

Ciencia Latina Revista Científica Multidisciplinar, Ciudad de México, México.
ISSN 2707-2207 / ISSN 2707-2215 (en línea), septiembre-octubre 2025,
Volumen 9, Número 5.

https://doi.org/10.37811/cl_rcm.v9i5

INDUCCIÓN DE TUMORES *IN OVO* PARA EL ESTUDIO DEL EFECTO ANTITUMORAL DEL EXTRACTO DE AJO ENVEJECIDO

INDUCTION OF *IN OVO* TUMORS FOR THE STUDY OF THE ANTITUMOR EFFECT OF AGED GARLIC EXTRACT

Carlos César Patiño Morales

Universidad Autónoma Metropolitana Cuajimalpa

Ricardo Jaime Cruz

Universidad Tecnológica de México-Campus Sur

Laura Villavicencio Guzmán

Hospital Infantil de México Federico Gómez, México

Marcela Salazar García

Hospital Infantil de México Federico Gómez, México

DOI: https://doi.org/10.37811/cl_rcm.v9i5.19745

Inducción de Tumores *in ovo* para el Estudio del Efecto Antitumoral del Extracto de Ajo Envejecido

Carlos César Patiño Morales¹

carloscsarpmorales@gmail.com

<https://orcid.org/0000-0003-1995-0308>

Hospital Infantil de México Federico Gómez
México

Universidad Autónoma Metropolitana
Cuajimalpa

Ricardo Jaime Cruz

ricardo.jaime.cruz@gmail.com

<https://orcid.org/0000-0002-0403-537X>

Universidad Tecnológica de México-Campus
Sur

México

Laura Villavicencio Guzmán

lauvillavi@gmail.com

<https://orcid.org/0000-0002-8314-8996>

Hospital Infantil de México Federico Gómez
México

Marcela Salazar García

msalazar@himfg.edu.mx

<https://orcid.org/0000-0001-5318-8148>

Hospital Infantil de México Federico Gómez
México

RESUMEN

En este trabajo se analizó el efecto del extracto de ajo envejecido (EAE) en células HeLa de cáncer cervicouterino mediante observación de cambios morfológicos, ensayo de viabilidad (MTT) y medición de p53 por western blot. En el modelo *in ovo*, se inocularon 4×10^6 células en la membrana corioalantoidea de embriones de pollo para generar tumores, posteriormente tratados con EAE. Se incluyó un grupo control y dos grupos con tratamiento, con seis embriones por grupo (calculados mediante G power). Se evaluó el tamaño tumoral mediante análisis morfométrico y la expresión de p53 por inmunohistoquímica. Los datos se analizaron con Kruskal Wallis y prueba de Dunn. En el modelo *in vitro*, el EAE al 10% y 20% produjo cambios morfológicos compatibles con muerte celular, reducción de viabilidad y aumento de p53 en forma dosis-dependiente. En el modelo *in vivo*, el tratamiento con EAE redujo aproximadamente 50% el tamaño tumoral e incrementó la expresión de p53 en el tejido. El extracto de ajo envejecido presenta un efecto antitumoral en células HeLa, posiblemente mediado por la sobreexpresión de p53. Dicho efecto se observa tanto *in vitro* como *in vivo*.

Palabras clave: antitumoral, cáncer, extracto de ajo envejecido, HeLa, *In ovo*

¹ Autor principal

Correspondencia: msalazar@himfg.edu.mx

Induction of In Ovo Tumors for the Study of the Antitumor Effect of Aged Garlic Extract

ABSTRACT

In this study, the effect of aged garlic extract (AGE) was analyzed in HeLa cervical cancer cells through the observation of morphological changes, a viability assay (MTT), and p53 measurement by western blot. In the *in ovo* model, 4×10^6 cells were inoculated into the chorioallantoic membrane of chicken embryos to generate tumors, which were subsequently treated with AGE. A control group and two treatment groups were included, with six embryos per group (sample size calculated using G*Power). Tumor size was evaluated through morphometric analysis, and p53 expression was assessed by immunohistochemistry. Data were analyzed using the Kruskal–Wallis test followed by Dunn’s post hoc test. In the *in vitro* model, AGE at 10% and 20% induced morphological changes consistent with cell death, reduced viability, and increased p53 expression in a dose-dependent manner. In the *in ovo* model, AGE treatment reduced tumor size by approximately 50% and increased p53 expression in the tissue. Aged garlic extract exerts an antitumor effect on HeLa cells, possibly mediated by p53 overexpression. This effect is observed both *in vitro* and *in vivo*.

