



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**PAPEL DE LAS ESPECIES REACTIVAS DEL
OXÍGENO EN LA CITOTOXICIDAD INDUCIDA POR
JACAREUBINA EN CÉLULAS DE GLIOBLASTOMA
HUMANO**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

BIÓLOGA

P R E S E N T A :

DIANELENA EUGENIO PÉREZ



**DIRECTOR DE TESIS:
DR. JOSÉ PEDRAZA CHAVERRI**

Ciudad Universitaria, CD. MX., 2023



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

ÍNDICE

RESUMEN.....	5
1. INTRODUCCIÓN.....	7
2. HIPÓTESIS.....	38
3. OBJETIVO GENERAL Y OBJETIVOS PARTICULARES.....	38
4. JUSTIFICACIÓN.....	38
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	39
6. RESULTADOS.....	47
7. DISCUSIÓN.....	58
8. CONCLUSIONES.....	68
9. REFERENCIAS.....	69
10. MATERIAL SUPLEMENTARIO.....	88

Lista de tablas y figuras

Figuras

1. Corte histológico de tumor de paciente con glioblastoma..... **Página 11**
2. Clasificación del glioblastoma.....**Página 19**
3. Estructuras de la jacareubina y su precursor, la benzofenona.....**Página 24**
4. Formación de especies reactivas del oxígeno a partir del radical superóxido.....**Página 27**
5. Estructuras del pro-fármaco temozolomida y su fármaco, el metildiazonio.....**Página 36**
6. Cromatografía en capa fina fase reversa de mezclas de xantonas, separadas con fase móvil acetoneitrilo:agua en proporciones 7:3.....**Página 47**
7. Cromatografía en capa fina fase reversa de mezclas de xantonas, separadas con fase móvil acetoneitrilo:agua en proporciones 7:3, con ácido acético al 0.5%.....**Página 47**
8. Cromatografía en capa fina fase reversa de mezclas de xantonas, separadas con fase móvil acetoneitrilo:agua en proporciones 5:5, con ácido acético al 0.5%.....**Página 48**
9. Cromatografía en capa fina fase reversa de mezclas de xantonas, separadas con fase móvil acetoneitrilo:agua en proporciones 6:4, con ácido acético al 0.5%.....**Página 48**
10. Cromatografía en capa fina fase reversa de mezclas de xantonas, separadas con fase móvil acetoneitrilo:agua en proporciones 65:35, con ácido acético al 0.5%.....**Página 49**
11. Curva concentración-respuesta de jacareubina para células de glioblastoma humano DBTRG-05.....**Página 52**
12. Curva concentración-respuesta de temozolomida para células de glioblastoma humano DBTRG-05.....**Página 53**
13. Intervalo de confianza al 95 % para las diferencias de las concentraciones efectivas de jacareubina y temozolomida..... **Página 53**
14. Curva concentración-respuesta de jacareubina para astrocitos de rata.....**Página 54**
15. Efecto de la jacareubina en los niveles de glutatión (GSH).....**Página 55**
16. Efecto de la jacareubina en los niveles de especies reactivas del oxígeno (ERO)...**Página 56**

17. Rangos para la actividad de las caspasas-3 y -7 tras los tratamientos sólo con jacareubina o en co-tratamiento con Trolox..... Página 57

Tablas

1. Cambios en incidencia, mortalidad y letalidad mundial de tumores cerebrales.....Página 24

2. Concentración inhibitoria media de la jacareubina en algunos tipos de células cancerosas y normales, con 48 horas de incubación.....Página 25

3. Asignaciones del espectro de resonancia magnética nuclear de hidrógeno de las fracciones 15 y 17.Página 50

4. Asignaciones del espectro de resonancia magnética nuclear de carbono de las fracciones 15 y 17.....Página 50

5. Asignaciones del espectro de resonancia magnética nuclear de hidrógeno de la fracción 16.....Página 51

6. Asignaciones del espectro de resonancia magnética nuclear de carbono de la fracción 16.....Página 51

7. Cociente CI_{50} astrocitos/ CI_{50} células de glioblastoma.....Página 55

8. Resumen de resultados.....Página 67

Un tumor es ingenio, fuerza, adaptación. Un tumor es poesía, merece ser tratado con inteligencia y respeto.

RESUMEN

El cáncer es una de las principales causas de muerte a nivel mundial, lo cual está relacionado con tratamientos ineficientes que, además, ocasionan efectos colaterales. En particular, el glioblastoma, tumor primario más frecuente y letal del sistema nervioso central, representa un problema de salud pública relevante. Este tipo de cáncer se considera incurable, siendo la media de supervivencia de 15 meses tras el diagnóstico, lo cual evidencia problemas en el tratamiento estándar. Además, la incidencia del glioblastoma ha aumentado en los últimos años. De esta manera, es evidente la necesidad de desarrollar nuevas estrategias terapéuticas. En este contexto, existen diversos productos naturales que representan una alternativa al tratamiento, pues poseen actividad anticarcinogénica, así como baja toxicidad en células no cancerosas. En este trabajo, se evaluó el efecto citotóxico de la xantona jacareubina, aislada del duramen de *Calophyllum brasiliense*, en la línea celular de glioblastoma humano DBTRG-05. Además, se determinó la toxicidad de este compuesto en astrocitos no tumorales. Asimismo, en las células de glioblastoma, se evaluó la modulación del estado redox celular como posible mecanismo de acción. Notablemente, se encontró que la jacareubina ejerce un efecto tóxico en células de glioblastoma, desde concentraciones menores a 10 μM , las cuales no generan toxicidad en astrocitos no tumorales (disminución de la viabilidad con concentraciones $>10 \mu\text{M}$). Además, se observó que la jacareubina presenta mayor potencia que el fármaco estándar en el tratamiento del glioblastoma, la temozolomida. Respecto a la modulación del estado redox como mecanismo de citotoxicidad, se halló que la jacareubina reduce los niveles del antioxidante glutatión (GSH) y aumenta los de las especies reactivas del oxígeno (ERO), las cuales pueden conducir a distintos tipos de muerte. En conclusión, la jacareubina induce un

efecto tóxico en las células DBTRG-05, el cual no se presenta en astrocitos, y aumenta los niveles de ERO.

1. INTRODUCCIÓN

El cáncer es un conjunto de enfermedades que pueden afectar a cualquier parte del cuerpo y son provocadas por un grupo de células que proliferan sin control y de manera autónoma, invadiendo localmente y a distancia otros tejidos ¹, lo cual puede comprometer la función de órganos vitales o alterar la fisiología corporal ². El cáncer representa un problema de salud pública, siendo una de las principales causas de muerte a nivel mundial ¹, lo cual se asocia a que las terapias actuales no son eficientes, ya que se presenta farmacorresistencia o reincidencia tras el tratamiento ³. Además, la acción de los fármacos empleados no es específica, pues tienen efectos tóxicos en células no cancerosas, ocasionando efectos colaterales ⁴.

En este contexto, algunos compuestos naturales representan una alternativa al tratamiento del cáncer, ya que se ha descrito que poseen actividad anticarcinogénica, así como baja toxicidad en células no cancerosas ⁵⁻⁷. Además, se ha evidenciado que algunos de ellos potencian el efecto de agentes antineoplásicos empleados en la actualidad ^{5,8}. Un metabolito secundario de origen vegetal, potencial para el desarrollo de fármacos que puedan emplearse en el tratamiento del cáncer, es la xantona prenilada jacareubina. Se ha reportado que esta xantona reduce la viabilidad de células de distintos tipos de cáncer a concentraciones bajas ⁹⁻¹², las cuales no tienen efectos tóxicos en células no cancerosas ¹³. No obstante, los mecanismos de acción implicados en el efecto citotóxico de la jacareubina en células cancerosas no se han estudiado ampliamente y sólo se ha descrito, en células de cáncer cervical, que la jacareubina induce arresto del ciclo celular y apoptosis ¹¹. Por lo cual, en este trabajo se evaluó la modulación de las especies reactivas del oxígeno (ERO) por parte de la jacareubina, empleando células de glioblastoma, tumor incurable del sistema nervioso central. Previamente, se ha encontrado que la modulación de las ERO está involucrada en la inducción de muerte celular y en el efecto dual, es decir, citotóxico en células cancerosas e inocuo en células normales, de diversos compuestos ¹⁴.

1.1. Glioblastoma

1.1.1. Biología y características clínicas

El glioblastoma es el tumor primario del sistema nervioso central más frecuente y con mayor letalidad ¹⁵. Históricamente, se consideraba a los astrocitos como los responsables del origen de este tipo de tumores. No obstante, recientemente se propuso que se trata de células troncales de la capa astrocítica de la zona subventricular ^{16,17}. Debido a que las células troncales neurales tienen un mayor periodo de proliferación que los astrocitos ^{18,19} y, por lo tanto, tienen más tiempo para adquirir mutaciones, se planteó que estas células probablemente originan tumores cerebrales ^{16,17}. Lee y colaboradores realizaron diversas pruebas al respecto ¹⁶. Notablemente, hallaron que el tejido de la zona subventricular de pacientes con glioblastoma comparte mutaciones con el tejido tumoral ¹⁶. Además, al mutar algunos genes supresores de tumores y oncogenes en la zona subventricular (nicho de células troncales y progenitoras) en ratones, encontraron que las células mutadas migraban a la corteza, donde originaban tumores. Por otro lado, al mutar estos genes en células corticales, éstas no migraban ni formaban tumores ¹⁶. Asimismo, al seguir la formación de clonas derivadas de una sola célula del tumor, no encontraron células que presentaran solo las mutaciones compartidas, lo cual descarta la posibilidad de que células del tumor con estas mutaciones migraran a la zona subventricular ¹⁶. Por lo tanto, estas observaciones sugieren que las células troncales y progenitoras de la zona subventricular son capaces de originar un glioblastoma. De hecho, al modificar en murinos genes supresores de tumores en células con expresión del gen para la proteína ácida fibrilar glial (GFAP, presente en células troncales y en astrocitos) se forman gliomas (más del 85% de tipo glioblastoma, el resto de tipo glioma grado III ²⁰), cuya formación es inhibida por la eliminación de células que co-expresan nestina (células troncales) ²¹, sugiriendo que las células troncales neurales pueden formar tumores de tipo glioblastoma. No obstante, las células con expresión de nestina fueron eliminadas empleando un vector con timidina cinasa del virus

herpes simplex y administrando ganciclovir a las 8 semanas de edad ²¹. Debido a ello, este estudio no descarta que las células de origen hayan dado lugar, en estas 8 semanas, a células troncales tumorales (con expresión de nestina), encargadas del mantenimiento tumoral, pero no responsables del origen del tumor. Asimismo, debe considerarse y descartarse la posibilidad de que estas células que originan tumores sean astrocitos reactivos, los cuales también expresan nestina ²².

Por otro lado, también en ratones, se ha encontrado que al mutar genes supresores de tumores directamente en células progenitoras de neuronas y en células progenitoras de oligodendrocitos, éstas forman tumores semejantes al glioblastoma ^{23,24}. En contraste, recientemente, se evaluó la capacidad tumorigénica de células con mayor diferenciación (progenitores tardíos de neuronas, neuroblastos y neuronas maduras) y se encontró que ninguna es capaz de formar tumores intracraneales ²⁵, evidenciando que, conforme avanza el grado de diferenciación, las células neurales pierden la capacidad de generar un glioblastoma.

Respecto a los astrocitos como posibles células de origen, que estas células formen tumores es difícil, pues tienen un menor tiempo de proliferación y baja probabilidad de adquirir mutaciones ^{18,19}. No obstante, esta alternativa no se descarta, pues, en ese tiempo, los astrocitos pueden adquirir mutaciones que los lleven a dediferenciación o que promuevan procesos oncogénicos. Por ejemplo, un grupo de investigación que evaluó la posibilidad de dediferenciar astrocitos maduros de murinos, encontró que, en un contexto *Trp53*^{-/-}, al generar sobreexpresión del gen serina/treonina cinasa AKT1 (*Akt1*), el proto-oncogén MYC (*Myc*), o ambos, aumentan los marcadores de células progenitoras y troncales, mientras que los niveles de GFAP, proteína característica de astrocitos maduros, disminuyen ²⁶. Además, bajo estas condiciones aumenta la proliferación celular ²⁶. Estos resultados sugieren que, si un astrocito adquiere mutaciones en *TP53* (con lo cual se hace más vulnerable a obtener otras mutaciones ²⁷) y después adquiere mutaciones en oncogenes como *AKT1* o *MYC*, puede sufrir

desdiferenciación y un aumento en proliferación. Con esto, al ganar otras mutaciones (la desdiferenciación aumenta el tiempo en que la célula puede mutar ^{18,19} y el estado de *TP53* lo favorece), podría adquirir más características distintivas de células cancerosas (*hallmarks* del cáncer ²⁸) y originar un tumor.

De hecho, otro trabajo reportó que la introducción de genes para formas activas de la GTPasa KRas (KRAS) y AKT, en astrocitos de ratones con delección del gen del inhibidor 2 de cinasas dependientes de ciclinas (*Cdkn2a*), induce la formación de tumores con características del glioblastoma humano ²⁹. No obstante, el aumento en la actividad de KRAS y AKT en astrocitos de ratones silvestres para *Cdkn2a* no es suficiente para formar gliomas, aunque estas alteraciones sí forman tumores a partir de células progenitoras ²⁹. Además, otros datos de este artículo sugieren que el papel de la delección de *Cdkn2a* es desdiferenciar a los astrocitos ²⁹. De esta manera, es posible que los astrocitos también sean células de origen del glioblastoma, pero en una menor proporción de pacientes, pues tienen la barrera de la diferenciación y menor tiempo para adquirir mutaciones. De cualquier manera, se requieren más estudios al respecto, por ejemplo, para buscar mutaciones compartidas en astrocitos no tumorales de pacientes con glioblastoma.

Otro aspecto relevante de la biología de este tipo de tumor es su capacidad de infiltrarse en el parénquima adyacente rápidamente, la cual está asociada a baja prognosis ^{30,31}. La migración celular y la subsecuente invasión del parénquima sano resultan, en gran medida, del establecimiento de zonas de hipoxia en el tumor ³¹. Existen dos hipótesis en torno a la generación de estas zonas. La primera explica que durante el desarrollo del tumor ocurren patologías vasculares (regresión de los vasos pre-existentes o trombosis), que resultan en una deficiente distribución de oxígeno a las células tumorales que rodean a estos vasos ³². La segunda considera que, conforme las células cancerosas proliferan, la demanda de oxígeno

supera la cantidad provista por la vasculatura, de tal suerte que las células más distantes a ésta son sometidas a hipoxia ³².

El desarrollo de zonas hipóxicas genera una respuesta que incluye migración celular hacia áreas con mayor cantidad de oxígeno. Este fenómeno resulta en la infiltración de células cancerosas en el parénquima cerebral sano ³¹. De hecho, la migración celular inducida por hipoxia genera un arreglo celular, patognomónico del glioblastoma, denominado arreglo en pseudoempalizada, que consta de una zona hiper celular que rodea a un foco necrótico y fibrótico (Figura 1) ³². Este arreglo resulta de la migración de células en condiciones de hipoxia hacia fuera del foco hipóxico (fenómeno evidenciado por la presencia de marcadores de respuesta a hipoxia y de migración en la zona hiper celular) y de la muerte por necrosis de las células que no fueron capaces de migrar ³².

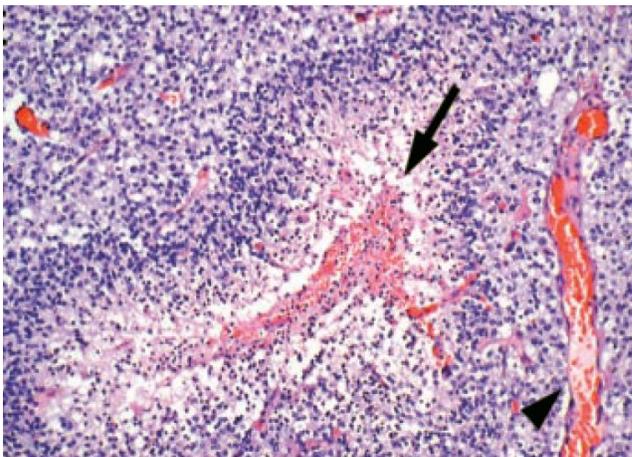


Figura 1. Arreglo en pseudoempalizada. Corte histológico de tumor de paciente con glioblastoma. Se aprecia en el centro un vaso en degeneración (flecha) rodeado, primero, de una zona necrótica y, después, del área hiper celular, que, se presume, consta de células migrando en búsqueda de una nueva fuente de oxígeno (vasos sanos, punta de flecha). Imagen del artículo de Brat et al., publicado en 2004 ³².

El principal mediador de la respuesta a hipoxia es el factor inducido por hipoxia (HIF)1; factor de transcripción que, en condiciones de hipoxia, se activa e induce la transcripción de sus genes blanco ³³, que incluyen genes que codifican para proteínas que participan en procesos de migración ³³ y se encuentran sobre-expresadas en glioblastoma. Por ejemplo, HIF1 induce la expresión del proto-oncogén, receptor tirosina cinasa MET, cuyo producto es un receptor que

se une al factor de crecimiento de hepatocitos (HGF/SF), el cual conduce a la migración de células de glioma ³⁴. Asimismo, se encontró que, al someter a células de glioblastoma a condiciones de hipoxia, aumentan los niveles de HIF1 α , lo cual resulta en un incremento en los niveles de la caja homeótica de unión a la caja E con dedos de Zinc (ZEB1) ³⁵, factor de transcripción que participa en la transición proneural-mesenquimal, proceso análogo a la transición epitelio-mesénquima, que genera un tipo de glioblastoma más agresivo ³⁶.

En torno a la clasificación del glioblastoma, este tipo de tumor es un glioma difuso grado IV, según la clasificación de la Organización Mundial de la Salud (OMS) ³⁷. Los gliomas se reconocen histológicamente por su semejanza con células gliales (la mayoría de las células de glioblastoma semejan astrocitos) y los gliomas difusos se caracterizan por no mostrar bordes definidos. Por otra parte, los gliomas grado IV se reconocen histológicamente por presentar señales de angiogénesis, hiper celularidad, atipia nuclear, figuras mitóticas, pleomorfismo y necrosis. Es importante mencionar que los pacientes con este tipo de gliomas presentan menor supervivencia que los de gliomas de menor grado ¹⁵.

El glioblastoma se puede clasificar en primario o secundario, según se haya originado *de novo* o tras la progresión de un glioma de menor grado. El glioblastoma primario es más frecuente (90% de los pacientes) y se presenta en pacientes de mayor edad (media de 55 años vs. 40 años en pacientes con glioblastoma secundario); asimismo, es más común en hombres, mientras que el glioblastoma secundario es más habitual en mujeres. Cabe destacar, que las alteraciones genéticas en *P53* y en isocitrato deshidrogenasa 1 (*IDH1*) son más frecuentes en el subtipo secundario, mientras que los pacientes del subtipo primario presentan, con mayor frecuencia, mutaciones en el gen homólogo a fosfatasa y tensina (*PTEN*), sobreexpresión del gen del receptor del factor de crecimiento epidermal (*EGFR*), y deleciones en el cromosoma 10

Además de esta clasificación, se han diseñado sistemas de clasificación basados en criterios moleculares. Por ejemplo, los tumores se pueden clasificar de acuerdo a la presencia de mutaciones en los genes *IDH1* e *IDH2*. Se ha reportado que un 70 a 80% de los pacientes con glioblastoma secundario presentan mutaciones en estas enzimas, mientras que solamente el 3.7% de pacientes con glioblastoma primario las presentan ³⁸. Estas mutaciones tienen valor pronóstico. Los pacientes con mutaciones en *IDH* presentan una media de supervivencia de 31 meses, contra la media de 15 meses de pacientes con *IDH* silvestre ³⁸. Además, los pacientes con estas mutaciones muestran una mejor respuesta al fármaco antineoplásico temozolomida ¹⁵. La mejor prognosis se podría explicar por una menor tasa de crecimiento tumoral, debida a la generación, por parte de enzimas *IDH* mutantes, del metabolito D-2-hidroxiglutarato (D-2-HG). Este metabolito regula negativamente la glucólisis ³⁹, vía que, en gliomas de tipo *IDH_{WT}*, favorece la proliferación celular y el crecimiento tumoral ⁴⁰. Asimismo, el D-2-HG bloquea la vía del blanco de rapamicina en mamíferos (mTOR), la cual también promueve la proliferación celular ⁴⁰. Además, este oncometabolito inhibe a la ATP sintasa, lo cual, junto con la inhibición de la glucólisis, genera un estado de estrés energético en las células, haciéndolas más vulnerables a muerte ⁴⁰. Con estos efectos el tumor crecería más lento, pues habría menos proliferación y más muerte.

