y Fas/CD95, junto con la actividad de las caspasas-9 y -8. Suprimió la expresión proteica de Bcl-2. Liberó la proteína citocromo c.
Lukhele and Motadi 2016	<i>Cannabis sativa</i> (no se encontró la información requerida)	No (adquirido de Sigma-Aldrich)	Cannabidiol (644019)	Resorcinoles	SiHa, HeLa y ME-180	Vía mitocondrial	Aumentó la expresión proteica de Bax y la actividad de las proteínas p53, caspasa 3/7, caspasa-9. Disminuyó la expresión proteica de Bcl-2.
Ramesh and Alshatwi 2013	<i>Citrus x paradisi</i> (NCBI:txid37656)	No (adquirido de Sigma, EE. UU.)	Naringina (442428)	Flavanona	SiHa	Vía intrínseca como extrínseca	Aumentó la expresión proteica de Bax, Fas y FADD. Aumentó la actividad de las proteínas p53, caspasa-3, -8 y -9.
Kumar et al. 2016	<i>Curcuma longa</i> (NCBI:txid136217) <i>Punica Granatum</i> (NCBI:txid22663)	No (adquirido de MP Biomedicals)	Curcumina (969516) Ácido elágico (5281855)	Polifenol Catecoles	HeLa	Vía intrínseca	Aumentó la expresión proteica de Bax. Aumentó la actividad de las proteínas p53.

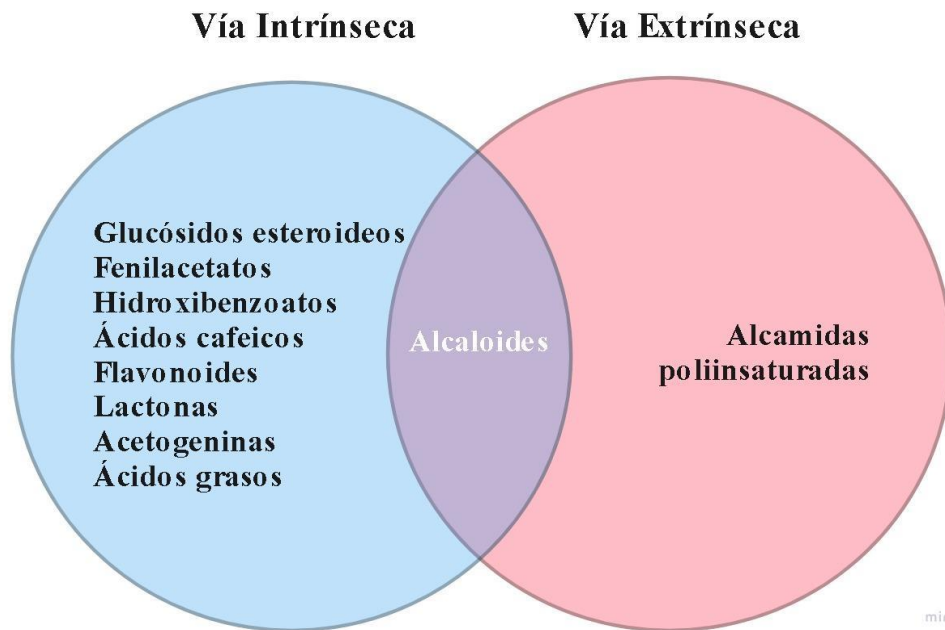
Zhang et al. 2018	<i>Morus alba</i> (no se encontró la información requerida)	No (extraído de hojas, purificado e identificado)	Morina (5281670)	Pentahidroxi flavona	HeLa	Vía intrínseca y extrínseca	Aumentó la expresión de ARNm de p53, Bax, Bad, citocromo c, Apaf-1, caspasas-9, -10, DR3, DR5, FasL, FADD, PARP y Smac. Suprimió la expresión de ARNm Bcl-2, Bcl-xL, cIAP-1 y, cIAP-2.
Zhang et al. 2017	<i>Zingiber officinale</i> (NCBI:txid94328)	No (extraído de toda la planta, purificado e identificado)	6-Gingerol (442793)	Guayacoles	HeLa	Vía intrínseca	Aumentó la expresión de Bax y la actividad de las caspasa-3, -8, -9. Suprimió la expresión de Bcl-2. Escindió la proteína PARP. Liberó citocromo c.
Zhang et al. 2014	<i>Paris polyphylla</i> (no se encontró la información requerida)	No (adquirido de PureOne Biotechnology)	Saponina Paris VII (176233)	Saponinas	HeLa	Vía intrínseca	Aumentó la expresión proteica de Bax y la actividad de las proteínas caspasa-3, -9. Suprimió la expresión proteica de Bcl-2.
Chen et al. 2019	<i>Epimedium</i> (no se encontró la información requerida)	No (adquirido de Yuanye Biotechnology)	Icaritina (5318980)	Flavonoides	HeLa y SiHa.	Vía apoptótica intrínseca	Aumentó la expresión proteica de Bax y la actividad de las proteínas caspasas 3 y 9. Suprimió la expresión proteica de Bcl-2 y XIAP.
Munagala et al. 2011	<i>Withania Somnifera</i> (NCBI:txid126910)	No (adquirido de Chromadex (Irvine, CA))	Withaferin A (265237)	Withanólidos	CaSki	Vía p53	Aumentó la expresión proteica de Bax y la actividad de las proteínas p53 y caspasa-3. Suprimió la expresión proteica de Bcl-2. Escindió la proteína PARP.

### 2.2.3. *Discusión*

**2.2.3.1 Análisis Convergente de Metabolitos Secundarios.** Según la revisión sistemática realizada, se encontró incursión en las dos vías apoptóticas, la vía intrínseca y la vía extrínseca. Siete artículos expusieron los extractos herbales propuestos frente a las líneas células del CCU, encontrándose representativo los siguientes metabolitos secundarios: alcaloides y alcanoides poliinsaturadas, donde la actividad apoptótica estuvo sobre la vía extrínseca. Mientras que para la vía intrínseca se encontraron los siguientes principios activos: alcaloides, glucósidos esteroideos, fenilacetatos, hidroxibenzoatos, ácidos cafeicos, flavonoides, lactonas, acetogeninas y ácidos grasos.

Se evidenció una convergencia en ambas vías apoptóticas con los alcaloides, como se puede evidenciar en la **Figura 2**. Se conoce que los alcaloides tienen propiedades anticancerígenas, antiinflamatorias, inmunomoduladoras, antidiabéticas, antihepatotóxicas y antibacterianas (Mondal et al. 2019). Como lo presenta el trabajo de Pal e investigadores, los alcaloides son el mayor componente bioactivo presente en los extractos de las hojas de *T. racemosa*, inhibiendo la proliferación de las células SiHa, actuando en la activación de p53 y la caspasa-3. Alterando la relación Bax-Bcl-2 e inhibiendo Bcl-2. A su vez resaltan los efectos sinérgicos que presenta la mezcla de alcaloides provocando apoptosis en las células cancerígenas (Pal et al. 2021).

Por consiguiente, como lo sugiere la **Figura 2**, el principio activo alcaloide es representativo en la composición herbal; sin embargo, se debe tener en consideración que este metabolito secundario sólo se reportó en dos de siete artículos (Pal et al. 2021; Silva et al. 2019). Asimismo, muy pocos estudios evalúan las moléculas reguladoras de la apoptosis de la vía extrínseca (dos de siete) (Pal et al. 2021; Willig et al. 2019). Se ha de tener en cuenta, que en los estudios que evaluaron la actividad de los extractos completos, puede existir una actividad sinérgica entre los distintos metabolitos secundarios, por lo que es necesario identificar el compuesto responsable de generar apoptosis en las líneas celulares cancerígenas correspondientes.

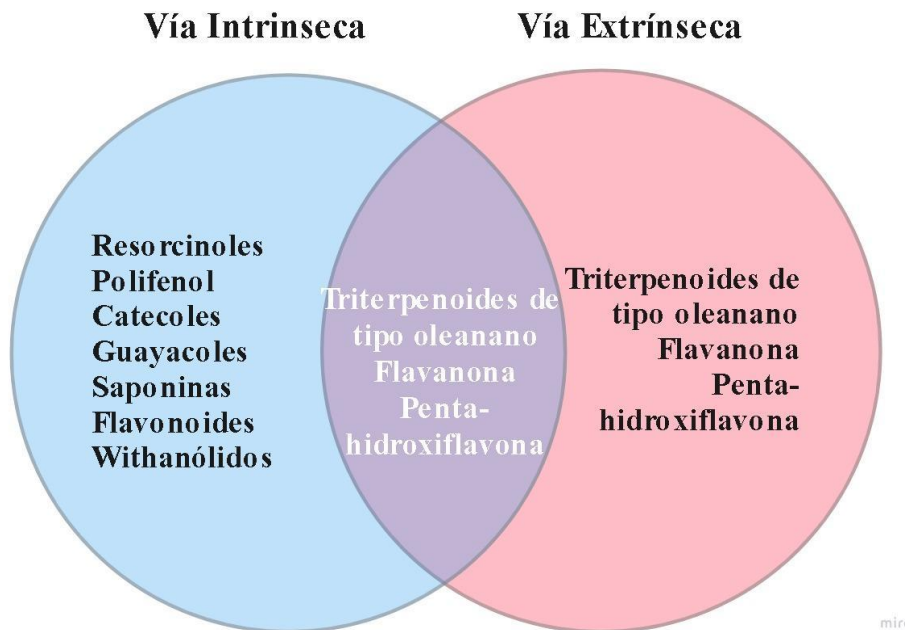


**Figura 2.** Diagrama de Venn para evaluar convergencia de grupos de metabolitos secundarios presentes en los extractos herbales entre las rutas apoptóticas.

Dentro de esta misma revisión sistemática se evidenció conjuntamente nueve experimentos que expusieron los metabolitos secundarios (previamente aislados, purificados e identificados) frente a las diferentes líneas celulares del CCU. Se encontró que los siguientes metabolitos secundarios tuvieron acción en la vía intrínseca: triterpenoides de tipo oleanano, resorcinoles, flavanonas, polifenoles, catecoles, pentahidroxi flavona, guayacoles, saponinas, flavonoides y withanólidos. Adicionalmente los principios activos encontrados en la vía extrínseca fueron: triterpenoides de tipo oleanano, flavanonas y pentahidroxi flavona. Reportando que los triterpenoides de tipo oleanano, flavanonas y los pentahidroxi flavona, convergen en ambas vías apoptóticas, evidenciado en la **Figura 3**. La flavanona y la pentahidroxi flavona, son ambos compuestos que pertenecen a la familia de los flavonoides, los cuales se discutirán más adelante. Para los triterpenoides de tipo oleanano, Huang y colaboradores presentan en su investigación, un compuesto derivado de triterpenos pentacíclicos que posee un resto polihidroxilo en el anillo A (Ácido 1b, 2a,3b,19b,23)-1,2,3,19,23-pentahydroxyolean-12-en-28-oico), el que presenta una actividad antitumoral potente y selectiva, que induce la apoptosis en las células HeLa (Huang et al. 2018). Asimismo, en este mismo estudio se sugiere realizar más ensayos que aclaren el mecanismo y el efecto farmacológico de este compuesto con respecto a su actividad anticancerígena.

Las investigaciones que evaluaron la acción de los metabolitos secundarios que convergen en las vías intrínsecas y extrínsecas, es debido al diseño experimental empleado al evaluar moléculas reguladoras apoptóticas de ambas vías (Huang et al. 2018; Ramesh and Alshatwi 2013; Zhang et al.

2018), mientras que los otros experimentos sólo estudiaron las moléculas reguladoras apoptóticas de la vía intrínseca. Debido a esto se requieren estudios que evalúen los principios activos en la vía extrínseca, para conocer su respuesta apoptótica completa ante las líneas celulares del CCU.



**Figura 3.** Diagrama de Venn para evaluar convergencia de compuestos específicos de metabolitos secundarios entre las rutas apoptóticas.

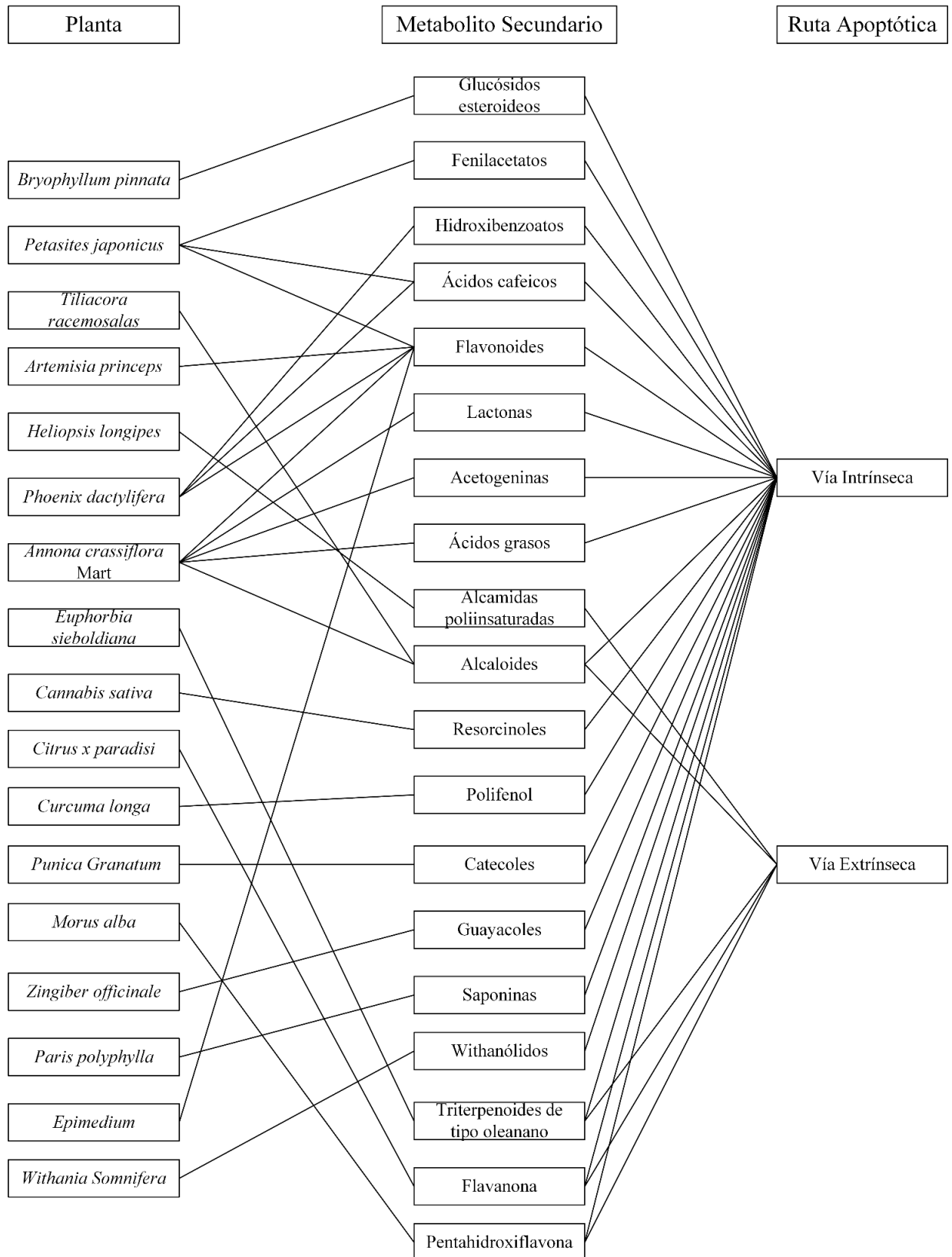
Complementando la información evidenciada en las **Figuras 2 y 3**, se puede observar en el diagrama representativo (**Figura 4**), la convergencia directa entre las plantas, metabolitos secundarios y las dos rutas apoptóticas. Destacando los flavonoides, como los metabolitos secundarios más representativos en la composición herbácea de algunas plantas, seguido de los ácidos cafeicos, junto con los alcaloides.

Los flavonoides tienen diversas actividades biológicas, incluidas propiedades anticancerígenas, antiinflamatorias y antivirales (Thouri et al. 2019). Ju y colaboradores reportan que las fracciones ricas en flavonoides presentan una mayor actividad apoptótica en comparación con los flavonoides individuales, debido a la actividad sinérgica generada; como lo demuestra la fracción rica en flavonoides de *Artemisia princeps* que induce la apoptosis en las células HeLa por medio de la activación de las caspasas-9, -3 y -8, (Ju et al. 2012). Por otra parte, como lo describen Hwang y asociados, la leutonina miembro de la familia de los flavonoides, es un compuesto activo del extracto de *P. japonicus*, que ocasiona apoptosis, postulando como posible mecanismo, la translocación de Bax/Bak en la membrana mitocondrial. En este mismo extracto se encuentra la presencia del ácido cafeico, el cual induce la apoptosis en las células del CCU al inhibir la actividad de Bcl-2, lo que conduce a la liberación del



citocromo c y la posterior activación de la caspasa-3. Por tanto, los autores determinan que los efectos anticancerígenos observados en *P. japonicus* pueden deberse a la combinación de la leutonina y el ácido cafeico (Hwang et al. 2015). Asimismo, el ácido cafeico ha reportado su actividad frente a distintas células cancerosas demostrando efectos antiproliferativos selectivos (Thouri et al. 2019).

Cabe aclarar que los principios activos encontrados son representativos para esta revisión sistemática, pero no se encuentran en la composición de todas las plantas. A la vez se observa que la mayoría de metabolitos secundarios tienen una mayor incidencia dentro de la vía apoptótica intrínseca, considerando que los estudios consultados para esta revisión sistemática muestran un mayor interés por esta vía, en vez de indicar la activación única y exclusiva de esta. Es por esto que se requieren mayores estudios en la vía extrínseca, para determinar en un futuro la posible activación de ambas vías.



**Figura 4.** Diagrama representativo de metabolitos secundarios presentes en las plantas y su regulación sobre las rutas apoptóticas.

Según las investigaciones reportadas en esta revisión sistemática, se encuentran los siguientes metabolitos secundarios con actividad apoptótica en las líneas celulares del CCU: alcaloides, alcámidas poliinsaturadas, glucósidos esteroideos, fenilacetatos, hidroxibenzoatos, ácidos cafeicos, flavonoides, lactonas, acetogeninas, ácidos grasos, triterpenoides de tipo oleanano, resorcinoles, flavanonas,

polifenoles, catecoles, pentahidroxi flavona, guayacoles, saponinas, flavonoides y withanólidos.

**2.2.3.2 Posibles Mecanismos de Acción.** Dentro de las **Tablas 2 y 3**, se describe la identidad taxonómica de cada especie herbal (Taxonomía ID), extraída de la base de datos *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (National Center for Biotechnology Information (NCBI) n.d.). De la misma forma la identidad del metabolito secundario, que está clasificado por familia, se verificó por medio de la base de datos *National Institutes of Health* (NIH) (PubChem n.d.).

Según lo revisado en este trabajo, los metabolitos secundarios presentes en los artículos seleccionados, poseen actividad apoptótica ante las líneas celulares del CCU, al activar la vía extrínseca uniéndose como líganos a los receptores de muerte. Por otro lado, los metabolitos secundarios alteran la regulación del estrés oxidativo, por medio de señales intracelulares que activan la vía intrínseca, provocando la disminución o el incremento de especies reactivas de oxígeno (ROS), dirigido por mecanismos aun desconocidos (Carvajal Carvajal and Carvajal Carvajal 2019; Jacob et al. 2011; Arfin et al. 2021).

En la **Tabla 2** se evidencia la información resumida de siete artículos que describen la actividad apoptótica de extractos herbales expuestos frente a líneas celulares del CCU. Dichos extractos presentan diferentes metabolitos secundarios que pueden o no actuar en sinergia, descritos en los resultados.

Según lo mencionado en el año 2012 Mahata y colaboradores, evaluaron la actividad del extracto de éter de petróleo y acetato de etilo de la especie vegetal *Bryophyllum pinnata* (NCBI: txid80913) en la línea celular HeLa, demostrando la posible presencia del glucósido esteroideo briofilina -A (PubChem CID:5488801), que está directamente implicado en la ruta apoptótica intrínseca, debido a que genera un aumento de Bax y caspasa-3 (miembro de la familia de enzimas que integran el grupo cisteín-proteasas). La proteína pro-apoptótica Bax, proteína efectora activada por un estímulo apoptótico, se agrega en la membrana externa mitocondrial, encargada de liberar al citocromo C del espacio intermembrana al citosol. Donde posteriormente el citocromo C recluta a la proteína Apaf-1, dando paso a la creación del apoptosoma, el cual activa a la caspasa-9 iniciadora, que a su vez activa la cascada de caspasas, convergiendo en la caspasa-3 efectora, donde el extracto también reportó actividad. Posteriormente esta caspasa efectora desencadena las últimas fases de la apoptosis provocando daño intracelular, al activar las endonucleasas (enzima encargada de destruir al ADN) y degradando al citoesqueleto por medio de

proteasas que descomponen los filamentos de actina y los microtúbulos (Mahata et al. 2012). Así mismo Hwang y asociados demostraron una regulación positiva en Bax y un aumento de caspasa-9 y -3 en la misma línea celular evaluada anteriormente, empleando el extracto de etanol de *Petasites japonicus* (NCBI: txid186965), el cual demostró la presencia de flavonoides, fenilacetatos y ácidos cafeicos, ante el reporte de los metabolitos secundarios: luteolina (PubChem CID:5280445), ácido fukínólico (PubChem CID:6441059) y ácido cafeico (PubChem CID:689043), respectivamente. Además de evidenciar una regulación negativa de Bcl-2 y corte de PARP. La proteína anti-apoptótica Bcl-2, en ausencia de estímulos de apoptosis, evita la agregación de las proteínas pro-apoptóticas en la membrana mitocondrial externa, impidiendo de esta forma la liberación del citocromo C, generando así la inactivación del proceso apoptótico. Por otro lado, PARP (Poli ADP ribosa polimerasa) es escindida, evadiendo el proceso de reparación del ADN (Hwang et al. 2015). Como se mencionó anteriormente existen diferentes mediadores pro y anti apoptóticos, como lo son Bax y Bcl-2, respectivamente, los cuales son parte de la familia conocida como la familia de proteínas Bcl-2. En esta, se encuentran las proteínas Bak y Bcl-XL que ejercen una acción similar a las proteínas nombradas anteriormente de manera respectiva. Ju y colaboradores evidenciaron la activación de Bak y la disminución de Bcl-2 frente al extracto de etanol de *Artemisia princeps* (NCBI: txid223870), el cual mostro la presencia de flavonoides, también descritos en la investigación realizada por Hwang y asociados en el 2015. Adicionalmente se observó la activación de las caspasas-3 y -9 que están relacionadas con la vía intrínseca, a la par de la liberación del citocromo C, escisión de PARP y disminución de Bcl-XL, acciones causadas ante los metabolitos secundarios eupatilina (PubChem CID:5273755) y jaceosidina (PubChem CID:5379096) en el modelo *in vitro* HeLa. Cabe resaltar que esta fracción estandarizada rica en flavonoides de *Artemisia princeps*, también activa a la caspasa-8, pero este proceso es independiente del receptor de muerte, provocado por la escisión de las capasas-3 y -9, las cuales se activan entre sí (caspasas-3, -8 y -9) a través de un mecanismo circuito de retroalimentación (Ju et al. 2012). Willig e investigadores en el 2019, también observaron en las células HeLa una activación en las caspasas-3 y -8, donde esta última está relacionada con la vía extrínseca y se encarga de generar la cascada de caspasas, provocando la activación de caspasas ejecutoras como las caspasas-3, -7 y -6, sin embargo en este caso, el extracto usado corresponde al n-hexano de *Heliopsis longipes* (NCBI:txid185653), el cual presenta a

la alcamida poliinsaturada, espilantol (PubChem CID: 5353001), que según los investigadores está relacionada con la actividad apoptótica en la vía extrínseca (Willig et al. 2019). En el mismo año Thouri y asociados, evaluaron en el modelo SiHa los extractos metanólico de semillas de *Phoenix dactylifera* (NCBI:txid42345), la cual mostró compuestos como hidroxibenzoatos, ácidos cafeicos y flavonoides, familias del ácido gálico (PubChem CID:370), ácido cafeico (PubChem CID:689043) y de la rutina (PubChem CID:5280805), respectivamente, responsables que desencadenaron el aumento de la caspasa-9 y una disminución en el mediador PARP, efecto similar observado por Silva y colaboradores en el 2019, frente a una partición de hexano de *Annona crassiflora* Mart (NCBI:txid508206), que demostró igualmente la presencia de flavonoides, además de otros compuestos como alcaloides, lactonas, acetogeninas y ácidos grasos, familias de los siguientes compuestos: goniotrocina (PubChem CID:44559072), coriaheptocina (PubChem CID:44566648), ácido palmitato (PubChem CID:985) y ácido octadecatrienoico (PubChem CID:6506665), respectivamente, que activaban estas mismas caspasas y a su vez realizaron un corte en PARP ante las líneas celulares SiHa, activando la ruta apoptótica intrínseca (Silva et al., 2019; Thouri et al., 2019). Otro de los mediadores involucrados en el proceso de la regulación de la apoptosis es la proteína p53, que se activa en respuesta al daño en el ADN, encargada de encender genes pro-apoptóticos, que estimula a la vía intrínseca. Según lo mencionado, Pal e investigadores en el 2021, observaron la activación de este mediador frente a un extracto metanólico de *Tiliacora racemosalas*, el cual contenía bisbencilisoquinolina (PubChem CID:22169421), un alcaloide que, según los autores, es un principio activo que está relacionado con el proceso de activación apoptótica en la vía extrínseca e intrínseca ante la exposición de las líneas celulares SiHa (Pal et al. 2021).