Keywords: antitumor, cancer, aged garlic extract, HeLa, In ovo

Artículo recibido 23 agosto 2023

Aceptado para publicación: 26 septiembre 2023



INTRODUCCIÓN

El cáncer cervicouterino (CaCu) continúa siendo un problema importante de salud. Aunque se ha avanzado mucho en su prevención, todavía hay mujeres que mueren por esta enfermedad. Se sabe que la infección con el virus del papiloma humano es una causa necesaria pero no suficiente para el desarrollo del cáncer, debido a que además de la infección entran en juego múltiples factores como lo propios del virus (la persistencia, la carga viral o la variante) o propios de la paciente (como el estado físico e inmunológico, la edad de la menarca, el número de partos por canal vaginal, y hábitos como fumar o el consumo de alcohol) [1]. El tratamiento actual de este tipo de tumores consiste en radioterapia, quimioterapia, terapia hormonal, terapia inmunológica y cirugía, sin embargo, se han reportado tumores que son resistentes al tratamiento [2]. Es por ello que se sigue en la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas o moléculas coadyuvantes que sean efectivas para eliminar las células tumorales de manera selectiva, pero que a su vez sean accesibles para toda la población y que no afecten la calidad de vida de los pacientes. Los compuestos naturales han llamado la atención por su efectividad como coadyuvantes en el tratamiento de diversas patologías, incluyendo el cáncer. Además, estos compuestos pueden ser selectivos y dirigirse solo hacia células tumorales sin ocasionar efectos secundarios [3]. Estudios epidemiológicos y en animales han demostrado que el consumo de ajo y sus compuestos de azufrados reducen la incidencia de cáncer de estómago, esófago, colon, mama, piel, útero y pulmón [4]. Existen numerosas publicaciones que han confirmado la eficacia del ajo para la prevención y el tratamiento de una variedad de enfermedades validando de esta manera sus usos tradicionales [5]. El ajo se puede consumir en varias presentaciones, entre ellas como extracto de ajo envejecido (EAE), esta particular forma de preparación se produce al remojar el ajo en agua o etanol y sometiéndolo a envejecimiento natural durante un periodo mayor a 10 meses a temperatura ambiente.



Sus constituyentes incluyen compuestos hidrofílicos e hidrofóbicos, tales como S-alilcisteína (SAC), S-1-propenilcisteína (S1PC), S-alilmercaptocisteína (SAMC), y algunos componentes característicos que se encuentran en el ajo crudo, como aliina, γ -glutamyl-S-alilcisteína (GSAC) y γ -glutamyl-S-1-propenilcisteína (GS1PC), [6]. La s-allil-cisteína (SAC) es el compuesto activo y la molécula más abundante que se encuentra en el extracto de ajo envejecido y a la que se han atribuido múltiples efectos benéficos, entre ellos la acción antitumoral [7], también se reconoce su potencial antioxidante por la eliminación de especies reactivas de oxígeno como anión superóxido, peróxido de hidrógeno, radical hidroxilo y anión peroxinitrito. Además, es un componente no tóxico, soluble en agua, estable y fácilmente absorbido por diversos tejidos, incluido el cerebro [8]. A nivel molecular se ha demostrado que en algunos tipos de cáncer los compuestos del ajo pueden incrementar p53, este punto es importante porque esta proteína es un blanco terapéutico en CaCu; se sabe que en estos tumores p53 es *wild type* y su vía se encuentra intacta y es completamente funcional. Sin embargo, está enmascarada por la acción de las oncoproteínas virales, específicamente E6. Visto desde esta perspectiva, el restablecimiento de los niveles de p53 podría reactivar uno de los puntos de control principales dentro del ciclo celular, llevando a la célula tumoral a la apoptosis [9]. Aunque los compuestos naturales son moléculas con gran potencial terapéutico, es necesario hacer el escalamiento de su estudio a modelos *in vivo* para evaluar su toxicidad y para evaluar también su potencial como agentes antitumorales. Si bien muchos agentes probados *in vitro* parecen promisorios, pocos han sido exitosos en modelos preclínicos o en pacientes. El modelo más común utilizado para la detección de fármacos con potencial antitumoral es el modelo de xenoinjerto en ratones inmunosuprimidos que consiste en la introducción de células tumorales por vía subcutánea [10]. Los modelos de ratón son costosos, delicados y consumen mucho tiempo en el cuidado y mantenimiento, por lo que se necesita introducir nuevos modelos de los cuales



puedan obtenerse resultados rápidos, y que a su vez puedan contribuir a la identificación de terapias con el potencial de progresar hacia ensayos preclínicos o ensayos clínicos. La membrana corioalantoidea de pollo (CAM) se ha utilizado durante muchos años para apoyar el crecimiento de tumores [11]. Ha sido especialmente atractivo como modelo para estudiar la angiogénesis debido a la accesibilidad y visibilidad de los vasos sanguíneos en tumores [12]. La capacidad de las células para formar tumores en la CAM también se ha utilizado para investigar la biología tumoral, la capacidad de las células tumorales para invadir y hacer metástasis en el embrión y como una plataforma para analizar la eficacia de los fármacos contra el cáncer [13,14]. El modelo de CAM de *Gallus gallus domesticus* es un modelo económico, fácil de utilizar, no se requiere comprar alimento adicional para su mantenimiento y además no requiere un monitoreo tan frecuente como el modelo de ratón. Conjuntamente, como es un modelo inmunosuprimido de manera natural puede utilizarse para establecer xenotrasplantes a partir de líneas celulares tumorales humanas [15]. Este trabajo permitirá sentar las bases en el uso de un modelo *in ovo* para el estudio del efecto de compuestos naturales en cáncer cervicouterino, además permitirá hacer una aproximación al mecanismo molecular, mediante el cual compuestos como el EAE ejercen un efecto antitumoral. Este trabajo tiene la finalidad de analizar el efecto antitumoral del extracto de ajo envejecido mediado por el incremento en los niveles de p53 en modelo *in vitro*; con células HeLa y en tumores inducidos en la membrana corioalantoidea de embrión de pollo (*in ovo*). Para validar la funcionalidad del modelo *in ovo* como una alternativa para el estudio de la actividad antitumoral de compuestos naturales