Por otro lado, en tumores con *IDH* mutante, la mejor respuesta a temozolomida resulta de varios factores. La temozolomida tiene dos mecanismos de acción relevantes, la inducción de estrés oxidante y el daño al ADN ⁴¹. En tumores con *IDH_{mut}* disminuyen los niveles de NADPH, que participa en el restablecimiento o activación de componentes del sistema antioxidante ⁴². Su disminución en *IDH_{mut}* genera niveles basales de ERO mayores que en *IDH_{WT}* y mejora la respuesta a temozolomida ⁴². Respecto al daño al ADN inducido por este fármaco, el metabolito 2-HG bloquea la acción de enzimas involucradas en su reparación, permitiendo la persistencia de las alteraciones y la subsecuente muerte celular ^{42,43}.

Aparte de este sistema de clasificación, se han propuesto otros dos basados en el transcriptoma tumoral. Primero, Phillips y colaboradores ⁴⁴ propusieron una clasificación que separaba al glioblastoma en tres entidades, el subtipo proneural, caracterizado por la expresión de genes asociados a neurogénesis, el subtipo proliferativo, distinguido por niveles elevados de marcadores de proliferación (como topoisomerasa II α y el antígeno nuclear de proliferación celular, PCNA), y el subtipo mesenquimal, en el cual se observa una alta expresión de marcadores de angiogénesis y componentes de matriz extracelular. El subtipo proneural está caracterizado por una alta expresión de marcadores de neuroblastos y neuronas, mientras que los otros dos subtipos presentan mayor expresión de marcadores de células troncales y multipotentes. Asimismo, los tumores de tipo proneural presentan menor frecuencia de ganancias en el cromosoma 7 y pérdidas del cromosoma 10, en contraste con los otros subtipos. El subtipo proneural también muestra menos pérdidas de *PTEN* y ganancias de *EGFR*, así como una mayor activación de Notch. Cabe destacar que esta clasificación presentó valor pronóstico, presentando los pacientes del subtipo proneural una mayor supervivencia que los de los otros dos subtipos ⁴⁴.

Después, en 2010, Verhaak y colaboradores propusieron una clasificación que se emplea en la actualidad y que separa al glioblastoma en 4 subtipos, denominados clásico, mesenquimal, proneural, y neural ⁴⁵. El subtipo clásico se caracteriza por alteraciones en *EGFR*, las cuales incluyen amplificaciones, mutaciones puntuales y la expresión de un receptor constitutivamente activo, denominado VIII. Además, estos tumores carecen de mutaciones en *P53* y frecuentemente presentan delección de *CDKN2* y una alta expresión de marcadores de células troncales o progenitoras ⁴⁵. Este subtipo podría corresponder al subtipo proliferativo de la clasificación anterior, al presentar regulación positiva de vías proliferativas (delección de *CDKN2* y aumento en la actividad de *EGFR*) y marcadores de células troncales. Por otro lado, el subtipo mesenquimal se caracteriza por la delección del gen para neurofibromina 1 (*NF1*), la

expresión de marcadores mesenquimales y el aumento en la expresión de miembros de la familia de factores de necrosis tumoral, así como de la vía del factor nuclear kappa B (NF-κB). Asimismo, los tumores del subtipo mesenquimal presentan una elevada expresión de marcadores de microglía ⁴⁵. El subtipo proneural presenta alteraciones en el gen del receptor alfa del factor de crecimiento derivado de plaquetas (*PDGFRA*), que constan de amplificaciones, alta expresión y mutaciones puntuales. Además, en este subtipo, son comunes las alteraciones en *P53* e *IDH1*. Este subtipo de glioblastoma también presenta una alta expresión de marcadores del desarrollo de oligodendrocitos ⁴⁵. Por último, el subtipo neural expresa genes expresados en neuronas diferenciadas. Notablemente, este estudio describió que se presenta una mayor sobrevida en pacientes del subtipo proneural, así como una mejor respuesta a tratamiento agresivo en pacientes de los subtipos mesenquimal y clásico ⁴⁵.

En un mismo tumor pueden presentarse células de distintos subtipos, predominando uno de los subtipos. Notablemente, el subtipo neural suele encontrarse en la periferia del tumor ^{46,47}; además, este subtipo no presenta alteraciones génicas características, lo cual sugiere que esta firma puede resultar de la presencia de células no cancerosas en la muestra. De hecho, en 2017, se realizó una clasificación de glioblastoma basada en el transcriptoma, únicamente de células cancerosas, eliminando el de células del estroma ⁴⁸. En este estudio solamente se identificaron los subtipos proneural, mesenquimal y clásico, dando soporte al hecho de que la firma neural deriva de células sanas del parénquima adyacente al tumor ⁴⁸.

Cabe destacar que, en este interesante estudio, también encontraron que la pureza del tumor, es decir, el grado en que predomina un tipo celular en el mismo, dista entre los pacientes ⁴⁸. Al analizar el valor pronóstico de la clasificación basada en genes intrínsecos al glioma no encontraron diferencias en sobrevida entre los pacientes de los distintos subtipos; no obstante, al restringir el análisis a tumores de alta pureza, hallaron valor pronóstico para esta clasificación, siendo la media de sobrevida de los pacientes de subtipo mesenquimal menor a la

de los pacientes de los otros dos subtipos (medias de 11.5, 14.7, y 17 meses para pacientes de los subtipos mesenquimal, clásico y proneural, respectivamente). Por otra parte, en el subtipo proneural, encontraron una correlación positiva entre pureza del tumor y sobrevida ⁴⁸.

En este estudio aportaron también más información en torno a los diferentes subtipos tumorales, específicamente en torno a los tipos de células infiltradas en los tumores. El subtipo mesenquimal presenta una alta proporción de células infiltradas, entre las que se encuentran macrófagos M1 y M2, así como neutrófilos. Por otro lado, el subtipo clásico se caracteriza por la elevada infiltración de células dendríticas y el subtipo proneural por una reducción significativa de la cantidad de células T CD4⁺ ⁴⁸.

Dentro del subtipo proneural, se propuso realizar otra clasificación con valor pronóstico. Esta clasificación se basa en el grado de metilación del ADN en zonas específicas de determinados loci, denominadas islas CpG, que son regiones de ADN con un alto contenido de guaninas y citosinas. Se encontraron dos grupos de pacientes, aquellos que presentan hipermetilación en estas zonas (fenotipo G-CIMP) y aquellos que no ^{49,50}. El grupo G-CIMP podría corresponder al grupo de pacientes IDH mutante, pues se observó que este grupo presenta una alta frecuencia de mutaciones en esta enzima y, como se mencionó previamente, estas mutaciones resultan en hipermetilación del ADN.

Notablemente, los pacientes con fenotipo G-CIMP eran más jóvenes que los demás pacientes del subtipo proneural y su diferencia en sobrevida era considerable, mostrando, los pacientes con hipermetilación, una media de 150 semanas y, los pacientes sin hipermetilación, una media de 42 semanas. El grupo G-CIMP se caracteriza por una alta frecuencia de mutaciones en el gen para la helicasa ATRX (proteína asociada al síndrome alfa-talasemia con retraso mental ligado al cromosoma X), así como por amplificaciones del oncogen *MYC*. Además, este tipo de tumores presenta menos amplificaciones del cromosoma 7 y regulación negativa de genes asociados a

invasión y al subtipo mesenquimal, lo cual puede explicar la mejor prognosis. Asimismo, este grupo de pacientes tiene una alta frecuencia (79% de los pacientes vs 46% de pacientes sin fenotipo G-CIMP) de hipermetilación en el promotor del gen O6-metilguanina-ADN-metiltransferasa (*MGMT*), cuyo producto (enzima del mismo nombre) remueve grupos alquilo del ADN y es capaz de revertir la alquilación inducida por temozolomida, confiriendo resistencia a este fármaco, estándar en el tratamiento de glioblastoma. Este hecho también puede explicar la mejor prognosis ^{49,50}.

En 2012, otro grupo de investigación realizó una clasificación de tumores de glioblastoma, basada también en grado de metilación del ADN. Notablemente, este estudio incluyó tumores provenientes de niños, adolescentes, adultos jóvenes y adultos ⁴⁷. Al realizar la clasificación, se hallaron 6 subgrupos de tumores, cada uno caracterizado por un rango de edad ⁴⁷. Estos investigadores también clasificaron los tumores con base en el sistema de Verhaak y colaboradores ⁴⁵, encontrando, dentro del subtipo proneural, 3 tipos de tumores con distinto grado de metilación. La clasificación descrita en el párrafo anterior, que también se basó en metilación, encontró dos grupos de tumores dentro del subtipo proneural, los tumores G-CIMP y los tumores sin hipermetilación ^{49,50}. En este trabajo se encontró, dentro del subtipo proneural, un grupo con hipermetilación que correspondería al grupo G-CIMP (la hipermetilación característica de tumores IDH_{mut} sólo se halló en este grupo, sugiriendo que la mayoría de los pacientes IDH_{mut} se ubican en este grupo del subtipo proneural) ⁴⁷. Asimismo, se encontraron otros dos tipos de tumores que se ubicarían dentro de los tumores sin hipermetilación, el grupo PDGFRA, caracterizado por amplificaciones de este gen, y el grupo K27, caracterizado por mutaciones que generan sustituciones en el residuo de aminoácido K27 de la variante H3.3 de la histona 3 (estas alteraciones resultan en cambios transcripcionales) ⁴⁷. El grupo PDGFRA está enriquecido en tumores de pacientes adultos jóvenes, mientras que el grupo K27 consta de tumores de pacientes niños. Notablemente, se apreció que los tumores del

grupo K27 presentan una ubicación característica; estos tumores se desarrollan en estructuras de la línea media del sistema nervioso central, como el tálamo, el puente o la médula espinal, mientras que el resto de tumores se desarrollan en hemisferios cerebrales ⁴⁷.

Respecto a los otros 3 grupos de tumores, se encontró un tipo caracterizado por sustituciones en el residuo de aminoácido G34 en H3.3 (estas alteraciones también resultan en cambios transcripcionales), baja expresión de los factores de transcripción de oligodendrocitos (OLIG) 1 y 2, e hipometilación global ⁴⁷. Este tipo de tumores se presentan en pacientes adolescentes y se encontraron dentro de los subtipos proneural, mesenquimal y clásico de la clasificación de Verhaak y colaboradores ⁴⁵. De esta manera, dentro de estos subtipos se encontrarían tumores G34_{mut}. Determinar si un tumor de cierto subtipo transcripcional es de tipo G34_{mut} tendría importancia en la clínica pues los pacientes con estos tumores muestran mayor sobrevida que aquellos sin esta mutación.

Acerca de los otros dos tipos, se encontraron grupos con patrones de metilación característicos que estaban enriquecidos en los subtipos mesenquimal y clásico de Verhaak y colaboradores ⁴⁵, respectivamente ⁴⁷. Se describió un rango amplio de edad en el subtipo mesenquimal (edades de 2-85 años, con media de 47 años) y enriquecimiento de pacientes adultos en el subtipo clásico ⁴⁷. De esta manera, considerando los resultados de este estudio, del estudio anterior de metiloma, y los del estudio de transcriptoma de Verhaak y colaboradores ⁴⁵, se podrían clasificar los tumores en varios subtipos y cada subtipo en grupos, tal como se muestra en la Figura 2.

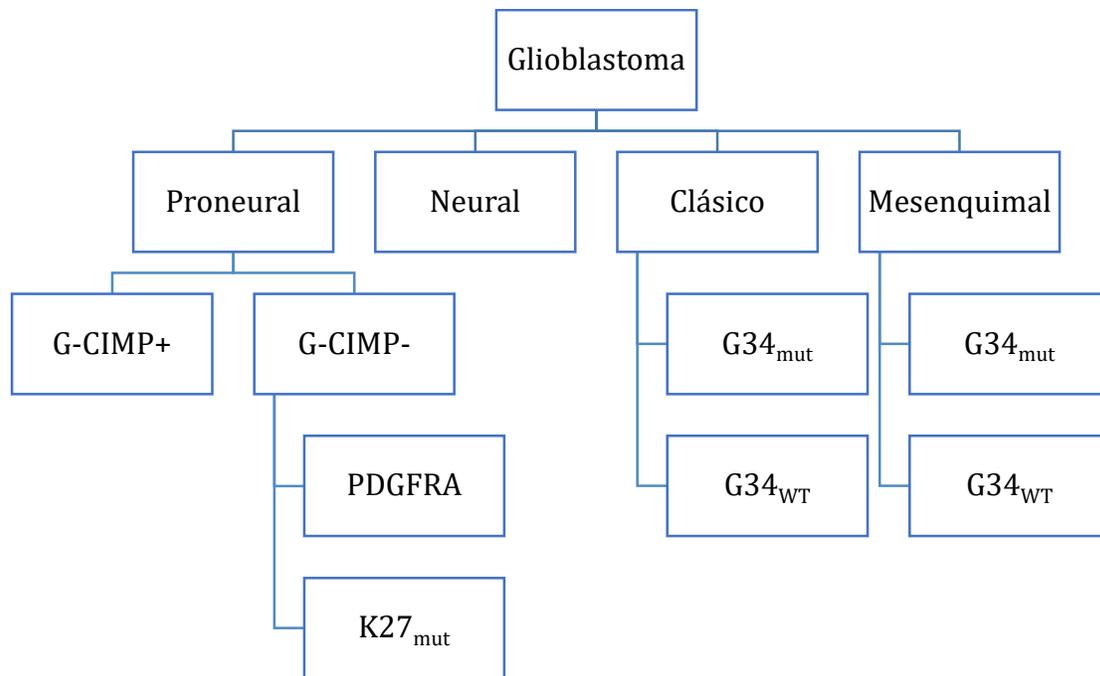


Figura 2. Clasificación del glioblastoma, considerando los estudios de transcriptoma y grados de metilación del ADN.

Pasando al tema de la presentación clínica de esta patología, se han descrito varios síntomas en los pacientes. En un estudio observacional realizado en adultos con glioblastoma, se encontró que los principales son dolor de cabeza (57% de los pacientes), pérdida de memoria (39%), cambios cognitivos (39%), problemas motores (36%) y en habla (36%), cambio de personalidad (27%), convulsiones (24%), problemas visuales (21%), cambios en la conciencia (18%), náusea y vómito (15%), problemas sensoriales (12%), y papiledema (inflamación del nervio óptico, al entrar al ojo, debida al aumento en presión intracraneal, se presenta en 5% de los pacientes) ⁵¹.

El dolor de cabeza, la náusea y el vómito se deben al aumento en la presión intracraneal debido al crecimiento tumoral ⁵², mientras que los problemas neurológicos resultan de la compresión de estructuras cerebrales ⁵³. Por otro lado, las convulsiones se generan por alteraciones en las redes neurales y por un aumento en la concentración extracelular de

glutamato y potasio. Las redes neurales están alteradas en esta patología por la muerte neural (debida a excitotoxicidad resultante del aumento del exporte de glutamato por células de glioma), así como por fenómenos de plasticidad neuronal, axonal y sináptica. Estas alteraciones resultan en la disminución de vías inhibitorias y el aumento en vías excitatorias, resultando en convulsiones ⁵⁴.

En relación al aumento extracelular de glutamato, éste se debe, principalmente, a un incremento en la expresión de la subunidad catalítica del transportador cistina/glutamato (SXC) en algunos pacientes con glioblastoma ⁵⁵⁻⁵⁸. Estos transportadores meten a la célula cistina y sacan glutamato, por lo cual su sobre-expresión resulta en un aumento en los niveles extracelulares de este neurotransmisor excitador y en convulsiones ⁵⁹. Además, en pacientes con glioblastoma, la barrera hematoencefálica está dañada, resultando en la extravasación de glutamato del suero sanguíneo, lo cual también contribuye al aumento en su concentración en el parénquima cerebral ^{54,60}. Asimismo, en pacientes con mutaciones en la enzima isocitrato deshidrogenasa (mutación común en glioblastoma secundario, el cual deriva de otro astrocitoma de menor grado), se produce el metabolito oncogénico 2-hidroxisuccinato, el cual tiene una estructura similar al glutamato y genera los mismos efectos ⁶¹.

De igual manera, una disminución en la señalización por GABA (señales inhibitorias) contribuye al efecto excitador del glutamato. La señalización por GABA está alterada en glioblastoma debido a una disminución en la expresión y actividad del cotransportador de cloro y potasio (KCC2), el cual saca iones cloro de la célula, manteniendo una mayor concentración de este ion en el exterior. De esta manera, en condiciones normales, GABA se une a su receptor (canal de Cl⁻ dependiente de ligando), generando su apertura, la subsecuente entrada de cloro e hiperpolarización. No obstante, al estar alterada la función de KCC2, se presenta una mayor concentración de cloro en el interior de la células, ocasionando que, al unirse GABA y abrirse el canal de cloro, este ion salga de la célula teniendo un efecto despolarizante ⁶².

Respecto al incremento en los niveles de potasio, éste también deriva de la alteración de la barrera hematoencefálica, pues permite el flujo de albúmina del suero sanguíneo, el cual puede ser tomado por astrocitos perivasculares. La acumulación de albúmina en astrocitos genera la inhibición de canales rectificadores de K^+ , disminuyendo la capacidad amortiguadora de este ion de los astrocitos. Además, también filtra fibrinógeno de la sangre al parénquima, que, junto con la albúmina, pueden inducir astrogliosis reactiva que también comprometería la capacidad amortiguadora de los astrocitos, generando hiperexcitabilidad y convulsiones ⁵⁴.

Finalmente, en relación al deceso de los pacientes con glioblastoma, éstos fallecen debido a que el crecimiento del tumor genera presión sobre el tallo cerebral, estructura que regula y mantiene las funciones cardíaca y respiratoria ⁶³. La presión sobre esta estructura resulta en paro cardíaco y respiratorio.

1.1.2. Abordaje clínico y datos epidemiológicos

El glioblastoma se considera un tipo de cáncer incurable, pues no existen terapias que sean eficientes. A pesar del tratamiento, se presenta una media de sobrevida de 15 meses tras el diagnóstico ¹⁵. El abordaje actual consta de cirugía de remoción de la masa tumoral, seguida de quimioterapia (con el fármaco temozolomida) combinada con radioterapia. Este acercamiento busca eliminar la mayor cantidad de células con la cirugía y las remanentes con la quimioterapia y radioterapia. No obstante, la cirugía presenta una gran limitante, la ubicación del tumor. En cirugías de resección de otros tipos de tumores, por ejemplo, de mama, es posible remover centímetros de margen del tumor; sin embargo, en el caso del glioblastoma, solo se pueden remover milímetros de margen (que contiene células cancerosas, pues el glioblastoma es un tumor infiltrativo), ya que, si se remueven cantidades mayores de tejido cerebral, se comprometerían funciones relevantes.

Además, la radioterapia y quimioterapia también presentan problemas, entre los que destaca la resistencia de algunas células tumorales a estas estrategias. Los tumores de glioblastoma presentan una subpoblación de células cancerosas, denominadas células troncales tumorales, las cuales son resistentes a ambos tratamientos y son capaces de restablecer el tumor ^{21,64}.

Asimismo, las modalidades de radioterapia que se aplican actualmente en pacientes con glioblastoma implican la aplicación directa de radiación hacia el tumor ⁶⁵, lo cual genera que células de la periferia del tumor o células cancerosas presentes en el parénquima adyacente reciban dosis subletales de radiación. Por ejemplo, en México, las modalidades de radioterapia recomendadas por instituciones de salud pública son radioterapia conformacional, estereostática, radiocirugía, y braquiterapia ⁶⁵. En la radioterapia conformacional, se obtienen imágenes del tumor (por tomografía computarizada o resonancia magnética) y un equipo aplica radiación directamente al tumor ⁶⁶. En la radioterapia estereostática, se fija la cabeza del paciente con un soporte y se aplica radiación intensa en una pequeña parte del tumor ⁶⁶. Respecto a la radiocirugía, la radiación se aplica durante una cirugía, en la cual, se aparta el tejido sano y se dirige la radiación hacia el tumor ⁶⁶. Por último, la braquiterapia consta del uso de implantes de material radiactivo en el centro del tumor ⁶⁶. De esta manera, en todos los casos, existen células cancerosas sometidas a cantidades subletales de radiación.

Notablemente, se ha encontrado que la radiación subletal de células cancerosas permite la activación de mecanismos pro-sobrevivencia, entre los que se encuentra un aumento en la migración celular, que permite a las células escapar de la radiación ⁶⁷. De esta manera, la radiación subletal en ciertas células cancerosas permite que la patología persista y puede explicar la observación de que la reincidencia en pacientes con glioblastoma ocurre en el área contigua al primer tumor.