En la **Tabla 3** se describen nueve estudios evaluados directamente con metabolitos secundarios expuestos a diferentes líneas celulares del CCU. Cada estudio expuso a un metabolito secundario específico con actividad apoptótica en dichas células. Dentro de estos, tres artículos describen la extracción, aislamiento y purificación de los principios activos. Por otro lado, seis artículos reportan la adquisición del metabolito activo por medio de una casa comercial.

Como lo reporta Huang y colaboradores en el 2018, quienes evaluaron el Ácido 1b, 2a,3b,19b,23)-1,2,3,19,23-pentahydroxyolean-12-en-28-oic, un triterpenoide de tipo oleanano,

proveniente de *Euphorbia sieboldiana* (NCBI: txid526202), que ejerce acción en las células HeLa, en ambas vías de la apoptosis, activando a las caspasas-8 y -9, citocromo C, Bax y Fas/CD95. Este último mediador, es un receptor de muerte, presente en la superficie de la membrana celular, que activa la vía extrínseca. Además de esto, este compuesto demostró la supresión de Bcl-2 y de la procaspasa-3 (forma inactiva de la caspasa-3), en consecuencia, desencadena la activación del proceso de apoptosis (Huang et al. 2018). Otros mediadores involucrados en el proceso son la caspasa-7, la cual se encarga de provocar los últimos procesos apoptóticos, esta fue evaluada por Lukhele y Motadi en el 2016, frente al cannabidiol (PubChem CID:644019), metabolito secundario de la familia de los resorcinoles. El cannabidiol fue evaluado en tres líneas celulares diferentes SiHa, HeLa y ME-180, que además de regular positivamente a la caspasa-7, demostró un aumento de p53, caspasas-3 y -9, Bax y una disminución en Bcl-2, observando la activación de la vía mitocondrial (Lukhele and Motadi 2016). Así mismo se encontró elevada la proteína adaptadora FADD, evidenciado en el trabajo de Ramesh e investigadores en el 2013, donde esta molécula reguladora de apoptosis participa en la vía extrínseca, la cual hace parte del complejo de señalización que induce a la muerte DISC [dominio de muerte del receptor Fas + proteína adaptadora FADD + procaspasa-8], el cual se encarga de activar a la caspasa iniciadora 8 y liberarla al citosol, donde esta posteriormente inducirá la activación de la cascada de caspasas, activando a las caspasas ejecutoras de apoptosis 3, 6 y 7. De esta misma forma se evidenció la regulación positiva de las caspasas-3, -8 y -9, junto a un elevado aumento de p53, Bax y Fas, eventos causados por la naringina (PubChem CID:442428), de la familia de flavanonas, un metabolito secundario presente en la planta *Citrus x paradisi* (NCBI:txid37656) expuesta en las células SiHa, que activaron tanto la vía intrínseca como la extrínseca (Ramesh and Alshatwi 2013). La proteína Bad pro-apoptótica, miembro de la familia de proteínas Bcl-2, pertenece a la subfamilia BH3-only, activas solamente en respuesta de estímulos apoptóticos, donde su principal función es promover la inhibición de proteínas anti-apoptóticas (Bcl-2 y Bcl-XL), generando indirectamente la apoptosis. Bad como miembro de esta subfamilia, al unirse e inhibir a las proteínas anti-apoptóticas, permite el agregamiento de Bax y Bak en la superficie de la mitocondria, logrando de esta forma la liberación de proteínas mitocondriales intermembranales, como el citocromo C, que induce a la apoptosis. De esta forma la morina (PubChem CID:5281670), compuesto de la familia pentahidroxi-flavona, molécula que pertenece

a la planta *Morus alba*, y evaluada en la línea celular HeLa, reporta una mayor expresión de p53, Bax, Bad, citocromo C, Apaf-1, caspasa-9 y -10, aumento de los receptores de muerte DR3 y DR5 de superficie (miembros de la familia del receptor del factor de necrosis tumoral (TNF)), a la vez del aumento del ligando Fas (Fas-L), el cual provoca la activación del receptor de muerte Fas. En conjunto se reporta la activación de la proteína adaptadora FADD, la proteína PARP y de Smac/DIABLO. Smac/DIABLO son moléculas liberadas del espacio intermembrana de la mitocondria al citosol, conocidas como activadores secundarios que inhiben la función de proteínas anti-apoptóticas. Evidenciando al mismo tiempo la disminución de la proteína Bcl-2, Bcl-XL, a la par de cIAP-1 y cIAP-2; estas dos últimas abreviaturas que significan: inhibidor celular de la apoptosis proteína-1 y -2, que pertenecen a la familia de las proteínas IAP, indicando de esta forma la activación de las vías intrínsecas y extrínsecas apoptóticas celulares. En los resultados reportados por Chen y colaboradores en el 2019 evidenciaron la disminución de XIAP (proteína que tiene como función detener la muerte celular apoptótica) y la regulación negativa de Bcl-2 en las células HeLa y SiHa expuestas a la icaritina (PubChem CID:5318980), un flavonoide que a su vez reporto un aumento de Bax y de las caspasa-3 y -9, registrando la activación de la vía apoptótica intrínseca (Chen et al. 2019). Para el estudio generado por Munagala y asociados en la línea celular CaSki, se reportó la activación de la vía p53 por la exposición de la withaferin A (PubChem CID:265237), la que pertenece a la familia de los withanólidos, principio activo encontrado en la planta *Withania Somnifera* (NCBI:txid126910), restaura p53 en comparación con las células control, registro a la par un aumento en la relación Bax/Bcl-2, la caspasa-3 y la proteína PARP escindida (Munagala et al. 2011). En el año 2017, Zhang e investigadores, publicaron la exposición del 6-gingerol (PubChem CID:442793) en las células HeLa, compuesto que pertenece al *Zingiber officinale* (NCBI:txid94328), catalogado en la familia de los guayacoles, metabolito secundario que evidenció la escisión de las caspasas-3, -8 y -9, un aumento en la proteína PARP y de la relación Bax/Bcl-2, junto a la liberación del citocromo C, moléculas que pertenecen a la vía intrínseca. No obstante, a pesar de registrar una actividad en la caspasa-8, se sospecha que la vía extrínseca se encontraba inactiva, siendo el proceso responsable del aumento de esta enzima, el mecanismo en circuito de retroalimentación, reportado por Ju y colaboradores en el 2012 (Zhang et al. 2017). El reporte generado en el 2014 por Zhang y asociados, mostró un aumento de las moléculas reguladoras de la

apoptosis, tales como Bax, caspasas-3 y -9. Disminuyendo Bcl-2, proteína anti-apoptótica, lo que da lugar al desencadenamiento de la vía intrínseca de la apoptosis exponiendo a las células HeLa a las saponinas paris VII (PubChem CID:176233), pertenecientes de la familia de las saponinas de la planta *Paris polyphylla* (Zhang et al. 2014). Lo reportado por Kumar y colaboradores ante la exposición de las células HeLa a la curcumina (PubChem CID:969516), perteneciente de la *Curcuma longa* (NCBI: txid136217) y al ácido elágico (PubChem CID:5281855) de la *Punica Granatum* (NCBI: txid22663), activaron la vía intrínseca al evidenciar la expresión de Bax y la restauración de p53 en las células cancerígenas ante la exposición de los polifenoles y catecoles, respectivamente (Kumar et al. 2016). Dichas vías apoptóticas (intrínseca y extrínseca), convergen en las caspasas -3, -7 y -6, caspasas efectoras miembros de la familia de proteasas intracelulares, que tienen como función generar cambios que desencadenan las últimas fases de la muerte celular programada. Posteriormente estas caspasas efectoras desencadenan las últimas fases de la apoptosis provocando daño intracelular, al activar las endonucleasas y degradando al citoesqueleto por medio de proteasas que descomponen los filamentos de actina y los microtúbulos. Los pasos finales del proceso de apoptosis, se evidencian en la fragmentación del núcleo, disminución del tamaño celular, formación de vesículas citoplasmáticas, que posteriormente formarán cuerpos apoptóticos, los cuales expresan ligandos fagocíticos, que permiten a estos ser capturados, digeridos y degradados, generalmente por los macrófagos (Alberts et al. 2017).

**2.2.3.3 Direcciones Futuras.** Con el propósito de dar continuidad a futuros trabajos dentro del área experimental del grupo de investigación QUIRÓN, adscrito a la Universidad Antonio Nariño, se propone extraer los metabolitos secundarios de la especie herbal *Heliotropium indicum* (planta blanco del grupo de investigación), con el fin de evaluar los efectos apoptóticos ante la línea celular HeLa, tanto en la vía intrínseca, como en la vía extrínseca.

*H. indicum* pertenece a la familia Boraginaceae, la cual se encuentra en lugares tropicales de distintas partes del mundo. En Colombia, la mayor presencia de esta especie herbácea se registra en el departamento de Córdoba (Pérez-Vásquez et al., 2015). En la actualidad, esta planta medicinal se usa para el tratamiento de diversas enfermedades gracias a sus propiedades antitumorales, antiinflamatorias, antimicrobianas y analgésicas, propiedades que se atribuyen a metabolitos como terpenoides y



flavonoides, compuestos destacados en esta revisión sistemática. Además, también se reporta el contenido de escualeno (terpenoide), fitol (terpenoide), trialcaloides de pirrolizidina, indicina-N-óxidos, esteroides, triterpenos, saponinas y taninos (Ghosh et al. 2018; Michael 2011; Pathania et al. 2015; Paul et al. 2015; Kumar et al. 2014). El N-óxido de incina parece ser la molécula principal con actividad antitumoral; sin embargo, se han reportado efectos secundarios tóxicos que no justifican el uso de este extracto (G. K. & M. S., 2013). Por otra parte, un compuesto presente en el extracto etanólico de esta planta, el Fitol, de la familia de los terpenoides, ha mostrado ser un metabolito secundario útil como estrategia preventiva del cáncer (R. Meenatchi & G. Viji, 2013). Cabe resaltar que se ha reportado actividad anticancerígena de *H. indicum* en pulmón (Chunthorng-Orn et al. 2016), próstata (Jemilamary.V.A, 2016), osteosarcoma (Reyes - Álvarez, et al., 2018) y CCU (Paul & Kundu, 2018). Por todo lo anterior, es factible continuar estudiando los efectos anticancerígenos que otorga esta planta, y otras, como estrategia complementaria para la prevención o tratamiento del CCU.

Finalmente, los profesionales del área de la salud deben ser conscientes que el factor de riesgo más relevante del CCU es la infección del papilomavirus, encontrando en un 99% de las biopsias (Sharmin et al., 2021). Por lo tanto, más allá del establecimiento de herramientas terapéuticas, deben primar las estrategias de prevención primaria (vacunas contra el VPH) y secundaria (precisión en la detección temprana) junto al estilo de vida saludable (Pardo & de Vries, 2018). El apoyo investigativo en estas áreas de salud tan críticas, es primordial a la hora de abarcar posibles soluciones que den a las pacientes afectadas un control a tiempo de la enfermedad, e interrupción posterior de la severidad.

Partiendo del hecho que el CCU es una patología de necesidad prioritaria, no sólo para mejorar la calidad de vida actual de las pacientes que lo padecen, sino también debido a los altos costos de los tratamientos en el sistema de salud, sumado a los ineficaces tratamientos existentes, se propone continuar indagando sobre el uso de los fitoquímicos como agentes quimioterapéuticos en la lucha contra el CCU.

### 3. Conclusiones

La evaluación de la evidencia científica *in vitro* y el análisis de convergencia, muestra que los principales grupos de metabolitos secundarios que presentan un efecto regulador sobre vías apoptóticas

(intrínseca y extrínseca), es debido al efecto antioxidante, en diferentes modelos celulares del CCU (principalmente HeLa), correspondiendo a los terpenoides, flavonoides, alcaloides y ácidos cafeicos.

La mayoría de los metabolitos involucrados parecen actuar únicamente sobre la vía apoptótica intrínseca; sin embargo, se requiere más investigación para confirmar los efectos sobre las vías extrínsecas.

Esta revisión sistemática resume aspectos metodológicos y procedimentales relacionados al tipo de extracto, concentración de metabolitos y duración de la administración, con el fin de contribuir al desarrollo de próximos estudios toxicológicos y la evaluación pre-clínica sobre marcadores del CCU. Resulta paradójica la baja actividad investigativa y evidencia la necesidad de pesquisa de este tema en países sudamericanos, en los que a pesar de tener los índices de prevalencia y riesgo más altos del CCU, contiene las áreas más ricas de flora del mundo.

#### **4. Agradecimientos**

Agradezco a la Facultad de Ciencias de la Universidad Antonio Nariño, por ser la cuna donde desarrolle mi conocimiento.

A mi directora Yuly Elien Bernal Rosas por darme el privilegio de tenerla como directora de grado, agradezco su paciencia, guía, enseñanzas, comprensión, cariño, motivación y ejemplo; es quien admiro, de quien aprendo diariamente y quien se ha convertido en mi inspiración.

A mi director Orlando Alfredo Torres García por su motivación, palabras de aliento, dedicación, paciencia y orientación, tanto en la construcción de mi vida profesional, como en la personal.

A mi asesor Diego A. Bonilla, quien tuve la fortuna de reencontrarlo y desde entonces es mi guía, quien me ha alentado para culminar mi trabajo de grado, de quien tengo mucho respeto y admiración.

A todos los docentes que me guiaron y me brindaron sus conocimientos a lo largo de mi carrera universitaria; me mostraron las herramientas necesarias para afrontar los retos académicos, que me forjaron en la profesional que soy.

A mis padres y a toda mi familia por ser mi roca, por acompañarme en el proceso de formación, apoyarme financiera y anímicamente a lo largo de toda mi carrera; quienes, junto con su amor, paciencia, comprensión, actitud, ánimo y ejemplo en la vida personal, al igual que por su constancia, compromiso y pasión en la vida profesional, son un ejemplo clave en mi vida.

A mis amigos de la vida y de la facultad, gracias por el apoyo diario en mi vida personal y académica; de quienes me siento muy afortunada de conocer y de recibir su amistad, siendo excelentes en todo lo que se proponen y quienes no dudaron en apoyarme cuando necesitaba, a quienes agradezco enormemente por no soltar mi mano sin importar la dificultad de los tiempos.

Sin la ayuda de todos ustedes, este trabajo no hubiera sido posible. ¡Mil gracias!

## 5. Referencias

- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Morgan, D., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2017). *Molecular biology of the cell* (J. Wilson & T. Hunt, Eds.). Garland Science. <https://doi.org/10.1201/9781315735368>
- Ali, B. (2021). Salicylic acid: An efficient elicitor of secondary metabolite production in plants. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 31, 101884. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101884>
- American Cancer Society. (2020, October 26). ¿Qué es el cáncer? <https://www.cancer.org/es/tratamiento/como-comprender-su-diagnostico/que-es-el-cancer.html>
- Arbyn, M., Castellsagué, X., de Sanjosé, S., Bruni, L., Saraiya, M., Bray, F., & Ferlay, J. (2011). Worldwide burden of cervical cancer in 2008. *Annals of Oncology*, 22(12), 2675–2686. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdr015>
- Arfin, S., Jha, N. K., Jha, S. K., Kesari, K. K., Ruokolainen, J., Roychoudhury, S., Rathi, B., & Kumar, D. (2021). Oxidative stress in cancer cell metabolism. *Antioxidants* (Basel, Switzerland), 10(5).

<https://doi.org/10.3390/antiox10050642>

Asociación Española Contra el Cáncer. (2020). Cáncer de cuello uterino o cérvix ¿Qué es?| AECC. <https://www.aecc.es/es/todo-sobre-cancer/tipos-cancer/cancer-cuello-uterino-cervix>

Baker, C. C., Phelps, W. C., Lindgren, V., Braun, M. J., Gonda, M. A., & Howley, P. M. (1987). Structural and transcriptional analysis of human papillomavirus type 16 sequences in cervical carcinoma cell lines. *Journal of Virology*, 61(4), 962–971. <https://doi.org/10.1128/JVI.61.4.962-971.1987>

Benitez-Restrepo, C. C., Arias-Ortiz, N. E., & Arboleda-Ruiz, W. A. (2020). Cervical cancer incidence and patient survival in Manizales, Colombia, 2008-2012. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica*, 37(3), 438–445. <https://doi.org/10.17843/rpmesp.2020.373.4838>

Bernedo-Carrasco, S., & Waldner, C. L. (2016). The role of socio-demographic factors in premature cervical cancer mortality in Colombia. *BMC Public Health*, 16, 981. <https://doi.org/10.1186/s12889-016-3645-1>

Beronius, A., Hanberg, A., Zilliacus, J., Ågerstrand, M., & Rudén, C. (2014). The SciRAP tool for evaluating the quality of in vitro studies. *Science in Risk Assessment and Policy*. <http://www.scirap.org/Page/Index/ee9102de-4b17-4c3a-86b6-e3e70d6ca3d1/evaluate-reliability-and-relevance>

Bhattacharya, A. (2019). High-Temperature Stress and Metabolism of Secondary Metabolites in Plants. In *Effect of high temperature on crop productivity and metabolism of macro molecules* (pp. 391–484). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817562-0.00005-7>

Bourgioti, C., Chatoupis, K., & Mouloupoulos, L. A. (2016). Current imaging strategies for the evaluation of uterine cervical cancer. *World Journal of Radiology*, 8(4), 342–354. <https://doi.org/10.4329/wjr.v8.i4.342>

Carrasco, D., Espinoza, R., Alejandro, G., Martínez, J., Santamaría-Aguirre, J., Zúñiga, F., Endara, P., & Terán, R. (2020). Evaluation of the microbiological quality of natural processed products for medicinal use marketed in Quito, Ecuador. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica*, 37(3), 431–437. <https://doi.org/10.17843/rpmesp.2020.373.4889>

Carrera Páez, L. C. (2015). Comparación del cultivo celular de HeLa y HEp-2: Perspectivas de estudios con *Chlamydia trachomatis*. *Nova*, 13(23), 19. <https://doi.org/10.22490/24629448.1371>

- Carvajal Carvajal, C., & Carvajal Carvajal, C. (2019). Especies reactivas del oxígeno: formación, función y estrés oxidativo. *Medicina Legal de Costa Rica*.
- Chacón, J., Mateos, M. L., Sanz, I., Rubio, M. D., & Baquero, F. (2006). Genotipos de virus del papiloma humano más frecuentes en mujeres con citología cervicovaginal alterada utilizando técnicas de captura de híbridos y reacción en cadena de la polimerasa. *Clínica e Investigación En Ginecología y Obstetricia*, 33(3), 97–101. [https://doi.org/10.1016/S0210-573X\(06\)74093-X](https://doi.org/10.1016/S0210-573X(06)74093-X)
- Chen, X., Song, L., Hou, Y., & Li, F. (2019). Reactive oxygen species induced by icaritin promote DNA strand breaks and apoptosis in human cervical cancer cells. *Oncology Reports*, 41(2), 765–778. <https://doi.org/10.3892/or.2018.6864>
- Chunthorng-Orn, J., Dechayont, B., Phuaklee, P., Prajuabjinda, O., Juckmeta, T., & Itharat, A. (2016). Cytotoxic, Anti-inflammatory and Antioxidant Activities of *Heliotropium indicum* Extracts. *Journal of the Medical Association of Thailand = Chotmaihet Thangphaet*, 99 Suppl 4, S102-9.
- Cohen, P. A., Jhingran, A., Oaknin, A., & Denny, L. (2019). Cervical cancer. *The Lancet*, 393(10167), 169–182. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)32470-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)32470-X)
- de Vries, E., Arroyave, I., & Pardo, C. (2018). Re-emergence of educational inequalities in cervical cancer mortality, Colombia 1998–2015. *Journal of Cancer Policy*, 15, 37–44. <https://doi.org/10.1016/j.jcpo.2017.12.007>
- Espitia-Baena, J. E., Robledo-Restrepo, S. M., Soraya Cuadrado-Cano, B., Duran-Sandoval, H. del R., & Gómez-Estrada, H. A. (2014). Perfil fitoquímico, actividad anti-*Leishmania*, hemolítica y toxicológica de *Cordia dentata* Poir. y *Heliotropium indicum* L. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*.
- Estaquier, J., Vallette, F., Vayssiere, J.-L., & Mignotte, B. (2012). The mitochondrial pathways of apoptosis. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 942, 157–183. [https://doi.org/10.1007/978-94-007-2869-1\\_7](https://doi.org/10.1007/978-94-007-2869-1_7)
- Fakhri, S., Moradi, S. Z., Ash-Rafzadeh, A., & Bishayee, A. (2022). Targeting cellular senescence in cancer by plant secondary metabolites: A systematic review. *Pharmacological Research*, 177, 105961. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2021.105961>
- Fakhri, S., Moradi, S. Z., Farzaei, M. H., & Bishayee, A. (2022). Modulation of dysregulated cancer metabolism by plant secondary metabolites: A mechanistic review. *Seminars in Cancer Biology*, 80,

276–305. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2020.02.007>

Fiorentino, S., & Urueña, C. (2018). La fitoterapia como fuente de medicamentos reguladores del metabolismo tumoral y activadores de la respuesta inmunitaria. *Revista de La Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, 42(163), 132. <https://doi.org/10.18257/raccefyn.542>

G. K., D., & M. S., A. (2013). A REVIEW ON HELIOTROPIUM INDICUM L. (BORAGINACEAE). *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*.