METODOLOGÍA

Diseño experimental: Este trabajo se realizó en el laboratorio de Investigación en Biología del desarrollo y Teratogénesis Experimental del Hospital Infantil de México Federico Gómez. Por el empleo de los sujetos de estudio y la captación de la información, este estudio es experimental y prospectivo;



por la medición del fenómeno en el tiempo es transversal; y por la presencia de un grupo de control es comparativo. Se incluyeron embriones de pollo de 5 días de incubación e inducción efectiva de tumores en la membrana corioalantoidea (MCA) y cultivos de líneas celulares saludables a una confluencia del 70%. Se excluyeron cultivos contaminados, muestras con bajas concentraciones de proteínas y embriones de pollo con malformaciones congénitas. Los grupos de estudio fueron los siguientes. Para el modelo *in vitro*: 1) células sin tratamiento (grupo control), 2) células tratadas con 5% de EAE, 3) células tratadas con 10% de EAE, 4) células tratadas con 20% de EAE y 5) células tratadas con 30% de EAE. Para el modelo *in ovo* los grupos fueron: 1) tumores sin tratamiento, 2) tumores tratados con 10% de EAE y 3) tumores tratados con 20% de EAE. En cuanto a las variables, la variable independiente fue el tratamiento con EAE, y en cuanto a las variables dependientes fueron las siguientes: Viabilidad celular, niveles de p53 (proteína) y tamaño de los tumores. Se utilizaron líneas celulares provenientes de CaCu, adquiridas de ATCC y huevos fértiles adquiridos de la granja ALPES Puebla. El extracto de ajo envejecido fue adquirido con la empresa KYOLIC MX, S. DE R.L. DE C.V.

Cultivo celular: La línea celular HeLa fue cultivada en medio DMEM con 10% de suero fetal bovino y 1% de una solución de antibiótico antimicótico que contiene 10000 U/ml de penicilina G y 10000 µg/ml de estreptomycinina y 25µg/ml . Se mantuvieron a 37 °C y a una tensión de CO₂ del 5%. Se sembraron en placas de 6 pozos y después del tratamiento se registraron los cambios morfológicos utilizando un microscopio invertido de campo claro

Ensayo de viabilidad celular: Se realizó el ensayo como se ha descrito previamente [16]. Las células HeLa se sembraron en placas de 96 pozos a una densidad de 5,000 células por pozo y se trataron con EAE: 0, 5, 10, 20 y 30 % durante 24 horas. Se realizó el ensayo con Bromuro de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) para evaluar la viabilidad celular. Después del tratamiento se preparó una solución de MTT de 50 mg/ml en medio de cultivo y se agregó 100 µl en cada pozo y las placas se incubaron a 37 °C durante 3 horas, pasado este tiempo se retiró el medio y los cristales de formazán se disolvieron con DMSO, se realizó una lectura a 560 nm.

Western blot: Las células con y sin tratamiento se lisaron en buffer RIPA (Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, 150 NaCl mM, Nonidet P-40 al 1,0%, SDS al 0,1%) que contenía inhibidores de proteasa. Las muestras se prepararon en laemli buffer SDS (Tris-HCl 50 mM, pH 6,8, glicerol al 10%, 4% SDS, azul de



bromofenol al 0,5% y mercaptoetanol al 10%) y posteriormente se separaron 30 μg de proteínas mediante SDS-PAGE y se transferirán a membranas de nitrocelulosa de 0,45. Las membranas se incubaron durante la noche a 4 ° C con los anticuerpos primarios anti-p53 (1: 1000) y anti-GAPDH (1:1000), posteriormente se incubaron con el anticuerpo secundario acoplado a HRP durante 1 hora a temperatura ambiente. Todos los anticuerpos fueron colocados en TBS- Tween-leche al 6%. Las proteínas se visualizaron utilizando quimioluminiscencia utilizando una placa autorradiográfica y el análisis de la densitometría se realizó con el programa Image J.

Inducción de tumores en la membrana corioalantoidea (CAM) de *Gallus gallus*: Se realizó el ensayo como se ha descrito previamente [17]. Se obtuvieron huevos de gallina fertilizados de la granja Alpes, Puebla. Los huevos se incubaron a 38 ° C y 80% de humedad durante los primeros tres días. En el día 4 se abrió una ventana de 1 cm^2 en el extremo romo del huevo, retirando la cutícula y exponiendo la CAM, los huevos se sellaron con cinta adhesiva transparente y se incubaron en condiciones estáticas hasta el día 7, en este día se implantaron en la CAM 4 X 10⁶ células HeLa resuspendidas en 5 μl de matrigel. Antes de colocar la suspensión celular la CAM se lesionó por laceración con la punta de una pipeta. Los huevos se volvieron a sellar y después del establecimiento del tumor se les dio tratamiento durante 72 horas.

Inmunohistoquímica: Los tumores se extrajeron del huevo con ayuda de unas pinzas de disección y fueron fijados en paraformaldehído al 4%, posteriormente se deshidrataron a través de una serie de alcoholes (30-100%), se sumergieron en xileno y se embebieron en parafina, se realizaron cortes de 5 μm y se montaron en laminillas. Se realizó una incubación con anti p53(1:100) 1 hora a 37 °C, se realizaron tres lavados de 10 minutos con TBS-tween 20 y se incubaron con anti mouse-HRP (1:200) durante 1 hora a temperatura ambiente. Se utilizó diaminobencidina (DAB) como sustrato

Análisis estadístico: Todos los ensayos fueron realizados por triplicado. Se utilizó el software JAMOVI para la realización del análisis estadístico y la elaboración de las gráficas. Se realizó la prueba de Kruskal Wallis seguida de la prueba de Dunn. Los datos se representan como media \pm DE (desviación estándar), una $p < 0.05$ se tomó como estadísticamente significativa.