Cabe destacar que el abordaje clínico para glioblastoma también ocasiona efectos colaterales. La quimioterapia y radioterapia afectan funciones cognitivas. Existen estudios que indican que los pacientes bajo este esquema de tratamiento pueden desarrollar problemas de aprendizaje, memoria y motores ^{68,69}. Asimismo, se ha reportado que, en roedores, la temozolomida reduce la regeneración neuronal en el hipocampo ⁷⁰.

De igual manera, se pueden presentar complicaciones graves en la cirugía, entre las que se encuentran daño vascular o al parénquima cerebral sano, hematomas, convulsiones, hidrocefalia, y trombosis vascular profunda, entre otros ⁷¹.

Además de estos problemas, el tratamiento es altamente costoso, por ejemplo, el esquema estándar de quimioterapia consiste en tomar 1 cápsula de temozolomida (100 mg) al día, durante 25 días, posteriormente, cada 20 días, tomar 2 o 3 cápsulas durante una semana, hasta completar 6 meses de tratamiento ⁷². Una caja con 5 cápsulas de temozolomida tiene un costo promedio de 55 salarios mínimos (salario mínimo 2022), por lo tanto, la quimioterapia completa cuesta aproximadamente 932 salarios mínimos (salario mínimo 2022).

No conforme con los problemas con el tratamiento, la incidencia y mortalidad mundial de tumores cerebrales ha aumentado en años recientes (Tabla 1) ^{73,74}. Asimismo, existen informes de diversos países (Inglaterra, Estados Unidos y Australia, entre otros) que indican que la incidencia de glioblastoma ha incrementado en los últimos años ^{75,76}. Estas tendencias se pueden atribuir a un aumento en la exposición a los factores de riesgo del glioblastoma, entre los que destacan el uso de teléfonos celulares y la exposición a agroquímicos ⁷⁷⁻⁸¹. En ambos casos, la proporción de la población expuesta a estos factores continúa aumentando. En este contexto, es evidente la necesidad de encontrar nuevos fármacos que permitan abordar de manera eficiente este creciente problema de salud.

Tabla 1. Cambios en incidencia, mortalidad y letalidad mundial de tumores cerebrales ^{73,74}.

Año	Incidencia	Mortalidad	Letalidad
2012	256,213	189,382	73.92%
2018	296,851	241,037	81.20%

Este trabajo busca evaluar el efecto citotóxico y los mecanismos involucrados del metabolito secundario vegetal jacareubina, en células de glioblastoma humano. Este estudio se realizó en la línea celular DBTRG-05, que representa un modelo apropiado de esta enfermedad, pues presenta alteraciones cromosómicas y genéticas comunes en la clínica (Tabla Suplementaria 1) ⁸². Además, muestra características fenotípicas, como resistencia a fármacos y radiación, que son frecuentes en los pacientes con este padecimiento ⁸³.

1.2. Jacareubina

La jacareubina es un metabolito secundario presente en el duramen del árbol *Calophyllum brasiliense* Cambess (Calophyllaceae), especie que se distribuye en América Latina, desde Brasil hasta México ^{9,84,85}. En México, esta especie se ubica principalmente en el sur de Veracruz, oeste de Tabasco y norte de Chiapas ⁹. La jacareubina pertenece al grupo de las xantonas y, al haber sido la tercera xantona aislada del duramen de *C. brasiliense* en México ⁸⁵, en algunos trabajos se le denomina xantona III. Las xantonas son compuestos con un esqueleto C6-C1-C6, derivados de la benzofenona (Figura 3). Pueden ser simples o modificadas por algún sustituyente ⁹, la jacareubina posee un sustituyente isoprenilo que se encuentra formando un pirano.

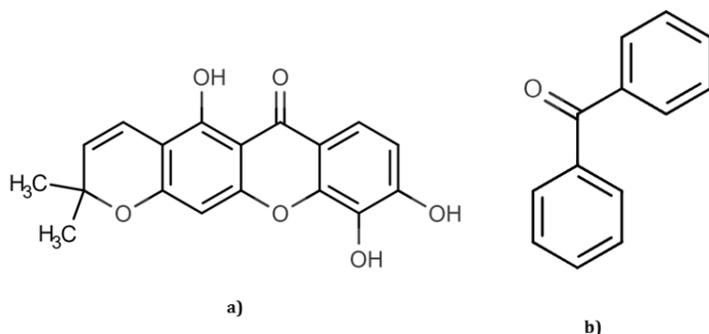


Figura 3. Estructuras de la jacareubina (a) y su precursor, la benzofenona (b), en la cual se aprecia la estructura C6-C1-C6 que caracteriza a las xantonas.

Se ha descrito que la jacareubina presenta actividad antitumoral en diversas líneas celulares cancerosas, entre ellas, líneas de cáncer cervical, de laringe, hepático, linfoma, y glioblastoma (Tabla 2) ⁹⁻¹². Sin embargo, los mecanismos involucrados en este efecto no se han evaluado ampliamente. Únicamente se ha informado que la jacareubina induce arresto del ciclo celular y apoptosis en células de cáncer cervical ¹¹.

Notablemente, las concentraciones a las cuales se ha observado que la jacareubina reduce la viabilidad de células cancerosas no son tóxicas en células normales (Tabla 2) ¹³. Esto revela que la jacareubina es un compuesto potencial para el desarrollo de fármacos que eliminen efectivamente a células cancerosas, sin tener efectos negativos en células normales y, por lo tanto, sin ocasionar efectos secundarios.

Tabla 2. Concentración inhibitoria media de la jacareubina en algunos tipos de células cancerosas y normales, con 48 horas de incubación.

Tipo celular	CI₅₀ (μM)	Referencia
Linfoma	3.4	9
Glioblastoma	2.7	9
Cáncer cervical	1.1	11
Cáncer de laringe	2.5	9
Cáncer de pulmón	6.9	11
Células sanguíneas periféricas mononucleares proliferativas	104.5	13
Células sanguíneas periféricas mononucleares en fase G ₀	122.5	13

Además, la concentración inhibitoria media (CI₅₀) encontrada para temozolomida, fármaco estándar en el tratamiento de glioblastoma, en la línea celular de glioblastoma U251,

es de 57.6 μM ⁸⁶, mientras que la de jacareubina es de 2.7 μM ⁹. Lo anterior demuestra que, en este modelo de estudio, la jacareubina presenta una mayor potencia.

De esta manera, es relevante estudiar los mecanismos involucrados en los efectos citotóxico y dual (tóxico en células cancerosas y no tóxico en normales) de la jacareubina.

1.3. Especies reactivas del oxígeno (ERO)

Un mecanismo que podría estar involucrado en el efecto citotóxico de la jacareubina en células cancerosas y que también podría explicar el efecto dual de esta xantona, es el aumento en los niveles celulares de ERO. Las ERO son moléculas oxidantes que, en altas concentraciones, pueden inducir daño celular al reaccionar con diversas biomoléculas, alterando su función biológica ⁸⁷. Las ERO incluyen radicales libres, como los radicales superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) e hidroxilo ($\text{OH}\cdot$), así como moléculas no radicales, como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el anión peroxinitrito ($\text{OONO}\cdot$) ⁸⁷.

La principal fuente de ERO son los complejos I y III de la cadena de transporte de electrones mitocondrial, donde el oxígeno molecular se reduce por un electrón, formando el $\text{O}_2^{\cdot-}$, que se considera la especie reactiva primaria, al ser capaz de formar otras ERO ¹⁴ (Figura 4). Este radical puede recibir un electrón y dos protones, formándose el H_2O_2 . Esta reacción es catalizada por la enzima superóxido dismutasa (SOD) ⁸⁸. El H_2O_2 puede ser metabolizado por diversas enzimas antioxidantes; por ejemplo, la catalasa, que produce agua y oxígeno. No obstante, si el H_2O_2 reacciona con un metal reducido como el Fe^{2+} y el Cu^+ , recibe un electrón proveniente de éste, con lo cual se rompe en un anión hidroxilo y un $\text{OH}\cdot$, que es la especie del oxígeno más reactiva. Esta reacción se denomina reacción de Fenton ⁸⁸.

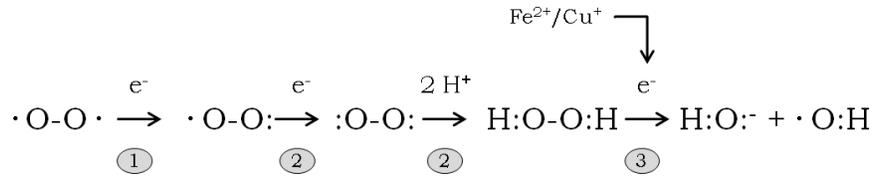
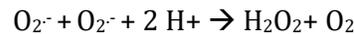


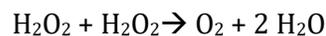
Figura 4. Formación de especies reactivas del oxígeno (ERO).

Las ERO producidas en el metabolismo son neutralizadas por el sistema antioxidante endógeno, cuyos componentes se dividen en enzimáticos y no enzimáticos. Respecto a los componentes enzimáticos, los más relevantes son las enzimas SOD y catalasa, así como las enzimas de los sistemas glutatión peroxidasa (GPx) y peroxirredoxina (Prx) ⁸⁹.

Como se mencionó previamente, la enzima SOD metaboliza el O_2^- en H_2O_2 , que es menos reactivo, y en gas O_2 ⁸⁹.



Posteriormente, el H_2O_2 es reducido para formar agua. Esta reducción puede ser catalizada por la enzima catalasa, así como por los sistemas GPx y Prx ¹⁴. La enzima catalasa reduce al H_2O_2 , en dos pasos, a través del grupo hemo de su sitio activo ⁹⁰. Primero, el hierro del grupo hemo se une a un átomo de oxígeno del H_2O_2 , con lo cual se libera agua. Posteriormente, otra molécula de H_2O_2 se une a la catalasa y uno de sus átomos de oxígeno se asocia al oxígeno que ya estaba unido al hierro, con lo cual, se genera gas O_2 . Por otra parte, se libera otra molécula de agua ⁹¹. De esta manera, se producen en total dos moléculas de agua y una de gas O_2 . La reacción general se presenta a continuación.



El sistema GPx tiene dos componentes enzimáticos, las enzimas GPx y glutatión reductasa (GR). La primera reduce al H_2O_2 , empleando electrones del tiol glutatión (GSH), que,

posteriormente, es reducido por la enzima GR, la cual usa como donador de electrones al NADPH ¹⁴.

Respecto al sistema Prx, éste consta de cuatro componentes, las enzimas peroxirredoxina y tioredoxina reductasa y los donadores de electrones NADPH y tioredoxina. La peroxirredoxina reduce al H₂O₂, a través de un residuo de cisteína (cisteína peroxidática), el cual forma un puente disulfuro con otro residuo de cisteína (cisteína reductiva) de una molécula de Prx vecina. Este puente disulfuro es, posteriormente, reducido, siendo el donador de electrones la tioredoxina (a través de dos residuos de cisteína en un motivo altamente conservado). Este componente finalmente es reducido, por acción de la enzima tioredoxina reductasa, que emplea como donador de electrones al NADPH ⁹²⁻⁹⁴

En torno a los componentes no enzimáticos, este tipo de antioxidantes neutralizan directamente especies reactivas. Entre este tipo de componentes se encuentran el GSH, la vitamina E, la vitamina C, polifenoles, y carotenoides, entre otros ⁹⁵.

En células cancerosas existe una mayor producción de ERO. En glioblastoma se han descrito diversas fuentes de ERO. Se han encontrado mutaciones en el ADN mitocondrial que pueden ser somáticas o de línea germinal y que resultan en alteraciones en la estructura de los complejos de la cadena de transporte de electrones, lo cual conduce a un aumento en la producción de ERO. Por ejemplo, existe una mutación puntual en el gen mitocondrial que codifica para el citocromo b del complejo III, que resulta en un cambio del residuo de aminoácido en la posición 252. Este residuo es central para la función del complejo III, pues media el bombeo de protones, de tal suerte que, con la proteína mutada, se predice que se reduzca la velocidad del bombeo de protones y la remoción de electrones del ubiquinol y la ubisemiquinona, con lo cual aumentaría la producción de ERO ⁹⁶. También existe otra mutación puntual, presente en un tercio de los pacientes con glioblastoma, en el gen del citocromo b, la

cual genera la sustitución del residuo del aminoácido aromático fenilalanina de la posición 18 por el residuo del aminoácido alifático leucina. Este sitio es un *pocket* que forma parte del sitio Qi, en el cual se une la ubiquinona, y que restringe las interacciones entre ésta y el grupo hemo del citocromo b, haciendo eficiente la transferencia de electrones. El cambio de un residuo de aminoácido aromático voluminoso por uno alifático abre el *pocket*, permitiendo otras interacciones entre la ubiquinona y el grupo hemo, lo cual, se presume, reduce la eficiencia en la transferencia de electrones de este grupo a la ubiquinona, aumentando la vida media del radical ubisemiquinona y favoreciendo la formación de ERO ⁹⁶.

También se han hallado alteraciones en otros complejos de la cadena de transporte de electrones, las cuales conducen a un aumento en los niveles de ERO. Por ejemplo, en glioblastoma se puede presentar pérdida de la subunidad B del complejo II ⁹⁷, mientras que la subunidad A, en este tipo de cáncer, no presenta alteraciones ⁹⁸. La subunidad A oxida al succinato y transfiere los electrones a la subunidad B, la cual los transfiere a la subunidad C, la cual a su vez los transfiere a la subunidad D, que, finalmente, reduce a la ubiquinona, formando ubiquinol. Ante alteraciones en la actividad de las subunidades distales (B, C y D), la actividad de la subunidad A puede permanecer intacta. No obstante, al haber problemas en la transferencia de electrones hacia complejos distales, el oxígeno presente en la matriz mitocondrial puede oxidar a la subunidad A y formar O_2^- . De esta manera, la pérdida de la subunidad B en glioblastoma también contribuye al aumento en los niveles de ERO ⁹⁹.

Además, en glioblastoma, existen alteraciones en vías de señalización asociadas a procesos carcinogénicos, las cuales conducen a un aumento en los niveles de ERO. Por ejemplo, algunos pacientes con glioblastoma presentan mutaciones en *P53*, generando pérdida de su función. Estas mutaciones conducen a un aumento en los niveles de ERO pues P53 favorece su detoxificación, al actuar sobre blancos como el factor nuclear 2 relacionado al factor eritroide 2 (Nrf2, regulador maestro de la respuesta antioxidante) ¹⁰⁰. Asimismo, en una gran proporción

de pacientes (60% de pacientes con glioblastoma primario) hay un aumento en la señalización por EGFR ¹⁰¹. Notablemente, este incremento aumenta los niveles de ERO pues EGFR favorece el ensamblaje de las isoformas de la NADPH oxidasa (NOX) 1 y 2, importantes fuentes de radical superóxido ^{102,103}. De igual manera, en varios pacientes existe un aumento en la actividad de la vía fosfatidilinositol-3 cinasa (PI3K)/AKT/mTOR (más del 90% de pacientes con glioblastoma primario a través de la pérdida de PTEN) ¹⁰⁴, la cual inhibe la actividad del factor de transcripción 3 de la familia Forkhead box (FOXO3) ¹⁰⁰, el cual favorece la respuesta antioxidante al inducir la síntesis de enzimas como Mn-SOD y catalasa ¹⁰⁵. De esta manera, esta vía también contribuye a los niveles de ERO elevados que se observan en glioblastoma.

Por otro lado, las células de glioblastoma conservan la actividad metabólica mitocondrial (incluso se puede presentar un aumento en glutaminólisis, la cual aporta metabolitos para el ciclo de Krebs) ^{100,106} y, con el aumento en la tasa metabólica característico de células cancerosas, ocurre una mayor formación de los equivalentes reductores NADH y FADH₂. De esta manera, se presenta una mayor tasa de transporte de electrones en los complejos mitocondriales, generándose un aumento en el potencial de la membrana mitocondrial interna, el cual reduce la velocidad de transporte de los electrones, favoreciendo así la producción de ERO.

Además, como se mencionó previamente, existen zonas del tumor donde las células están sometidas a hipoxia y a ciclos de hipoxia/reoxigenación ³¹. En diversos estudios se ha descrito que la hipoxia aumenta los niveles de ERO citosólicos y que, bajo estas condiciones, la producción ocurre, principalmente, a partir del radical ubisemiquinona ¹⁰⁷, intermediario metabólico formado tras la oxidación de ubiquinol en el complejo III de la cadena de transporte de electrones. A pesar de que el aumento de ERO es evidente, los mecanismos involucrados aún no son claros. Se han propuesto tres hipótesis, la primera indica que la producción de ERO disminuye tras la reducción en los niveles de oxígeno, pero el transporte de estas moléculas

fuera de la mitocondria incrementa. La segunda hipótesis indica que la caída en los niveles de oxígeno modifica la estructura de la membrana mitocondrial interna conduciendo a una mayor interacción entre el oxígeno y el radical ubisemiquinona. Finalmente, la tercera hipótesis sugiere que, en condiciones hipóxicas, hay una reducción en la velocidad de oxidación de la ubisemiquinona, lo cual favorece la formación del radical superóxido ¹⁰⁷. Recientemente, se describió que la hipoxia conduce a un aumento en ERO citosólicas pero no mitocondriales, las cuales de hecho disminuyen, dando sustento a la primer hipótesis ¹⁰⁸.

Como se mencionó, las células de glioblastoma también están sometidas a ciclos de hipoxia y reoxigenación, que conducen a un aumento en las ERO, debido, al menos en parte, a un aumento en la expresión del gen NADPH oxidasa 4 (*NOX4*) ^{109,110}; aunque la contribución de otras fuentes de ERO requiere ser evaluada. Notablemente, este incremento favorece procesos carcinogénicos, como la progresión tumoral, migración celular e invasión del parénquima adyacente, al actuar sobre blancos como proteínas cinasas activadas por mitógeno (MAPK) y NF-κB ^{109,110}.

Además, se encontró que, en glioblastoma, las ERO producidas durante la hipoxia cíclica inducen quimiorresistencia al activar a HIF1 y NF-κB, que median la expresión del gen semejante a BCL2 1 (*BCL2L1*), cuyo producto inhibe la muerte por apoptosis ¹¹¹.

Como se mencionó previamente, las ERO promueven procesos carcinogénicos, como proliferación celular y metástasis. Respecto a la proliferación, las ERO la promueven al actuar sobre diferentes blancos. Por ejemplo, conducen a la metilación e inactivación de genes supresores de tumores, entre los cuales, destacan el correpresor transcripcional del retinoblastoma 1 (*RB1*) y *CDKN2A*, los cuales regulan negativamente el ciclo celular ¹⁴.

Asimismo, las ERO modulan la actividad de vías proliferativas, como la vía PI3K. Esta vía comienza con la activación de receptores tirosina cinasa tras la unión de sus ligandos, lo cual

resulta en la activación de la enzima PI3K. Esta cinasa forma, en la membrana plasmática, fosfatidilinositol trifosfato (PIP₃) a partir del lípido membranal fosfatidilinositol difosfato (PIP₂). La cinasa dependiente de fosfatidilinositol 1 (PDK1) se une al PIP₃ formado; de igual manera, la cinasa AKT es reclutada en la membrana, con lo cual se permite su fosforilación y activación mediada por PDK1. La forma activa de AKT actúa sobre distintos blancos para promover la proliferación y sobrevivencia celular. Entre sus blancos se encuentran proteínas que participan en el ciclo celular, en procesos anabólicos y en la regulación de la apoptosis ¹¹². Las ERO regulan positivamente esta vía al bloquear la actividad de la fosfatasa PTEN, la cual defosforila a PIP₃, impidiendo la activación de AKT ¹⁴.

En relación a la metástasis, las ERO también tienen varios blancos a través de los cuales favorecen este proceso. Entre ellos se encuentra la fosfotirosina fosfatasa (PTP), la cual es inhibida por las ERO ¹¹³. Esta enzima defosforila e inhibe a la cinasa de adhesión local (FAK), proteína integral central para la migración celular ¹⁴. De igual manera, las ERO regulan positivamente a metaloproteinasas, enzimas que degradan componentes de la matriz extracelular, permitiendo que las células cancerosas puedan migrar ¹¹⁴⁻¹¹⁶. Asimismo, las ERO favorecen la remodelación del citoesqueleto, proceso vital para la formación de lamelipodios (estructuras que permiten la migración celular) ¹⁴, a través de mecanismos como la estimulación de la proteína homóloga a slingshot 1 (SSH1L), la cual activa a la proteína cofilina, que regula la remodelación de filamentos de actina ¹¹⁷⁻¹¹⁹. Además, las ERO pueden oxidar unidades de β-actina, ocasionando el desensamblaje de actina y miosina durante la migración celular ¹²⁰.