Ghosh, P., Das, P., Das, C., & Chatterjee, S. (2018). Morphological characteristics and Phytopharmacological detailing of Hatishur (*Heliotropium indicum* Linn.): A concise review. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*.

Goyal, S., Gupta, N., Chatterjee, S., & Nimesh, S. (2017). Natural plant extracts as potential therapeutic agents for the treatment of cancer. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 17(2), 96–106. <https://doi.org/10.2174/1568026616666160530154407>

G del Carmen, M., & O Schorge, J. (2011). Invasive cervical adenocarcinoma. UpToDate.

Huang, R.-Z., Jin, L., Wang, C.-G., Xu, X.-J., Du, Y., Liao, N., Ji, M., Liao, Z.-X., & Wang, H.-S. (2018). A pentacyclic triterpene derivative possessing polyhydroxyl ring A suppresses growth of HeLa cells by reactive oxygen species-dependent NF- $\kappa$ B pathway. *European Journal of Pharmacology*, 838, 157–169. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2018.08.032>

Hwang, Y.-J., Wi, H.-R., Kim, H.-R., Park, K. W., & Hwang, K.-A. (2015). Induction of apoptosis in cervical carcinoma HeLa cells by *Petasites japonicus* ethanol extracts. *Food Science and Biotechnology*, 24(2), 665–672. <https://doi.org/10.1007/s10068-015-0087-y>

Instituto Nacional del Cancer. (2021, January 22). El virus del papiloma humano (VPH) y el cáncer. <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/causas-prevencion/riesgo/germenes-infecciosos/vph-y-cancer>

Iwasa, J., & Marshall, W. (2020). CAPÍTULO 16: Cáncer. In McGraw Hil (Ed.), *Karp Biología Celular Y Molecular. Conceptos Y Experimentos / 8 Ed. (8a ed.)*. Sotano. <https://accessmedicina.mhmedical.com/content.aspx?bookid=2817&sectionid=249687742>

Jacob, C., Jamier, V., & Ba, L. A. (2011). Redox active secondary metabolites. *Current Opinion in Chemical Biology*, 15(1), 149–155. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2010.10.015>

Jemilmary.V.A, J. (2016). In Vitro Anti-Cancer Activities of *Vitex Negundo* and *Heliotropium*

- Indicum Extracts against Human Cancer Cell Lines [Master thesis, THE TAMIL NADU DR. M.G.R. MEDICAL UNIVERSITY]. <http://repository-tnmgrmu.ac.in/4947/>
- Jones, H. W., McKusick, V. A., Harper, P. S., & Wu, K. D. (2021). HeLa CCL-2 . *Obstetrics and Gynecology*, 38(6), 945–949.
- Ju, H.-K., Lee, H.-W., Chung, K.-S., Choi, J.-H., Cho, J.-G., Baek, N.-I., Chung, H.-G., & Lee, K.-T. (2012). Standardized flavonoid-rich fraction of *Artemisia princeps* Pampanini cv. Sajabal induces apoptosis via mitochondrial pathway in human cervical cancer HeLa cells. *Journal of Ethnopharmacology*, 141(1), 460–468. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2012.03.011>
- Kaliff, M., Sorbe, B., Mordhorst, L. B., Helenius, G., Karlsson, M. G., & Lillsunde-Larsson, G. (2018). Findings of multiple HPV genotypes in cervical carcinoma are associated with poor cancer-specific survival in a Swedish cohort of cervical cancer primarily treated with radiotherapy. *Oncotarget*, 9(27), 18786–18796. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.24666>
- Kiraz, Y., Adan, A., Kartal Yandim, M., & Baran, Y. (2016). Major apoptotic mechanisms and genes involved in apoptosis. *Tumour Biology*, 37(7), 8471–8486. <https://doi.org/10.1007/s13277-016-5035-9>
- Kumar, D., Basu, S., Parija, L., Rout, D., Manna, S., Dandapat, J., & Debata, P. R. (2016). Curcumin and Ellagic acid synergistically induce ROS generation, DNA damage, p53 accumulation and apoptosis in HeLa cervical carcinoma cells. *Biomedicine & Pharmacotherapy (Biomedecine & Pharmacotherapie)*, 81, 31–37. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2016.03.037>
- Kumar, M. S., Chaudhury, S., & Balachandran, S. (2014). In vitro callus culture of *Heliotropium indicum* Linn. for assessment of total phenolic and flavonoid content and antioxidant activity. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 174(8), 2897–2909. <https://doi.org/10.1007/s12010-014-1235-1>
- Liu, Y.-M., Ni, L.-Q., Wang, S.-S., Lv, Q.-L., Chen, W.-J., & Ying, S.-P. (2018). Outcome and prognostic factors in cervical cancer patients treated with surgery and concurrent chemoradiotherapy: a retrospective study. *World Journal of Surgical Oncology*, 16(1), 18. <https://doi.org/10.1186/s12957-017-1307-0>
- Lukhele, S. T., & Motadi, L. R. (2016). Cannabidiol rather than *Cannabis sativa* extracts inhibit cell growth and induce apoptosis in cervical cancer cells. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 16(1), 335. <https://doi.org/10.1186/s12906-016-1280-0>

- Mahata, S., Maru, S., Shukla, S., Pandey, A., Mugesh, G., Das, B. C., & Bharti, A. C. (2012). Anticancer property of *Bryophyllum pinnata* (Lam.) Oken. leaf on human cervical cancer cells. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 12, 15. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-12-15>
- Meiyanto, E., Hermawan, A., & Anindyajati. (2012). Natural products for cancer-targeted therapy: citrus flavonoids as potent chemopreventive agents. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 13(2), 427–436. <https://doi.org/10.7314/apjcp.2012.13.2.427>
- Michael, O. (2011). Phytochemical and antimicrobial screening of methanol extract of *Heliotropium*. *Journal of Microbiology and Antimicrobials*, 3(8), 213–216.
- Mondal, A., Gandhi, A., Fimognari, C., Atanasov, A. G., & Bishayee, A. (2019). Alkaloids for cancer prevention and therapy: Current progress and future perspectives. *European Journal of Pharmacology*, 858, 172472. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2019.172472>
- Moreno-Acosta, P., Vallard, A., Carrillo, S., Gamboa, O., Romero-Rojas, A., Molano, M., Acosta, J., Mayorga, D., Rancoule, C., Garcia, M. A., Cotes Mestre, M., & Magné, N. (2017). Biomarkers of resistance to radiation therapy: a prospective study in cervical carcinoma. *Radiation Oncology*, 12(1), 120. <https://doi.org/10.1186/s13014-017-0856-2>
- Munagala, R., Kausar, H., Munjal, C., & Gupta, R. C. (2011). Withaferin A induces p53-dependent apoptosis by repression of HPV oncogenes and upregulation of tumor suppressor proteins in human cervical cancer cells. *Carcinogenesis*, 32(11), 1697–1705. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgr192>
- Muñoz, N., & Bravo, L. E. (2012). Epidemiology of cervical cancer in Colombia. *Colombia Medica (Cali, Colombia)*, 43(4), 298–304.
- National Center for Biotechnology Information (NCBI). (n.d.). Home - Taxonomy - NCBI. National Library of Medicine. Retrieved April 18, 2022, from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/taxonomy/?term=>
- National Center for HIV/AIDS, Viral Hepatitis, STD, and TB Prevention. (2017). Infección genital por VPH - Enfermedades de transmisión sexual. <https://www.cdc.gov/std/spanish/vph/stdfact-hpv-s.htm>
- Oyenihi, O. R., Oyenihi, A. B., Erhabor, J. O., Matsabisa, M. G., & Oguntibeju, O. O. (2021). Unravelling the Anticancer Mechanisms of Traditional Herbal Medicines with Metabolomics. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 26(21). <https://doi.org/10.3390/molecules26216541>
- Pal, A., Sengupta, S., & Kundu, R. (2021). *Tiliacora racemosa* leaves induce oxidative stress mediated



- DNA damage leading to G2/M phase arrest and apoptosis in cervical cancer cells SiHa. *Journal of Ethnopharmacology*, 269, 113686. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.113686>
- Pardo, C., & de Vries, E. (2018). Breast and cervical cancer survival at Instituto Nacional de Cancerología, Colombia. *Colombia Medica (Cali, Colombia)*, 49(1), 102–108. <https://doi.org/10.25100/cm.v49i1.2840>
- Parham, S., Kharazi, A. Z., Bakhsheshi-Rad, H. R., Nur, H., Ismail, A. F., Sharif, S., RamaKrishna, S., & Berto, F. (2020). Antioxidant, antimicrobial and antiviral properties of herbal materials. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 9(12). <https://doi.org/10.3390/antiox9121309>
- Pater, M. M., & Pater, A. (1985). Human papillomavirus types 16 and 18 sequences in carcinoma cell lines of the cervix. *Virology*, 145(2), 313–318.
- Pathania, S., Ramakrishnan, S. M., & Bagler, G. (2015). Phytochemica: a platform to explore phytochemicals of medicinal plants. *Database: The Journal of Biological Databases and Curation*, 2015. <https://doi.org/10.1093/database/bav075>
- Paul, S., Chakraborty, S., Mukherjee, A., & Kundu, R. (2015). Evaluation of Cytotoxicity and DNA Damaging Activity of Three Plant Extracts. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 31(37), 183–189.
- Paul, S., & Kundu, R. (2018). ROS mediated DNA damage and induction of apoptosis in cervical cancer cells by *Heliotropium indicum* L. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 92–106. <https://doi.org/10.7324/JAPS.2018.8814>
- Pérez-Vásquez, N. D. S., Arias-Rios, J., & Quirós-Rodríguez, J. A. (2015). VARIACIÓN ESPACIO-TEMPORAL DE PLANTAS VASCULARES ACUÁTICAS EN EL COMPLEJO CENAGOSO DEL BAJO SINÚ, CÓRDOBA, COLOMBIA. *Acta Biológica Colombiana*, 20(3), 155–165. <https://doi.org/10.15446/abc.v20n3.45380>
- Portt, L., Norman, G., Clapp, C., Greenwood, M., & Greenwood, M. T. (2011). Anti-apoptosis and cell survival: a review. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1813(1), 238–259. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2010.10.010>
- PubChem, N. I. of H. (NIH). (n.d.). PubChem. PubChem. Retrieved April 18, 2022, from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>

- R. Meenatchi, A., & G. Viji, S. B. (2013). GC-MS Determination of Bioactive Constituents of *Heliotropium indicum* Leaf. *Journal of Medicinal Plants Studies*.
- Ramesh, E., & Alshatwi, A. A. (2013). Naringin induces death receptor and mitochondria-mediated apoptosis in human cervical cancer (SiHa) cells. *Food and Chemical Toxicology*, 51, 97–105. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2012.07.033>
- Reyes - Álvarez, K., Lozano - Aguilar, E., Torres, O., & Muñoz, A. (2018). Evaluación in vitro de la actividad citotóxica de extractos de *Malachra alceifolia*, *Cordia dentata* Poir y *Heliotropium indicum* Linn sobre la línea celular de Osteosarcoma canino OSCA-8 . *Encuentro Internacional de Investigación Universitaria*, 2, 69.
- Serkies, K., & Jassem, J. (2018). Systemic therapy for cervical carcinoma - current status. *Chinese Journal of Cancer Research = Chung-Kuo Yen Cheng Yen Chiu*, 30(2), 209–221. <https://doi.org/10.21147/j.issn.1000-9604.2018.02.04>
- Shahzad, F., Anderson, D., & Najafzadeh, M. (2020). The Antiviral, Anti-Inflammatory Effects of Natural Medicinal Herbs and Mushrooms and SARS-CoV-2 Infection. *Nutrients*, 12(9). <https://doi.org/10.3390/nu12092573>
- Shah, U., Shah, R., Acharya, S., & Acharya, N. (2013). Novel anticancer agents from plant sources. *Chinese Journal of Natural Medicines*, 11(1), 16–23. [https://doi.org/10.1016/S1875-5364\(13\)60002-3](https://doi.org/10.1016/S1875-5364(13)60002-3)
- Sharmin, S., Zohura, F. T., Islam, M. S., Shimonty, A., Khan, M. A.-A.-K., Parveen, R., Sharmin, F., Ahsan, C. R., Islam, A. B. M. M. K., & Yasmin, M. (2021). Mutational profiles of marker genes of cervical carcinoma in Bangladeshi patients. *BMC Cancer*, 21(1), 289. <https://doi.org/10.1186/s12885-021-07906-5>
- Siegel, R. L., Miller, K. D., Fuchs, H. E., & Jemal, A. (2021). *Cancer Statistics, 2021*. CA: A Cancer Journal for Clinicians, 71(1), 7–33. <https://doi.org/10.3322/caac.21654>
- Silva, V. A. O., Alves, A. L. V., Rosa, M. N., Silva, L. R. V., Melendez, M. E., Cury, F. P., Gomes, I. N. F., Tansini, A., Longato, G. B., Martinho, O., Oliveira, B. G., Pinto, F. E., Romão, W., Ribeiro, R. I. M. A., & Reis, R. M. (2019). Hexane partition from *Annona crassiflora* Mart. promotes cytotoxicity and apoptosis on human cervical cancer cell lines. *Investigational New Drugs*, 37(4), 602–615. <https://doi.org/10.1007/s10637-018-0657-y>

- Solé Medina, A. (2020, March 2). El culebrón de las células HeLa. <https://onscience.es/culebron-celulas-hela/>
- Srivastava, P., Singh, M., & Chaturvedi, R. (2020). Herbal medicine and biotechnology for the benefit of human health. In *Animal Biotechnology* (pp. 613–629). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811710-1.00028-8>
- Stelzle, D., Tanaka, L. F., Lee, K. K., Ibrahim Khalil, A., Baussano, I., Shah, A. S. V., McAllister, D. A., Gottlieb, S. L., Klug, S. J., Winkler, A. S., Bray, F., Baggaley, R., Clifford, G. M., Broutet, N., & Dalal, S. (2021). Estimates of the global burden of cervical cancer associated with HIV. *The Lancet. Global Health*, 9(2), e161–e169. [https://doi.org/10.1016/S2214-109X\(20\)30459-9](https://doi.org/10.1016/S2214-109X(20)30459-9)
- 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. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>
- Tewari, K. S., & Monk, B. J. (2019). Evidence-Based Treatment Paradigms for Management of Invasive Cervical Carcinoma. *Journal of Clinical Oncology*, 37(27), 2472–2489. <https://doi.org/10.1200/JCO.18.02303>
- Thouri, A., La Barbera, L., Canuti, L., Vegliante, R., Jelled, A., Flamini, G., Ciriolo, M. R., & Achour, L. (2019). Antiproliferative and apoptosis-inducing effect of common Tunisian date seed (var. Korkobbi and Arechti) phytochemical-rich methanolic extract. *Environmental Science and Pollution Research International*, 26(36), 36264–36273. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-06606-9>
- van der Horst, J., Siebers, A. G., Bulten, J., Massuger, L. F., & de Kok, I. M. (2017). Increasing incidence of invasive and in situ cervical adenocarcinoma in the Netherlands during 2004-2013. *Cancer Medicine*, 6(2), 416–423. <https://doi.org/10.1002/cam4.971>
- Willig, J. B., Salomón, J. L. d. O., Vianna, D. R. B., Moura, S., Pilger, D. A., Buffon, A., & Konrath, E. L. (2019). *Heliopsis longipes* S.F. Blake (Asteraceae) extract causes cell cycle arrest and induces caspase dependent apoptosis against cancer cell lines. *South African Journal of Botany*, 125, 251–260. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2019.07.035>
- World Health Organization. (2020). *Global Health Estimates 2020: Deaths by Cause, Age, Sex, by*

Country and by Region, 2000-2019. <https://www.who.int/data/gho/data/themes/mortality-and-global-health-estimates/ghe-leading-causes-of-death>

Yee, C., Krishnan-Hewlett, I., Baker, C. C., Schlegel, R., & Howley, P. M. (1985). Presence and expression of human papillomavirus sequences in human cervical carcinoma cell lines. *The American Journal of Pathology*, 119(3), 361–366.

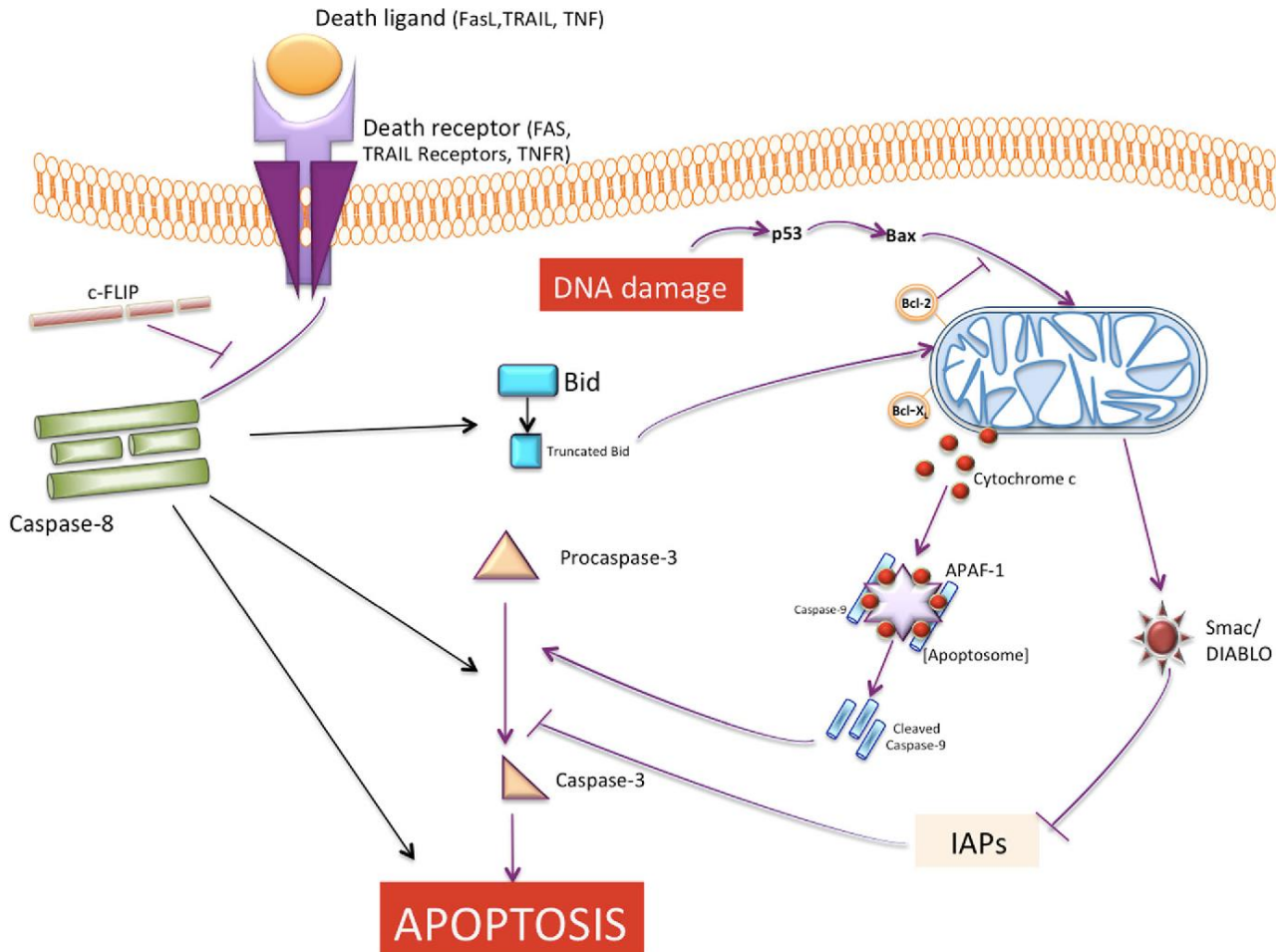
Zhang, F., Zhang, J.-G., Qu, J., Zhang, Q., Prasad, C., & Wei, Z.-J. (2017). Assessment of anti-cancerous potential of 6-gingerol (Tongling White Ginger) and its synergy with drugs on human cervical adenocarcinoma cells. *Food and Chemical Toxicology*, 109(Pt 2), 910–922. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.02.038>

Zhang, Q., Zhang, F., Thakur, K., Wang, J., Wang, H., Hu, F., Zhang, J.-G., & Wei, Z.-J. (2018). Molecular mechanism of anti-cancerous potential of Morin extracted from mulberry in Hela cells. *Food and Chemical Toxicology*, 112, 466–475. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.07.002>

Zhang, W., Zhang, D., Ma, X., Liu, Z., Li, F., & Wu, D. (2014). Paris saponin VII suppressed the growth of human cervical cancer Hela cells. *European Journal of Medical Research*, 19, 41. <https://doi.org/10.1186/2047-783X-19-41>

## **6. Anexos**

### **6.1 Anexos Figuras**



**Figura S1.** Dos vías apoptóticas principales: vías intrínseca y extrínseca (Kiraz et al., 2016).

# Evaluation of in vitro toxicity studies

Tool version 2.0

The development of the tool and the updates in version 2.0 are described in our [new publication](#).

The web-based evaluation tool is available by scrolling down this page.

Instructions for evaluating reliability and relevance of *in vitro* studies are available for download [here](#) or in the menu to the right.

## Reliability evaluation

The SciRAP method for evaluating reliability of *in vitro* toxicity studies consists of criteria for for evaluating both the **reporting quality** and **methodological quality** of studies, separately. You can switch between evaluation of reporting and methodological quality by selecting the tabs below.

## Relevance evaluation

Whether or not a study is relevant depends on the context within which it is to be used as evidence. The aim of the SciRAP method is to provide guidance and a structured approach for determining the relevance of *in vitro* toxicity studies for human health risk assessment. To that end, four study aspects should be evaluated under the tab **relevance**. It is important to note that all listed items do not have to be relevant for the study to serve as evidence in risk assessment.

When you have completed your evaluation, click the green "export to excel" button at the bottom right to generate and download a summary of your evaluation.

Please consult the [instructions](#) for how to interpret the results of the evaluation! Especially note that the scores calculated by the tool are only comparable between evaluations where the same criteria have been removed or given increased weight.

Reporting quality   Methodological quality   **Relevance**

[Reset form](#)

Evaluate relevance of the study by addressing each of the four items below. Any comments may be made in the comments field and will be included in the final summary.

- |   |   |   |                                      |
|---|---|---|--------------------------------------|
| 1 | The identity of the tested substance <a href="#">Guidance</a> ⓘ | <input type="text" value="Not determined"/> | <input type="text" value="Comment"/> |
| 2 | The test system used <a href="#">Guidance</a> ⓘ                 | <input type="text" value="Not determined"/> | <input type="text" value="Comment"/> |
| 3 | The endpoint studied <a href="#">Guidance</a> ⓘ                 | <input type="text" value="Not determined"/> | <input type="text" value="Comment"/> |
| 4 | The concentrations used <a href="#">Guidance</a> ⓘ              | <input type="text" value="Not determined"/> | <input type="text" value="Comment"/> |

Evaluate reporting quality   Evaluate methodological quality

[Export to excel](#) ⓘ

Continúa...