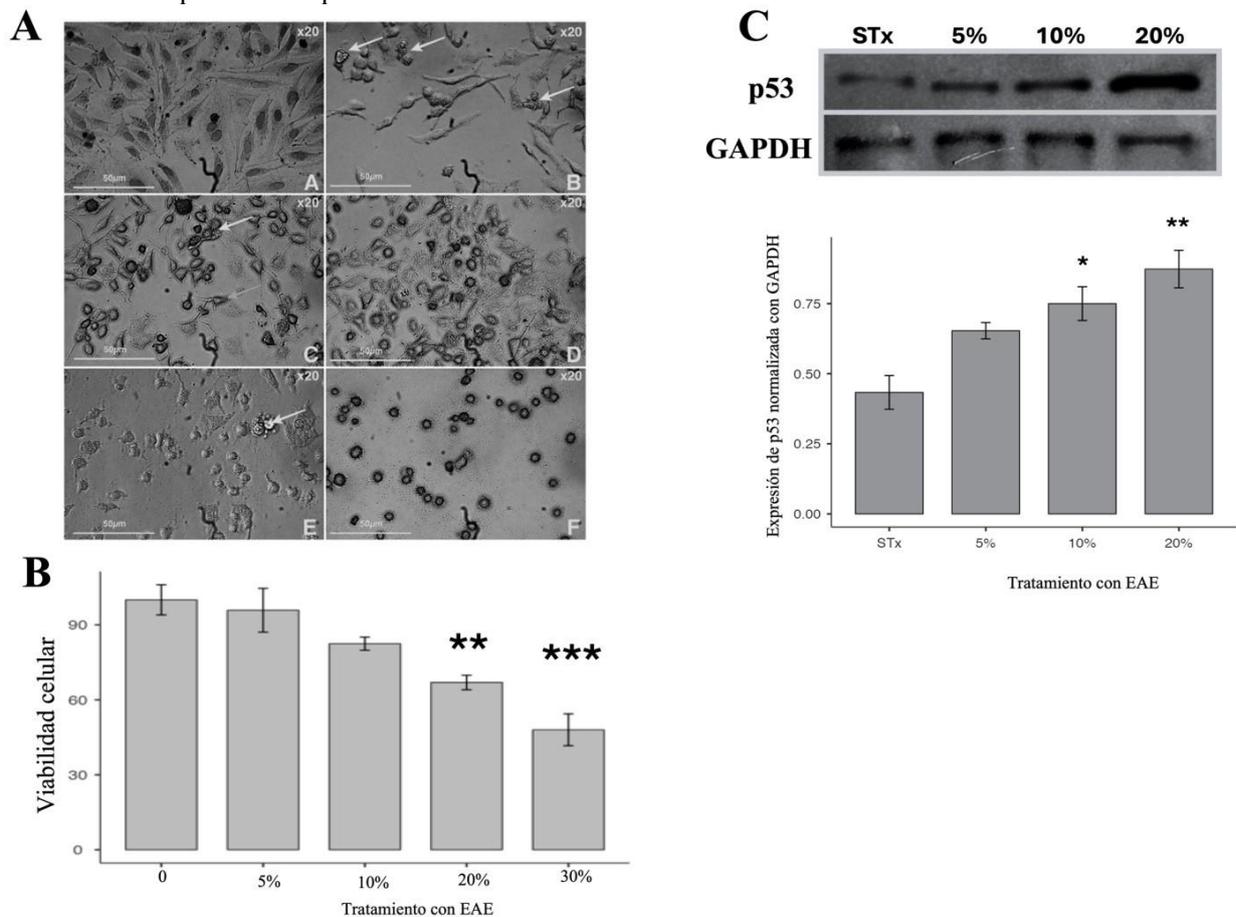


RESULTADOS

Cambios morfológicos sugerentes de muerte celular

Para demostrar el efecto del EAE en la morfología de células HeLa se realizaron tratamientos a cultivos celulares al 70% de confluencia, demostrando que el EAE induce cambios morfológicos sugerentes de muerte celular. Las células pierden comunicación entre sí, se desprenden del soporte y se forman cuerpos apoptóticos señalados con flechas (Figura 1 A). Se realizó además un ensayo de viabilidad celular con MTT demostrando que el tratamiento con EAE induce una disminución significativa en la viabilidad celular de una manera dosis dependiente (Figura 1 B). Se realizó el análisis de los niveles de p53 mediante western blot, observando que el tratamiento con EAE incrementa los niveles de p53. La dosis de 20% es la que ocasiono un incremento mayor en los niveles de p53 (Figura 1C).