Sin embargo, las ERO, en niveles demasiado altos, pueden activar distintos tipos de muerte celular, como apoptosis extrínseca e intrínseca, piroptosis, muerte lisosoma-dependiente, necroptosis, ferroptosis, entre otras ^{14,121-124}. Por ejemplo, las ERO pueden inducir apoptosis intrínseca, que es un tipo de muerte celular caracterizada por la condensación del citoplasma y

el núcleo, la activación de caspasas (proteasas que efectúan procesos de muerte celular) y nucleasas, y la fragmentación de la célula en cuerpos apoptóticos. Este tipo de muerte comienza con un aumento en la permeabilidad de la membrana mitocondrial externa y la subsecuente liberación de factores apoptóticos ubicados en el espacio intermembranal, como el citocromo c, que, tras ser liberado, participa en la activación del zimógeno de la caspasa-9 (pro-caspasa-9), proteasa que participa en este tipo de muerte ¹²⁵. Las ERO pueden estimular esta vía al actuar sobre blancos como pro-caspasa-9, ya que su oxidación favorece su activación ¹²⁶. Asimismo, las ERO también pueden modular la función y los niveles de las proteínas que participan en el proceso de permeabilización de la membrana mitocondrial externa. Estas proteínas conforman la familia Bcl-2, la cual se divide en miembros pro-apoptóticos, que forman poros en la membrana o que activan a los miembros que forman estos poros, y miembros anti-apoptóticos, que inhiben la actividad de los primeros. Se ha observado que las ERO inhiben la actividad del regulador de la apoptosis BCL2 (BCL2), miembro anti-apoptótico de esta familia ¹²⁷. Además, favorecen la degradación de esta proteína e impiden la del agonista de muerte celular asociado a BCL2 (BAD) y la del regulador de la apoptosis BAX (BAX), miembros pro-apoptóticos de esta familia ^{128,129}.

Notablemente, las ERO pueden inducir tipos de muerte celular muy variados. Por ejemplo, no sólo estimulan tipos de muerte que involucran la acción de caspasas, como la apoptosis y piroptosis, sino también aquellos donde estas proteasas no participan, como la ferroptosis ^{14,121}, tipo de muerte celular con morfotipo necrótico, donde las ERO juegan un papel central, ya que la muerte resulta de un aumento en la peroxidación lipídica ^{121,130}.

Cuando se alcanzan los niveles de ERO que conducen a estos eventos de muerte, se considera que se alcanzó el umbral de muerte. El umbral de muerte se ha empleado para explicar el efecto dual de compuestos con actividad antitumoral. La teoría del umbral de muerte por ERO explica que los niveles basales de estas moléculas en células cancerosas son mayores

a los que se presentan en células normales y se presume que diversos compuestos con efecto dual aumentan las ERO, con lo cual se alcanza el umbral de muerte por ERO en células cancerosas, pero no en células normales ¹⁴.

Es posible que la jacareubina actúe a través de este mecanismo, pues su estructura sugiere que puede unirse covalentemente con el antioxidante intracelular más abundante, el glutatión. Este aspecto será discutido profundamente en el siguiente apartado.

1.4. Glutatión

1.4.1. Características generales

El glutatión es el tiol de bajo peso molecular más abundante en las células, presente en la mayoría de los eucariontes y bacterias Gram-negativas, así como en algunas bacterias Gram-positivas ¹³¹. Este tiol es el principal antioxidante celular y consta de un tripéptido formado por cisteína, glicina y glutamato ¹³², siendo el residuo de cisteína, por medio de su grupo tiol, el que participa en reacciones de reducción ¹³³.

El glutatión atrapa directamente algunas ERO, entre ellas, los radicales OH· y el OONO· ¹³⁴. Además, como se mencionó previamente, es empleado por componentes enzimáticos del sistema antioxidante.

Respecto a la síntesis de este tiol, este proceso puede ocurrir *de novo* o a partir de glutatión extracelular. La síntesis *de novo* consta de dos reacciones, la primera consiste en la conjugación de un residuo de cisteína con uno de glutamato, reacción catalizada por la enzima glutamato cisteína ligasa. La segunda reacción consiste en la unión del dipéptido resultante con un residuo de glicina y es catalizada por la enzima glutatión sintetasa. Ambas reacciones son dependientes de ATP ¹³⁵.

Por otro lado, la síntesis a partir de glutatión extracelular (cuya principal fuente es el hígado), involucra la acción de la enzima γ -glutamyltranspeptidasa, la cual se encuentra en la membrana plasmática, con su sitio activo en la cara externa de la membrana. Esta enzima transfiere el glutamato del glutatión a otro aminoácido, resultando un γ -glutamyl-aminoácido y un dipéptido cisteína-glicina ¹³⁴. Este dipéptido entra en la célula y es hidrolizado. Por otro lado, el γ -glutamyl-aminoácido también entra a la célula y es escindido en oxoprolina y un aminoácido. La oxoprolina después da origen a glutamato por acción de la enzima oxoprolinasa ¹³⁴. Finalmente, los aminoácidos resultantes son reciclados para la síntesis de GSH por la vía previamente descrita ¹³⁵.

Se ha reportado que, en células de glioblastoma, los niveles intracelulares de GSH son elevados ¹³⁶. Esta característica previene el daño excesivo que podría resultar de los altos niveles de ERO en estas células y, cabe destacar, que se ha descrito que la reducción de los niveles de GSH disminuye la proliferación de células de glioblastoma ¹³².

1.4.2. Antineoplásico temozolomida y su relación con el antioxidante glutatión

Notablemente, el GSH está asociado a la resistencia al fármaco estándar en el tratamiento de glioblastoma, la temozolomida. La temozolomida (Figura 5) es un pro-fármaco a partir del cual se genera un agente alquilante. La temozolomida es estable en pH ácido, lo cual permite su administración oral; no obstante, este compuesto es lábil en pH mayor a 7. De esta manera, tras ser absorbida, la temozolomida solamente tiene una vida media de 1.8 h en plasma (pH 7.4). En plasma, la temozolomida se degrada en 5-(3-metiltriazol-1-il)imidazol-4-carboxamida (MTIC), compuesto que reacciona con agua, formando el catión metildiazonio (Figura 5) y 5-aminoimidazol 4-carboxamida. El metildiazonio, tras entrar al núcleo celular, metila principalmente guaninas en posición N7 (70% de sus modificaciones). Además, también metila adeninas en posición N3 (9%) y guaninas en posición O6 (6 %).

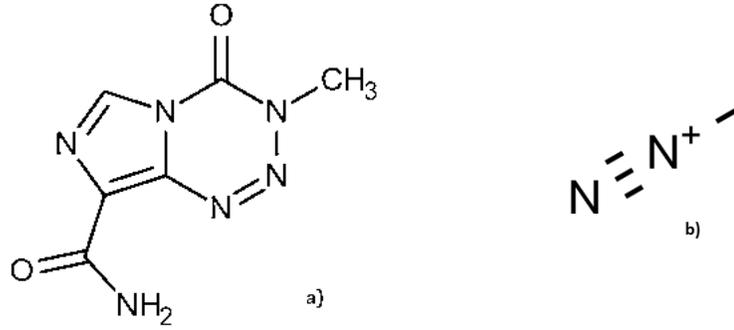


Figura 5. Estructuras del pro-fármaco temozolomida (a) y su fármaco derivado, el metildiazonio (b).

Las alteraciones de guaninas en posición N7 y de adeninas en posición N3 son reparadas rápidamente por el sistema de reparación por escisión de bases (BER). Sin embargo, las guaninas metiladas en la posición O6 pueden persistir y ser apareadas, durante la replicación del ADN, con timinas y no con citosinas. Este error en el apareamiento es reconocido por el sistema de reparación MMR (*Mismatched repair*), que corta la base mal apareada en la hebra hija. No obstante, la metilación persiste en la hebra templado, con lo cual se vuelve a unir timina a las guaninas metiladas y se generan ciclos de re inserción y remoción de timina. Esto resulta en rupturas persistentes del ADN y en el colapso del asa de replicación, fenómeno que conduce a un arresto en el ciclo celular y, eventualmente, a apoptosis ¹³⁷.

Además, el metildiazonio también genera estas alteraciones en el ADN mitocondrial, el cual codifica para proteínas de la cadena de transporte de electrones, cuya alteración está asociada a la producción de ERO. De esta manera, al alterar el flujo de electrones a lo largo de la cadena respiratoria, la temozolomida incrementa los niveles de ERO, mecanismo que también está involucrado en su efecto citotóxico ¹³⁸.

Cabe destacar que existen mecanismos de resistencia al efecto tóxico de la alquilación del ADN nuclear. Algunas células de glioma pueden presentar expresión y alta actividad de la enzima MGMT, la cual remueve grupos alquilo de la posición O6 de guaninas, de tal suerte que

la alteración letal inducida por el metildiazonio puede ser reparada. Asimismo, algunas células pueden tener un sistema MMR deficiente, lo cual evita que las timinas mal apareadas sean removidas. De esta manera, si se presentan estos mecanismos de resistencia, el efecto de la temozolomida depende únicamente del aumento en los niveles de ERO. Sin embargo, se ha reportado que células de glioblastoma presentan también un mecanismo de resistencia a este efecto, el cual consta de una mayor síntesis de GSH tras el tratamiento. La temozolomida genera un aumento pequeño de ERO, el cual no alcanza el umbral de muerte y permite la respuesta antioxidante, que consta de la activación del factor Nrf2, el cual, como ya se mencionó, se considera el regulador maestro de la respuesta antioxidante ⁸⁷. Este factor de transcripción promueve la síntesis de GSH al activar la transcripción de proteínas involucradas en este proceso. Además, Nrf2 induce la expresión de enzimas antioxidantes que emplean al GSH, como la GPx ⁸⁷. De esta manera, el GSH impide el aumento de ERO y la acción de la temozolomida depende únicamente de las alteraciones al ADN previamente descritas.

Probablemente, el caso de jacareubina sea distinto. Notablemente, los carbonos insaturados β a un carbonilo pueden unirse covalentemente con el azufre de grupos tiol ¹³⁹. La jacareubina posee este tipo de carbonos (Figura 3) y, por lo tanto, sería capaz de unirse a GSH. De esta manera, en el presente trabajo, se propone que la jacareubina se une a GSH, reduce sus niveles y con ello logra un aumento de ERO que alcanza el umbral de muerte en células cancerosas. El umbral se alcanzaría debido a que, como se mencionó, el sistema antioxidante depende en gran medida del GSH y, además, este antioxidante sostiene la homeostasis redox en células de glioma ante los elevados niveles basales de ERO. Es probable que el incremento de ERO en células normales no alcance el umbral de muerte, debido a los niveles basales de ERO menores en células no cancerosas.

2. HIPÓTESIS

La jacareubina disminuirá los niveles de GSH y aumentará los de ERO, con lo cual inducirá muerte celular, en la línea celular de glioblastoma humano DBTRG-05.

3. OBJETIVO GENERAL Y OBJETIVOS PARTICULARES

Estudiar el efecto citotóxico y en el estado redox celular de la jacareubina en la línea celular de glioblastoma humano DBTRG-05, con el fin de contribuir al desarrollo de fitofármacos basados en este metabolito secundario que puedan emplearse en el tratamiento del glioblastoma.

- a) Aislar a la jacareubina de fracciones del extracto metanólico del duramen de *Calophyllum brasiliense*.
- b) Establecer si la jacareubina reduce la viabilidad en las células de glioblastoma DBTRG-05.
- c) Determinar, en células de glioblastoma, si la jacareubina reduce los niveles celulares del antioxidante GSH y aumenta los de las ERO.
- d) Establecer, en células de glioblastoma, si el efecto citotóxico inducido por jacareubina involucra la actividad de caspasas ejecutoras y si el aumento en ERO conduce a la activación de estas proteasas.
- e) Evaluar si la jacareubina es tóxica en astrocitos no tumorales.

4. JUSTIFICACIÓN

El cáncer es un problema de salud pública que representa una de las principales causas de muerte a nivel mundial; una de cada 6 muertes se debe a cáncer ¹. En particular, el glioblastoma es un problema relevante debido a que presenta una alta mortalidad, siendo la media de sobrevivencia de 15 meses, con menos del 5% de pacientes que sobreviven más de 5 años ¹⁵, lo cual

refleja que las terapias empleadas en su tratamiento no son eficientes. De esta manera, el estudio de compuestos con propiedades anticarcinogénicas que puedan emplearse para tratar este padecimiento y el cáncer, en general, es necesario. La jacareubina representa un compuesto potencial para el desarrollo de fármacos para el tratamiento de cáncer, debido a que presenta un efecto dual, es decir, es tóxica para células cancerosas e inocua para normales ^{9,13}. Sus mecanismos de acción se desconocen y es necesario su estudio para el desarrollo de terapias basadas en este compuesto. Un mecanismo que podría estar implicado en su efecto dual es el aumento de ERO, ya que su estructura evidencia que puede conjugarse con el GSH, lo cual puede resultar en un incremento de ERO. Con este aumento, en células cancerosas, se alcanzaría el umbral de muerte por ERO, mientras que, en células normales, no se presentaría toxicidad debido a que no se alcanzaría dicho umbral.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. MATERIALES

Las placas para cromatografía en capa fina de Silica gel RP-18 se adquirieron de Merck (Kenilworth, NJ, EUA). El adsorbente para las columnas cromatográficas C-18 se obtuvo de Macherey-Nagel (Duren, Alemania).

La línea celular DBTRG-05 de glioblastoma humano y el medio de cultivo RPMI se adquirieron de ATCC (Manassas, VA, EUA). Los siguientes reactivos se obtuvieron de Sigma Aldrich (St Louis, MO, EUA): adenina, ATP disódico, cistina, ácido 4-(2-hidroxietil) piperacina-1-etansulfónico (HEPES), hipoxantina, prolina, timidina, dimetilsulfóxido (DMSO), fluoresceína diacetato (FDA), tritón X-100, 2-vinilpiridina, GSH, glutatión disulfuro (GSSG), ácido 5,5-ditio-bis-(2-nitrobenzoico) (DTNB), GR de *Saccharomyces cerevisiae*, NADPH, ditiotreitól, Tris-HCl, temozolomida y el péptido sintético N-acetil-Asp-Glu-Val-Asp-7-amido-4-metilcumarina (Ac-DEVD-AMC). Los siguientes reactivos se adquirieron de J.T. Baker (Center valley, PA, EUA):

fosfato de sodio dibásico, fosfato de sodio monobásico, ácido etilendiaminotetracético (EDTA), cloruro de sodio y fosfato de sodio dibásico. El suero fetal bovino, la solución antibiótica (penicilina-estreptomicina), y el medio basal Eagle se obtuvieron de Biowest (Riverside, MO, EUA). La sonda carboxi-H₂DCFDA se obtuvo de Molecular Probes (Eugene, Oregon, EUA), el ácido sulfosalicílico de Mallinckrodt (St Louis, MO, EUA), el agente de disociación TrypLE Express de Gibco Laboratories (Gaithersburg, MD, EUA), y el antioxidante Trolox de Calbiochem (San Diego, CA, EUA).

5.2. MÉTODOS

5.2.1. Aislamiento de la jacareubina

El aislamiento de la jacareubina se realizó en el Instituto de Química de la UNAM, en el laboratorio del Dr. Ricardo Reyes Chilpa, con su asesoría y la del Dr. Jorge I. Castillo Arellano.

A partir de mezclas de las xantonas III-V obtenidas en un trabajo previo a partir del extracto metanólico del duramen de *C. brasiliense*¹⁴⁰, se separó la xantona III. Esto se realizó separando las mezclas en columnas cromatográficas fase reversa empacadas con Silica Gel C-8. Primero, se realizaron pruebas en cromatografía en capa fina fase reversa para determinar la fase móvil a emplear en las columnas. Las placas obtenidas en estas pruebas se visualizaron bajo una lámpara de luz UV.

Se comenzaron las pruebas con la fase móvil acetonitrilo:agua 7:3, con base en trabajos previos con otras xantonas preniladas¹⁴¹, y se probó la adición de ácido acético, ya que en la literatura se recomienda la adición de ácidos en cromatografía fase reversa para aislar compuestos de una manera uniforme¹⁴². Tras seleccionar la fase móvil que separaba correctamente a las xantonas (acetonitrilo:agua en proporciones 65:35, con ácido acético al 0.5%), se corrieron las columnas. Se realizó cromatografía en capa fina fase normal de las fracciones obtenidas en las columnas (fase móvil de diclorometano: metanol 95:5) y las placas

obtenidas se revelaron con sulfato cérico. Las fracciones que presentaron factor de retardo y coloración semejante al estándar de xantona III se recrystalizaron con acetona. Finalmente, los cristales obtenidos se analizaron por resonancia magnética nuclear de hidrógeno y carbono, para determinar su pureza.

5.2.2. Pruebas biológicas

5.2.2.1. Cultivo celular y tratamientos

En este trabajo se empleó la línea celular de glioblastoma humano DBTRG-05. Asimismo, se realizaron pruebas de toxicidad en cultivos primarios de astrocitos de rata, los cuales fueron proporcionados por el Dr. Julio Morán del Instituto de Fisiología Celular, UNAM. Las células se mantuvieron en una atmósfera con CO₂ al 5%, a 37°C. Las células de glioblastoma se cultivaron en medio RPMI suplementado con (mg/litro): adenina, 10; ATP, 1; cistina, 35; HEPES, 3570; hipoxantina, 15, prolina, 30; timidina, 1. Los cultivos de astrocitos en medio basal Eagle. En ambos casos, se adicionó al medio de cultivo suero fetal bovino al 10% y antibiótico al 1%.

Respecto a los tratamientos, la jacareubina se disolvió en DMSO, en una concentración de 250 mM. A partir de este stock, se preparó otro en medio de cultivo, con concentración de jacareubina 500 µM. Este stock fue filtrado y a partir de él se prepararon los demás tratamientos. La concentración máxima de DMSO fue 0.5%, la cual se empleó como control negativo, es decir, se consideró como el 100% de viabilidad.

Por otro lado, la temozolomida se disolvió en solución acuosa de DMSO al 60%. Para lograr una solución, la temozolomida en DMSO fue sonicada. Con este stock (12.5 g/ml) se preparó otro 1000 mM en medio de cultivo, el cual se filtró y usó para preparar los demás tratamientos. La concentración máxima de DMSO fue 0.7%, la cual se empleó como control negativo.

5.2.2.2. Curvas de viabilidad y ensayo FDA

Primero se construyeron curvas de viabilidad en las cuales se evaluó el efecto de distintas concentraciones de jacareubina (0.5-500 μM) o temozolomida (10-1000 μM) en la viabilidad de las células de glioblastoma. Estas pruebas se realizaron en placas de 96 pozos, en las cuales se sembraron 4000 células por pozo, mismas que se trataron 24 horas después. Cada tratamiento se probó por cuadruplicado y, tras 48 horas de exposición a cada agente, se evaluó la viabilidad celular a través del ensayo FDA. Con estos datos, se construyeron curvas concentración-respuesta y se determinó la concentración inhibitoria (CI) media (CI_{50}) y la CI_{70} , las cuales se emplearon en los ensayos subsecuentes.

El ensayo FDA evalúa la integridad de la membrana citoplásmica y la actividad enzimática intracelular. El FDA es un compuesto no polar y no fluorescente que difunde libremente hacia el interior de la célula, donde es hidrolizado a fluoresceína por esterasas no específicas. La fluoresceína es polar y fluorescente, por lo cual se acumula en células con membranas intactas generando fluorescencia cuantificable que indica tanto la actividad enzimática de las esterasas como la integridad de la membrana celular¹⁴³. Para realizar este ensayo, primero se incubaron las células con la sonda FDA disuelta en medio de cultivo en concentración 12 μM por 5 minutos a 37°C. Posteriormente, se lavaron las células con PBS y se cuantificó la fluorescencia (excitación de 485/20 nm y emisión de 528/20 nm) en un lector de placas. La viabilidad celular resultante de los tratamientos se expresó como el porcentaje de emisión de fluorescencia con respecto al control.

5.2.2.3. Toxicidad en astrocitos no cancerosos

Para determinar si la jacareubina es tóxica en células no cancerosas, se evaluó el efecto de distintas concentraciones de esta xantona en la viabilidad de astrocitos no tumorales de rata. Al igual que en las células de glioblastoma, se empleó la prueba FDA, se construyó una curva

concentración-respuesta y se determinó la CI_{50} . Asimismo, se calculó el cociente CI_{50} en astrocitos no cancerosos/ CI_{50} en células de glioblastoma, para la jacareubina y la temozolomida. Este cociente aporta una aproximación de la amplitud de la ventana terapéutica.