Reporting quality

Methodological quality

Relevance

Reset form

Evaluate methodological quality by addressing each criterion below. Any comments may be made in the comments field and will be included in the final summary. Note that all criteria are not applicable to all types of in vitro studies and individual criteria may be removed. The weight may also be increased for criteria that are considered more critical in the context of the assessment being conducted. Decisions about removing or increasing the weight of criteria should be made before starting the evaluation. Note that comparison between evaluations is only possible when the same criteria have been removed or weighted up!

1	The test compound or mixture was unlikely to contain any impurities that may significantly have affected the results of the study. <a href="#">Guidance</a> ?	Not determined ▾	<input type="text" value="Comment"/>
2	It was likely that the test compound was soluble at the concentrations used. <a href="#">Guidance</a> ?	Not determined ▾	<input type="text" value="Comment"/> <input type="button" value="Increase weight"/> <input type="button" value="Remove"/>
3	An appropriate solvent (vehicle) was used that is not expected to interfere with the results of the study at the concentration used. <a href="#">Guidance</a> ?	Not determined ▾	<input type="text" value="Comment"/> <input type="button" value="Increase weight"/> <input type="button" value="Remove"/>
4	A solvent (vehicle) control was included. <a href="#">Guidance</a> ?	Not determined ▾	<input type="text" value="Comment"/> <input type="button" value="Increase weight"/> <input type="button" value="Remove"/>
5	An appropriate positive control was included, and the expected result was observed from this treatment. <a href="#">Guidance</a> ?	Not determined ▾	<input type="text" value="Comment"/> <input type="button" value="Increase weight"/> <input type="button" value="Remove"/>
6	A reliable and sensitive test system (e.g., cell line / cells/ tissue / organ / embryo / sub-cellular fractions) with metabolic competence, if relevant, was used for investigating the test compound and endpoints. <a href="#">Guidance</a> ?	Not determined ▾	<input type="text" value="Comment"/> <input type="button" value="Increase weight"/> <input type="button" value="Remove"/>
7	Conditions for cultivation and/or maintenance of the cell line / cells / tissue / organ /embryo / sub-cellular fractions (incubation temperature, humidity, CO2 concentration, media used, number of cell passages, control of contamination) were appropriate. <a href="#">Guidance</a> ?	Not determined ▾	<input type="text" value="Comment"/> <input type="button" value="Increase weight"/> <input type="button" value="Remove"/>
8	The duration of exposure was suitable for the test system and investigated endpoints. <a href="#">Guidance</a> ?	Not determined ▾	<input type="text" value="Comment"/> <input type="button" value="Increase weight"/> <input type="button" value="Remove"/>
9	The concentrations used were suitable for the test system and investigated endpoints. <a href="#">Guidance</a> ?	Not determined ▾	<input type="text" value="Comment"/> <input type="button" value="Increase weight"/> <input type="button" value="Remove"/>

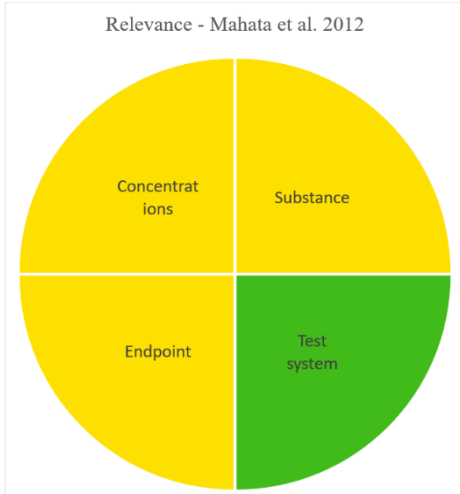
Continúa...

10	The test conditions during and after exposure to the test compound were suitable (media and serum used, cell density, incubation temperature, humidity, CO2 concentration). <a href="#">Guidance</a>	Not determined	Comment	Increase weight	Remove
11	Reliable and sensitive tests and/or analytical methods were used for investigating the endpoints. <a href="#">Guidance</a>	Not determined	Comment	Increase weight	Remove
12	Sufficient numbers of replicates or repetitions of the experiment were used to generate reliable and valid results. <a href="#">Guidance</a>	Not determined	Comment	Increase weight	Remove
13	Measurements were collected at suitable time points in order to generate sensitive, valid and reliable data. <a href="#">Guidance</a>	Not determined	Comment	Increase weight	Remove
14	Cytotoxicity was measured and the test compound did not cause cytotoxicity that significantly affected the results. <a href="#">Guidance</a>	Not determined	Comment	Increase weight	Remove
15	The statistical methods were clearly described and do not seem inappropriate, unusual or unfamiliar. <a href="#">Guidance</a>	Not determined	Comment	Increase weight	Remove
16	Are there any other aspects of study design, performance or reporting that influence reliability? <a href="#">Guidance</a>		Comment		
<a href="#">Evaluate reporting quality</a> <a href="#">Evaluate relevance</a>		<input type="text" value="Name your file"/>		<a href="#">Export to excel</a>	

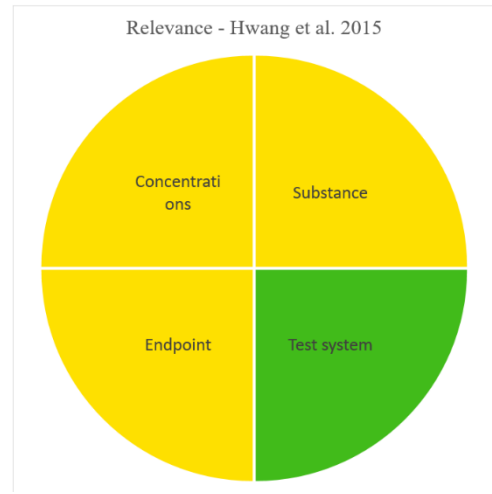
**Figura S2.** Herramienta *Science in Risk Assessment and Policy* (SciRAP) para la evaluación de la calidad metodológica y relevancia de estudios *in vitro*.

La evaluación de la Relevancia para todos los estudios reportados con la presencia de extractos herbales (**Tabla 2**), presenta como ítem únicamente cumplido el dominio Sistema de prueba. Por otra parte el dominio Sustancia, al ser una mezcla de metabolitos secundarios y fitoquímicos, indica la presencia de impurezas que puedan afectar significativamente los resultados, es por esto que el extracto no cumple con la pureza requerida para este ítem. En el caso de los dominios Punto final y Concentraciones estuvieron parcialmente cumplidos al ser requisito que los criterios de valoración estudiados o las concentraciones sean relevantes para la salud humana, lo cual no es posible saber al ser estos estudios *in vitro* o *in vivo*. A continuación se muestra la evaluación de la Relevancia para todos los estudios reportados con la presencia de extractos herbales (**Anexos Figuras S3-S9**).

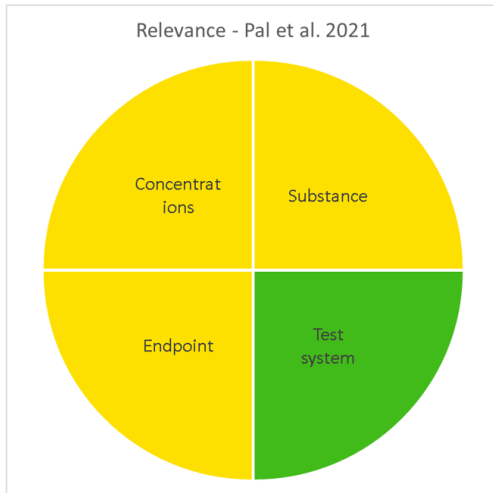




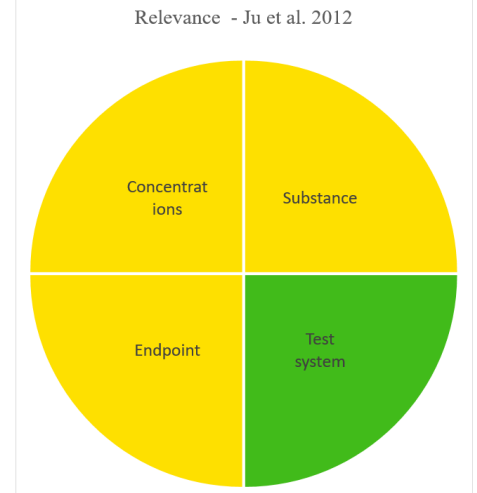
**Figura S3.** Relevancia (Mahata et al. 2012).



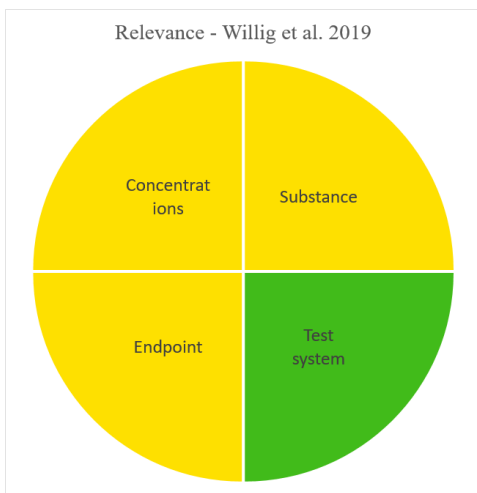
**Figura S4.** Relevancia (Hwang et al. 2015).



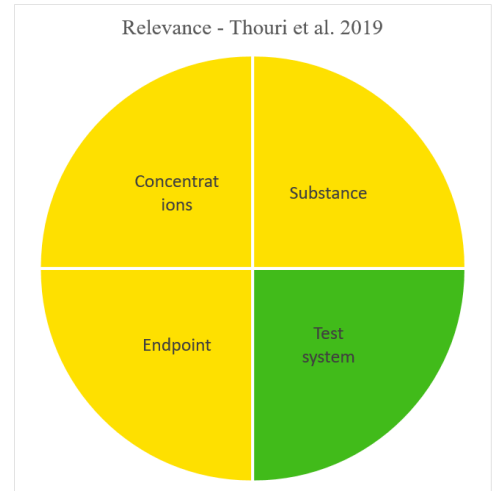
**Figura S5.** Relevancia (Pal et al. 2021).



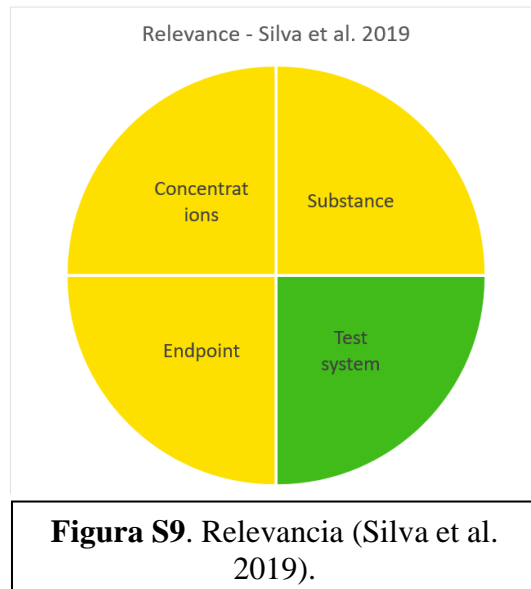
**Figura S6.** Relevancia (Ju et al. 2012).



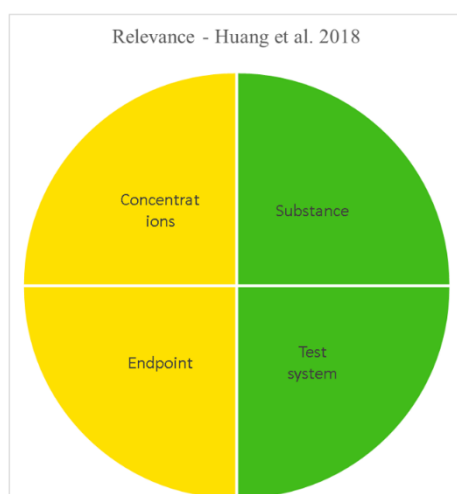
**Figura S7.** Relevancia (Willig et al. 2019).



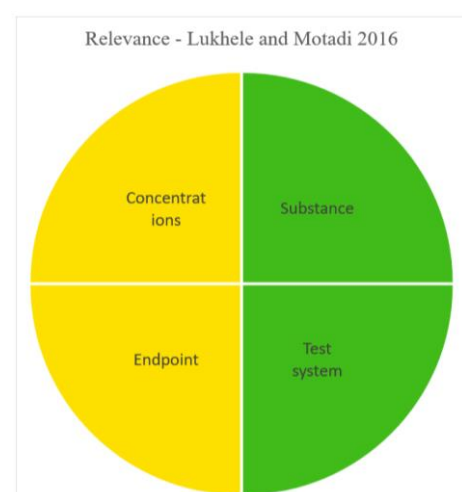
**Figura S8.** Relevancia (Thouri et al. 2019).



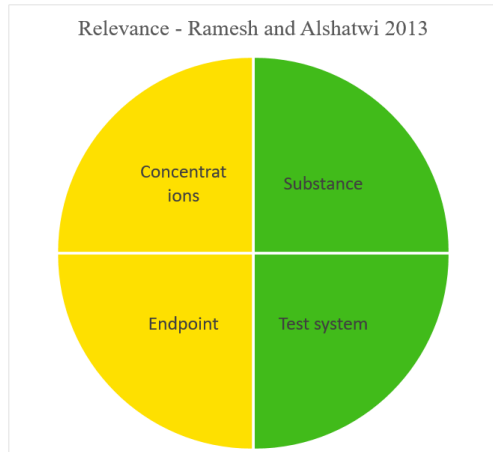
Para los estudios que evalúan la exposición directa del metabolito secundario en las células (**Tabla 3**), la Relevancia presenta dos dominios cumplidos Sustancia y Sistema de prueba. Sin embargo, para los dominios Punto final y Concentraciones también estuvieron parcialmente cumplidos al ser requisito que los criterios de valoración estudiados o las concentraciones sean relevantes para la salud humana, lo cual no es posible saber al ser estos estudios *in vitro* o *in vivo*. Información evidenciada en. A continuación se presenta la Relevancia para los estudios que evalúan la exposición directa del metabolito secundario en las células (**Anexos Figuras S10-S18**).



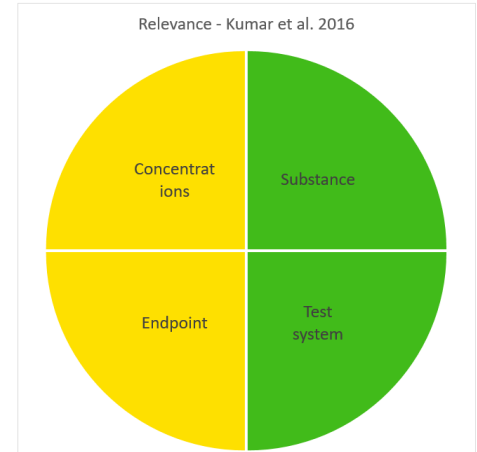
**Figura S10.** Relevancia (Huang et al. 2018).



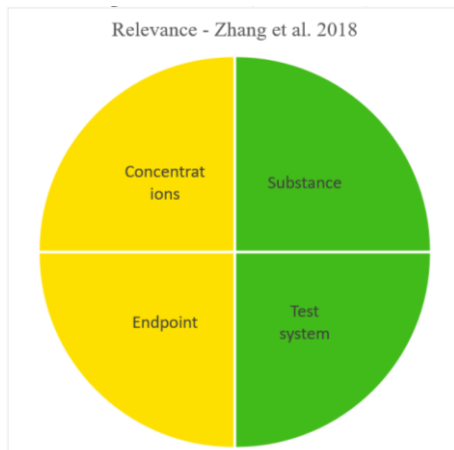
**Figura S11.** Relevancia (Lukhele and Motadi 2016).



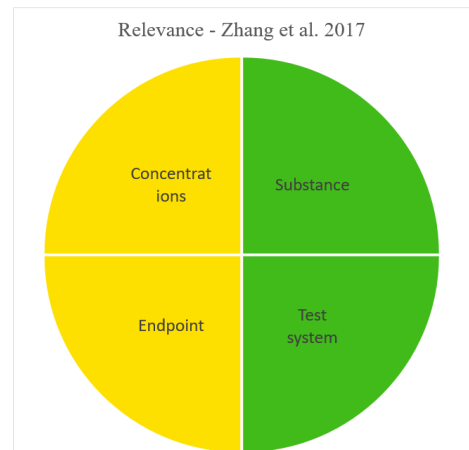
**Figura S12.** Relevancia (Ramesh and Alshatwi 2013).



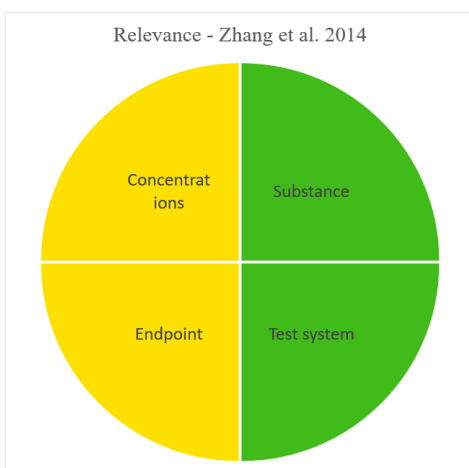
**Figura S13.** Relevancia (Kumar et al. 2016).



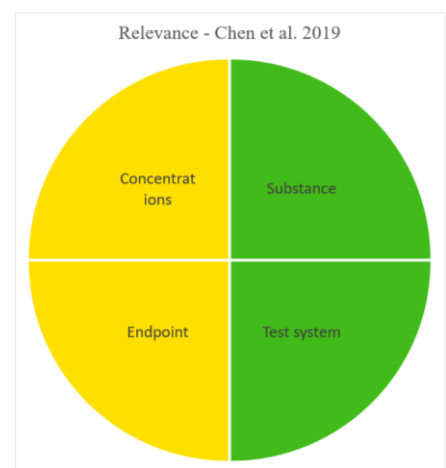
**Figura S14.** Relevancia (Zhang et al. 2018).



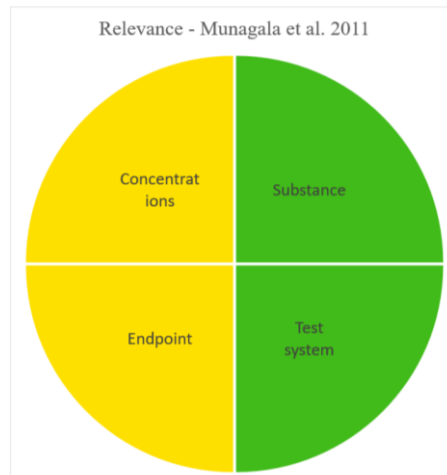
**Figura S15.** Relevancia (Zhang et al. 2017).



**Figura S16.** Relevancia (Zhang et al. 2014).



**Figura S17.** Relevancia (Chen et al. 2019).



**Figura S18.** Relevancia (Munagala et al. 2011).

## 6.2 Anexo Tablas

El artículo (Kumar et al. 2016), presentó un 68.18% de calidad, pues como muestra la **Tabla S21** en Anexos, la información brindada no reportó la presencia de dos criterios del dominio Compuesto de prueba y controles, los cuales evaluaban el uso de un disolvente (vehículo) apropiado que no interfiera con los resultados y el uso de un control positivo apropiado (fármaco anticancerígeno). Mientras para el dominio Recolección de datos y análisis, el criterio que evalúa los métodos estadísticos empleados estuvo parcialmente cumplido al considerar podría haber manejado métodos más robustos o un software que otorgará mayor precisión a los datos y por último no se mencionó el control celular utilizado para medir la citotoxicidad del compuesto de prueba, como puede evidenciarse en el diagrama de barras **Tabla 1**.

Con un 79.17% para el artículo (Mahata et al. 2011), este presenta dentro del dominio Compuesto de prueba y controles, dos criterios parcialmente completos, uno de estos corresponde, al ser un extracto contener impurezas que afecten los resultados, adicionalmente a pesar de presentar un control de disolvente (vehículo), este no lo identifica y el criterio no cumplido es debido a no reportar un control positivo dentro de los estudios. Sobre el dominio Recolección de datos y análisis fue parcialmente cumplido al presentar métodos estadísticos, pero no de la robustez y precisión adecuada. Información evidenciada en la **Tabla S1**.

Para el rango de la calidad metodología del 80%, (Munagala et al. 2011) registro 81.82% al no cumplir dos criterios del dominio Compuesto de prueba y controles, no reportando el disolvente usado

(vehículo), ni incluir controles positivos en la investigación (información evidenciada en la **Tabla S31**). Con un 83.33% (Hwang et al. 2015), no cumplió en el dominio Compuesto de prueba y controles, un apropiado control positivo. Conjuntamente presenta dos dominios parcialmente cumplidos, al ser un extracto y no poseer la pureza requerida, junto a no reportar el solvente control utilizado (vehículo) (información evidenciada en la **Tabla S3**). Tanto (Pal et al. 2021) como (Thouri et al. 2019) resultaron con un 87.50% de calidad metodológica, en el que ambos por ser extracto cumplieron parcialmente con la pureza requerida para las evaluaciones. (Pal et al. 2021) no reportó el uso de ningún fármaco como control positivo (información evidenciada en la **Tabla S5**). En el caso de (Thouri et al. 2019) no cumplió con el control disolvente (vehículo) requerido en la evaluación (información evidenciada en la **Tabla S11**).

Dentro del rango del 90% se encuentran ocho artículos, de estos, cuatro estudios (Zhang et al. 2018) (**Tabla S23**), (Zhang et al. 2014) (**Tabla S27**), (Chen et al. 2019) (**Tabla S29**) y (Ramesh and Alshatwi 2013) (**Tabla S19**) presentan un puntaje de calidad del 90.91%, valor calculado al no cumplir con el reporte de un control positivo apropiado para comparar los resultados del estudio. Con un 91.67% (Silva et al. 2019) al ser un estudio que presenta un extracto, no cumple con el criterio de pureza presente en el dominio Compuesto de prueba y controles, a pesar de esto, tampoco empleó un número de réplicas mínimas aceptables, realizando los experimentos por duplicado (información evidenciada en la **Tabla S13**). En el caso de los estudios que cumplieron con el 95.83% de calidad (Ju et al. 2012) (**Tabla S7**) y (Willig et al. 2019) (**Tabla S9**), ambos presentaron criterios como parcialmente cumplidos, el criterio que evalúa la improbabilidad de que el extracto contenga impurezas que afecten los resultados. Mientras que para (Lukhele and Motadi 2016) la única falencia detectada fue el reporte por duplicado de los experimentos, en vez del triplicado o más, con el fin de generar un análisis de los datos fiables y válidos (información evidenciada en la **Tabla S17**).

Con un 100.00% en el reporte de calidad metodológica, las investigaciones generadas por (Zhang et al. 2017) y (Huang et al. 2018) son los ensayos más confiables de la totalidad de los 16 estudios seleccionados en esta revisión (información evidenciada en la **Tabla S25**, junto con en la **Tabla S15**, respectivamente en Anexos).

Cabe resaltar que se especula que los autores de dichos estudios pudieron haber considerado los criterios anteriormente mencionados, pero se excluyeron del informe final por diferentes razones.