Figura 1. Tratamiento de células HeLa en cultivo. A) Cambios morfológicos en las células tratadas, las flechas indican los cuerpos apoptóticos. B). Ensayo de viabilidad celular con MTT, C) Western blot de los niveles de p53 junto con su análisis densitométrico. Todos los grupos experimentales se compararon con el grupo control, los datos son representados con media \pm DE. Los asteriscos indican significancia estadística: ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$

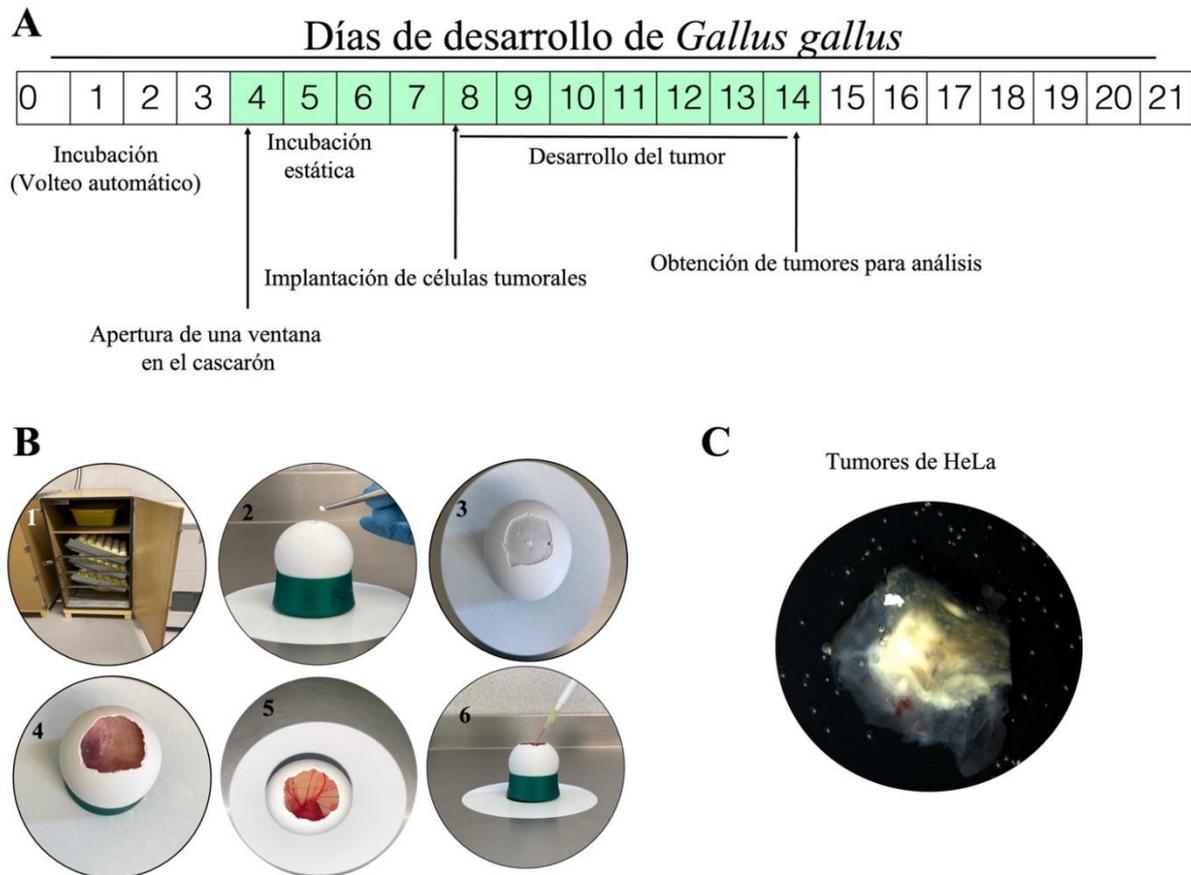


Inducción de tumores *in ovo*

Se realizó el establecimiento de tumores en la CAM del embrión de pollo, los huevos fertilizados de pollo se colocan en una incubadora con rotación automática. En el cuarto día de incubación se ha formado la CAM y los huevos se retiran de la incubadora y se desinfectan utilizando gasas rociadas con alcohol al 70%. se retiran suavemente pequeñas secciones de la cáscara del huevo desde el extremo romo utilizando pinzas de disección. Esto se hace para crear una ventana (~1 cm²) en la cáscara del huevo para exponer la membrana testácea externa. Esta membrana se sopla suavemente utilizando un bulbo de pipeta de Pasteur (para evitar que pequeños fragmentos de cáscara caigan en la cámara de aire) y se retira. Esto expone la membrana testácea interna que se encuentra al fondo de la cámara de aire; esta membrana debe retirarse con mucho cuidado para no dañar la vasculatura, exponiendo así la CAM para la inoculación de células tumorales. Finalmente, la ventana se sella con cinta transparente y el huevo se coloca en una incubadora estática a 37.5 °C con humedad constante (85%). El esquema general del procedimiento se esquematiza en la figura 2 A-C.