Para tomar en cuenta la heterogeneidad de las líneas celulares de glioblastoma, se promediaron los datos encontrados en este trabajo para la línea DBTRG-05 con datos de la literatura para otras líneas celulares. Para que los datos de la literatura fueran comparables, se emplearon aquellos obtenidos con 48 horas de incubación. Para la jacareubina, se empleó el único estudio previo de su actividad en glioblastoma, el cual se realizó en la línea U251⁹. Por otro lado, para la temozolomida existen varios antecedentes en distintas líneas celulares y los empleados se muestran en la Tabla Suplementaria 2.

Respecto a los datos de toxicidad de la temozolomida en astrocitos no tumorales de rata, éstos también se obtuvieron de la literatura¹⁴⁴.

5.2.2.4. Niveles de especies reactivas del oxígeno (ERO)

Para determinar los niveles de ERO se empleó la sonda diacetato de carboxi-2',7'-diclorodihidrofluoresceína (carboxi- H_2DCFDA). Esta sonda es un compuesto no polar y no fluorescente que permea libremente hacia el interior de la célula, donde es escindido por esterasas formándose el compuesto polar carboxi- $DCFH_2$. Este compuesto se acumula en el citoplasma y es oxidado al compuesto fluorescente DCF que es detectado a 530 nm cuando la muestra se excita a 485 nm¹⁴⁵.

Para realizar el ensayo, primero se sembraron las células en placas de 48 pozos (8000 células por pozo). Veinticuatro horas después se colocaron los tratamientos (se emplearon 4 pozos por tratamiento). Se evaluó la producción de ERO con cada tratamiento después de 18, 24 y 48 horas de tratamiento. Transcurrido este tiempo, las células se incubaron con carboxi- $DCFDA$ 15 μM , por 30 minutos, a 37°C. Posteriormente, se realizaron lavados con PBS 1X. Se

cuantificó la fluorescencia (excitación de 487/20 nm y emisión de 528/20 nm) y las células se visualizaron con el lector multi-modal Cytation 5, empleando los filtros correspondientes.

En cada experimento, la fluorescencia media de cada grupo se corrigió por número de células promedio por grupo. Las células se contaron en fotografías de campo claro obtenidas con el lector multi-modal. Se obtuvieron 5 campos por pozo en todos los pozos y se empleó el software ImageJ para determinar el área de la imagen.

5.2.2.5. Niveles de glutatión (GSH)

Los niveles de GSH se cuantificaron tras 18, 24 y 48 horas de tratamiento. Para determinar los niveles de este antioxidante en cada muestra se empleó el método de DTNB con reciclamiento enzimático y derivatización con 2-vinilpiridina ¹⁴⁶. Este ensayo se basa en la reacción del DTNB con el GSH la cual produce el cromóforo TNB y aductos glutatión-TNB. El glutatión de los aductos es reciclado por la actividad de la enzima GR (presente en la mezcla de reacción) y puede volver a reaccionar con el DTNB. La enzima GR también forma GSH a partir del glutatión oxidado (glutatión disulfuro, GSSG) presente en la muestra. De esta manera, el TNB formado, que es detectado a 412 nm, es proporcional a la concentración de GSH + GSSG (glutatión total). Para obtener la concentración de GSH, una alícuota de cada muestra es derivatizada con 2-vinilpiridina que une covalentemente al GSH y permite la cuantificación únicamente del GSSG. Al realizar el ensayo con la alícuota derivatizada y la muestra sin derivatizar, se obtiene la concentración del GSSG y del glutatión total, respectivamente, y por medio de una resta se calcula la concentración de GSH ¹⁴⁶.

Para realizar estas determinaciones primero se obtuvieron lisados celulares. Para ello se despegaron las células con el agente de disociación TrypLE Express, cuya actividad fue neutralizada con medio de cultivo suplementado con suero fetal bovino al 10%. Esta suspensión se centrifugó a 1000 g por 3 minutos para obtener el botón de células, que fue resuspendido en

amortiguador de fosfatos y centrifugado nuevamente. Este nuevo botón se resuspendió en amortiguador de extracción (fosfato de potasio 0.1 M, EDTA 5 mM, tritón X-100 al 0.1% y ácido sulfosalicílico al 0.6%) y la suspensión se sonicó durante 2 minutos en intervalos de 30 segundos, separados por una breve agitación. Finalmente, se centrifugaron las muestras a 3000 g por 4 minutos para obtener los lisados. De cada lisado se separaron 100 µl para realizar la derivatización con 2-vinilpiridina (µl por minutos).

El ensayo de DTNB se realizó de la manera descrita en la literatura ¹⁴⁶. Brevemente, se colocaron en una microplaca las muestras, así como estándares de GSH y GSSG, a los cuales se adicionaron DTNB, GR y NADPH. En un lector de placas, se cuantificó la absorbancia a 412 nm por 2 minutos en intervalos de 1 minuto. Con estos datos se obtuvieron los cambios de absorbancia, a partir de los cuales se estimó la cantidad de glutatión total, GSH y GSSG en las muestras.

La cantidad de GSH en cada muestra se corrigió por cantidad de proteína cuantificada por el método de Bradford ¹⁴⁷.

5.2.6. Actividad de las caspasas-3 y -7

Para comenzar a elucidar los mecanismos involucrados en la muerte celular inducida por jacareubina, se realizó un ensayo de actividad de las caspasas ejecutoras -3 y -7. Además, para evaluar si este mecanismo depende del incremento de ERO, se emplearon co-tratamientos con jacareubina y el antioxidante directo Trolox. Se seleccionó una concentración de Trolox que no es tóxica para esta línea celular y que presenta actividad antioxidante (150 µM, Figura Suplementaria 5).

Para evaluar la actividad de las caspasas-3 y -7 se empleó el sustrato fluorogénico Ac-DEVD-AMC. Las caspasas-3 y -7 presentan selectividad por la secuencia de aminoácidos DEVD, de tal manera que escinden el sustrato entre el aminoácido aspartato (D) y la AMC. Esta última

presenta fluorescencia azul y puede ser detectada a 442 nm cuando la muestra es excitada a 354 nm ¹⁴⁸.

Para obtener las muestras, se sembraron células en proporción de 25,500 células/cm² en cajas Petri de 60 mm. Los tratamientos se colocaron 24 horas después y, tras 24 horas de tratamiento, se obtuvieron lisados celulares. Se colocó amortiguador de lisis en cada caja (206 µL por caja), se rasparon las células y se lisaron por 30 minutos en hielo. Finalmente, se centrifugó la suspensión para obtener el sobrenadante.

En el ensayo se colocaron, en placas de 96 pozos opacas, 40 µL de lisado, 60 µL de amortiguador de lisis, y 100 µL de amortiguador de reacción con el sustrato de las caspasas-3 y 7, Ac-DEVD-AMC, en concentración 50 µM (concentración final de 25 µM). Finalmente, se cuantificó, empleando un espectrofluorómetro, el AMC liberado (excitación de 354 nm y emisión de 442 nm) cada 5 minutos por media hora. El cambio de fluorescencia por minuto se corrigió por cantidad de proteína, la cual se determinó por el ensayo de Bradford.

5.2.7. Análisis estadístico

Las pruebas estadísticas se realizaron en el software R, versión 3.6.1. Para los datos de las curvas concentración-respuesta se ajustó un modelo de regresión, se realizó una prueba de bondad de ajuste y una prueba χ^2 de efecto de la concentración, la cual compara el modelo generado con un modelo de pendiente igual a cero. Para los datos de ERO y GSH, se realizaron pruebas ANOVA de dos vías con post-hoc Tukey (variables independientes: concentración de jacareubina y tiempo, variable dependiente: niveles de ERO y GSH, respectivamente). Para los datos de actividad de caspasa-3 se realizó una prueba ART-ANOVA, incluyendo al tratamiento como variable de efecto fijo y a la identidad de cada experimento independiente como variable de efecto aleatorio. La normalidad de los datos se evaluó con la prueba Shapiro-Wilk y para homocedasticidad se usó la prueba Bartlett. Para todas las pruebas, se consideró un valor

$p < 0.05$ como estadísticamente significativo. Cada gráfica muestra los datos como la media aritmética \pm error estándar.

6. RESULTADOS

6.1. AISLAMIENTO DE LA JACAREUBINA

La jacareubina se separó de fracciones del extracto metanólico del duramen de *Calophyllum brasiliense*. Con base en datos de la literatura de separación de otras xantonas preniladas ¹⁴¹, las pruebas para estandarizar la fase móvil comenzaron con la fase acetonitrilo:agua en proporciones 7:3. Como se aprecia en la Figura 6, el uso de esta fase generó la separación de las xantonas.

Previamente se informó que el ácido acético genera una separación más eficiente en cromatografía de fase reversa ¹⁴², por lo cual se adicionó a la fase móvil ácido acético al 0.5%, lo que resultó en bandas más definidas (Figura 7). Debido a este resultado, se decidió usar ácido acético en la fase móvil.

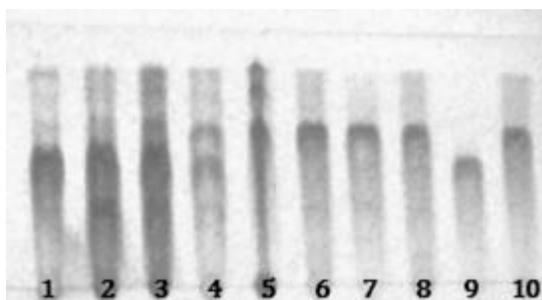


Figura 6. Cromatografía en capa fina fase reversa de mezclas de xantonas, separadas con fase móvil acetonitrilo: agua 7:3. Las primeras 8 muestras corresponden a las mezclas, la novena es el estándar de jacareubina y la décima el estándar de la xantona V.

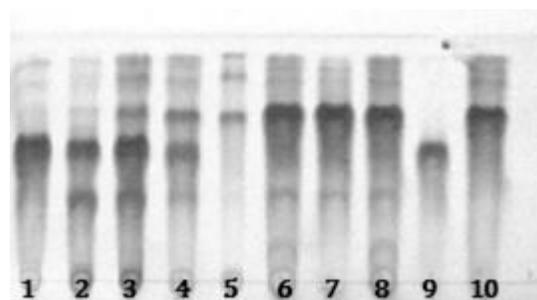


Figura 7. Cromatografía en capa fina fase reversa de mezclas de xantonas, separadas con fase móvil acetonitrilo: agua 7:3, con ácido acético al 0.5%. Las primeras 8 muestras corresponden a las mezclas, la novena es el estándar de jacareubina y la décima el estándar de la xantona V.

Con el fin de aumentar la retención de las xantonas III y V en la fase estacionaria y obtener una mayor resolución al separarlas por medio de columnas cromatográficas, también se probaron fases móviles más polares, usando una mayor proporción de agua. Primero se probó una fase móvil de acetonitrilo y agua en proporciones 5:5 con la cual se obtuvo mayor retención en la fase estacionaria, aunque la separación fue mínima (Figura 8).

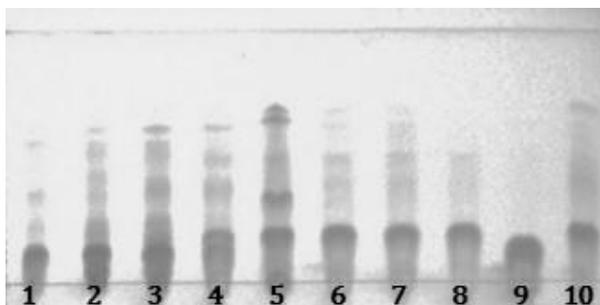


Figura 8. Cromatografía en capa fina fase reversa de mezclas de xantonas, separadas con fase móvil acetonitrilo:agua en proporciones 5:5, con ácido acético al 0.5%. Las primeras 8 muestras corresponden a las mezclas, la novena es el estándar de jacareubina y la décima el estándar de la xantona V.

Posteriormente, se probó una fase móvil de acetonitrilo y agua en proporciones 6:4. Con esta fase se observaron a las xantonas en la parte inferior de la placa y la separación fue mejor que la obtenida con la fase anterior (Figura 9), no obstante, la distancia entre las xantonas seguía siendo corta.

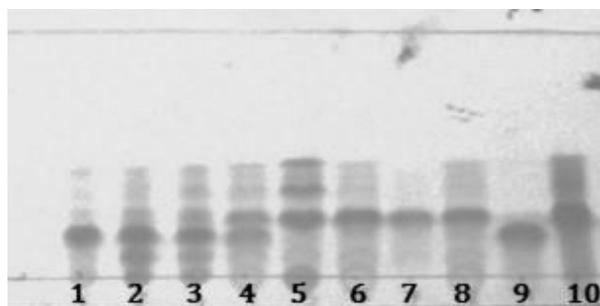


Figura 9. Cromatografía en capa fina fase reversa de mezclas de xantonas, separadas con fase móvil acetonitrilo:agua en proporciones 6:4, con ácido acético al 0.5%. Las primeras 8 muestras corresponden a las mezclas, la novena es el estándar de jacareubina y la décima el estándar de la xantona V.

Finalmente, se probó la fase acetonitrilo:agua en proporciones 65:35, intermedia entre la 7:3, que separó adecuadamente a las xantonas, y la 6:4, que resultó en mayor retención en la fase estacionaria. Esta fase separó apropiadamente a las xantonas y se observó mayor retención en la fase estacionaria que con la fase 7:3 (Figura 10), por lo cual, se seleccionó esta fase móvil para correr las columnas cromatográficas.

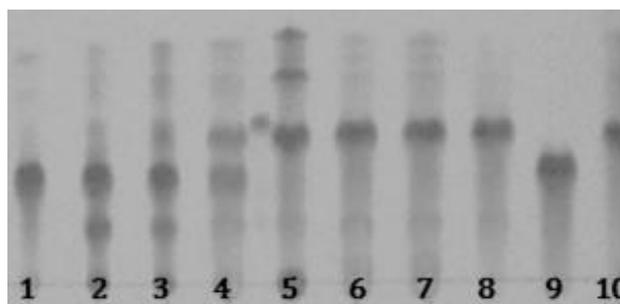
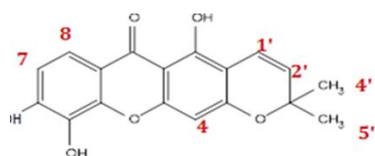


Figura 10. Cromatografía en capa fina fase reversa de mezclas de xantonas, separadas con fase móvil acetonitrilo:agua en proporciones 65:35, con ácido acético al 0.5%. Las primeras 8 muestras corresponden a las mezclas, la novena es el estándar de jacareubina y la décima el estándar de la xantona V.

Tras correr las columnas cromatográficas, se analizaron las fracciones obtenidas por cromatografía en capa fina y se encontraron fracciones cuya retención y coloración (tras el revelado con sulfato cérico) coincidían con los del estándar de jacareubina (fracciones 15-17). Estas fracciones se recrystalizaron y los cristales se analizaron por resonancia magnética nuclear. En los espectros de resonancia se pueden apreciar únicamente los picos correspondientes a los hidrógenos y carbonos de la jacareubina (Tablas 3-6 y Figuras Suplementarias 1-4), lo cual evidencia la pureza de estas fracciones.

Tabla 3. Asignaciones del espectro de resonancia magnética nuclear de hidrógeno de las fracciones 15 y 17. Se muestran las características de las señales del espectro, las cuales corresponden a cada protón de la jacareubina. No se observaron señales adicionales.



Protón	δ (ppm)	Multiplicidad	Integral	J (Hz)
4' 5'	1.46	S	5.66	-
2'	5.73	D	0.91	10.05
4	6.33	S	1.38	-
1'	6.68	DD	1.36	10.68
				0.63
7	6.98	D	1.08	8.73
8	7.62	D	1.00	8.73

Tabla 4. Asignaciones del espectro de resonancia magnética nuclear de carbono de las fracciones 15-17. Se muestran los desplazamientos de las señales del espectro (δ) y los carbonos de la jacareubina a los que corresponden. No se observaron señales adicionales.

Carbono	δ (ppm)	Carbono	δ (ppm)
1	161.10	4a	158.69
2	105.22	5a	146.89
3	157.88	8a	113.84
4	95.54	9a	103.54
5	133.27	1'	128.65
6	152.29	2'	115.81
7	114.72	3'	78.96
8	117.47	4' 5'	28.48
9	181.33		

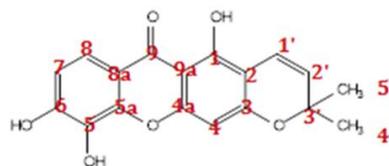


Tabla 5. Asignaciones del espectro de resonancia magnética nuclear de hidrógeno de la fracción 16. Se muestran las características de las señales del espectro, las cuales corresponden a cada protón de la jacareubina. No se observaron señales adicionales.

Protón	δ (ppm)	Multiplicidad	Integral	J (Hz)
4' 5'	1.46	S	5.69	-
2'	5.72	D	1.00	10.05
4	6.34	S	1.11	-
1'	6.68	DD	1.66	10.56
				0.48
7	6.99	D	1.05	8.73
8	7.62	D	1.06	8.73

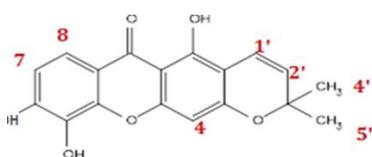
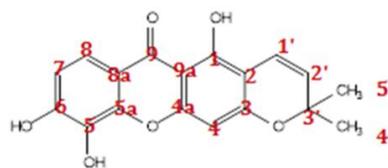


Tabla 6. Asignaciones del espectro de resonancia magnética nuclear de carbono de la fracción 16. Se muestran los desplazamientos de las señales del espectro (δ) y los carbonos de la jacareubina a los que corresponden. No se observaron señales adicionales.

Carbono	δ (ppm)	Carbono	δ (ppm)
1	161.07	4a	158.66
2	105.19	5a	146.88
3	157.87	8a	113.81
4	95.55	9a	103.52
5	133.26	1'	128.63
6	152.28	2'	115.79
7	114.70	3'	78.95
8	117.44	4' 5'	28.48
9	181.31		



6.2. PRUEBAS BIOLÓGICAS

6.2.1. EFECTO CITOTÓXICO DE LA JACAREUBINA EN LA LÍNEA CELULAR DE GLIOBLASTOMA HUMANO DBTRG-05

Para evaluar el efecto de la jacareubina en la viabilidad celular de la línea de glioblastoma humano DBTRG-05, se empleó la prueba FDA. Como se aprecia en la Figura 11, la jacareubina disminuye la viabilidad en esta línea celular de manera concentración-dependiente, evidenciando su toxicidad en células de glioblastoma. Cabe destacar, que este efecto se observa desde concentraciones bajas (menores a 10 μM).

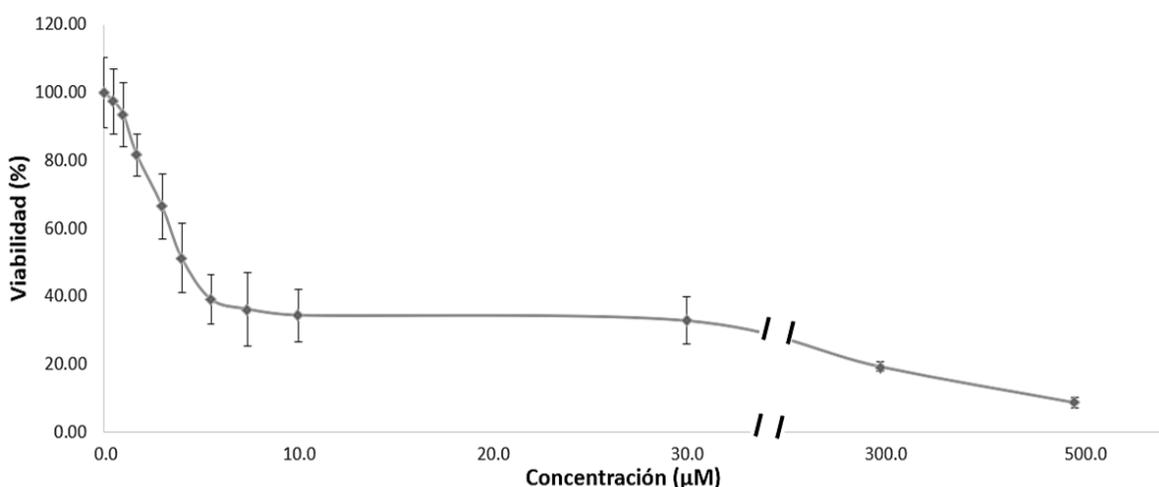


Figura 11. Curva concentración-respuesta de jacareubina para la línea celular de glioblastoma humano DBTRG-05. Valor p para la prueba de efecto de la concentración = 6.6×10^{-11} . $\text{CI}_{50} = 2.6 \pm 1.4 \mu\text{M}$. $n=4-6$ experimentos independientes. Concentraciones empleadas entre 0 y 10 μM : 0.5, 1, 1.7, 3, 4, 5.5 y 7.4 μM .