**Tabla S1. Calidad metodológica (Mahata et al. 2012).**

<b>Calidad metodológica - Mahata et al. 2012</b>			
<b>Weight/Removed</b>	<b>Evaluation criteria</b>	<b>Selection</b>	<b>Comment</b>
<b>Test compound and controls</b>			
1	1. The test compound or mixture was unlikely to contain any impurities that may significantly have affected the results of the study.	Partially fulfilled	Un extracto de cloroformo derivado de <i>B. Pinnata</i> , puede contener muchos metabolitos secundarios, que podrían o no interferir en los resultados (presenta muchas impurezas).
Removed	2. It was likely that the test compound was soluble at the concentrations used.	Not applicable	Se excluyó por falta de experiencia del usuario.
1	3. An appropriate solvent (vehicle) was used that is not expected to interfere with the results of the study at the concentration used.	Fulfilled	El extracto se separó usando cromatografía en columna con gradiente escalonado de éter de petróleo y acetato de etilo (50:50), los cuales arrastran sustancias de diferentes polaridades. Por medio de TLC, HPTLC y NMR las fracciones se caracterizaron en busca de compuestos fitoquímicos.
1	4. A solvent (vehicle) control was included.	Partially fulfilled	Presenta control, pero no lo identifican en el artículo. Comentando que el porcentaje de viabilidad celular se calculó utilizando la siguiente fórmula: Porcentaje de viabilidad celular = (OD de las muestras del experimento/OD del control) × 100.
1	5. An appropriate positive control was included, and the expected result was observed from this treatment.	Not fulfilled	No se reportó el uso de ningún fármaco como control positivo para contrastar los resultados de la lineal celular y poder corroborar los resultados obtenidos.
<b>Test System</b>			
1	6. A reliable and sensitive test system (e.g., cell line / cells/ tissue / organ / embryo / sub-cellular fractions) with metabolic competence, if relevant, was used for investigating the test compound and endpoints.	Fulfilled	La línea celular de cáncer de cuello uterino humano VPH18 positiva, HeLa, se obtuvo de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC), EE.UU.
1	7. Conditions for cultivation and/or maintenance of the cell line / cells / tissue / organ / embryo / sub-cellular fractions (incubation temperature, humidity, CO2 concentration, media used, number of cell passages, control of contamination) were appropriate.	Fulfilled	Las células HeLa se cultivaron en DMEM suplementado con FCS al 10%, penicilina 100 U/ml, estreptomycin 100 µg/ml y se mantuvieron a 37 °C en una atmósfera humidificada con CO2 al 5% según lo recomendado por la ATCC.
<b>Administration of the test compound</b>			
Removed	8. The duration of exposure was suitable for the test system and investigated endpoints.	Not applicable	Se excluyó por falta de experiencia del usuario.
1	9. The concentrations used were suitable for the test system and investigated endpoints.	Fulfilled	Las concentraciones evaluadas fueron de 0, 50, 100, 250, 500 y 750 µg/ml para la fracción F4 y la concentración inhibitoria de IC50 fue de 91 µg/ml en cultivos tratados durante 24 h, lo que demuestra que suprime la proliferación de células cancerosas de manera dependiente de la dosis.
1	10. The test conditions during and after exposure to the test compound were suitable (media and serum used, cell density, incubation temperature, humidity, CO2 concentration).	Fulfilled	No hay reportes de cambios en esta información. Las células HeLa se cultivaron en DMEM suplementado con FCS al 10%, penicilina 100 U/ml, estreptomycin 100 µg/ml y se mantuvieron a 37 °C en una atmósfera humidificada con CO2 al 5% según lo recomendado por la ATCC.

Continúa...

Data collection and analysis			
1	11. Reliable and sensitive tests and/or analytical methods were used for investigating the endpoints.	Fulfilled	Cromatografía en columna, cromatografía de capa fina (TLC), análisis fitoquímico (prueba de Raymond y prueba de Dragendorff), espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN), cromatografía de capa fina de alto rendimiento (HPTLC), ensayo MTT, aislamiento de proteínas nucleares y ensayo de cambio de movilidad electroforética (EMSA).
1	12. Sufficient numbers of replicates or repetitions of the experiment were used to generate reliable and valid results.	Fulfilled	Los resultados son representativos de tres experimentos independientes con resultados similares. Los valores son la media ± DE de los cultivos por triplicado.
Removed	13. Measurements were collected at suitable time points in order to generate sensitive, valid and reliable data.	Not applicable	Se excluyó por falta de experiencia del usuario.
1	14. Cytotoxicity was measured and the test compound did not cause cytotoxicity that significantly affected the results.	Fulfilled	Existe como control células cancerígenas sin tratamiento, evaluadas con la concentración indicada del extracto o las fracciones F3 y F4.
1	15. The statistical methods were clearly described and do not seem inappropriate, unusual or unfamiliar.	Partially fulfilled	Se realizaron análisis estadísticos, sin embargo no se realizaron análisis estadísticos robustos o no se realizaron en un software que brindara mayor precisión a los resultados. Los valores son la media ± DE *p < 0,05 frente a cultivos no tratados. #p < 0,05 frente a células tratadas con una dosis similar de extracto crudo o tratamiento con fracción F4 a las 48 h y 72 h de cultivo.
Other			
1	16. Are there any other aspects of study design, performance or reporting that influence reliability?		No se realizó ningún comentario adicional del estudio, por falta de experiencia del usuario.

**Tabla S2. Relevancia (Mahata et al. 2012).**

Relevancia - Mahata et al. 2012		
Evaluation criteria	Selection	Comment
1. The identity of the tested substance	Indirectly relevant	Al ser un extracto derivado de <i>B. Pinnata</i> , no cuenta con la pureza suficiente, al contener varios metabolitos secundarios.
2. The test system used	Directly relevant	El ensayo se realizó en la línea celular de cáncer de cuello uterino humano VPH18 positiva, HeLa, se obtuvo de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC), EE.UU.
3. The endpoint studied	Indirectly relevant	Los criterios de evaluación estudiados son relevantes para investigaciones <i>in vitro</i> , pero no lo son para estudios clínicos.
4. The concentrations used	Indirectly relevant	Las concentraciones en esta investigación <i>in vitro</i> no son relevantes para la exposición humana.



**Tabla S3. Calidad metodológica (Hwang et al. 2015).**

Calidad metodológica - Hwang et al. 2015			
Weight/Removed	Evaluation criteria	Selection	Comment
<b>Test compound and controls</b>			
1	1. The test compound or mixture was unlikely to contain any impurities that may significantly have affected the results of the study.	Partially fulfilled	Se evaluó un extracto de etanol de <i>P. japonicus</i> con presencia de diferentes metabolitos secundarios, que podrían o no interferir en los resultados.
Removed	2. It was likely that the test compound was soluble at the concentrations used.	Not applicable	Se excluyó por falta de experiencia del usuario.
1	3. An appropriate solvent (vehicle) was used that is not expected to interfere with the results of the study at the concentration used.	Fulfilled	Según la metodología a <i>P. japonicus</i> seco se extrajo tres veces con etanol al 70% y los extractos se filtraron. Posteriormente, los filtrados se combinaron y evaporaron al vacío y luego se liofilizaron con un liofilizador a 70 °C, a presión reducida (<20 Pa). El residuo seco se almacenó a 20 °C. Para análisis posteriores, el extracto seco se reconstituyó con dimetilsulfóxido (DMSO). Para determinar la viabilidad celular se diluyó en PBS. Basándose en una metodología propia. Según los resultados obtenidos el disolvente no interfirió con los resultados esperados.
1	4. A solvent (vehicle) control was included.	Partially fulfilled	Para los ensayos <i>in vitro</i> no se reportó el solvente (vehículo) control utilizado. Mientras que los ratones del grupo control fueron tratados con 0,2 mL de vehículo (PBS) para observar que este disolvente no afectara la actividad de las células control, comparadas con las expuestas frente al extracto.
1	5. An appropriate positive control was included, and the expected result was observed from this treatment.	Not fulfilled	No se reportó el uso de ningún fármaco como control positivo para contrastar los resultados de la línea celular y así corroborar los resultados obtenidos.
<b>Test System</b>			
1	6. A reliable and sensitive test system (e.g., cell line / cells/ tissue / organ / embryo / sub-cellular fractions) with metabolic competence, if relevant, was used for investigating the test compound and endpoints.	Fulfilled	Se implementó la línea celular de cáncer de cuello uterino humano HeLa para los estudios <i>in vitro</i> . Se compraron ratones CB17-SCID macho de SLC (Hamahatsu, Japón) para los ensayos <i>in vivo</i> .
1	7. Conditions for cultivation and/or maintenance of the cell line / cells / tissue / organ / embryo / sub-cellular fractions (incubation temperature, humidity, CO2 concentration, media used, number of cell passages, control of contamination) were appropriate.	Fulfilled	La línea celular creció en medio mínimo esencial (MEM) con 10% (v/v) de suero fetal bovino inactivado por calor (FBS), penicilina (100 U/mL) y estreptomycinina (100µg/mL). Los cultivos se mantuvieron a 37 °C, con 5% de CO2 en la incubadora.
<b>Administration of the test compound</b>			
Removed	8. The duration of exposure was suitable for the test system and investigated endpoints.	Not applicable	Se excluyó por falta de experiencia del usuario.
1	9. The concentrations used were suitable for the test system and investigated endpoints.	Fulfilled	El ensayo expuso a las células a varias concentraciones de <i>P. japonicus</i> (10, 50 y 100 µg/ml) durante 24 horas. <i>P. japonicus</i> demostró que suprime la proliferación de células HeLa de manera dependiente de la dosis, donde la proliferación de células HeLa se redujo en un 57,2% después de la exposición a 100µg/mL.
1	10. The test conditions during and after exposure to the test compound were suitable (media and serum used, cell density, incubation temperature, humidity, CO2 concentration).	Fulfilled	Las condiciones de exposición evaluadas se mantuvieron estables desde el inicio al final de los experimentos.

Continúa...

Data collection and analysis			
1	11. Reliable and sensitive tests and/or analytical methods were used for investigating the endpoints.	Fulfilled	La metodología incluye ensayo de MTT para medir la viabilidad celular, tinción nuclear con Hoechst 33342 para determinar la actividad citotóxica de <i>P. japonicus</i> , citometría de flujo para análisis de apoptosis, western Blot para medir los niveles de moléculas reguladoras de apoptosis, RT-PCR para determinar los niveles de expresión.
1	12. Sufficient numbers of replicates or repetitions of the experiment were used to generate reliable and valid results.	Fulfilled	Los experimentos se realizaron por triplicado.
Removed	13. Measurements were collected at suitable time points in order to generate sensitive, valid and reliable data.	Not applicable	Se excluyó por falta de experiencia del usuario.
1	14. Cytotoxicity was measured and the test compound did not cause cytotoxicity that significantly affected the results.	Fulfilled	No hubo efecto citotóxico en líneas celulares normales (células RAW 264.7) a la concentración probada.
1	15. The statistical methods were clearly described and do not seem inappropriate, unusual or unfamiliar.	Fulfilled	Los análisis estadísticos se realizaron con el software estadístico SPSS y se utilizó la prueba Student.
Other			
1	16. Are there any other aspects of study design, performance or reporting that influence reliability?		Se realizó la evaluación de la actividad antitumoral del extracto de <i>P. japonicus</i> midiendo el tiempo de supervivencia y la inhibición del crecimiento tumoral en ratones xenoinjertados.

**Tabla S4. Relevancia (Hwang et al. 2015).**

Relevancia - Hwang et al. 2015		
Evaluation criteria	Selection	Comment
1. The identity of the tested substance	Indirectly relevant	Se evaluó un extracto de etanol de <i>P. japonicus</i> con diferentes metabolitos secundarios, que podrían o no interferir en los resultados (presenta muchas impurezas).
2. The test system used	Directly relevant	El extracto se evaluó en la línea celular de cáncer de cuello uterino humano HeLa para los estudios <i>in vitro</i> . Para los estudios <i>in vivo</i> se evaluaron ratones CB17-SCID macho de SLC (Hamahatsu, Japón) con el mismo extracto.
3. The endpoint studied	Indirectly relevant	No se realizaron estudios clínicos, se evaluaron efecto citotóxico tanto <i>in vitro</i> como <i>in vivo</i> .
4. The concentrations used	Indirectly relevant	Las concentraciones no son relevantes para la exposición humana, pero son relevantes para estudios <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> .

**Tabla S5. Calidad metodológica (Pal et al. 2021).**

<b>Calidad metodológica - Pal et al. 2021</b>			
<b>Weight/Removed</b>	<b>Evaluation criteria</b>	<b>Selection</b>	<b>Comment</b>
<b>Test compound and controls</b>			
1	1. The test compound or mixture was unlikely to contain any impurities that may significantly have affected the results of the study.	Partially fulfilled	El extracto metanólico (TRM) de <i>T. racemosa</i> , rico en bisbencilisoquinolina y otros alcaloides, contiene diferentes metabolitos secundarios, que podrían o no interferir en los resultados.
Removed	2. It was likely that the test compound was soluble at the concentrations used.	Not applicable	Se excluyó por falta de experiencia del usuario.
1	3. An appropriate solvent (vehicle) was used that is not expected to interfere with the results of the study at the concentration used.	Fulfilled	Se usaron diferentes disolventes para la preparación del extracto, encontrando hexano (TRH), acetato de etilo (TREA), metanol (TRM) y agua (TRAq). El rendimiento porcentual obtenido fue del 9,34% para el extracto metanólico, 4.66% para el extracto de acetato de etilo, 2,14% para el extracto de hexano y 1,72% del extracto acuoso.
1	4. A solvent (vehicle) control was included.	Fulfilled	El DMSO se utilizó como solvente para evaluar su potencial anticancerígeno en células de cáncer de cuello uterino <i>in vitro</i> .
1	5. An appropriate positive control was included, and the expected result was observed from this treatment.	Not fulfilled	No se reportó el uso de ningún fármaco como control positivo para contrastar los resultados de la lineal celular y poder corroborar los resultados obtenidos.
<b>Test System</b>			
1	6. A reliable and sensitive test system (e.g., cell line / cells / tissue / organ / embryo / sub-cellular fractions) with metabolic competence, if relevant, was used for investigating the test compound and endpoints.	Fulfilled	La célula de carcinoma de cuello uterino humano HeLa (HPV 18+), SiHa (HPV 16+) y la célula de riñón embrionario humano (HEK 293) se obtuvieron del depósito de células del Centro Nacional de Ciencias Celulares (NCCS), Pune, Maharashtra, India, mientras que C33A (VPH negativo) fueron proporcionadas por la Dra. Sharmila Sengupta (Instituto Nacional de Genómica Biomédica, Kalyani, India).
1	7. Conditions for cultivation and/or maintenance of the cell line / cells / tissue / organ / embryo / sub-cellular fractions (incubation temperature, humidity, CO2 concentration, media used, number of cell passages, control of contamination) were appropriate.	Fulfilled	Todas las células se cultivaron en DMEM suplementado con SFB al 10% y solución antibiótica (100 unidades/ml de penicilina y 0,1 mg/ml de estreptomycin) y agente antimicótico (0,25 µg/ml de anfotericina B). Las células se mantuvieron en un 5% de CO2 humidificado, incubado a 37 °C.
<b>Administration of the test compound</b>			
Removed	8. The duration of exposure was suitable for the test system and investigated endpoints.	Not applicable	Se excluyó por falta de experiencia del usuario.
1	9. The concentrations used were suitable for the test system and investigated endpoints.	Fulfilled	Las concentraciones evaluadas fueron de 0, 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140 y 160 µg/ml y la concentración inhibitoria de TRM demostró que suprime la proliferación de células cancerosas de manera dependiente de la dosis.
1	10. The test conditions during and after exposure to the test compound were suitable (media and serum used, cell density, incubation temperature, humidity, CO2 concentration).	Fulfilled	Las condiciones de exposición evaluadas se mantuvieron estables desde el inicio al final de los experimentos.

Continúa...

Data collection and analysis			
1	11. Reliable and sensitive tests and/or analytical methods were used for investigating the endpoints.	Fulfilled	En este estudio la metodología reporta ensayo de MTT para determinar la viabilidad celular, ensayo cometa para detectar daños en el ADN, análisis de citometría de flujo para estudiar proteínas marcadoras de apoptosis, entre otros.
1	12. Sufficient numbers of replicates or repetitions of the experiment were used to generate reliable and valid results.	Fulfilled	Todos los experimentos se realizaron por triplicado y los datos se representaron como medias $\pm$ DE (n = 3 para cada experimento).
Removed	13. Measurements were collected at suitable time points in order to generate sensitive, valid and reliable data.	Not applicable	Se excluyó por falta de experiencia del usuario.
1	14. Cytotoxicity was measured and the test compound did not cause cytotoxicity that significantly affected the results.	Fulfilled	Al medir la citotoxicidad en las células control se reportó un efecto mínimo de toxicidad en líneas celulares normales (células HEK 293) a la concentración probada.
1	15. The statistical methods were clearly described and do not seem inappropriate, unusual or unfamiliar.	Fulfilled	Se utilizó el software GraphPad Prism 8.0 para calcular la significación estadística, por medio de un análisis de varianza (ANOVA) de una vía seguido de la prueba de comparación múltiple de Dunnett y/o Tukey. Las diferencias significativas se han representado como *p < 0,01, **p < 0,001 y ***p < 0,0001.
Other			
1	16. Are there any other aspects of study design, performance or reporting that influence reliability?		No se realizó ningún comentario adicional del estudio, por falta de experiencia del usuario.

**Tabla S6. Relevancia (Pal et al. 2021).**

Relevancia - Pal et al. 2021		
Evaluation criteria	Selection	Comment
1. The identity of the tested substance	Indirectly relevant	El extracto metanólico (TRM) de <i>T. racemosa</i> , contiene diferentes metabolitos secundarios, que podrían o no interferir en los resultados (presenta muchas impurezas).
2. The test system used	Directly relevant	La célula de carcinoma de cuello uterino humano HeLa, SiHa y la célula de riñón embrionario humano (HEK 293) se obtuvieron del depósito de células del Centro Nacional de Ciencias Celulares (NCCS), Pune, Maharashtra, India, mientras que C33A (VPH negativo) fueron proporcionadas por la Dra. Sharmila Sengupta (Instituto Nacional de Genómica Biomédica, Kalyani, India).
3. The endpoint studied	Indirectly relevant	No se realizaron estudios clínicos, pero los criterios de valoración estudiados son relevantes para los efecto citotóxico evaluados <i>in vitro</i> .
4. The concentrations used	Indirectly relevant	No es un estudio clínico, las concentraciones solo corresponden al estudio <i>in vitro</i> .

**Tabla S7. Calidad metodológica (Ju et al. 2012).**

Calidad metodológica - Ju et al. 2012			
Weight/Removed	Evaluation criteria	Selection	Comment
<b>Test compound and controls</b>			
1	1. The test compound or mixture was unlikely to contain any impurities that may significantly have affected the results of the study.	Partially fulfilled	Se evaluó una fracción rica en flavonoides de <i>Artemisia princeps</i> (FRAP), la cual contiene diferentes metabolitos secundarios, que podrían o no interferir en los resultados (presenta muchas impurezas).
Removed	2. It was likely that the test compound was soluble at the concentrations used.	Not applicable	Se excluyó por falta de experiencia del usuario.
1	3. An appropriate solvent (vehicle) was used that is not expected to interfere with the results of the study at the concentration used.	Fulfilled	Se usaron diferentes disolventes para la preparación del extracto como etanol, acetato de etilo y hexano, los cuales arrastran sustancias de diferentes polaridades. Usados para buscar los metabolitos secundarios contenidos en el extracto.
1	4. A solvent (vehicle) control was included.	Fulfilled	En los ensayos celulares y ensayos <i>in vivo</i> se usó el DMSO como control vehículo, el cual no mostró variabilidad en los ensayos.
1	5. An appropriate positive control was included, and the expected result was observed from this treatment.	Fulfilled	Se usó como control positivo el cisplatino para comparar los efectos citotóxicos de FRAP en las líneas celulares cancerígenas.
<b>Test System</b>			
1	6. A reliable and sensitive test system (e.g., cell line / cells/ tissue / organ / embryo / sub-cellular fractions) with metabolic competence, if relevant, was used for investigating the test compound and endpoints.	Fulfilled	Se usaron las líneas celulares HeLa (cáncer de cuello uterino humano), A549 (cáncer de pulmón humano), T-47D (cáncer de mama humano) y AsPC-1 (cáncer de páncreas humano) de Korean Cell Line Bank (KCLB, Seúl). Junto con IOSE-80PC (línea celular epitelial de superficie ovárica inmortalizada) proporcionado por el Dr. Auersperg (Universidad de British Columbia) y el Dr. Godwin (Fox Chase Cancer Center, PA).
1	7. Conditions for cultivation and/or maintenance of the cell line / cells / tissue / organ / embryo / sub-cellular fractions (incubation temperature, humidity, CO <sub>2</sub> concentration, media used, number of cell passages, control of contamination) were appropriate.	Fulfilled	Las células se cultivaron en medio RPMI-1640 que contenía 2,0 g/l de bicarbonato de sodio más SFB al 10%, 100 unidades/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomycin. Todas las líneas celulares se mantuvieron en una incubadora humidificada en una atmósfera de aire al 95% y CO <sub>2</sub> al 5% a 37 °C en presencia o ausencia de FRAP.
<b>Administration of the test compound</b>			
Removed	8. The duration of exposure was suitable for the test system and investigated endpoints.	Not applicable	Se excluyó por falta de experiencia del usuario.
1	9. The concentrations used were suitable for the test system and investigated endpoints.	Fulfilled	Las concentraciones evaluadas fueron de 25,47 a 41,92 µg/ml y la concentración inhibitoria de FRAP mostro un CI50 de 26,75 µg/ml, siendo altamente activo su efecto citotóxico en las células HeLa.
1	10. The test conditions during and after exposure to the test compound were suitable (media and serum used, cell density, incubation temperature, humidity, CO <sub>2</sub> concentration).	Fulfilled	Las condiciones de exposición evaluadas se mantuvieron estables desde el inicio al final de los experimentos.

Continúa...

Data collection and analysis			
1	11. Reliable and sensitive tests and/or analytical methods were used for investigating the endpoints.	Fulfilled	Los métodos utilizados fueron ensayo de cultivo celular, MTT, tinción DAPI para la determinación de la morfología nuclear, análisis de citometría de flujo, Western Blot y ensayos de actividad antitumoral <i>in vivo</i> .
1	12. Sufficient numbers of replicates or repetitions of the experiment were used to generate reliable and valid results.	Fulfilled	Se realizaron tres experimentos independientes con patrones similares.
Removed	13. Measurements were collected at suitable time points in order to generate sensitive, valid and reliable data.	Not applicable	Se excluyó por falta de experiencia del usuario.
1	14. Cytotoxicity was measured and the test compound did not cause cytotoxicity that significantly affected the results.	Fulfilled	En el estudio <i>in vitro</i> se compararon las líneas cancerosas con o sin la exposición al extracto. En los análisis <i>in vivo</i> en ratones los tratamientos se evaluaron con o sin FRAP.
1	15. The statistical methods were clearly described and do not seem inappropriate, unusual or unfamiliar.	Fulfilled	Los métodos estadísticos fueron adecuados para cada uno de los ensayos realizados informando datos como medias $\pm$ DE para el número indicado de experimentos separados. La significación estadística (* P < 0,05) entre los grupos tratados se determinó mediante ANOVA de una vía.
Other			
1	16. Are there any other aspects of study design, performance or reporting that influence reliability?		Se realizó un ensayo <i>in vivo</i> en ratones hembra con tumores, que demostró la alta actividad y selectividad de FRAP sin afectar a las células normales.