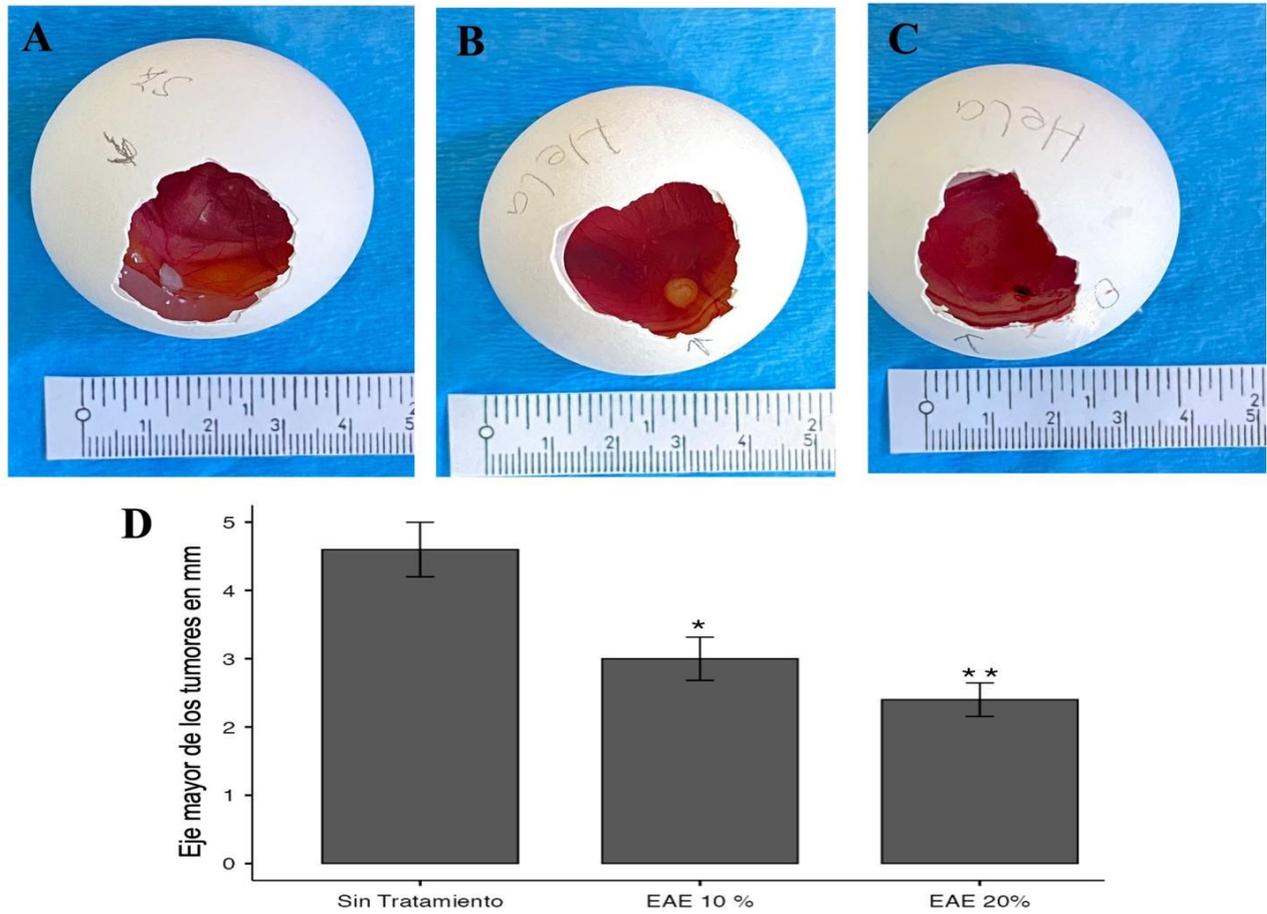
Figura 2. Estrategia general para la inducción de tumores *in ovo*. Se realizó la inducción de tumores para evaluar el efecto antitumoral del EAE. A) Se indican los días durante los cuales el embrión de pollo se desarrolla, B) 1-6 Se inicia incubando los huevos en movimiento constante, se retira el cascarón y las membranas testáceas, se expone la CAM y se inoculan las células tumorales. C) Una vez desarrollado el tumor, se retira del huevo y se procesa para análisis posteriores.



Tratamiento de tumores con EAE

Los tumores inducidos *in ovo* se trataron con EAE durante 72 horas (Figura 3 A-C). Después del tratamiento se realizó la medición del eje mayor de los tumores, el tratamiento disminuye el tamaño de los tumores en un 25% (dosis de 10%) y en un 50% (dosis de 20%). Indicando el efecto antitumoral del extracto estudiado.

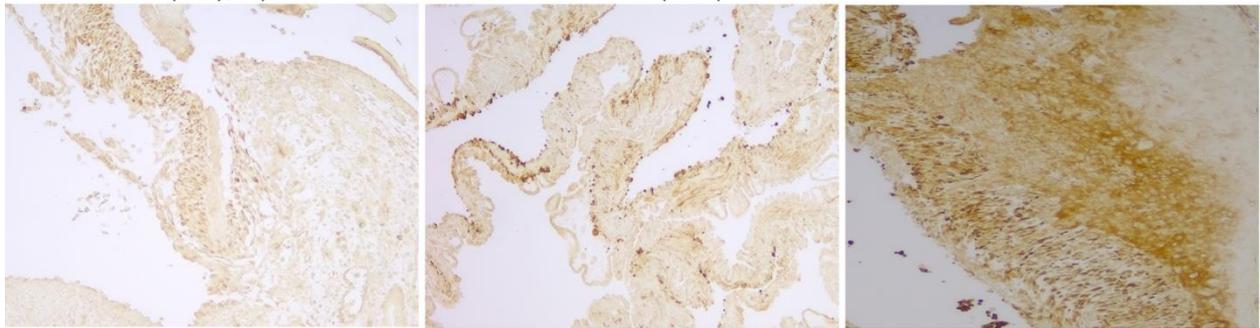
Figura 3. Tratamiento de los tumores inducidos en el modelo *in ovo*. A partir de la línea celular HeLa se indujeron tumores en la membrana corioalantoidea (CAM) de embrión de pollo, después del tratamiento de los tumores con EAE por 72 horas se observó una disminución en el tamaño de estos. Las flechas señalan los tumores dentro del huevo. A) Tumor sin tratamiento, B) Tumor tratado con EAE 10%, C) Tumor tratado con EAE 20%, D) Análisis del eje mayor. Los grupos experimentales se compararon con el grupo control, los datos son representados con media \pm DE. Los asteriscos indican significancia estadística: * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$



Inmnodetección de p53 en tumores inducidos *in ovo* tratados con EAE

Para comprobar el hallazgo *in vitro* en donde se observa un incremento en los niveles de p53, se midió por inmunohistoquímica p53 en secciones de los tumores inducidos *in ovo*, se observa que existe un incremento en la expresión de este marcador en tejido tratado comparado con el tejido sin tratamiento (Figura 4)

Figura 4. Expresión de p53 en tumores inducidos *in ovo* tratados con EAE. Secciones de tumores en los que se realizó la inmunodetección de p53 (+). A) Tumor sin tratamiento, B) tumor tratado con 10% de EAE (++), C) tumor tratado con 20% de EAE (+++).