También se comparó, en esta línea celular, la potencia de la jacareubina con la del fármaco temozolomida, antineoplásico estándar en el tratamiento de glioblastoma. Notablemente, la jacareubina presenta mayor potencia que la temozolomida. Tal como se aprecia en la Figura 12, la temozolomida también ejerce un efecto citotóxico; sin embargo, éste se observa únicamente en concentraciones elevadas (mayores a 100 μM).

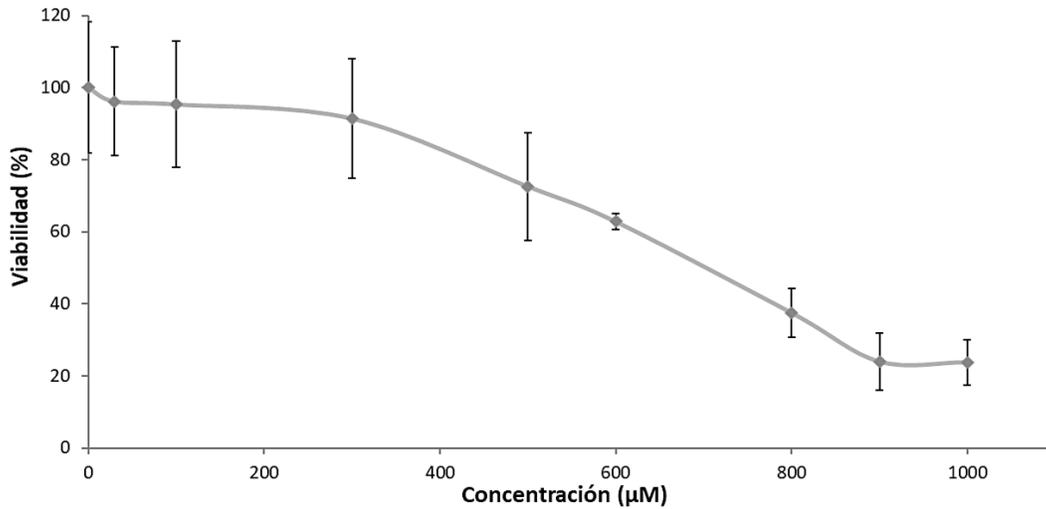


Figura 12. Curva concentración-respuesta de temozolomida para la línea celular de glioma humano DBTRG-05. Valor p para la prueba de efecto de la concentración = 2.5×10^{-7} . $CI_{50} = 545 \pm 205 \mu\text{M}$. n=3 experimentos independientes.

Además, se realizó un intervalo de confianza para las diferencias de las concentraciones efectivas de estos compuestos, para concluir que se presenta una diferencia en potencia. Tal como se aprecia en la Figura 13, el intervalo construido no incluye al cero, por lo tanto, la potencia de jacareubina y temozolomida es estadísticamente diferente.

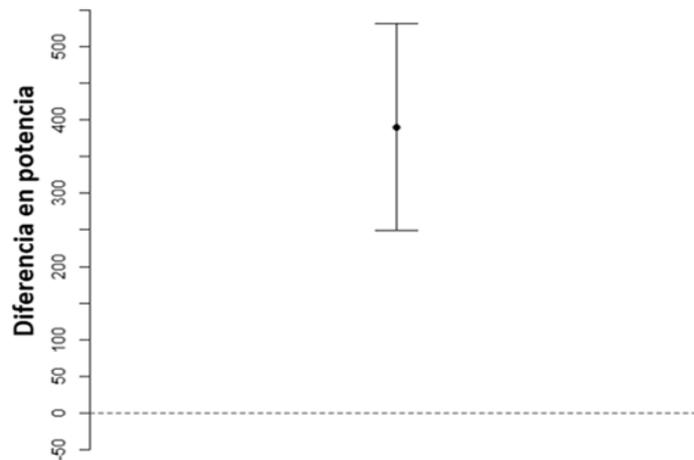


Figura 13. La jacareubina es más potente que la temozolomida en la línea celular DBTRG-05. Intervalo de confianza al 95% para las diferencias de las concentraciones efectivas de la parte lineal de las curvas de viabilidad de jacareubina y temozolomida.

En conclusión, la jacareubina es tóxica para esta línea celular de glioblastoma y su potencia es mayor que la del fármaco temozolomida.

6.2.2. TOXICIDAD DE JACAREUBINA EN ASTROCITOS NO CANCEROSOS

Para determinar si el efecto de la jacareubina es específico a células cancerosas, se evaluó su toxicidad en cultivos primarios de astrocitos de rata, a través de la prueba FDA. Como se aprecia en la Figura 14, la jacareubina no reduce la viabilidad en concentraciones de hasta 10 μM , las cuales sí presentaron toxicidad en células cancerosas; esta xantona es tóxica únicamente en concentraciones mayores a 10 μM .

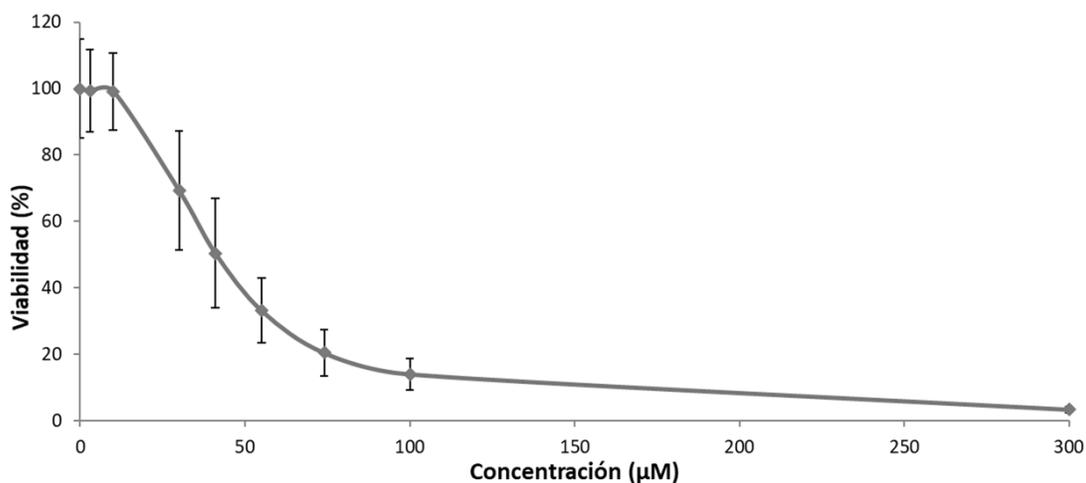


Figura 14. Curva concentración-respuesta de jacareubina para cultivos primarios de astrocitos de rata. Valor p para la prueba de efecto de la concentración = 6.2×10^{-12} . $\text{CI}_{50} = 37.5 \pm 17.7 \mu\text{M}$. n=4-6 experimentos independientes.

Se calculó el cociente CI_{50} en astrocitos no cancerosos/ CI_{50} en células de glioblastoma para la jacareubina y temozolomida (Tabla 7). Este cociente aporta un acercamiento a la ventana terapéutica de estos compuestos; entre mayor sea el valor, se espera que el fármaco sea más selectivo. Observamos que este valor es mayor para la jacareubina que para la temozolomida (Tabla 7).

Tabla 7. Cociente CI₅₀ astrocitos/ CI₅₀ células de glioblastoma.

	JACAREUBINA	TEMOZOLOMIDA
CI ₅₀ astrocitos sanos de rata (μM)	37.5	400 ¹⁴⁴
CI ₅₀ células de glioma humano (μM)	2.6	569
COCIENTE	14.4	0.7

Se muestran los datos de CI₅₀ para astrocitos no tumorales de rata y células de glioblastoma usados para calcular el cociente. Las CI₅₀ en células de glioma, para ambos compuestos, se calcularon promediando las de este trabajo con las reportadas en la literatura para otras líneas.

6.2.3. NIVELES DE GLUTATIÓN

Para determinar si, en efecto, la jacareubina disminuye los niveles de GSH, se cuantificó este tiol en lisados de células tratadas con dos concentraciones distintas de jacareubina (CI₅₀ y CI₇₀). Asimismo, se evaluó el efecto de la jacareubina en los niveles de GSH tras 18, 24 y 48 horas de tratamiento. Tal como se observa en la Figura 15, la jacareubina reduce significativamente los niveles de GSH y existe una tendencia a una mayor disminución con la concentración mayor de jacareubina (no significativa en cada uno de los tiempos, pero con p<0.002 en general). Por otra parte, no se observa un cambio de los niveles de GSH en el tiempo.

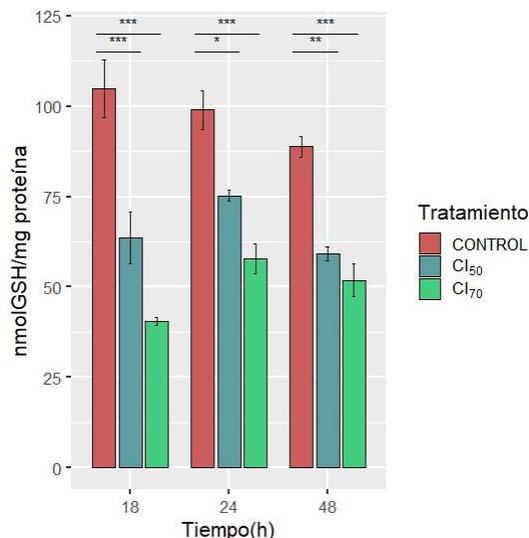


Figura 15. La jacareubina disminuye los niveles del glutati3n (GSH). Los datos se analizaron por ANOVA de dos v3as y la prueba post-hoc Tukey. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001. n=3 experimentos independientes. CI₅₀: CI₅₀ de jacareubina, CI₇₀: CI₇₀ de jacareubina.

6.2.4. NIVELES DE LAS ESPECIES REACTIVAS DEL OXÍGENO

Para evaluar si el efecto de la jacareubina sobre los niveles de GSH conduce a un aumento de ERO, se cuantificaron estas moléculas, empleando la sonda carboxi-DCFDA. Como se observa en la Figura 16, la jacareubina aumenta las ERO de manera concentración- y tiempo-dependiente .

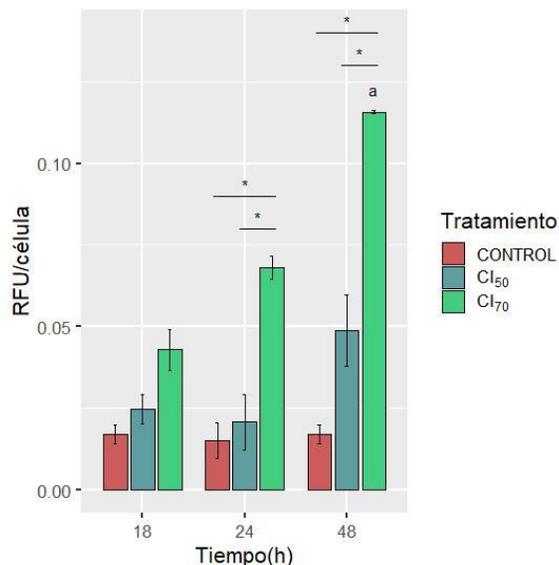


Figura 16. La jacareubina incrementa los niveles de especies reactivas del oxígeno (ERO). Los datos se analizaron por ANOVA de dos vías y la prueba post-hoc Tukey. * $p < 0.001$, a: $p < 0.002$ vs. CI₇₀ 18 y 24 horas. $n = 3$ experimentos independientes. CI₅₀: CI₅₀ de jacareubina, CI₇₀: CI₇₀ de jacareubina.

6.2.5. ACTIVIDAD DE LAS CASPASAS-3 Y -7

Para comenzar a dilucidar los mecanismos involucrados en el efecto citotóxico de la jacareubina, en este trabajo se evaluó la actividad de las caspasas-3 y -7. Para este ensayo, además de los tratamientos con jacareubina, se incluyeron co-tratamientos con el antioxidante Trolox, con el fin de determinar el impacto del aumento de las ERO en la activación de mecanismos de muerte celular.

Debido a que los datos obtenidos presentan heteroscedasticidad, así como un efecto batch para cada experimento independiente, se realizó la prueba no paramétrica ART-ANOVA, incluyendo a la variable experimento como variable de efecto aleatorio. Ya que esta prueba realiza una transformación de los datos a rangos, la Figura 17 presenta los rangos de todos los datos (puntos de colores), así como los estimados para cada grupo (puntos negros). Puede apreciarse una tendencia al aumento en el rango para los grupos tratados sólo con jacareubina y una tendencia a la disminución, respecto a estos grupos, para los co-tratamientos con Trolox. No obstante, la prueba no encontró diferencias estadísticamente significativas ($p = 0.0864$).

La distribución de los datos no transformados puede consultarse en la Figura Suplementaria 6, que presenta gráficos de violín para cada grupo experimental.

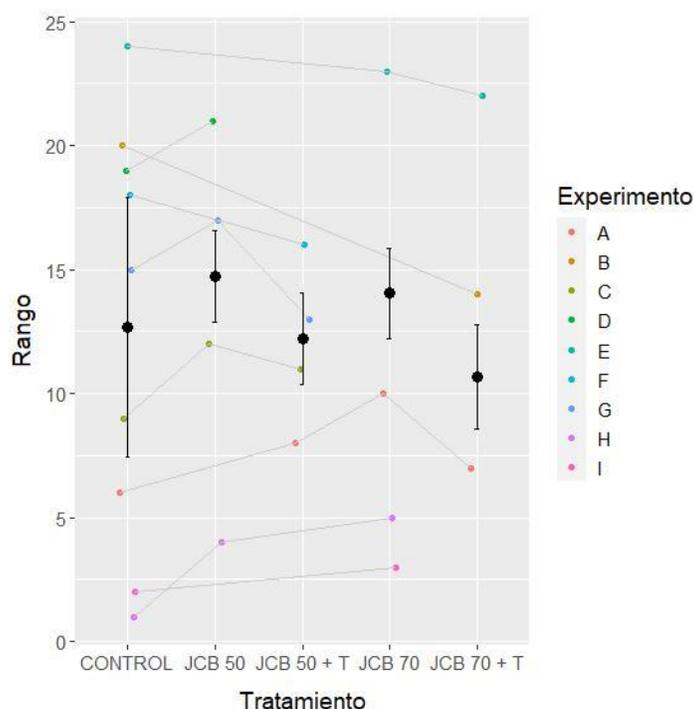


Figura 17. Rangos para la actividad de las caspasas-3 y -7 tras los tratamientos sólo con jacareubina o en co-tratamiento con Trolox. La gráfica presenta todos los datos transformados a rangos, con colores distintos para cada experimento independiente. También se presentan los rangos estimados por grupo (puntos negros) con intervalos de confianza al 95%. Los datos fueron analizados por ART-ANOVA ($p = 0.0864$). $n=3-9$ experimentos independientes por grupo. JCB 50: CI_{50} de jacareubina. JCB 70: CI_{70} de jacareubina. JCB + T: Co-tratamientos con Trolox.

7. DISCUSIÓN

En relación al método de aislamiento de la jacareubina a partir de fracciones del extracto metanólico del duramen de *C. brasiliense*, se discutirán dos aspectos: el efecto de la adición de ácido acético a la fase móvil y el cambio en las proporciones de disolventes en la misma. Respecto al primer punto, previamente se había propuesto que, en cromatografía fase reversa, la adición de ácido acético a la fase móvil resulta en una separación más eficiente ¹⁴². En efecto, en este trabajo se observó que, al agregar ácido acético, se genera una mejor separación (Figuras 6 y 7). Esto puede explicarse por el hecho de que los protones del ácido son capaces de neutralizar las cargas de los grupos silanol remanentes en el gel de sílice ¹⁴², evitando interacciones no específicas, y de generar que la mayoría del compuesto se encuentre en forma no ionizada ¹⁴² y, por lo tanto, se separe en conjunto.

Respecto al cambio en las proporciones de disolventes en la fase móvil, éste se realizó para obtener la mayor cantidad de jacareubina pura. Empleando la fase móvil descrita en la literatura para otras xantonas, sí se separaron estos compuestos; sin embargo, la separación ocurrió en la parte superior de la placa (Figura 7), por lo cual, ocurriría en la parte inferior de la columna y en consecuencia la distancia de separación de las xantonas sería corta, resultando en una baja resolución. Por ello, se modificó la proporción de los solventes. Se empleó una mayor proporción de agua para aumentar la polaridad de la fase, reducir la afinidad de las xantonas por la misma e incrementar su retención por parte de la fase estacionaria ¹⁴⁹. En efecto, el aumento en la proporción de agua genera que las xantonas se separen en la parte inferior de la placa (Figuras 8-10). Se probaron distintas proporciones de acetonitrilo y agua, entre 5:5 y 7:3, y se seleccionó la fase 65:35, al ser aquella que separaba a las xantonas a una distancia adecuada y en la parte media de la placa.

Para concluir los aspectos a discutir acerca del aislamiento de la jacareubina, es relevante mencionar que las señales observadas en los espectros de resonancia magnética nuclear, tanto de carbono como de hidrógeno, fueron confirmadas con las descritas en la literatura ^{150,151}.

Respecto a las pruebas biológicas, de acuerdo con los resultados, la jacareubina es un compuesto potencial para el desarrollo de fármacos contra glioblastoma, pues tal como se observa en las Figuras 11 y 14, presenta una alta potencia y baja toxicidad, características deseables para fármacos antineoplásicos. Además, presenta mayor potencia que el fármaco empleado actualmente en la quimioterapia de pacientes con glioblastoma, la temozolomida (Figuras 12 y 13).

Respecto a la diferencia en potencia entre jacareubina y temozolomida, ésta puede atribuirse al mecanismo de acción de los compuestos. La temozolomida depende de dos efectos, siendo el principal la alteración del ADN, y uno complementario, el aumento de ERO ¹⁵². Sin embargo, existen mecanismos de resistencia para ambos efectos. La temozolomida es un agente alquilante que conduce a alteraciones del ADN, entre ellas, la metilación de guaninas en la posición O6, lo cual genera el apareamiento de una timina, en lugar de una citosina. Este error en la replicación es reconocido por el sistema MMR, el cual corta la timina apareada; no obstante, la guanina metilada persiste en la hebra templado. Esto resulta en ciclos de inserción y remoción de timinas, lo cual genera una persistente ruptura del ADN, el colapso del asa de replicación en el siguiente ciclo celular, arresto del ciclo y muerte ⁴¹. Existen dos mecanismos de resistencia a este efecto, en células de glioblastoma. El primero consta de la actividad de la enzima MGMT, que se expresa en algunas células de glioma. Esta enzima remueve grupos alquilo de la posición O6 de guaninas, por lo cual es capaz de reparar el daño por temozolomida. Además, algunos pacientes, presentan un sistema MMR deficiente, con lo cual, a pesar de que la mutación persista (cambio de C por T), no ocurre muerte celular.

Por otro lado, la temozolomida aumenta los niveles de ERO por medio de daño al ADN mitocondrial, el cual codifica para proteínas de los complejos de la cadena de transporte de electrones ¹⁵³. Si la cadena es disfuncional, incrementa la producción de ERO. Sin embargo, el aumento en los niveles intracelulares de ERO inducido por temozolomida es pequeño, no alcanza el umbral de muerte y permite la respuesta antioxidante, que implica un aumento en GSH, mediado por la activación del factor de transcripción Nrf2 (varios de sus genes blanco participan en la síntesis de GSH) ¹⁵². El hecho de que el incremento sea pequeño puede deberse a que el fármaco se distribuye entre ADN nuclear y mitocondrial, de tal suerte que únicamente en concentraciones altas que pudieran llegar a varias mitocondrias se generaría un aumento importante de ERO. Además, las células de glioblastoma presentan niveles basales elevados de GSH, lo que permite contrarrestar este incremento.