**Tabla S8. Relevancia (Ju et al. 2012).**

Relevancia - Ju et al. 2012		
Evaluation criteria	Selection	Comment
1. The identity of the tested substance	Indirectly relevant	Se evaluó una fracción rica en flavonoides de <i>Artemisia princeps</i> Pampanini cv. Sajabal (FRAP), la cual contiene diferentes metabolitos secundarios, que podrían o no interferir en los resultados (presenta muchas impurezas).
2. The test system used	Directly relevant	Se usaron 5 líneas celulares de cánceres relevantes en la salud humana que al entrar en contacto con el extracto mostraron alta toxicidad celular.
3. The endpoint studied	Indirectly relevant	No se realizaron estudios clínicos, pero se evaluaron efecto citotóxico tanto <i>in vitro</i> como <i>in vivo</i> .
4. The concentrations used	Indirectly relevant	No es un estudio clínico, las concentraciones solo corresponden a estudios <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> .

**Tabla S9. Calidad metodológica (Willig et al. 2019).**

Calidad metodológica - Willig et al. 2019			
Weight/Removed	Evaluation criteria	Selection	Comment
<b>Test compound and controls</b>			
1	1. The test compound or mixture was unlikely to contain any impurities that may significantly have affected the results of the study.	Partially fulfilled	El extracto de n -hexano de <i>Heliopsis longipes</i> (HLE) por cromatografía en capa fina se aisló y purifico el espilanthol y el HL. El análisis de GC-MS evidencio que el espilanthol era el componente principal (63,94 %), basándose en la metodología de Déciga-Campos et al., 2010. Sin embargo no se determina que compuestos realmente interfieren en los resultados.
Removed	2. It was likely that the test compound was soluble at the concentrations used.	Not applicable	Se excluyó por falta de experiencia del usuario.
1	3. An appropriate solvent (vehicle) was used that is not expected to interfere with the results of the study at the concentration used.	Fulfilled	Como disolvente de la extracción se usó hexano y luego de una serie de pasos se aisló el residuo por cromatografía en capa fina. Posteriormente el espilanthol como el HLE se disolvió en una mezcla de sulfóxido de dimetilo (DMSO) al 40% y agua destilada estéril al 60% para obtener una solución madre. En los resultados no se observa alteración por parte del disolvente utilizado por lo que se obtuvieron los resultados esperados.
1	4. A solvent (vehicle) control was included.	Fulfilled	Se usó como disolvente vehículo el DMEM PBS al 10% en las células control, el cual se evaluó como control negativo para observar que no interfieran en los resultados obtenidos.
1	5. An appropriate positive control was included, and the expected result was observed from this treatment.	Fulfilled	Se usaron cisplatino (HeLa y MCF-7) y mesilato de imatinib (K-562) como control positivo.
<b>Test System</b>			
1	6. A reliable and sensitive test system (e.g., cell line / cells / tissue / organ / embryo / sub-cellular fractions) with metabolic competence, if relevant, was used for investigating the test compound and endpoints.	Fulfilled	Las líneas celulares HeLa y MCF-7 se obtuvieron de la Colección Americana de Cultivos Tipo (Rockville, MD, EE. UU.) y K-562 del Banco de Células de Río de Janeiro. Las células HaCaT fueron donadas por la Dra. Luisa Villa (ICESP, Escola de Medicina).
1	7. Conditions for cultivation and/or maintenance of the cell line / cells / tissue / organ / embryo / sub-cellular fractions (incubation temperature, humidity, CO2 concentration, media used, number of cell passages, control of contamination) were appropriate.	Fulfilled	Las líneas celulares se mantuvieron en medio de cultivo suplementado con suero bovino fetal al 10%, a 37 °C en atmósfera humidificada de CO2 al 5%. HeLa y MCF-7 se mantuvieron en matraz de cultivo en DMEM bajo en glucosa, HaCaT en DMEM alto en glucosa y K-562 en medio RPMI 1640. Se usaron células HaCaT para representar células no cancerosas.
<b>Administration of the test compound</b>			
Removed	8. The duration of exposure was suitable for the test system and investigated endpoints.	Not applicable	Se excluyó por falta de experiencia del usuario.
1	9. The concentrations used were suitable for the test system and investigated endpoints.	Fulfilled	Las líneas celulares se trataron con HLE en concentraciones de 25 a 300 µg/mL durante 24 y 48 h, con espilanthol en concentraciones de 25 a 100 µg/mL durante 48 h. Demostrando en los resultados valores de IC50 dentro de los rangos evaluados.
1	10. The test conditions during and after exposure to the test compound were suitable (media and serum used, cell density, incubation temperature,	Fulfilled	Las condiciones de exposición fueron mantenidas durante y hasta el final del proceso, a lo largo de los ensayos realizados según lo descrito por los experimentadores.

Continúa...

Data collection and analysis			
1	11. Reliable and sensitive tests and/or analytical methods were used for investigating the endpoints.	Fulfilled	Los análisis de viabilidad celular se evaluaron por MTT. Para los ensayos de recuento celular y ciclo celular se utilizó citometría de flujo. Para las tinciones se usó un microscopio de fluorescencia y el análisis de qRT-PCR se usó para identificar las moléculas reguladoras de apoptosis.
1	12. Sufficient numbers of replicates or repetitions of the experiment were used to generate reliable and valid results.	Fulfilled	Los datos se expresan como media $\pm$ SD de tres experimentos independientes realizados por triplicado.
Removed	13. Measurements were collected at suitable time points in order to generate sensitive, valid and reliable data.	Not applicable	Se excluyó por falta de experiencia del usuario.
1	14. Cytotoxicity was measured and the test compound did not cause cytotoxicity that significantly affected the results.	Fulfilled	Se realizó un control en células cancerígenas sin tratamiento y con tratamiento en las líneas celulares HaCaT, HeLa y MCF-7.
1	15. The statistical methods were clearly described and do not seem inappropriate, unusual or unfamiliar.	Fulfilled	Los datos se evaluaron utilizando un análisis de varianza de una vía, seguido de la prueba post hoc de Tukey. Los análisis se realizaron utilizando el software GraphPad Prism 5. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas si $p < 0,05$ .
Other			
1	16. Are there any other aspects of study design, performance or reporting that influence reliability?		No se realizó ningún comentario adicional del estudio, por falta de experiencia del usuario.

Tabla S10. Relevancia (Willig et al. 2019).

Calidad metodológica - Willig et al. 2019		
Evaluation criteria	Selection	Comment
1. The identity of the tested substance	Indirectly relevant	Los principios activos obtenidos fueron extraídos por los investigadores y separados en cromatografía de capa fina, sin embargo no se tiene certeza de su pureza y el nivel de interferencia de estos en el ensayo.
2. The test system used	Directly relevant	Todas las líneas celulares evaluadas eran cancerosas, necesarias para realizar los estudios de apoptosis, generados por los agentes fitoquímicos activos.
3. The endpoint studied	Indirectly relevant	En el estudio no se realizaron análisis clínicos, pero si fueron <i>in vitro</i> . <i>Es por esto</i> que se propone estudiarlos en un futuro, ya que los compuesto fitoquímicos activos evaluados presentaron alta actividad anticancerígena.
4. The concentrations used	Indirectly relevant	Las concentraciones administradas no son relevantes para la exposición humana, debido a que es un estudio <i>in vitro</i> , pero el paso a seguir es realizar estudios <i>in vivo</i> y clínicos.



**Tabla S11. Calidad metodológica (Thouri et al. 2019).**

<b>Calidad metodológica - Thouri et al. 2019</b>			
<b>Weight/Removed</b>	<b>Evaluation criteria</b>	<b>Selection</b>	<b>Comment</b>
<b>Test compound and controls</b>			
1,0	1. The test compound or mixture was unlikely to contain any impurities that may significantly have affected the results of the study.	Partially fulfilled	Se evaluó un extracto metanólico de semillas de dátiles con diferentes metabolitos secundarios, que podrían o no interferir en los resultados.
Removed	2. It was likely that the test compound was soluble at the concentrations used.	Not applicable	Se excluyó por falta de experiencia del usuario.
1	3. An appropriate solvent (vehicle) was used that is not expected to interfere with the results of the study at the concentration used.	Fulfilled	Según la metodología cada muestra se extrajo dos veces agitando con metanol y posteriormente se volvió a disolver en el metanol. Según los resultados obtenidos el disolvente no interfirió con los resultados esperados.
1	4. A solvent (vehicle) control was included.	Not fulfilled	No se reporta la información.
1	5. An appropriate positive control was included, and the expected result was observed from this treatment.	Fulfilled	El fármaco anticanceroso doxorubicina, a una concentración final de 25 µg ml <sup>-1</sup> se utilizó como control positivo.
<b>Test System</b>			
1	6. A reliable and sensitive test system (e.g., cell line / cells/ tissue / organ / embryo / sub-cellular fractions) with metabolic competence, if relevant, was used for investigating the test compound and endpoints.	Fulfilled	Implementaron la línea celular de cáncer de cuello uterino humano HeLa (ICLC HTL95023) y la línea celular de cáncer de hígado humano HepG2 (ICLC HTL95005).
1	7. Conditions for cultivation and/or maintenance of the cell line / cells / tissue / organ / embryo / sub-cellular fractions (incubation temperature, humidity, CO <sub>2</sub> concentration, media used, number of cell passages, control of contamination) were appropriate.	Fulfilled	La línea celular HepG2 se cultivó en RPMI 1640 con L - glutamina y las placas de cultivo se incubaron durante 48 h a 37 °C y 5% de CO <sub>2</sub> . HeLa y 10FS se cultivaron en medio de Eagle modificado por Dulbecco 4,5 gl <sup>-1</sup> con L - glutamina 2 mM. Ambos medios se complementan con suero fetal bovino al 10% y 10 U ml <sup>-1</sup> de penicilina/estreptomicina. Las células se cultivaron dos veces por semana y se mantuvieron a 37 °C en una atmósfera de 5% de CO <sub>2</sub> en aire.
<b>Administration of the test compound</b>			
Removed	8. The duration of exposure was suitable for the test system and investigated endpoints.	Not applicable	Se excluyó por falta de experiencia del usuario.
1	9. The concentrations used were suitable for the test system and investigated endpoints.	Fulfilled	Se evaluaron diferentes concentraciones en un rango de 12,5 a 100 µg ml <sup>-1</sup> de extracto metanólico en la línea celular. Teniendo en cuenta los resultados se observó que el IC <sub>50</sub> estaba dentro de los rangos evaluados.
1	10. The test conditions during and after exposure to the test compound were suitable (media and serum used, cell density, incubation temperature, humidity, CO <sub>2</sub> concentration).	Fulfilled	Las condiciones de exposición evaluadas se mantuvieron estables desde el inicio al final de los experimentos.

Continúa...

Data collection and analysis			
1	11. Reliable and sensitive tests and/or analytical methods were used for investigating the endpoints.	Fulfilled	Se realizaron análisis HPLC, HPLC-UV, cromatografía para la identificación de compuestos fitoquímicos del extracto evaluado. Para la evaluación de la viabilidad celular se usó MTT, la evaluación del efecto apoptótico se realizó mediante electroforesis SDS PAGE.
1	12. Sufficient numbers of replicates or repetitions of the experiment were used to generate reliable and valid results.	Fulfilled	Todas las extracciones se realizaron por triplicado.
Removed	13. Measurements were collected at suitable time points in order to generate sensitive, valid and reliable data.	Not applicable	Se excluyó por falta de experiencia del usuario.
1	14. Cytotoxicity was measured and the test compound did not cause cytotoxicity that significantly affected the results.	Fulfilled	El extracto se evaluó en la línea celular no cancerígena de fibroblastos humanos 10FS.
1	15. The statistical methods were clearly described and do not seem inappropriate, unusual or unfamiliar.	Fulfilled	Las diferencias estadísticas se analizaron con la prueba ANOVA de una vía, utilizando el software SPSS 18.0.
Other			
1	16. Are there any other aspects of study design, performance or reporting that influence reliability?		No se realizó ningún comentario adicional del estudio, por falta de experiencia del usuario.

**Tabla S12.** Relevancia (Thouri et al. 2019).

Relevancia - Thouri et al. 2019		
Evaluation criteria	Selection	Comment
1. The identity of the tested substance	Indirectly relevant	Se evaluó un extracto metanólico de semillas de dátiles con diferentes metabolitos secundarios, que podrían o no interferir en los resultados (presenta muchas impurezas).
2. The test system used	Directly relevant	El extracto se evaluó en las líneas celulares HepG2, HeLa de tipo cancerígeno que presentan biomarcadores de apoptosis, de acuerdo con el ensayo que se buscaba realizar y en 10FS se evaluó el mismo extracto con el que se esperaba evaluar la citotoxicidad en células sanas.
3. The endpoint studied	Indirectly relevant	Están presentes los criterios de investigación <i>in vitro</i> , no clínicos.
4. The concentrations used	Indirectly relevant	Las concentraciones administradas no son relevantes para la exposición humana, debido a que es un estudio <i>in vitro</i> , pero el paso a seguir es realizar estudios <i>in vivo</i> y clínicos.

**Tabla S13. Calidad metodológica (Silva et al. 2019).**

Calidad metodológica - Silva et al. 2019			
Weight/Removed	Evaluation criteria	Selection	Comment
<b>Test compound and controls</b>			
1	1. The test compound or mixture was unlikely to contain any impurities that may significantly have affected the results of the study.	Partially fulfilled	Se evaluó una partición de hexano de <i>Annona crassiflora</i> Mart. que contiene diferentes metabolitos secundarios, que podrían o no interferir en los resultados (presenta muchas impurezas).
Removed	2. It was likely that the test compound was soluble at the concentrations used.	Not applicable	Se excluyó por falta de experiencia del usuario.
1	3. An appropriate solvent (vehicle) was used that is not expected to interfere with the results of the study at the concentration used.	Fulfilled	El extracto crudo se disolvió en dimetilsulfóxido (DMSO) y posteriormente se disolvió en 4 disolventes diferentes con polaridad aumentada: A- Hidroalcohólico, B- Hexano, C- Cloroformo y D- Acetato de etilo. Las particiones se sometieron a liofilización. En los resultados no se observa alteración por parte del disolvente utilizado por lo que se obtuvieron los esperados.
1	4. A solvent (vehicle) control was included.	Fulfilled	Los controles se trataron con DMSO, para observar que este disolvente no afectara la actividad del extracto frente a la célula evaluada.
1	5. An appropriate positive control was included, and the expected result was observed from this treatment.	Fulfilled	El cisplatino, se tomó como fármaco de referencia. En comparación con el cisplatino, el extracto crudo mostró un valor medio más alto.
<b>Test System</b>			
1	6. A reliable and sensitive test system (e.g., cell line / cells/ tissue / organ / embryo / sub-cellular fractions) with metabolic competence, if relevant, was used for investigating the test compound and endpoints.	Fulfilled	Se usó siete modelos de líneas celulares de cáncer de cuello uterino humano inmortalizado obtenido de la European Collection of Cell Cultures (ECACC, Salisbury, Reino Unido), siendo entonces: HtTA-1, HR5, HeLa, SiHa, BU25TK, HR5-CL11 y CaSki.
1	7. Conditions for cultivation and/or maintenance of the cell line / cells / tissue / organ / embryo / sub-cellular fractions (incubation temperature, humidity, CO2 concentration, media used, number of cell passages, control of contamination) were appropriate.	Fulfilled	Todas las líneas celulares se mantuvieron en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM 1X, glucosa alta; Gibco, Invitrogen), suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10% (Gibco, Invitrogen) y solución de penicilina/estreptomicina al 1% (P/S) (Gibco, Invitrogen), a 37 °C y 5% CO2, hasta la confluencia.
<b>Administration of the test compound</b>			
Removed	8. The duration of exposure was suitable for the test system and investigated endpoints.	Not applicable	Se excluyó por falta de experiencia del usuario.
1	9. The concentrations used were suitable for the test system and investigated endpoints.	Fulfilled	Los ensayos de citotoxicidad mostraron el tratamiento con concentraciones de 2,5 a 25 µg/mL de partición de hexano. Teniendo en cuenta los resultados, se observó que el IC50 estaba dentro de los rangos evaluados.
1	10. The test conditions during and after exposure to the test compound were suitable (media and serum used, cell density, incubation temperature, humidity, CO2 concentration).	Fulfilled	Las condiciones de exposición evaluadas se mantuvieron estables desde el inicio al final de los experimentos.

Continúa...

Data collection and analysis			
1	11. Reliable and sensitive tests and/or analytical methods were used for investigating the endpoints.	Fulfilled	Se realizaron ensayos como FT-ICR MS, ensayo de viabilidad, clonogénico, celular y Western Blot.
1	12. Sufficient numbers of replicates or repetitions of the experiment were used to generate reliable and valid results.	Partially fulfilled	Los experimentos se realizaron por duplicado.
Removed	13. Measurements were collected at suitable time points in order to generate sensitive, valid and reliable data.	Not applicable	Se excluyó por falta de experiencia del usuario.
1	14. Cytotoxicity was measured and the test compound did not cause cytotoxicity that significantly affected the results.	Fulfilled	El extracto tuvo un control de células cancerígenas sin el extracto y células cancerígenas con el extracto para sí observar los cambios esperados.
1	15. The statistical methods were clearly described and do not seem inappropriate, unusual or unfamiliar.	Fulfilled	Se realizó la prueba t de Student para comparar dos condiciones, mientras que se utilizó el análisis de varianza de dos vías (ANOVA).
Other			
1	16. Are there any other aspects of study design, performance or reporting that influence reliability?		Se evaluó la actividad antitumoral <i>in vivo</i> en embriones de pollo.

**Tabla S14. Relevancia (Silva et al. 2019).**

Relevancia - Silva et al. 2019		
Evaluation criteria	Selection	Comment
1. The identity of the tested substance	Indirectly relevant	Se evaluó una partición de hexano de <i>Annona crassiflora</i> Mart con diferentes metabolitos secundarios, que podrían o no interferir en los resultados (presenta muchas impurezas).
2. The test system used	Directly relevant	Se usó siete modelos de líneas celulares de cáncer de cuello uterino humano inmortalizado obtenido de la European Collection of Cell Cultures (ECACC, Salisbury, Reino Unido), siendo entonces: HtTA-1, HR5, HeLa, SiHa, BU25TK, HR5-CL11 y CaSki.
3. The endpoint studied	Indirectly relevant	No se realizaron estudios clínicos, se evaluaron efecto citotóxico tanto <i>in vitro</i> como <i>in vivo</i> .
4. The concentrations used	Indirectly relevant	No es un estudio clínico, las concentraciones solo corresponden a estudios <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> .

**Tabla S15. Calidad metodológica (Huang et al. 2018).**

<b>Calidad metodológica - Huang et al. 2018</b>			
<b>Weight/Removed</b>	<b>Evaluation criteria</b>	<b>Selection</b>	<b>Comment</b>
<b>Test compound and controls</b>			
1	1. The test compound or mixture was unlikely to contain any impurities that may significantly have affected the results of the study.	Fulfilled	El Compuesto 5 (ácido 1b,2a,3b,19b,23)-1,2,3,19,23-pentahydroxyolean-12-en-28-oic) tiene una pureza del 95% analizado por HPLC. Extraído y purificado por los mismos experimentadores.
Removed	2. It was likely that the test compound was soluble at the concentrations used.	Not applicable	Se excluyó por falta de experiencia del usuario.
1	3. An appropriate solvent (vehicle) was used that is not expected to interfere with the results of the study at the concentration used.	Fulfilled	Los compuestos aislados de <i>Euphorbia sieboldiana</i> , se disolvieron en dimetilsulfóxido (DMSO) y se diluyeron en medios de cultivo celular hasta una concentración final de 0,1% o menos, para poder evaluarlos a nivel celular, sin afectar los resultados obtenidos.
Removed	4. A solvent (vehicle) control was included.	Not applicable	Se excluyó al no aplicar este ítem en la metodología de los experimentos realizados con metabolitos secundarios puros.
1	5. An appropriate positive control was included, and the expected result was observed from this treatment.	Fulfilled	Se utilizaron el ácido asiático (AA) y la doxorubicina (DOX) como controles positivos para medir la actividad antiproliferativa del Compuesto 5.
<b>Test System</b>			
1	6. A reliable and sensitive test system (e.g., cell line / cells / tissue / organ / embryo / sub-cellular fractions) with metabolic competence, if relevant, was used for investigating the test compound and endpoints.	Fulfilled	Se usaron las líneas celulares HeLa, HepG2, T24, Spca-2, MGC-803, HeLa/DOX, HL-7702, LO2 obtenidas del Instituto de Bioquímica y Biología Celular, Academia de Ciencias de China.
1	7. Conditions for cultivation and/or maintenance of the cell line / cells / tissue / organ / embryo / sub-cellular fractions (incubation temperature, humidity, CO2 concentration, media used, number of cell passages, control of contamination) were appropriate.	Fulfilled	Se describe la temperatura de 37 °C, con un porcentaje de CO2 del 5%, en medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) suplementado con SFB al 10% y control de contaminación con medicamentos como penicilina (100 U/ml) y estreptomycin (100 mg/ml).
<b>Administration of the test compound</b>			
Removed	8. The duration of exposure was suitable for the test system and investigated endpoints.	Not applicable	Se excluyó por falta de experiencia del usuario.
1	9. The concentrations used were suitable for the test system and investigated endpoints.	Fulfilled	Las células HeLa y LO2 se trataron con diferentes concentraciones del Compuesto 5 (0, 2,5, 5, 10, 20, 40 u 80 µM), dando como resultado un IC50 de 4.52 µM y 48.63 µM respectivamente.
1	10. The test conditions during and after exposure to the test compound were suitable (media and serum used, cell density, incubation temperature, humidity, CO2 concentration).	Fulfilled	La metodología usada al principio del ensayo se mantuvo acorde a los experimentos realizados por los investigadores.

Continúa...

Data collection and analysis			
1	11. Reliable and sensitive tests and/or analytical methods were used for investigating the endpoints.	Fulfilled	Se usaron pruebas para evaluar la proliferación celular y la apoptosis como el MTT y la citometría de flujo. Para evaluar las proteínas se empleó el ensayo de transferencia Western y se empleó el análisis de RT-PCR para identificar las moléculas reguladoras de la apoptosis.
1	12. Sufficient numbers of replicates or repetitions of the experiment were used to generate reliable and valid results.	Fulfilled	Los datos se realizaron por triplicado para cada grupo experimental.
Removed	13. Measurements were collected at suitable time points in order to generate sensitive, valid and reliable data.	Not applicable	Se excluyó por falta de experiencia del usuario.
1	14. Cytotoxicity was measured and the test compound did not cause cytotoxicity that significantly affected the results.	Fulfilled	Como control se usó la línea celular hepática humana normal LO2, expuesta a diferentes concentraciones del Compuesto 5.
1	15. The statistical methods were clearly described and do not seem inappropriate, unusual or unfamiliar.	Fulfilled	Los datos se expresan como media $\pm$ DE para tres determinaciones diferentes. La significación estadística se analizó mediante ANOVA de una vía. Las separaciones de medias se realizaron utilizando el método de diferencia mínima significativa. $P < 0,05$ se definió como estadísticamente significativo.
Other			
1	16. Are there any other aspects of study design, performance or reporting that influence reliability?		No se realizó ningún comentario adicional del estudio, por falta de experiencia del usuario.