DISCUSIÓN

El presente estudio proporciona evidencia sobre el efecto del extracto de ajo envejecido en la viabilidad de células HeLa, un modelo ampliamente utilizado para estudiar el cáncer cervical, así como en tumores inducidos *in ovo* (en la membrana corioalantoidea de embrión de pollo). Los resultados muestran que el extracto de ajo envejecido disminuye significativamente la viabilidad celular de las células HeLa en cultivo de una manera dosis-dependiente. Estos resultados están relacionados con estudios previos que han demostrado que el ajo y sus derivados, como el S- alilcisteína, poseen propiedades antitumorales debido a sus efectos antioxidantes, antiinflamatorios y de modulación de la apoptosis mediada por p53 [18, 19]. Se sabe que los compuestos sulfurados presentes en el ajo envejecido, como el S-alilcisteína, tienen propiedades que pueden modificar la actividad de diversas quinasas, inhibir la proliferación celular y favorecer la muerte celular programada [7].

p53 es considerado el guardián del genoma porque previene la transformación celular [20]. Aunque p53 está mutado en la mayoría de los cánceres, en el caso del cáncer cervical se conserva p53 de tipo silvestre y funcional [21]. Por lo tanto, si incrementa se pueden reactivar las vías de apoptosis [22]. La restauración de p53 puede ser una estrategia terapéutica prometedora. En este contexto, el ajo envejecido podría actuar como un agente quimioterapéutico natural, complementando o potenciando los tratamientos convencionales en la lucha contra el cáncer. El modelo *in ovo* utilizado en este estudio representa un avance significativo para la investigación de tratamientos anticancerígenos. La utilización del embrión de pollo como modelo para estudiar el crecimiento tumoral ofrece una serie de ventajas, como la observación directa de los efectos del tratamiento sobre el tumor. En este modelo, los tumores tratados

con extracto de ajo envejecido mostraron una disminución en el tamaño tumoral y un incremento en los niveles de p53, lo que sugiere que el extracto no solo afecta la viabilidad celular, sino que también interfiere con la tumorigénesis [13]. Este hallazgo es consistente con estudios anteriores que han indicado que el ajo y sus compuestos pueden inhibir el crecimiento de los tumores [23]. Además, el hecho de que el extracto de ajo envejecido haya mostrado eficacia tanto *in vitro* como *in vivo* demuestra su potencial como un agente coadyuvante terapéutico. Estos resultados refuerzan la idea de que los extractos naturales podrían jugar un papel importante en la medicina oncológica moderna, complementando las terapias convencionales y ofreciendo un enfoque menos tóxico en comparación con la quimioterapia convencional.

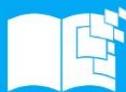
CONCLUSIONES

Este estudio destaca el potencial del extracto de ajo envejecido como un agente anticancerígeno, que podría tener aplicaciones tanto en la inhibición de la viabilidad celular como en la prevención de la progresión tumoral. Se justifica la realización de más investigaciones para explorar su aplicación en terapias complementarias y alternativas en el tratamiento del cáncer. Aunque los resultados obtenidos son prometedores, es importante señalar algunas limitaciones del estudio. En primer lugar, se debe realizar una mayor investigación sobre los mecanismos moleculares específicos a través de los cuales el ajo envejecido ejerce sus efectos antitumorales. El uso de modelos adicionales de cáncer y la evaluación de la toxicidad a largo plazo del extracto en modelos animales más complejos, también son cruciales para determinar la seguridad y la eficacia clínica de este tratamiento. Además, la variabilidad en la composición química del ajo envejecido según el proceso de preparación podría influir en los resultados, lo que sugiere que futuros estudios deberían estandarizar la preparación del extracto para garantizar su reproducibilidad.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Johnson, C. A., James, D., Marzan, A., & Armaos, M. (2019). Cervical cancer: An overview of pathophysiology and management. *Seminars in Oncology Nursing*, 35(2), 166–174.