La línea celular DBTRG-05 presenta un sistema MMR deficiente, al presentar una mutación sin sentido en el gen que codifica para la proteína aumentada en la segregación postmeiótica 2 (PMS2) ⁸², miembro del sistema MMR que, en complejo con el homólogo 1 de MutL (Mlh1), realiza incisiones en sitios con bases mal apareadas, permitiendo su posterior escisión por exonucleasas ^{154,155}. Esto confiere resistencia al efecto tóxico de la temozolomida mediado por daño al ADN nuclear. De esta manera, la toxicidad inducida por temozolomida dependería únicamente del aumento de ERO. Este incremento sería capaz de alcanzar el umbral de muerte solamente si se emplean concentraciones altas del fármaco (tal como se aprecia en la Figura 12), lo cual podría explicar por qué es menos potente que la jacareubina, la cual, desde concentraciones bajas (menores a 5 μM), aumenta las ERO (Figura 16) y compromete la viabilidad celular (Figura 11).

En este trabajo, se propone que la jacareubina aumenta las ERO al conjugarse con el principal antioxidante celular, el GSH, propuesta respaldada por la disminución en los niveles de GSH inducida por jacareubina (Figura 15). Con esto, se comprometería gran parte del

sistema antioxidante, pues, como se explicó en la introducción, en gran medida, depende del GSH. Además, los carbonos insaturados β al carbonilo de la jacareubina también podrían unirse a tioles de otros componentes del sistema antioxidante, como las enzimas peroxirredoxina y la tiorredoxina. De esta manera, al poder afectar distintos elementos del sistema antioxidante, la jacareubina, desde concentraciones bajas, sería capaz de generar un aumento en ERO lo suficientemente elevado para alcanzar el umbral de muerte.

Podría pensarse que no todas las células presentan los mecanismos de resistencia antes mencionados y que algunos pacientes sí responderían a temozolomida y el glioblastoma no debería ser incurable. No obstante, un grave problema del glioblastoma es la heterogeneidad intratumoral. Se ha observado que dentro de un mismo tumor existen clones con distinta respuesta a temozolomida, algunas mueren con facilidad, mientras que otras son resistentes¹⁵⁶. Es poco probable que el tumor de un paciente sea únicamente de células que responden a temozolomida, aunque sea una pequeña proporción de células debe ser resistente. Sencillamente, todos los tumores tienen una subpoblación de células cancerosas denominadas células troncales tumorales, las cuales presentan quimiorresistencia debido a mecanismos como la expresión del gen *MGMT* y de otros genes de reparación del DNA, específicamente, factores de la vía de la anemia de Fanconi y efectores de recombinación homóloga¹⁵⁷. Además, con el tratamiento con temozolomida, puede presentarse resistencia adquirida en cualquier célula a través de un aumento en la expresión de *MGMT*¹⁵⁸. De esta manera, algunas células persisten tras el tratamiento y generan un nuevo tumor.

En torno a las curvas de viabilidad celular, existe otro punto relevante a discutir. En las curvas de ambos compuestos (Figuras 11 y 12) se puede apreciar una meseta en el 30% de viabilidad, en la cual, a pesar de aumentar la concentración del compuesto, no se modifica la viabilidad celular. Esta observación puede ser explicada por la presencia de células troncales tumorales en la línea celular empleada. Las células troncales tumorales son una subpoblación

de células cancerosas que mantienen al tumor al ser capaces de autorrenovarse y diferenciarse ¹⁵⁹. Asimismo, este tipo de células son capaces de formar tumores en murinos inmunosuprimidos ¹⁶⁰. Notablemente, las células troncales tumorales también confieren farmacoresistencia al tumor ¹⁶⁰. En particular, se ha descrito que células troncales de glioblastoma son resistentes a temozolomida ²¹. Posiblemente, la proporción de células remanente en las curvas de viabilidad, que, de hecho, es la misma proporción en ambas curvas, sean células troncales tumorales. Este tipo de células también presentarían resistencia a jacareubina pues tienen niveles de ERO basales menores que el resto de células cancerosas ¹⁴, de esta manera, la jacareubina, en concentraciones bajas, no lograría alcanzar el umbral de muerte por ERO en células troncales.

Una alternativa para atacar a las células troncales podría ser el uso de cantidades elevadas de jacareubina que logren generar un aumento de ERO que alcance el umbral de muerte. De hecho, en este trabajo, se encontró que, empleando jacareubina en concentración de 500 μM , se logra abatir el total de la población de células cancerosas (Figura 11). No obstante, no se podría emplear la cantidad equivalente en la clínica, pues, como se aprecia en la Figura 14, la jacareubina es tóxica en células no cancerosas en concentraciones mayores a 10 μM .

Sin embargo, el escenario no es negativo pues podrían emplearse estrategias de nanotecnología para hacer llegar concentraciones elevadas de jacareubina únicamente a células troncales tumorales. De esta manera, podría emplearse un co-tratamiento de jacareubina en concentraciones bajas (hasta 10 μM) y jacareubina en una nanoformulación en concentraciones elevadas (por ejemplo, 500 μM). Notablemente, se ha observado que estas nanoformulaciones únicamente llegan a células troncales de glioma y no a células no cancerosas del cerebro, ni a células sanguíneas ¹⁶¹. De esta manera, con la nanoformulación abatiríamos únicamente a las células troncales tumorales y, empleando, a la par, bajas concentraciones de jacareubina,

eliminaríamos también a las células cancerosas no troncales, dejando viables a las células no cancerosas.

Si se tuviera que elegir entre jacareubina y temozolomida para tratar a la población de células cancerosas no troncales, debería considerarse la ventana terapéutica, que es el rango de dosis efectiva por debajo del cual no existe efecto terapéutico y por encima del cual se presentan efectos adversos debido a un exceso de fármaco ¹⁶². Un acercamiento a la ventana terapéutica que puede obtenerse con los datos disponibles al momento es el cociente CI_{50} para células sanas/ CI_{50} para células cancerosas. Este cociente indica cuántas veces más se necesita de la concentración de fármaco que elimina al 50% de células cancerosas para eliminar al 50% de células sanas en cultivos celulares. En este estudio, considerando como células sanas a astrocitos no tumorales de rata, observamos que los cocientes para temozolomida y jacareubina son 0.7 y 14.4 (Tabla 7), respectivamente. Esto sugiere que la jacareubina es más selectiva que la temozolomida, aunque este cociente presenta limitaciones que se discutirán más adelante. Por otro lado, es más fácil eliminar a astrocitos sanos que al promedio de células de glioblastoma con temozolomida, pues 70% de la cantidad que mata a células cancerosas (la mitad de una población) elimina a astrocitos sanos (la mitad). Para la línea celular U87, la temozolomida es más tóxica para glioma que para astrocitos (Tabla suplementaria 2, Tabla 7); sin embargo, en la mayoría de las líneas celulares no es así. Además, la CI_{50} para esta línea celular (355 μ M) está cerca de la CI_{50} para astrocitos normales (400 μ M), por lo cual, no es seguro emplear este fármaco, pues podrían generarse efectos adversos, los cuales, de hecho, ya se han observado en pacientes ^{68,69}. De esta manera, sería más seguro usar jacareubina, pues la cantidad que se requiere para llevar a muerte a células cancerosas es más de 10 veces menor de la que afecta la viabilidad de astrocitos sanos.

Una limitación que presenta este cociente es el uso de CI_{50} encontradas en astrocitos de rata y no de humano. Los astrocitos de rata son más vulnerables al estrés oxidante que los astrocitos

de humano ^{163,164} y, por lo tanto, se esperarían más toxicidad en astrocitos humanos. No obstante, estos cocientes son un acercamiento que permite comparar a la jacareubina con la temozolomida pues ambos fueron calculados con CI_{50} obtenidas en astrocitos de rata. Otra limitante es el uso de datos de sólo dos líneas celulares de glioblastoma para jacareubina debido a que no existen otros datos en la literatura. De esta manera, debe considerarse que el cociente de jacareubina no cubre tanta heterogeneidad como el cociente de temozolomida, aunque cabe resaltar que los datos de temozolomida para las distintas líneas se mantienen en el mismo orden de magnitud (Tabla Suplementaria 2) que es 2 órdenes mayor que el de ambos datos de jacareubina. Asimismo, cabe recordar que este es sólo un acercamiento y se requieren estudios *in vivo* con jacareubina que permitan considerar su toxicidad en todo el cerebro, así como en otros órganos y calcular índices terapéuticos que puedan compararse con los datos existentes de temozolomida.

Respecto a los cambios en los niveles de GSH inducidos por jacareubina, se halló que la jacareubina reduce los niveles de GSH, presentándose una tendencia (efecto no significativo) a una mayor disminución con la concentración mayor de jacareubina, en cada uno de los tiempos evaluados (Figura 15). Notablemente, este posible efecto concentración-dependiente es significativo al considerar juntos los datos de todos los tiempos (acercamiento válido pues no se observaron diferencias significativas en el tiempo, en ninguno de los grupos experimentales). Esta disminución podría explicarse por la unión de la jacareubina con el GSH (interacción propuesta con base en la estructura de la jacareubina) la cual reduciría los niveles disponibles de este antioxidante de manera concentración-dependiente, ya que a mayor cantidad de jacareubina, más uniones se presentarían con GSH.

Respecto a la modulación de GSH por parte de jacareubina en el tiempo, no se apreció un cambio en el efecto de esta xantona a lo largo del tiempo (Figura 15). Podría esperarse que, inicialmente, la jacareubina redujera los niveles de GSH y, después se observara un incremento,

debido a la activación de la respuesta antioxidante que resultaría del aumento en ERO. Sin embargo, se observa una disminución sostenida de los niveles intracelulares de GSH (Figura 15). Este resultado puede deberse a una deficiente respuesta antioxidante. La respuesta antioxidante es, principalmente, transcripcional. El factor de transcripción Nrf2 es activado ante el aumento en los niveles de ERO y conduce a la expresión de genes que codifican para componentes del sistema antioxidante, como la cadena ligera (xCT) del transportador cistina/glutamato, que importa a la célula cistina (precursor de la síntesis de GSH), o las subunidades catalítica y modificadora de la enzima glutamato-cisteína ligasa, que participa en la síntesis de GSH ⁸⁷. Sin embargo, se ha observado que el aumento en ERO reduce la tasa de traducción, de manera concentración-dependiente ¹⁶⁵. Este fenómeno puede estar asociado al umbral de muerte por ERO y puede también explicar una respuesta antioxidante deficiente tras el tratamiento con jacareubina. Un aumento moderado de ERO (fuera del umbral de muerte) conduce a una disminución pequeña en la traducción, de manera que, aún pueden sintetizarse componentes del sistema antioxidante que reduzcan los niveles de ERO. No obstante, un aumento grande en los niveles de ERO (que alcance el umbral de muerte) conduce a una reducción grande en la traducción, que evitaría la síntesis de componentes del sistema antioxidante permitiendo que las ERO continúen aumentando (la producción nunca cesa) y conduzcan a muerte. Esto, de hecho, sería benéfico para las células, pues les permitiría sobrevivir en condiciones donde el daño por ERO se puede reparar sin un gran costo energético, mientras que morirían cuando el daño es excesivo, costoso de reparar y, además, puede conducir a mutagénesis asociada al daño del DNA. De hecho, este fenómeno se ha observado en levaduras y células de mamífero, sugiriendo que está conservado ¹⁶⁵.

Las células cancerosas presentan niveles basales de ERO elevados ¹⁴, la jacareubina los aumenta aún más (Figuras 16); de esta manera, la disminución en la traducción sería significativa y evitaría la respuesta antioxidante. Esto podría explicar que no se observara una

disminución inicial, seguida de un aumento, de los niveles de GSH tras el tratamiento con jacareubina. Esto también explicaría el patrón en que jacareubina aumentó los niveles de ERO. Desde las 18 horas de tratamiento, la jacareubina redujo los niveles de GSH (Figura 15), pero no se observó un aumento significativo en las ERO (Figura 16). No obstante, las ERO aumentaron a las 24 horas e incrementaron aún más a las 48 horas (Figura 16). Este patrón puede explicarse de la siguiente manera: Los niveles de GSH disminuyen primero (18 horas), mientras que las ERO mantienen sus niveles basales, aunque continúa su producción; a las 24 horas se detecta un aumento en ERO debido a que se han seguido produciendo, no han sido neutralizadas por GSH (sus niveles se mantienen bajos), y se acumulan. Conforme avanza el tiempo, las ERO se siguen acumulando y por eso se observa un aumento tiempo-dependiente.

Respecto al incremento en ERO de manera concentración-dependiente (Figura 16), esto concuerda con la hipótesis que se propone en este trabajo, pues, conforme aumenta la cantidad de jacareubina, más uniones se presentan con GSH, más disminuyen sus niveles disponibles, menos ERO se pueden neutralizar y mayores serán sus niveles intracelulares.

Finalmente, acerca de la actividad de las caspasas-3 y -7, los datos obtenidos no son concluyentes. Tal como se observa en la Figura 17, se presenta efecto batch debido a diferentes respuestas (rango de valores) en cada experimento independiente. Este efecto, además de considerarse en el análisis estadístico, debe reducirse en los experimentos, estandarizando el ensayo.

En la literatura se ha reportado la agregación espontánea *in vitro* de péptidos pequeños^{166,167}, como el empleado en este ensayo (sustrato de las enzimas). El grado de agregación varía de acuerdo a variables como el pH, la temperatura, la presencia y concentración de detergentes y la adición de osmolitos¹⁶⁶⁻¹⁶⁸. Debido a esto, es posible que la variación entre experimentos independientes se deba a cambios en alguna de estas variables que ocasionaran diferencias en

la concentración del sustrato. Es factible que esta variación esté relacionada con la concentración de detergentes y osmolitos, pues el amortiguador de reacción contiene Tween-20 y tritón X-100 (detergentes) y glicerol (osmolito), reactivos viscosos, con los cuales se sabe que existe variabilidad en el volumen distribuido al usar micropipeta ¹⁶⁹. De esta manera, posibles soluciones para estandarizar el ensayo serían el uso de otro sistema de pipeteo, la preparación de volúmenes más grandes de amortiguador de reacción o la preparación de soluciones más concentradas de estos compuestos, las cuales después se diluyan en el amortiguador. Por otro lado, un tamaño de muestra mayor, en este ensayo, podría evidenciar un efecto significativo debido a los tratamientos.

Un resumen de los resultados encontrados en el presente trabajo se muestra en la Tabla 8.

Tabla 8. Resumen de resultados.

Determinación	Resultado
Toxicidad de jacareubina en células de glioblastoma humano	- Toxicidad desde concentraciones bajas (<10 μM), con CI_{50} de 2.6 μM . - Mayor potencia que temozolomida.
Toxicidad de jacareubina en células no cancerosas (astrocitos de rata)	-Toxicidad desde concentraciones > 10 μM , con CI_{50} de 37.5 μM . -Cociente CI_{50} en astrocitos/ CI_{50} en células de glioblastoma de 14.4, contra el cociente de 0.7 para temozolomida.
Modulación de los niveles de GSH por parte de jacareubina	-Disminución de los niveles de GSH.
Modulación de los niveles de ERO por parte de jacareubina	-Aumento de los niveles de ERO concentración- y tiempo-dependiente.
Actividad de las caspasas-3 y -7	-Datos preliminares no concluyentes.

8. CONCLUSIONES

El tratamiento con jacareubina en células de glioblastoma es eficiente, es tóxica en la línea DBTRG-05 en concentraciones $<10 \mu\text{M}$ y es más potente que la temozolomida, fármaco empleado actualmente en la quimioterapia para pacientes con glioblastoma. Además, los resultados sugieren que la jacareubina es un compuesto más selectivo, pues existe una mayor distancia entre la concentración necesaria para disminuir la viabilidad de células de glioblastoma y la que ejerce un efecto tóxico en astrocitos no tumorales de rata. El mecanismo molecular de acción de la jacareubina está asociado a la disminución en los niveles del antioxidante GSH y al incremento en los niveles de las ERO, lo cual puede estar involucrado en su efecto dual. De esta manera, la jacareubina es un compuesto potencial para el desarrollo de fármacos para tratar glioblastoma, aunque aún se requieren estudios en torno a su efecto en células troncales tumorales, los mecanismos de muerte celular que induce, su efecto tóxico en células no cancerosas humanas y estudios *in vivo*.

9. REFERENCIAS

1. WHO. World Health Organization Media Centre. *Cancer Fact Sheet* (2017).
2. Asociación Mexicana de Cirugía General. *Tratado de cirugía general*. (Manual Moderno, 2017).
3. Leary, M., Heerboth, S., Lapinska, K. & Sarkar, S. Sensitization of drug resistant cancer cells: A matter of combination therapy. *Cancers (Basel)*. **10**, 1–18 (2018).
4. Connors, T. A. Selectivity in Cancer Chemotherapy. in *Targeting of Drugs* 97–107 (Springer US, 1982). doi:10.1007/978-1-4684-4241-0_6
5. Briones-Herrera, A., Eugenio-Pérez, D., Reyes-Ocampo, J. G., Rivera-Mancía, S. & Pedraza-Chaverri, J. New highlights on the health-improving effects of sulforaphane. *Food Funct*. **9**, (2018).
6. Ovalle-Magallanes, B., Eugenio-Pérez, D. & Pedraza-Chaverri, J. Medicinal properties of mangosteen (*Garcinia mangostana* L.): A comprehensive update. *Food Chem. Toxicol*. **109**, (2017).
7. Giordano, A. & Tommonaro, G. Curcumin and Cancer. *Nutrients* **11**, 2376 (2019).
8. Lin, S. *et al.* Natural compounds as potential adjuvants to cancer therapy: preclinical evidence. *Br. J. Pharmacol.* bph.14816 (2019). doi:10.1111/bph.14816
9. Estrada-Muñiz, E. Tesis de maestría: Coumarinas y xantonas de *C. brasiliense*. Evaluación de su actividad, antiviral, citotóxica y antibacteriana. (Facultad de Ciencias, UNAM, 2001).
10. Tang, Z. Y. *et al.* Four new cytotoxic xanthones from *Garcinia nuijiangensis*. *Fitoterapia* **102**, 109–114 (2015).

11. Xia, Z. *et al.* Xanthones from the leaves of *Garcinia cowa* induce cell cycle arrest, apoptosis, and autophagy in cancer cells. *Molecules* **20**, 11387–11399 (2015).
12. Kaennakam, S., Siripong, P. & Tip-Pyang, S. Kaennacowanols A-C, three new xanthones and their cytotoxicity from the roots of *Garcinia cowa*. *Fitoterapia* **102**, 171–176 (2015).
13. García-Niño, W. R., Estrada-Muñiz, E., Valverde, M., Reyes-Chilpa, R. & Vega, L. Cytogenetic effects of Jacareubin from *Calophyllum brasiliense* on human peripheral blood mononucleated cells *in vitro* and on mouse polychromatic erythrocytes *in vivo*. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **335**, 6–15 (2017).
14. Galadari, S., Rahman, A., Pallichankandy, S. & Thayyullathil, F. Reactive oxygen species and cancer paradox: To promote or to suppress? *Free Radic. Biol. Med.* **104**, 144–164 (2017).
15. Tamimi, A. & Juweid, M. Epidemiology and outcomes of glioblastoma. En *Glioblastoma* (ed. De Vleeschouwer, S.) (Codon Publications., 2017).
16. Lee, J. H. *et al.* Human glioblastoma arises from subventricular zone cells with low-level driver mutations. *Nature* **560**, 243–247 (2018).
17. Alcantara Llaguno, S. *et al.* Malignant Astrocytomas Originate from Neural Stem/Progenitor Cells in a Somatic Tumor Suppressor Mouse Model. *Cancer Cell* **15**, 45–56 (2009).
18. Clavreul, S. *et al.* Cortical astrocytes develop in a plastic manner at both clonal and cellular levels. *Nat. Commun.* **10**, 4884 (2019).
19. Calzolari, F. *et al.* Fast clonal expansion and limited neural stem cell self-renewal in the adult subependymal zone. *Nat. Neurosci.* **18**, 490–492 (2015).

20. Kwon, C.-H. *et al.* Pten Haploinsufficiency Accelerates Formation of High-Grade Astrocytomas. *Cancer Res.* **68**, 3286–3294 (2008).
21. Chen, J. *et al.* A restricted cell population propagates glioblastoma growth after chemotherapy. *Nature* **488**, 522–526 (2012).
22. Ernst, C. & Christie, B. R. The putative neural stem cell marker, nestin, is expressed in heterogeneous cell types in the adult rat neocortex. *Neuroscience* **138**, 183–188 (2006).
23. Alcantara Llaguno, S. R. *et al.* Adult Lineage-Restricted CNS Progenitors Specify Distinct Glioblastoma Subtypes. *Cancer Cell* **28**, 429–440 (2015).
24. Galvao, R. P. *et al.* Transformation of quiescent adult oligodendrocyte precursor cells into malignant glioma through a multistep reactivation process. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **111**, E4214–E4223 (2014).
25. Alcantara Llaguno, S. *et al.* Cell-of-origin susceptibility to glioblastoma formation declines with neural lineage restriction. *Nat. Neurosci.* **22**, 545–555 (2019).
26. Radke, J., Bortolussi, G. & Pagenstecher, A. Akt and c-Myc Induce Stem-Cell Markers in Mature Primary p53^{-/-} Astrocytes and Render These Cells Gliomagenic in the Brain of Immunocompetent Mice. *PLoS One* **8**, e56691 (2013).
27. Brady, C. A. & Attardi, L. D. p53 at a glance. *J. Cell Sci.* **123**, 2527–2532 (2010).
28. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* **144**, 646–674 (2011).
29. Uhrbom, L. *et al.* Ink4a-Arf loss cooperates with KRas activation in astrocytes and neural progenitors to generate glioblastomas of various morphologies depending on activated Akt. *Cancer Res.* **62**, 5551–8 (2002).