**Tabla S16.** Relevancia (Huang et al. 2018).

Relevancia - Huang et al. 2018		
Evaluation criteria	Selection	Comment
1. The identity of the tested substance	Directly relevant	El compuesto 5 (ácido 1b,2a,3b,19b,23)-1,2,3,19,23-pentahydroxyolean-12-en-28-oic) tiene una pureza del 95% analizado por HPLC. Extraído y purificado por los mismos experimentadores.
2. The test system used	Directly relevant	Las líneas celulares evaluadas son de tipo cancerígenas (HeLa, HepG2, T24, Spca-2, MGC-803, HeLa/DOX) y no cancerígenas usados como controles (HL-7702 y LO2). Siendo apropiadas para evaluar los procesos apoptóticos expuestos a este principio activo.
3. The endpoint studied	Indirectly relevant	En este trabajo no se realizaron estudios clínicos para evaluar el efecto directo en humanos, pero los criterios de valoración estudiados son relevantes para este tipo de estudio <i>in vitro</i> .
4. The concentrations used	Indirectly relevant	Las concentraciones son ideales para ensayos <i>in vitro</i> pero aún se desconoce en ensayos clínicos.

**Tabla S17. Calidad metodológica (Lukhele and Motadi 2016).**

<b>Calidad metodológica - Lukhele and Motadi 2016</b>			
<b>Weight/Removed</b>	<b>Evaluation criteria</b>	<b>Selection</b>	<b>Comment</b>
<b>Test compound and controls</b>			
1	1. The test compound or mixture was unlikely to contain any impurities that may significantly have affected the results of the study.	Fulfilled	Este estudio comparo los efectos antiproliferativos del extracto crudo de hexano de <i>Cannabis sativa</i> y su compuesto principal cannabidiol (adquirido de Sigma-Aldrich) en diferentes líneas celulares de cáncer de cuello uterino.
Removed	2. It was likely that the test compound was soluble at the concentrations used.	Not applicable	Se excluyó por falta de experiencia del usuario.
1	3. An appropriate solvent (vehicle) was used that is not expected to interfere with the results of the study at the concentration used.	Fulfilled	Las soluciones de cannabidiol se disolvieron en un medio libre de glucosa suplementado con galactosa 10 mM.
1	4. A solvent (vehicle) control was included.	Fulfilled	Para evaluar el efecto del extracto y el cannabidiol en las células cancerosas, se incluyó dimetilsulfóxido (DMSO) como vehículo control (para este caso el ítem se incluyó al evaluar conjuntamente el extracto).
1	5. An appropriate positive control was included, and the expected result was observed from this treatment.	Fulfilled	Se incluyó la camptotecina (0,3 $\mu$ M (v/v)) como control positivo con fines comparativos.
<b>Test System</b>			
1	6. A reliable and sensitive test system (e.g., cell line / cells/ tissue / organ / embryo / sub-cellular fractions) with metabolic competence, if relevant, was used for investigating the test compound and endpoints.	Fulfilled	Se compraron líneas celulares HeLa agresivas, ME-180 metastásicas y SiHa primarias de ATCC (EE. UU., MD).
1	7. Conditions for cultivation and/or maintenance of the cell line / cells / tissue / organ/embryo / sub-cellular fractions (incubation temperature, humidity, CO2 concentration, media used, number of cell passages, control of contamination) were appropriate.	Fulfilled	Se cultivaron en medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10% (Highveld biológico) y penicilina/estreptomina al 1% (Sigma, EE. UU.). Las células se mantuvieron a 37 °C bajo 5% de dióxido de carbono (CO2) y 95% de humedad relativa. Después de cada tercer día de la semana, se extrajo el medio viejo y se reemplazó con medio nuevo para promover el crecimiento hasta que las células alcanzaran una confluencia de ~70–80%.
<b>Administration of the test compound</b>			
Removed	8. The duration of exposure was suitable for the test system and investigated endpoints.	Not applicable	Se excluyó por falta de experiencia del usuario.
1	9. The concentrations used were suitable for the test system and investigated endpoints.	Fulfilled	Las células se trataron con extractos de plantas de <i>Cannabis sativa</i> a varias concentraciones (0, 50, 100 y 150 $\mu$ g/ml (p/v)) durante 24 h. En el caso del cannabidiol las células fueron tratadas en concentraciones de 0, 8, 1,5 y 3,2 $\mu$ g/ml por 24 h.
1	10. The test conditions during and after exposure to the test compound were suitable (media and serum used, cell density, incubation temperature, humidity, CO2 concentration).	Fulfilled	Las condiciones celulares durante y después de las pruebas, no se vieron alteradas y fueron las adecuadas.

Continúa...

Data collection and analysis			
1	11. Reliable and sensitive tests and/or analytical methods were used for investigating the endpoints.	Fulfilled	Dentro de la metodología se reportó el ensayo MTT, ensayo de apoptosis (anexina VFITC), ensayo mitocondrial (reactivo de detección de ATP), medición de la actividad de la caspasa 3/7 (Caspase-Glo 3/7), mancha occidental (ensayo BCA).
1	12. Sufficient numbers of replicates or repetitions of the experiment were used to generate reliable and valid results.	Partially fulfilled	El análisis de los datos no se realizó por triplicado. Los experimentos se realizaron por duplicado.
Removed	13. Measurements were collected at suitable time points in order to generate sensitive, valid and reliable data.	Not applicable	Se excluyó por falta de experiencia del usuario.
1	14. Cytotoxicity was measured and the test compound did not cause cytotoxicity that significantly affected the results.	Fulfilled	Las líneas celulares cancerígenas no tratadas se incluyeron como controles, con fines comparativos.
1	15. The statistical methods were clearly described and do not seem inappropriate, unusual or unfamiliar.	Fulfilled	Los datos gráficos se expresaron como la desviación estándar media. El valor de p se analizó en comparación con el no tratado utilizando la prueba t de Student, en la que $p < 0,05$ se consideró significativo.
Other			
1	16. Are there any other aspects of study design, performance or reporting that influence reliability?		No se realizó ningún comentario adicional del estudio, por falta de experiencia del usuario.

**Tabla S18. Relevancia (Lukhele and Motadi 2016).**

Relevancia - Lukhele and Motadi 2016		
Evaluation criteria	Selection	Comment
1. The identity of the tested substance	Directly relevant	La sustancia presenta una confianza de pureza alta, al ser el cannabidiol adquirido de Sigma-Aldrich.
2. The test system used	Directly relevant	Las líneas celulares de cáncer de cuello uterino HeLa, ME-180 y SiHa fueron adquiridas de ATCC (EE. UU., MD).
3. The endpoint studied	Indirectly relevant	Los resultados de los criterios de evaluación son relevantes, pero al ser un estudio <i>in vitro</i> no están directamente relacionados con cambios en la salud humana.
4. The concentrations used	Indirectly relevant	Las concentraciones administradas no son directamente relevantes para la exposición humana al realizar evaluaciones <i>in vitro</i> .



**Tabla S19. Calidad metodológica (Ramesh and Alshatwi 2013).**

<b>Calidad metodológica - Ramesh and Alshatwi 2013</b>			
<b>Weight/Removed</b>	<b>Evaluation criteria</b>	<b>Selection</b>	<b>Comment</b>
<b>Test compound and controls</b>			
1	1. The test compound or mixture was unlikely to contain any impurities that may significantly have affected the results of the study.	Fulfilled	La naringina se adquirió de Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, EE. UU.).
Removed	2. It was likely that the test compound was soluble at the concentrations used.	Not applicable	Se excluyó por falta de experiencia del usuario.
1	3. An appropriate solvent (vehicle) was used that is not expected to interfere with the results of the study at the concentration used.	Fulfilled	Se preparó una solución madre de 20 mg/ml en DMSO (Sigma, EE. UU.). Luego se realizaron diluciones adicionales en DMEM hasta las concentraciones requeridas entre 250 y 2000 $\mu\text{M}$ para el tratamiento de células SiHa.
Removed	4. A solvent (vehicle) control was included.	Not applicable	Se excluyó al no aplicar este ítem en la metodología de los experimentos realizados con metodología secundarios puros.
1	5. An appropriate positive control was included, and the expected result was observed from this treatment.	Not fulfilled	No se incluye un fármaco de referencia como control positivo para comparar los resultados.
<b>Test System</b>			
1	6. A reliable and sensitive test system (e.g., cell line / cells / tissue / organ / embryo / sub-cellular fractions) with metabolic competence, if relevant, was used for investigating the test compound and endpoints.	Fulfilled	La línea celular de cáncer de cuello uterino SiHa fue proporcionada por el Prof. MA Akbarsha en el Centro Mahatma Gandhi-Doerenkamp (MGDC) para Alternativas al Uso de Animales en la Educación en Ciencias de la Vida, Universidad Bharthidasan, India.
1	7. Conditions for cultivation and/or maintenance of the cell line / cells / tissue / organ / embryo / sub-cellular fractions (incubation temperature, humidity, CO <sub>2</sub> concentration, media used, number of cell passages, control of contamination) were appropriate.	Fulfilled	La línea celular se mantuvo y propagó en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) al 90% que contenía suero fetal bovino (SFB) al 10% y penicilina/estreptomicina al 1%. Las células se cultivaron como una monocapa adherente con una confluencia de aproximadamente el 70-80%, a 37 °C en una atmósfera humidificada con un 5% de CO <sub>2</sub> .
<b>Administration of the test compound</b>			
Removed	8. The duration of exposure was suitable for the test system and investigated endpoints.	Not applicable	Se excluyó por falta de experiencia del usuario.
1	9. The concentrations used were suitable for the test system and investigated endpoints.	Fulfilled	Para evaluar la viabilidad de las células SiHa fueron tratadas a concentraciones de 0, 250, 500, 750, 1000, 1250, 1500, 2000 $\mu\text{M}$ . La naringina disminuyó notablemente la proliferación celular de manera dependiente de la dosis, con un valor de IC <sub>50</sub> de 750 $\mu\text{M}$ .
1	10. The test conditions during and after exposure to the test compound were suitable (media and serum used, cell density, incubation temperature, humidity, CO <sub>2</sub> concentration).	Fulfilled	Las condiciones expuestas en la metodología, durante y después de los experimentos son las mismas y las adecuadas.

Continúa...

Data collection and analysis			
1	11. Reliable and sensitive tests and/or analytical methods were used for investigating the endpoints.	Fulfilled	La metodología reportada contiene la medición de la viabilidad celular por MTT, análisis del potencial transmembrana mitocondrial, detección de apoptosis por microscopia de fluorescencia, análisis de RT-PCR para identificar las moléculas reguladoras apoptóticas presentes.
1	12. Sufficient numbers of replicates or repetitions of the experiment were used to generate reliable and valid results.	Fulfilled	Se analizaron muestras por cuadruplicado para cada concentración de naringina en tres experimentos independientes. Junto a esto, en otros ensayos los datos presentados son representativos en al menos tres experimentos independientes realizados por triplicado.
Removed	13. Measurements were collected at suitable time points in order to generate sensitive, valid and reliable data.	Not applicable	Se excluyó por falta de experiencia del usuario.
1	14. Cytotoxicity was measured and the test compound did not cause cytotoxicity that significantly affected the results.	Fulfilled	La viabilidad celular de la línea celular SiHa se expresó como el porcentaje de viabilidad de las células tratadas en comparación con el control no tratado. Las células de control se cultivaron de la misma manera en ausencia de naringina.
1	15. The statistical methods were clearly described and do not seem inappropriate, unusual or unfamiliar.	Fulfilled	Los resultados se expresan como media $\pm$ desviación estándar (DE). Los datos se analizaron mediante ANOVA unidireccional usando SPSS (Versión 11.5, PSS Inc., Chicago, IL, EE. UU.). Seguimiento de la prueba de comparación múltiple de Dunnett. Para todas las comparaciones, las diferencias se consideraron estadísticamente significativas en $p < 0,05$ .
Other			
1	16. Are there any other aspects of study design, performance or reporting that influence reliability?		No se realizó ningún comentario adicional del estudio, por falta de experiencia del usuario.

**Tabla S20. Relevancia (Ramesh and Alshatwi 2013).**

Relevancia - Ramesh and Alshatwi 2013		
Evaluation criteria	Selection	Comment
1. The identity of the tested substance	Directly relevant	La naringina se adquirió de Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, EE. UU.).
2. The test system used	Directly relevant	La línea celular de cáncer de cuello uterino SiHa fue proporcionada por el Prof. MA Akbarsha en el Centro Mahatma Gandhi-Doerenkamp (MGDC) para Alternativas al Uso de Animales en la Educación en Ciencias de la Vida, Universidad Bharthidasan, India.
3. The endpoint studied	Indirectly relevant	No se realizaron análisis clínicos para evaluar el efecto directo en humanos, pero los criterios de valoración estudiados son relevantes para este tipo de estudio <i>in vitro</i> .
4. The concentrations used	Indirectly relevant	Las concentraciones son ideales para ensayos <i>in vitro</i> pero aún se desconoce en ensayos clínicos.

**Tabla S21. Calidad metodológica (Kumar et al. 2016).**

<b>Calidad metodológica - Kumar et al. 2016</b>			
<b>Weight/Removed</b>	<b>Evaluation criteria</b>	<b>Selection</b>	<b>Comment</b>
<b>Test compound and controls</b>			
1	1. The test compound or mixture was unlikely to contain any impurities that may significantly have affected the results of the study.	Fulfilled	La curcumina y el ácido elagico provienen de MP Biomedicals, con lo cual se demuestra la pureza de los productos usados.
Removed	2. It was likely that the test compound was soluble at the concentrations used.	Not applicable	Se excluyó por falta de experiencia del usuario.
1	3. An appropriate solvent (vehicle) was used that is not expected to interfere with the results of the study at the concentration used.	Not fulfilled	No se reporta el compuesto vehículo en el que se disolvió la curcumina y el ácido elagico para poder proceder con los experimentos celulares.
Removed	4. A solvent (vehicle) control was included.	Not applicable	Se excluyó al no aplicar este ítem en la metodología de los experimentos realizados con metabolitos secundarios puros.
1	5. An appropriate positive control was included, and the expected result was observed from this treatment.	Not fulfilled	No se incluye control positivo como fármaco de referencia para comparar los resultados.
<b>Test System</b>			
1	6. A reliable and sensitive test system (e.g., cell line / cells/ tissue / organ / embryo / sub-cellular fractions) with metabolic competence, if relevant, was used for investigating the test compound and endpoints.	Fulfilled	Se usó la línea celular de cáncer de cuello uterino humano HeLa, obtenida del Centro Nacional para la Ciencia Celular (NCCS), Pune, India.
1	7. Conditions for cultivation and/or maintenance of the cell line / cells / tissue / organ / embryo / sub-cellular fractions (incubation temperature, humidity, CO2 concentration, media used, number of cell passages, control of contamination) were appropriate.	Fulfilled	Las células se mantuvieron en una incubadora humidificada con CO2 al 5% a 37 °C, en medio Eagle modificado por Dulbecco complementado con glucosa alta, SFB al 10%, 100 U/mL de penicilina y 100 µg/ml de estreptomicina.
<b>Administration of the test compound</b>			
Removed	8. The duration of exposure was suitable for the test system and investigated endpoints.	Not applicable	Se excluyó por falta de experiencia del usuario.
1	9. The concentrations used were suitable for the test system and investigated endpoints.	Fulfilled	Las concentraciones de la curcumina y el ácido elagico fueron adecuados 0, 20, 40, 60 µM, debido a que los resultados mostraron un IC50 de 16,52 µM y de 19,47 µM respectivamente.
1	10. The test conditions during and after exposure to the test compound were suitable (media and serum used, cell density, incubation temperature, humidity, CO2 concentration).	Fulfilled	La línea celular se mantuvo en medio de Eagle modificado por Dulbecco complementado con glucosa alta, suero bovino fetal al 10% (v/v), 100 U/mL de penicilina y 100 µg/ml de estreptomicina. Se mantuvo una confluencia del 70 y 80%, La temperatura de incubación fue 37 °C y concentración de CO2 al 5%.

Continúa...

1	11. Reliable and sensitive tests and/or analytical methods were used for investigating the endpoints.	Fulfilled	Se usaron pruebas para evaluar la proliferación celular por medio del MTT, medición de especies reactivas de oxígeno (ROS), ensayo cometa, inmunocitoquímica y RT-PCR semicuantitativa.
1	12. Sufficient numbers of replicates or repetitions of the experiment were used to generate reliable and valid results.	Fulfilled	Cada experimento se repitió al menos cuatro veces por triplicado.
Removed	13. Measurements were collected at suitable time points in order to generate sensitive, valid and reliable data.	Not applicable	Se excluyó por falta de experiencia del usuario.
1	14. Cytotoxicity was measured and the test compound did not cause cytotoxicity that significantly affected the results.	Not fulfilled	En este estudio no se reporta el control celular (células cancerígenas o sanas) sin exposición a los metabolitos secundarios, con fines comparativos.
1	15. The statistical methods were clearly described and do not seem inappropriate, unusual or unfamiliar.	Partially fulfilled	Se realizaron análisis estadísticos, sin embargo no se realizaron análisis estadísticos robustos o no se realizaron en un software que brindara mayor precisión a los resultados. Resultados estadísticamente significativo (ANOVA unidireccional, comparación múltiple posthoc de Tukey a nivel de significación). $p < 0,05$ .
<b>Other</b>			
1	16. Are there any other aspects of study design, performance or reporting that influence reliability?		No se realizó ningún comentario adicional del estudio, por falta de experiencia del usuario.

**Tabla S22. Relevancia (Kumar et al. 2016).**

<b>Relevancia - Kumar et al. 2016</b>		
<b>Evaluation criteria</b>	<b>Selection</b>	<b>Comment</b>
1. The identity of the tested substance	Directly relevant	Las sustancias analizadas son la curcumina y el ácido elágico (adquiridos de MP Biomedicals), los cuales son altamente purificados. En los resultados muestran su efecto directo en la apoptosis de las células Hela. Donde además en las discusiones describen su naturaleza, estructura y función.
2. The test system used	Directly relevant	Las células evaluadas son la línea celular de cáncer de cuello uterino humano HeLa (Centro Nacional para la Ciencia Celular (NCCS), Pune, India), la cual es de alta relevancia para evaluar la acción apoptótica de los biofármacos.
3. The endpoint studied	Indirectly relevant	Los resultados de los criterios de evaluación son relevantes, pero al ser un estudio <i>in vitro</i> no están directamente relacionados con cambios en la salud humana.
4. The concentrations used	Indirectly relevant	Las concentraciones administradas no son directamente relevantes para la exposición humana al realizar evaluaciones <i>in vitro</i> .

**Tabla S23. Calidad metodológica (Zhang et al. 2018).**

<b>Calidad metodológica - Zhang et al. 2018</b>			
<b>Weight/Removed</b>	<b>Evaluation criteria</b>	<b>Selection</b>	<b>Comment</b>
<b>Test compound and controls</b>			
1	1. The test compound or mixture was unlikely to contain any impurities that may significantly have affected the results of the study.	Fulfilled	El Morin se extrajo de hojas de <i>Morus alba</i> (morera). La pureza del compuesto Morin se determinó mediante el uso de HPLC con un detector UV, a partir de una longitud de onda de 280 nm y 340 nm, con un porcentaje de 98,81%.
Removed	2. It was likely that the test compound was soluble at the concentrations used.	Not applicable	Se excluyó por falta de experiencia del usuario.
1	3. An appropriate solvent (vehicle) was used that is not expected to interfere with the results of the study at the concentration used.	Fulfilled	El Morin se extrajo de hojas con metanol al 100% en una incubadora con agitación a temperatura ambiente durante 24 h. Posteriormente se purificó por HPLC.
Removed	4. A solvent (vehicle) control was included.	Not applicable	Se excluyó al no aplicar este ítem en la metodología de los experimentos realizados con metabolitos secundarios puros.
1	5. An appropriate positive control was included, and the expected result was observed from this treatment.	Not fulfilled	No se observa la presencia de un fármaco utilizado como referencia para evaluar la efectividad del metabolito analizado.
<b>Test System</b>			
1	6. A reliable and sensitive test system (e.g., cell line / cells / tissue / organ / embryo / sub-cellular fractions) with metabolic competence, if relevant, was used for investigating the test compound and endpoints.	Fulfilled	El modelo <i>in vitro</i> empleado fue la línea celular de cáncer de cuello uterino humano (HeLa) obtenido de Shanghai Wei Atlas Biological Technology Co., LTD.
1	7. Conditions for cultivation and/or maintenance of the cell line / cells / tissue / organ / embryo / sub-cellular fractions (incubation temperature, humidity, CO2 concentration, media used, number of cell passages, control of contamination) were appropriate.	Fulfilled	Las células se mantuvieron a 37 °C en una atmósfera humidificada de 95% de aire y 5% de CO2. Las células HeLa se colocaron en placas de cultivo de 60 mm × 15 mm y se cultivaron en medio DMEM alto en glucosa complementado con SFB inactivado por calor al 10%, L -glutamina 2 mM y penicilina-estreptomicina al 1%.
<b>Administration of the test compound</b>			
Removed	8. The duration of exposure was suitable for the test system and investigated endpoints.	Not applicable	Se excluyó por falta de experiencia del usuario.
1	9. The concentrations used were suitable for the test system and investigated endpoints.	Fulfilled	Las células se trataron con concentraciones en serie de Morin (0, 100, 200, 300, 400 y 500 µM) durante 48 h, demostrando su alta actividad anticancerígena con buenos valores de IC50 dentro de los rangos evaluados.
1	10. The test conditions during and after exposure to the test compound were suitable (media and serum used, cell density, incubation temperature, humidity, CO2 concentration).	Fulfilled	Las condiciones evaluadas se mantuvieron dentro los valores establecidos de inicio a fin.

Continúa...

Data collection and analysis			
1	11. Reliable and sensitive tests and/or analytical methods were used for investigating the endpoints.	Fulfilled	La viabilidad celular se evaluó mediante el ensayo MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) informado en un estudio de Pan et al., 2010. La progresión del ciclo celular se detectó mediante citometría de flujo (Becton Dickinson, San José, CA, EE. UU.) La proporción de células Hela que experimentaron apoptosis se detectó mediante citometría de flujo (BD FACSCalibur, EE. UU.). Utilizando el kit de detección de apoptosis con anexina V-FITC/PI (BD Biosciences Clontech, EE. UU.).
1	12. Sufficient numbers of replicates or repetitions of the experiment were used to generate reliable and valid results.	Fulfilled	El número de réplicas del experimento realizado se expresaron como media $\pm$ DE para tres determinaciones diferentes ( $n \geq 3$ ).
Removed	13. Measurements were collected at suitable time points in order to generate sensitive, valid and reliable data.	Not applicable	Se excluyó por falta de experiencia del usuario.
1	14. Cytotoxicity was measured and the test compound did not cause cytotoxicity that significantly affected the results.	Fulfilled	Como control negativo se emplearon células sin tratamiento, con el fin de evidenciar el cambio morfológico obtenido en comparación con las células tratadas con diferentes concentraciones de morin.
1	15. The statistical methods were clearly described and do not seem inappropriate, unusual or unfamiliar.	Fulfilled	El análisis estadístico se llevó a cabo utilizando el software SPSS 18.0. Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía usando el software Origin Lab (Origin Pro 8.0) a un nivel de significación de $p < 0.01$ .
Other			
1	16. Are there any other aspects of study design, performance or reporting that influence reliability?		No se realizó ningún comentario adicional del estudio, por falta de experiencia del usuario.