<https://doi.org/10.1016/j.soncn.2019.02.003>



2. Yadav, G., Srinivasan, G., & Jain, A. (2024). Cervical cancer: Novel treatment strategies offer renewed optimism. *Pathology - Research and Practice*, 254, 155136.
<https://doi.org/10.1016/j.prp.2024.155136>
3. Sauter, E. R. (2020). Cancer prevention and treatment using combination therapy with natural compounds. *Expert Review of Clinical Pharmacology*, 13(3), 265–285.
<https://doi.org/10.1080/17512433.2020.1738218>
4. De Greef, D., Barton, E. M., Sandberg, E. N., Croley, C. R., Pumarol, J., Wong, T. L., Das, N., & Bishayee, A. (2021). Anticancer potential of garlic and its bioactive constituents: A systematic and comprehensive review. *Seminars in Cancer Biology*, 73, 219–264.
<https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2020.11.020>
5. Rana, S. V., Pal, R., Vaiphei, K., Sharma, S. K., & Ola, R. P. (2011). Garlic in health and disease. *Nutrition Research Reviews*, 24(1), 60–71.
<https://doi.org/10.1017/S0954422410000338>
6. Koderá, Y., Kurita, M., Nakamoto, M., & Matsutomo, T. (2020). Chemistry of aged garlic: Diversity of constituents in aged garlic extract and their production mechanisms via the combination of chemical and enzymatic reactions. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 19(2), 1574–1584. <https://doi.org/10.3892/etm.2019.8393>
7. Agbana, Y. L., Ni, Y., Zhou, M., Zhang, Q., Kassegne, K., Karou, S. D., Kuang, Y., & Zhu, Y. (2020). Garlic-derived bioactive compound S-allylcysteine inhibits cancer progression through diverse molecular mechanisms. *Nutrition Research*, 73, 1–14.
<https://doi.org/10.1016/j.nutres.2019.11.002>
8. Colín-González, A. L., Sánchez-González, M., Pérez-Vázquez, V., et al. (2012). The antioxidant mechanisms underlying the aged garlic extract- and S-allylcysteine-induced protection. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2012, 1–16.
<https://doi.org/10.1155/2012/907162>
9. Zhao, X., Sun, W., Ren, Y., & Lu, Z. (2021). Therapeutic potential of p53 reactivation in cervical cancer. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 157, 103182.
<https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2020.103182>



10. Swadi, R., Mather, G., Pizer, B. L., Losty, P. D., See, V., & Moss, D. (2018). Optimising the chick chorioallantoic membrane xenograft model of neuroblastoma for drug delivery. *BMC Cancer*, *18*(1), 28. <https://doi.org/10.1186/s12885-017-3978-x>
11. Ribatti, D. (2008). The chick embryo chorioallantoic membrane in the study of tumor angiogenesis. *Romanian Journal of Morphology and Embryology*, *49*(2), 131–135.
12. Ribatti, D., Nico, B., Vacca, A., Roncali, L., & Dammacco, F. (1997). New model for the study of angiogenesis and antiangiogenesis in the chick embryo chorioallantoic membrane: The gelatin sponge/chorioallantoic membrane assay. *Journal of Vascular Research*, *34*(6), 455–463.
13. Cimpean, A. M., Ribatti, D., & Raica, M. (2008). The chick embryo chorioallantoic membrane as a model to study tumor metastasis. *Angiogenesis*, *11*(4), 311–319. <https://doi.org/10.1007/s10456-008-9117-1>
14. Mani, S., Swargiary, G., & Singh, K. K. (2020). Natural agents targeting mitochondria in cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(19), 6992. <https://doi.org/10.3390/ijms21196992>
15. Schneider-Stock, R., & Ribatti, D. (2021). The CAM assay as an alternative in vivo model for drug testing. In *Handbook of Experimental Pharmacology* (Vol. 265, pp. 303–323). Springer. https://doi.org/10.1007/164_2020_375
16. Kumar, P., Nagarajan, A., & Uchil, P. D. (2018). Analysis of cell viability by the MTT assay. *Cold Spring Harbor Protocols*, *2018*(6), pdb.prot095505. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot095505>
17. Patiño-Morales, C. C., Jaime-Cruz, R., Ramírez-Fuentes, T. C., Villavicencio-Guzmán, L., & Salazar-García, M. (2023). Technical implications of the chicken embryo chorioallantoic membrane assay to elucidate neuroblastoma biology. *International Journal of Molecular Sciences*, *24*(19), 14744. <https://doi.org/10.3390/ijms241914744>
18. Nicastro, H. L., Ross, S. A., & Milner, J. A. (2015). Garlic and onions: Their cancer prevention properties. *Cancer Prevention Research*, *8*(3), 181–189. <https://doi.org/10.1158/1940-6207.CAPR-14-0172>



19. Kawasaki, H., & Nussbaum, G. (2025). Therapeutic potential of garlic, aged garlic extract and garlic-derived compounds on pancreatic cancer (Review). *Biomedical Reports*, 22(3), 54.
<https://doi.org/10.3892/br.2025.1932>
20. Lavin, M. F., & Gueven, N. (2006). The complexity of p53 stabilization and activation. *Cell Death & Differentiation*, 13(6), 941–950. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401925>
21. Srivastava, S., Tong, Y. A., Devadas, K., Zou, Z. Q., Chen, Y., Pirollo, K. F., & Chang, E. H. (1992). The status of the p53 gene in human papillomavirus positive or negative cervical carcinoma cell lines. *Carcinogenesis*, 13(7), 1273–1275.
<https://doi.org/10.1093/carcin/13.7.1273>
22. Goodwin, E. C., & DiMaio, D. (2000). Repression of human papillomavirus oncogenes in HeLa cervical carcinoma cells causes the orderly reactivation of dormant tumor suppressor pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(23), 12513–12518.
<https://doi.org/10.1073/pnas.97.23.12513>
23. Farhat, Z., Hershberger, P. A., Freudenheim, J. L., Mammen, M. J., Hageman Blair, R., Aga, D. S., & Mu, L. (2021). Types of garlic and their anticancer and antioxidant activity: A review of the epidemiologic and experimental evidence. *European Journal of Nutrition*, 60(7), 3585–3609. <https://doi.org/10.1007/s00394-021-02482-7>