**Tabla S24. Relevancia (Zhang et al. 2018).**

Relevancia - Zhang et al. 2018		
Evaluation criteria	Selection	Comment
1. The identity of the tested substance	Directly relevant	El compuesto Morin se extrajo por HPLC y mostro una alta pureza (98,81%) a la hora de ser analizado.
2. The test system used	Directly relevant	Las células Hela usadas son línea celular de cáncer de cuello uterino humano obtenida de Shanghai Wei Atlas Biological Technology Co., LTD, con la cual se puede evaluar la actividad apoptotica causada por el principio activo.
3. The endpoint studied	Indirectly relevant	No se ha realizado un estudio clínico que permita determinar la actividad en humanos, pero los resultados de los criterios de evaluación son relevantes para los estudios <i>in vitro</i> .
4. The concentrations used	Indirectly relevant	No se puede determinar si las concentraciones utilizadas son toxicas en humanos, pero son directamente relevantes para los estudios <i>in vitro</i> .

**Tabla S25. Calidad metodológica (Zhang et al. 2017).**

Calidad metodológica - Zhang et al. 2017			
Weight/Removed	Evaluation criteria	Selection	Comment
<b>Test compound and controls</b>			
1	1. The test compound or mixture was unlikely to contain any impurities that may significantly have affected the results of the study.	Fulfilled	El 6-gingerol, proviene de <i>Zingiber officinale</i> . El compuesto se purificó a partir de la extracción en bruto de acuerdo con el procedimiento de separación HSCCC (cromatografía a contracorriente de alta velocidad) empleado por Zhan et al. (2011).
Removed	2. It was likely that the test compound was soluble at the concentrations	Not applicable	Se excluyó por falta de experiencia del usuario.
1	3. An appropriate solvent (vehicle) was used that is not expected to interfere with the results of the study at the concentration used.	Fulfilled	Las extracciones de jengibre se disolvieron en metanol, se filtraron y liofilizaron. El sobrenadante se eliminó por rotaevaporador. Finalmente para detectar el contenido del metabolito secundario se realizó un análisis de HPLC acoplado a espectrometría de masas.
Removed	4. A solvent (vehicle) control was included.	Not applicable	Se excluyó al no aplicar este ítem en la metodología de los experimentos realizados con metabolitos secundarios puros.
1	5. An appropriate positive control was included, and the expected result was observed from this treatment.	Fulfilled	En esta investigación, los tratamientos de 5-FU e inanición se utilizaron como control positivo y la inhibición de la proliferación celular después de 48 h de tratamiento alcanzó un 71,23% y 37,35% para 5-FU e inanición, respectivamente.
<b>Test System</b>			
1	6. A reliable and sensitive test system (e.g., cell line / cells / tissue / organ / embryo / sub-cellular fractions) with metabolic competence, if relevant, was used for investigating the test compound and endpoints.	Fulfilled	Las células HeLa se obtuvieron de Shanghai Wei Atlas Biological Technology Co., LTD.
1	7. Conditions for cultivation and/or maintenance of the cell line / cells / tissue / organ / embryo / sub-cellular fractions (incubation temperature, humidity, CO <sub>2</sub> concentration, media used, number of cell passages, control of contamination) were appropriate.	Fulfilled	Las células se cultivaron en placas de cultivo de seis pocillos de 35 mm, en medio DMEM alto en glucosa que contenía SFB inactivado por calor (10%), estreptomycin (100 µg/mL) y penicilina G (100 U/ml) a 37 °C en una atmósfera humidificada de 5% de CO <sub>2</sub> . El medio de cultivo se revivió dos veces por semana y las células adherentes se separaron con tripsina y luego se sembraron en placas de 6 o 96 pocillos.
<b>Administration of the test compound</b>			
Removed	8. The duration of exposure was suitable for the test system and investigated endpoints.	Not applicable	Se excluyó por falta de experiencia del usuario.
1	9. The concentrations used were suitable for the test system and investigated endpoints.	Fulfilled	Se evaluaron concentraciones de 6-gingerol (100 y 200 µM) o 5-FU (50 µM) durante 24, 48 y 60 h, respectivamente en la línea celular evaluada.
1	10. The test conditions during and after exposure to the test compound were suitable (media and serum used, cell density, incubation temperature, humidity, CO <sub>2</sub> concentration).	Fulfilled	Las condiciones de prueba fueron estables desde el inicio, hasta el final del experimento.

Continúa...

Data collection and analysis			
1	11. Reliable and sensitive tests and/or analytical methods were used for investigating the endpoints.	Fulfilled	La proliferación celular se ensayó de acuerdo con las instrucciones del fabricante del Cell Counting kit-8 (DOJINDO). El efecto del ciclo celular se evaluó por el kit de Análisis del Ciclo Celular (BD Biosciences). El análisis de apoptosis se realizó por medio de citometría de flujo.
1	12. Sufficient numbers of replicates or repetitions of the experiment were used to generate reliable and valid results.	Fulfilled	Todos los experimentos se realizaron por triplicado y se expresaron como media $\pm$ DE ( $n \geq 3$ ).
Removed	13. Measurements were collected at suitable time points in order to generate sensitive, valid and reliable	Not applicable	Se excluyó por falta de experiencia del usuario.
1	14. Cytotoxicity was measured and the test compound did not cause cytotoxicity that significantly affected the results.	Fulfilled	Se empleó como control negativo células sin tratamiento.
1	15. The statistical methods were clearly described and do not seem inappropriate, unusual or unfamiliar.	Fulfilled	El análisis estadístico se llevó a cabo utilizando el software SPSS 18.0.
Other			
1	16. Are there any other aspects of study design, performance or reporting that influence reliability?		No se realizó ningún comentario adicional del estudio, por falta de experiencia del usuario.

**Tabla S26. Relevancia (Zhang et al. 2017).**

Relevancia - Zhang et al. 2017		
Evaluation criteria	Selection	Comment
1. The identity of the tested substance	Directly relevant	Los rizomas de jengibre blanco chino autóctonos fueron suministrados por Tongling White Ginger Development Co., Ltd., China. Mediante análisis de HPLC se determinó la pureza del componente principal de la muestra en un 90,91% y por análisis de UPLC-TOF-MS/MS y NMR se determinó que el 6-gingerol era consistente con los espectros.
2. The test system used	Directly relevant	Las células Hela se obtuvieron de Shanghai Wei Atlas Biological Technology Co., LTD. Estas células de tipo cancerígeno permiten evaluar la apoptosis, provocado por el principio activo analizado.
3. The endpoint studied	Indirectly relevant	No se realizaron estudios clínicos donde se determine la actividad directamente involucrada en humanos, pero los criterios de valoración estudiados son adecuados para estudios <i>in vitro</i> .
4. The concentrations used	Indirectly relevant	Se desconoce aún si las concentraciones usadas son las adecuadas para un estudio clínico, por lo que se propone como investigación futura. Sin embargo las concentraciones reportadas mostraron buena actividad dentro de los valores evaluados para estudios <i>in vitro</i> .



**Tabla S27. Calidad metodológica (Zhang et al. 2014).**

Calidad metodológica - Zhang et al. 2014			
Weight/Removed	Evaluation criteria	Selection	Comment
<b>Test compound and controls</b>			
1	1. The test compound or mixture was unlikely to contain any impurities that may significantly have affected the results of the study.	Fulfilled	La saponina Paris VII (PS VII) con una pureza de >98% se adquirió de PureOne Biotechnology (Shanghai, China).
Removed	2. It was likely that the test compound was soluble at the concentrations used.	Not applicable	Se excluyó por falta de experiencia del usuario.
1	3. An appropriate solvent (vehicle) was used that is not expected to interfere with the results of the study at the concentration used.	Fulfilled	Las células Hela se sembraron en placas de 96 pocillos llenas de medio que contenía PS VII (10 mM HEPES/NaOH (pH 7,4), 140 mM NaCl, 2,5 mM CaCl 2) en diversas concentraciones.
Removed	4. A solvent (vehicle) control was included.	Not applicable	Se excluyó al no aplicar este ítem en la metodología de los experimentos realizados con metabolitos secundarios puros.
1	5. An appropriate positive control was included, and the expected result was observed from this treatment.	Not fulfilled	No se incluye un fármaco como control positivo de referencia para comparar los resultados.
<b>Test System</b>			
1	6. A reliable and sensitive test system (e.g., cell line / cells/ tissue / organ / embryo / sub-cellular fractions) with metabolic competence, if relevant, was used for investigating the test compound and endpoints.	Fulfilled	Línea celular de cáncer de cuello uterino humano (Hela), se obtuvo de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC, Manassas, VA, EE. UU.).
1	7. Conditions for cultivation and/or maintenance of the cell line / cells / tissue / organ / embryo / sub-cellular fractions (incubation temperature, humidity, CO2 concentration, media used, number of cell passages, control of contamination) were appropriate.	Fulfilled	La línea celular HeLa se mantuvo en medio DMEM suplementado con suero fetal bovino al 10%, 100 U/ml de penicilina y 100 U/ml de estreptomycin. Las células se mantuvieron en una atmósfera humidificada a 37 °C en CO2 al 5%.
<b>Administration of the test compound</b>			
Removed	8. The duration of exposure was suitable for the test system and investigated endpoints.	Not applicable	Se excluyó por falta de experiencia del usuario.
1	9. The concentrations used were suitable for the test system and investigated endpoints.	Fulfilled	La viabilidad de las células Hela tratadas con PS VII se expuso a diferentes concentraciones (1, 3, 10, 30 y 100 µM) durante 24 h. Se determinó mediante el ensayo MTT. En el que su IC50 fue de 2,62 ± 0,11 µM.
1	10. The test conditions during and after exposure to the test compound were suitable (media and serum used, cell density, incubation temperature, humidity, CO2 concentration).	Fulfilled	Las condiciones celulares durante y después de las pruebas, no se vieron alteradas y fueron las adecuadas.

Continúa...

Data collection and analysis			
1	11. Reliable and sensitive tests and/or analytical methods were used for investigating the endpoints.	Fulfilled	Dentro de la metodología se reportan pruebas de ensayos de MTT para la proliferación celular, pruebas de citometría de flujo, actividad de caspasa-3, análisis de Western Blot.
1	12. Sufficient numbers of replicates or repetitions of the experiment were used to generate reliable and valid results.	Fulfilled	Todos los experimentos se repitieron tres veces de forma independiente.
Removed	13. Measurements were collected at suitable time points in order to generate sensitive, valid and reliable data.	Not applicable	Se excluyó por falta de experiencia del usuario.
1	14. Cytotoxicity was measured and the test compound did not cause cytotoxicity that significantly affected the results.	Fulfilled	Las líneas celulares cancerígenas no tratadas se incluyeron como controles, con fines comparativos.
1	15. The statistical methods were clearly described and do not seem inappropriate, unusual or unfamiliar.	Fulfilled	Los datos se expresaron como media $\pm$ desviación estándar (DE). Los análisis estadísticos se realizaron utilizando la prueba ANOVA de una vía y la prueba t de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher para comparar los diferentes grupos. La probabilidad (valor P) de menos de 0,05 se consideró estadísticamente significativa.
Other			
1	16. Are there any other aspects of study design, performance or reporting that influence reliability?		No se realizó ningún comentario adicional del estudio, por falta de experiencia del usuario.

**Tabla S28.** Relevancia (Zhang et al. 2014).

Relevancia - Zhang et al. 2014		
Evaluation criteria	Selection	Comment
1. The identity of the tested substance	Directly relevant	La saponina Paris VII con una pureza de >98% se adquirió de PureOne Biotechnology (Shanghai, China).
2. The test system used	Directly relevant	Hela, una línea celular de cáncer de cuello uterino humano, se obtuvo de la American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, EE. UU.).
3. The endpoint studied	Indirectly relevant	Los criterios de valoración estudiados son relevantes para estudios <i>in vitro</i> , pero los resultados no son relevantes para la salud humana al no ser ensayos clínicos.
4. The concentrations used	Indirectly relevant	Las concentraciones administradas son relevantes para la exposición en estudios <i>in vitro</i> . Se deben realizar estudios clínicos para conocer los datos en humanos.

**Tabla S29. Calidad metodológica (Chen et al. 2019).**

<b>Calidad metodológica - Chen et al. 2019</b>			
<b>Weight/Removed</b>	<b>Evaluation criteria</b>	<b>Selection</b>	<b>Comment</b>
<b>Test compound and controls</b>			
1	1. The test compound or mixture was unlikely to contain any impurities that may significantly have affected the results of the study.	Fulfilled	La icaritina se adquirió de Yuanye Biotechnology (Shanghai, China). La pureza se midió por cromatografía líquida de alta resolución y se determinó que era del 99,6%.
Removed	2. It was likely that the test compound was soluble at the concentrations used.	Not applicable	Se excluyó por falta de experiencia del usuario.
1	3. An appropriate solvent (vehicle) was used that is not expected to interfere with the results of the study at the concentration used.	Fulfilled	Las soluciones madre de icaritina se prepararon en sulfóxido de dimetilo al 100% (DMSO, Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, Alemania).
Removed	4. A solvent (vehicle) control was included.	Not applicable	Se excluyó al no aplicar este ítem en la metodología de los experimentos realizados con metabolitos secundarios puros.
1	5. An appropriate positive control was included, and the expected result was observed from this treatment.	Not fulfilled	No se incluye control positivo como fármaco de referencia para comparara los resultados.
<b>Test System</b>			
1	6. A reliable and sensitive test system (e.g., cell line / cells / tissue / organ / embryo / sub-cellular fractions) with metabolic competence, if relevant, was used for investigating the test compound and endpoints.	Fulfilled	Las líneas celulares de cáncer de cuello uterino humano HeLa y SiHa, y las líneas celulares no cancerosas 293 y CCD-1095Sk se adquirieron de la American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, EE. UU.).
1	7. Conditions for cultivation and/or maintenance of the cell line / cells / tissue / organ / embryo / sub-cellular fractions (incubation temperature, humidity, CO <sub>2</sub> concentration, media used, number of cell passages, control of contamination) were appropriate.	Fulfilled	Las células se cultivaron a 37 °C con 5% de CO <sub>2</sub> de acuerdo con las instrucciones proporcionadas por la ATCC.
<b>Administration of the test compound</b>			
Removed	8. The duration of exposure was suitable for the test system and investigated endpoints.	Not applicable	Se excluyó por falta de experiencia del usuario.
1	9. The concentrations used were suitable for the test system and investigated endpoints.	Fulfilled	Células de cáncer de cuello uterino HeLa y SiHa tratadas con 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 30, 50 y 80 µM de icaritina, que según los resultado obtenidos encajan en las concentraciones evaluadas.
1	10. The test conditions during and after exposure to the test compound were suitable (media and serum used, cell density, incubation temperature, humidity, CO <sub>2</sub> concentration).	Fulfilled	La metodología usada al principio del ensayo se mantuvo acorde a los experimentos realizados por los investigadores.

Continúa...

Data collection and analysis			
1	11. Reliable and sensitive tests and/or analytical methods were used for investigating the endpoints.	Fulfilled	En la metodología empleada explican paso a paso el uso de la línea celular, específicamente el compuesto en el ensayo MTT, el ensayo de formación de colonias, ensayo de cicatrización de heridas. Especificando el tiempo, temperatura, cantidad.
1	12. Sufficient numbers of replicates or repetitions of the experiment were used to generate reliable and valid results.	Fulfilled	Los datos presentados son el promedio de tres experimentos independientes.
Removed	13. Measurements were collected at suitable time points in order to generate sensitive, valid and reliable data.	Not applicable	Se excluyó por falta de experiencia del usuario.
1	14. Cytotoxicity was measured and the test compound did not cause cytotoxicity that significantly affected the results.	Fulfilled	Se usó como control células de cáncer de cuello uterino HeLa y SiHa sin tratar con el extracto y tratadas con el extracto.
1	15. The statistical methods were clearly described and do not seem inappropriate, unusual or unfamiliar.	Fulfilled	Todos los análisis estadísticos se realizaron con el software GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, EE. UU.). Las comparaciones estadísticas entre dos grupos se realizaron mediante la prueba t de Student de dos colas no pareadas y las comparaciones multigrupo se realizaron mediante el uso de ANOVA de dos vías seguido de la prueba de Dunnett o Tukey. Se consideró que $P < 0,05$ indicaba una diferencia estadísticamente significativa.
Other			
1	16. Are there any other aspects of study design, performance or reporting that influence reliability?		No se realizó ningún comentario adicional del estudio, por falta de experiencia del usuario.

**Tabla S30.** Relevancia (Chen et al. 2019).

Relevancia - Chen et al. 2019		
Evaluation criteria	Selection	Comment
1. The identity of the tested substance	Directly relevant	La icaritina se adquirió de Yuanye Biotechnology (Shanghai, China). La pureza se midió por cromatografía líquida de alta resolución y se determinó que era del 99,6%.
2. The test system used	Directly relevant	Con base en informes previos en la literatura que demostraron la citotoxicidad de este compuesto contra una variedad de tipos de cáncer como lo son las líneas celulares de cáncer de cuello uterino humano HeLa y SiHa, y las líneas celulares no cancerosas 293 y CCD-1095Sk se adquirieron de la American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, EE. UU.).
3. The endpoint studied	Indirectly relevant	No se realizaron análisis clínicos para evaluar el efecto directo en humanos, pero los criterios de valoración estudiados son relevantes para este tipo de estudio <i>in vitro</i> .
4. The concentrations used	Indirectly relevant	Las concentraciones empleadas fueron las adecuadas para el ensayo <i>in vitro</i> realizado. Sin embargo se desconoce la actividad en estudios clínicos en humanos, por lo que se propone realizar una investigación posterior.

**Tabla S31. Calidad metodológica (Munagala et al. 2011).**

<b>Calidad metodológica - Munagala et al. 2011</b>			
<b>Weight/Removed</b>	<b>Evaluation criteria</b>	<b>Selection</b>	<b>Comment</b>
<b>Test compound and controls</b>			
1	1. The test compound or mixture was unlikely to contain any impurities that may significantly have affected the results of the study.	Fulfilled	La Withaferin A se adquirió de Chromadex (Irvine, CA).
Removed	2. It was likely that the test compound was soluble at the concentrations used.	Not applicable	Se excluyó por falta de experiencia del usuario.
1	3. An appropriate solvent (vehicle) was used that is not expected to interfere with the results of the study at the concentration used.	Not fulfilled	No se reporta el compuesto vehículo en el que se disolvió la Withaferin A para poder proceder con los experimentos celulares.
Removed	4. A solvent (vehicle) control was included.	Not applicable	Se excluyó al no aplicar este ítem en la metodología de los experimentos realizados con metabolitos secundarios puros.
1	5. An appropriate positive control was included, and the expected result was observed from this treatment.	Not fulfilled	No se incluye control positivo como fármaco de referencia para comparar los resultados.
<b>Test System</b>			
1	6. A reliable and sensitive test system (e.g., cell line / cells / tissue / organ / embryo / sub-cellular fractions) with metabolic competence, if relevant, was used for investigating the test compound and endpoints.	Fulfilled	Las células de cáncer de cuello uterino humano CaSki (VPH 16 + 18 positivo), HeLa (VPH 18 positivo), SiHa (VPH 16 positivo), C33a (VPH negativo) y queratinocitos epidérmicos humanos primarios (HEK <sub>n</sub> , normal) se obtuvieron de la American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA) fueron probados y autenticados citogenéticamente.
1	7. Conditions for cultivation and/or maintenance of the cell line / cells / tissue / organ / embryo / sub-cellular fractions (incubation temperature, humidity, CO <sub>2</sub> concentration, media used, number of cell passages, control of contamination) were appropriate.	Fulfilled	Las células de cáncer de cuello uterino se cultivaron en medio RPMI 1640 complementado con suero bovino fetal al 10%. Las células HEK <sub>n</sub> primarias se cultivaron en medios dérmicos de células basales complementados con componentes del kit de crecimiento de queratinocitos y antibióticos. Las células se mantuvieron en atmósfera humidificada que contenía 5% de CO <sub>2</sub> a 37 °C.
<b>Administration of the test compound</b>			
Removed	8. The duration of exposure was suitable for the test system and investigated endpoints.	Not applicable	Se excluyó por falta de experiencia del usuario.
1	9. The concentrations used were suitable for the test system and investigated endpoints.	Fulfilled	Para el ensayo de proliferación celular las células se trataron con WA (0–4 μM) durante 6–72 h. Los valores de IC <sub>50</sub> en orden ascendente fueron 0,2 ± 0,06, 0,45 ± 0,05, 1,0 ± 0,09 y 1,2 ± 0,1 μM para C33a, CaSki, HeLa y SiHa, respectivamente.
1	10. The test conditions during and after exposure to the test compound were suitable (media and serum used, cell density, incubation temperature, humidity, CO <sub>2</sub> concentration).	Fulfilled	En general, las condiciones en los experimentos durante y después son las adecuadas.

Continúa...

Data collection and analysis			
1	11. Reliable and sensitive tests and/or analytical methods were used for investigating the endpoints.	Fulfilled	Dentro de la metodología emplearon el ensayo de proliferación celular, ensayo de anexina V/yoduro de propidio para la apoptosis, análisis del ciclo celular por citometría de flujo, western blot, microscopia confocal, coimmunoprecipitación, qPCR, entre otros.
1	12. Sufficient numbers of replicates or repetitions of the experiment were used to generate reliable and valid results.	Fulfilled	Se realizaron evaluaciones <i>in vitro</i> de tres experimentos independientes para confirmar los resultados.
Removed	13. Measurements were collected at suitable time points in order to generate sensitive, valid and reliable data.	Not applicable	Se excluyó por falta de experiencia del usuario.
1	14. Cytotoxicity was measured and the test compound did not cause cytotoxicity that significantly affected the results.	Fulfilled	Para comparar los resultados se emplearon las células HEK293 (queratinocitos epidérmicos humanos primarios) como controles, reportando ser levemente afectadas por WA.
1	15. The statistical methods were clearly described and do not seem inappropriate, unusual or unfamiliar.	Fulfilled	Los puntos de datos que se muestran en las figuras representan la media $\pm$ DE. Las diferencias entre dos grupos se evaluaron utilizando la prueba t de Student. Las comparaciones entre grupos se realizaron mediante análisis de varianza. Se consideró estadísticamente significativo un valor de $p < 0,05$ .
Other			
1	16. Are there any other aspects of study design, performance or reporting that influence reliability?		<i>In vivo</i> la Withaferin A dio como resultado una reducción de casi el 70% del volumen del tumor en ratones desnudos atímicos con una tendencia esencialmente similar en la modulación de los marcadores moleculares <i>in vitro</i> .

**Tabla S32. Relevancia (Munagala et al. 2011).**

Relevancia - Munagala et al. 2011		
Evaluation criteria	Selection	Comment
1. The identity of the tested substance	Directly relevant	La Withaferin A se adquirió de Chromadex (Irvine, CA), es por esto que es un metabolito secundario de alta pureza.
2. The test system used	Directly relevant	En los ensayos se emplearon las células de cáncer de cuello uterino humano CaSki (VPH 16 + 18 positivo), HeLa (VPH 18 positivo), SiHa (VPH 16 positivo), C33a (VPH negativo) y queratinocitos epidérmicos humanos primarios (HEK293, normal) se obtuvieron de la American Type Culture Collection.
3. The endpoint studied	Indirectly relevant	En este trabajo no se realizaron estudios clínicos para evaluar el efecto directo en humanos, pero los criterios de valoración estudiados son relevantes para este tipo de estudio <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> .
4. The concentrations used	Indirectly relevant	Las concentraciones son ideales para ensayos <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> , pero aún se desconocen para ensayos clínicos.