30. Rao, J. S. Molecular mechanisms of glioma invasiveness: the role of proteases. *Nat. Rev. Cancer* **3**, 489–501 (2003).
31. Eugenio-Pérez, D., Briones-Herrera, A., Martínez-Klimova, E. & Pedraza-Chaverri, J. *Divide et Impera: Drp1-mediated Mitochondrial Fission in Glioma Malignancy. Yale J. Biol. Med.* **92**, 423–433 (2019).
32. Brat, D. J. *et al.* Pseudopalisades in Glioblastoma Are Hypoxic, Express Extracellular Matrix Proteases, and Are Formed by an Actively Migrating Cell Population. *Cancer Res.* **64**, 920–927 (2004).
33. Manoochehri Khoshinani, H., Afshar, S. & Najafi, R. Hypoxia: A Double-Edged Sword in Cancer Therapy. *Cancer Invest.* **34**, 536–545 (2016).
34. Eckerich, C. *et al.* Hypoxia can induce c-Met expression in glioma cells and enhance SF/HGF-induced cell migration. *Int. J. Cancer* **121**, 276–283 (2007).
35. Joseph, J. V. *et al.* Hypoxia enhances migration and invasion in glioblastoma by promoting a mesenchymal shift mediated by the HIF1 α -ZEB1 axis. *Cancer Lett.* **359**, 107–116 (2015).
36. Zhang, Y., Xu, L., Li, A. & Han, X. The roles of ZEB1 in tumorigenic progression and epigenetic modifications. *Biomed. Pharmacother.* **110**, 400–408 (2019).
37. Louis, D. N. *et al.* The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol.* **131**, 803–820 (2016).
38. Han, S. *et al.* IDH mutation in glioma: molecular mechanisms and potential therapeutic targets. *Br. J. Cancer* **122**, 1580–1589 (2020).
39. Dong, Z. & Cui, H. Epigenetic modulation of metabolism in glioblastoma. *Semin. Cancer*

Biol. **57**, 45–51 (2019).

40. Zhou, W. & Wahl, D. R. Metabolic abnormalities in glioblastoma and metabolic strategies to overcome treatment resistance. *Cancers (Basel)*. **11**, (2019).
41. Zhang, J., F.G. Stevens, M. & D. Bradshaw, T. Temozolomide: Mechanisms of Action, Repair and Resistance. *Curr. Mol. Pharmacol.* **5**, 102–114 (2012).
42. Molenaar, R. J., Maciejewski, J. P., Wilmink, J. W. & van Noorden, C. J. F. Wild-type and mutated IDH1/2 enzymes and therapy responses. *Oncogene* **37**, 1949–1960 (2018).
43. Johannessen, T.-C. A. *et al.* The DNA repair protein ALKBH2 mediates temozolomide resistance in human glioblastoma cells. *Neuro. Oncol.* **15**, 269–278 (2013).
44. Phillips, H. S. *et al.* Molecular subclasses of high-grade glioma predict prognosis, delineate a pattern of disease progression, and resemble stages in neurogenesis. *Cancer Cell* **9**, 157–173 (2006).
45. Verhaak, R. G. W. *et al.* Integrated Genomic Analysis Identifies Clinically Relevant Subtypes of Glioblastoma Characterized by Abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer Cell* **17**, 98–110 (2010).
46. Gill, B. J. *et al.* MRI-localized biopsies reveal subtype-specific differences in molecular and cellular composition at the margins of glioblastoma. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **111**, 12550–12555 (2014).
47. Sturm, D. *et al.* Hotspot Mutations in H3F3A and IDH1 Define Distinct Epigenetic and Biological Subgroups of Glioblastoma. *Cancer Cell* **22**, 425–437 (2012).
48. Wang, Q. *et al.* Tumor Evolution of Glioma-Intrinsic Gene Expression Subtypes Associates with Immunological Changes in the Microenvironment. *Cancer Cell* **32**, 42–

- 56.e6 (2017).
49. Brennan, C. W. *et al.* The Somatic Genomic Landscape of Glioblastoma. *Cell* **155**, 462–477 (2013).
 50. Noushmehr, H. *et al.* Identification of a CpG Island Methylator Phenotype that Defines a Distinct Subgroup of Glioma. *Cancer Cell* **17**, 510–522 (2010).
 51. Chang, S. M. *et al.* Patterns of Care for Adults With Newly Diagnosed Malignant Glioma. *JAMA* **293**, 557 (2005).
 52. Tachamo, N., Nazir, S., Lohani, S., Le, B. & Alweis, R. Glioblastoma management: challenges in the elderly population. *J. Community Hosp. Intern. Med. Perspect.* **6**, 32372 (2016).
 53. Hentschel, S. Current surgical management of glioblastoma. En *Glioblastoma Multiforme* (eds. Markert, J., DeVita, V., Hellman, S. & Rosenberg, S.) (John and Bartlett Publishers, 2005).
 54. Pallud, J., Capelle, L. & Huberfeld, G. Tumoral epileptogenicity: How does it happen? *Epilepsia* **54**, 30–34 (2013).
 55. Polewski, M. D. *et al.* Increased Expression of System x_c – in Glioblastoma Confers an Altered Metabolic State and Temozolomide Resistance. *Mol. Cancer Res.* **14**, 1229–1242 (2016).
 56. Takeuchi, S. *et al.* Increased xCT expression correlates with tumor invasion and outcome in patients with glioblastomas. *Neurosurgery* **72**, 33–41 (2013).
 57. Tsuchihashi, K. *et al.* The EGF receptor promotes the malignant potential of glioma by regulating amino acid transport system xc(-). *Cancer Res.* **76**, 2954–2963 (2016).

58. Kim, J. Y. *et al.* Human cystine/glutamate transporter: cDNA cloning and upregulation by oxidative stress in glioma cells. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1512**, 335–344 (2001).
59. Lefranc, F., Le Rhun, E., Kiss, R. & Weller, M. Glioblastoma quo vadis: Will migration and invasiveness reemerge as therapeutic targets? *Cancer Treat. Rev.* **68**, 145–154 (2018).
60. Buckingham, S. C. & Robel, S. Glutamate and tumor-associated epilepsy: Glial cell dysfunction in the peritumoral environment. *Neurochem. Int.* **63**, 696–701 (2013).
61. Chen, H. *et al.* Mutant IDH1 and seizures in patients with glioma. *Neurology* **88**, 1805–1813 (2017).
62. Campbell, S. L. *et al.* GABAergic disinhibition and impaired KCC2 cotransporter activity underlie tumor-associated epilepsy. *Glia* **63**, 23–36 (2015).
63. Traurig, H. The brainstem reticular formation. En *Neuroscience in Medicine* (ed. Conn, M.) (Humana Press, Totowa, NJ, 2008).
64. Bao, S. *et al.* Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature* **444**, 756–760 (2006).
65. IMSS. Tratamiento del Glioma Cerebral de alto grado (Astrocitoma-Oligodendroglioma III-IV) en el Adulto. *Catálogo Maest. Guías Práctica Clínica IMSS-647-1*, 42 (2016).
66. American Society of Clinical Oncology. Cancer.net. *¿Qué es la radioterapia?*
67. Wild-Bode, C., Weller, M., Rimner, A., Dichgans, J. & Wick, W. Sublethal irradiation promotes migration and invasiveness of glioma cells: implications for radiotherapy of human glioblastoma. *Cancer Res.* **61**, 2744–50 (2001).
68. Hilverda, K. *et al.* Cognitive functioning in glioblastoma patients during radiotherapy and

- temozolomide treatment: Initial findings. *J. Neurooncol.* **97**, 89–94 (2010).
69. Wefel, J., Armstrong, T. & Wang, M. Clinical utility of neurocognitive function as a prognostic factor for survival and measure of differential between-arm treatment effects on RTOG 0525. En *2011 Society for Neuro-Oncology Meeting in Collaboration with the AANS/CNS Section on Tumors* (2011).
 70. Nokia, M. S., Anderson, M. L. & Shors, T. J. Chemotherapy disrupts learning, neurogenesis and theta activity in the adult brain. *Eur. J. Neurosci.* **36**, 3521–3530 (2012).
 71. Jackson, C., Westphal, M. & Quiñones-Hinojosa, A. Complications of glioma surgery. En *Handbook of Clinical Neurology*. 201–218 (2016). doi:10.1016/B978-0-12-802997-8.00012-8
 72. Weller, M. *et al.* European Association for Neuro-Oncology (EANO) guideline on the diagnosis and treatment of adult astrocytic and oligodendroglial gliomas. *Lancet Oncol.* **18**, e315–e329 (2017).
 73. IARC. Population Fact Sheets: World. *Globocan 2012* (2012).
 74. IARC. Population Fact Sheets: World. *Globocan 2018* (2018).
 75. Miller, A. B., Morgan, L. L., Udasin, I. & Davis, D. L. Cancer epidemiology update, following the 2011 IARC evaluation of radiofrequency electromagnetic fields (Monograph 102). *Environ. Res.* **167**, 673–683 (2018).
 76. Philips, A., Henshaw, D. L., Lamburn, G. & O'Carroll, M. J. Brain tumours: Rise in glioblastoma multiforme incidence in England 1995-2015 Suggests an Adverse Environmental or Lifestyle Factor. *J. Environ. Public Health* **2018**, (2018).
 77. Smith-Rooker, J., Garrett, A., Hodges, L. & Shue, V. Prevalence of Glioblastoma Multiforme

- subjects with prior exposure to herbicides. *J. Neurosci. Nurs.* **24**, 260–264 (1992).
78. Musicco, M. *et al.* A case-control study of brain gliomas and occupational exposure to chemical carcinogens. The risk of farmers. *Am. J. Epidemiol.* **128**, 778–785 (1988).
79. Akhavan-Sigari, R., Baf, M. M. F., Ariabod, V., Rohde, V. & Rahighi, S. Connection between cell phone use, p53 gene expression in different zones of glioblastoma multiforme and survival prognoses. *Rare Tumors* **6**, 116–120 (2014).
80. IARC. Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk of Humans. Non-ionizing radiation. Part 2: Radiofrequency electromagnetic fields. **102**, (2013).
81. Lehrer, S., Green, S. & Stock, R. Association between number of cell phone contracts and brain tumor incidence in nineteen U.S. States. *J. Neurooncol.* **101**, 505–507 (2011).
82. Sanger Institute. Catalogue of Somatic Mutations in Cancer. Cell Lines Project. Disponible en www.cancer.sanger.ac.uk (2018). doi:10.1016/j.jmoldx.2015.11.004
83. Kruse, C. A. *et al.* Characterization of a Continuous Human Glioma Cell Line DBTRG-05MG : Growth Kinetics , Karyotype , Receptor Expression , and Tumor Suppressor Gene Analyses. *In Vitro. Cell. Dev. Biol.* **28A**, 609–614 (1992).
84. García Zebadúa, J. C. *et al.* The tropical tree *Calophyllum brasiliense*: A botanical, chemical and pharmacological review. *Vitae* **21**, 126–145 (2014).
85. Reyes-Chilpa, R., Jimenez-Estrada, M. & Estrada-Muñiz, E. Antifungal xanthenes from *Calophyllum brasiliensis* Heartwood. *J. Chem. Ecol.* **23**, 1901–1911 (1997).
86. Wang, X. *et al.* NF- κ B inhibitor reverses temozolomide resistance in human glioma TR/U251 cells. *Oncol. Lett.* **9**, 2586–2590 (2015).
87. Pedraza-Chaverri, J., Eugenio-pérez, D. & Molina-Jijón, E. Uso de activadores naturales de

- Nrf2 en diversas condiciones patológicas. *Mensaje Bioquímico* **XL**, 211–229 (2016).
88. Konigsberg, M. Estrés oxidante y daño celular. En *Antioxidantes en alimentos y salud*. (eds. Álvarez-Parrilla, E., de la Rosa, A., González-Aguilar, G. & Ayala-Zavala, J.) 584 (Clave Editorial, 2012).
89. Kehrer, J. P., Robertson, J. D. & Smith, C. V. Free Radicals and Reactive Oxygen Species. *Compr. Toxicol. Second Ed.* **1–14**, 277–307 (2010).
90. Goodsell, D. S. Catalase. *RCSB Protein Data Bank* (2004). doi:10.2210/rcsb_pdb/mom_2004_9
91. Goodsell, D. S. Catalase. *RCSB Protein Data Bank* (2004). doi:10.2210/rcsb_pdb/mom_2004_9
92. Rhee, S. G. Overview on Peroxiredoxin. *Mol. Cells* **39**, 1–5 (2016).
93. Lee, S., Kim, S. M. & Lee, R. T. Thioredoxin and thioredoxin target proteins: From molecular mechanisms to functional significance. *Antioxidants Redox Signal.* **18**, 1165–1207 (2013).
94. Stancill, J. S. & Corbett, J. A. The Role of Thioredoxin/Peroxiredoxin in the β -Cell Defense Against Oxidative Damage. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. **12**, 1–8 (2021).
95. Nimse, S. B. & Pal, D. Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. *RSC Adv.* **5**, 27986–28006 (2015).
96. Lloyd, R. E. *et al.* Identification and functional prediction of mitochondrial complex III and IV mutations associated with glioblastoma. *Neuro. Oncol.* **17**, 942–952 (2015).
97. Zhou, Y. *et al.* Metabolic Alterations in Highly Tumorigenic Glioblastoma Cells. *J. Biol. Chem.* **286**, 32843–32853 (2011).

98. Kreth, S. *et al.* Identification of valid endogenous control genes for determining gene expression in human glioma. *Neuro. Oncol.* **12**, 570–579 (2010).
99. Guzy, R. D., Sharma, B., Bell, E., Chandel, N. S. & Schumacker, P. T. Loss of the SdhB, but Not the SdhA, Subunit of Complex II Triggers Reactive Oxygen Species-Dependent Hypoxia-Inducible Factor Activation and Tumorigenesis. *Mol. Cell. Biol.* **28**, 718–731 (2008).
100. Strickland, M. & Stoll, E. A. Metabolic Reprogramming in Glioma. *Front. Cell Dev. Biol.* **5**, (2017).
101. Xu, H. *et al.* Epidermal growth factor receptor in glioblastoma (Review). *Oncol. Lett.* **14**, 512–516 (2017).
102. Johnson, B. & Chandra, J. Abstract 511: EGFR-initiated NADPH oxidase activity regulates Fyn expression in glioblastoma multiforme. En *Molecular and Cellular Biology* 511–511 (American Association for Cancer Research, 2014). doi:10.1158/1538-7445.AM2014-511
103. Chen, X. *et al.* Integrin $\alpha 1\beta 1$ Controls Reactive Oxygen Species Synthesis by Negatively Regulating Epidermal Growth Factor Receptor-Mediated Rac Activation. *Mol. Cell. Biol.* **27**, 3313–3326 (2007).
104. Gont, A. *et al.* PTEN loss represses glioblastoma tumor initiating cell differentiation via inactivation of Lgl1. *Oncotarget* **4**, 1266–1279 (2013).
105. Marinkovic, D. *et al.* Foxo3 is required for the regulation of oxidative stress in erythropoiesis. *J. Clin. Invest.* **117**, 2133–2144 (2007).
106. Comelli, M., Pretis, I., Buso, A. & Mavelli, I. Mitochondrial energy metabolism and signalling in human glioblastoma cell lines with different PTEN gene status. *J. Bioenerg.*

Biomembr. **50**, 33–52 (2018).

107. Guzy, R. D. & Schumacker, P. T. Oxygen sensing by mitochondria at complex III: the paradox of increased reactive oxygen species during hypoxia. *Exp. Physiol.* **91**, 807–819 (2006).
108. Damiani, E. *et al.* Modulation of Oxidative Status by Normoxia and Hypoxia on Cultures of Human Dermal Fibroblasts: How Does It Affect Cell Aging? *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2018**, 1–15 (2018).
109. Hsieh, C.-H. *et al.* NADPH Oxidase Subunit 4-Mediated Reactive Oxygen Species Contribute to Cycling Hypoxia-Promoted Tumor Progression in Glioblastoma Multiforme. *PLoS One* **6**, e23945 (2011).
110. Hsieh, C.-H., Chang, H.-T., Shen, W.-C., Shyu, W.-C. & Liu, R.-S. Imaging the Impact of Nox4 in Cycling Hypoxia-mediated U87 Glioblastoma Invasion and Infiltration. *Mol. Imaging Biol.* **14**, 489–499 (2012).
111. Chen, W.-L., Wang, C.-C., Lin, Y.-J., Wu, C.-P. & Hsieh, C.-H. Cycling hypoxia induces chemoresistance through the activation of reactive oxygen species-mediated B-cell lymphoma extra-long pathway in glioblastoma multiforme. *J. Transl. Med.* **13**, 389 (2015).
112. Chang, F. *et al.* Involvement of PI3K/Akt pathway in cell cycle progression, apoptosis, and neoplastic transformation: a target for cancer chemotherapy. *Leukemia* **17**, 590–603 (2003).
113. Chiarugi, P. *et al.* Reactive oxygen species as essential mediators of cell adhesion. *J. Cell Biol.* **161**, 933–944 (2003).
114. Binker, M. G., Binker-Cosen, A. A., Richards, D., Oliver, B. & Cosen-Binker, L. I. EGF

- promotes invasion by PANC-1 cells through Rac1/ROS-dependent secretion and activation of MMP-2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **379**, 445–450 (2009).
115. Siwik, D. A. & Colucci, W. S. Regulation of Matrix Metalloproteinases by Cytokines and Reactive Oxygen / Nitrogen Species in the Myocardium. *Heart Failure Reviews*, 43–51 (2004).
 116. Saari, H. *et al.* Reactive oxygen species as regulators of human neutrophil and fibroblast interstitial collagenases. *Int. J. Tissue React.* **14**, 113–20 (1992).
 117. Alexandrova, A. Y., Kopnin, P. B., Vasiliev, J. M. & Kopnin, B. P. ROS up-regulation mediates Ras-induced changes of cell morphology and motility. *Exp. Cell Res.* **312**, 2066–2073 (2006).
 118. Kim, J.-S., Huang, T. Y. & Bokoch, G. M. Reactive Oxygen Species Regulate a Slingshot-Cofilin Activation Pathway. *Mol. Biol. Cell* **20**, 2650–2660 (2009).
 119. Tothhawng, L., Deng, S., Pervaiz, S. & Yap, C. T. Redox regulation of cancer cell migration and invasion. *Mitochondrion* **13**, 246–253 (2013).
 120. Fiaschi, T. *et al.* Redox Regulation of β -Actin during Integrin-mediated Cell Adhesion. *J. Biol. Chem.* **281**, 22983–22991 (2006).
 121. Galluzzi, L. *et al.* Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death Differ.* **25**, 486–541 (2018).
 122. Hsu, S.-K. *et al.* The Role of Necroptosis in ROS-Mediated Cancer Therapies and Its Promising Applications. *Cancers (Basel)*. **12**, 2185 (2020).
 123. Wang, F., Gómez-Sintes, R. & Boya, P. Lysosomal membrane permeabilization and cell death. *Traffic* **19**, 918–931 (2018).

124. McKenzie, B. A., Dixit, V. M. & Power, C. Fiery Cell Death: Pyroptosis in the Central Nervous System. *Trends Neurosci.* **43**, 55–73 (2020).
125. Domingos, P. M. & Cairrao, F. Apoptosis: Molecular Mechanisms. En: Encyclopedia of Life Sciences. (2001). doi:10.1002/9780470015902.a0001150.pub2
126. Zuo, Y. *et al.* Oxidative modification of caspase-9 facilitates its activation via disulfide-mediated interaction with Apaf-1. *Cell Res.* **19**, 449–457 (2009).
127. Luanpitpong, S. *et al.* Regulation of apoptosis by Bcl-2 cysteine oxidation in human lung epithelial cells. *Mol. Biol. Cell* **24**, 858–869 (2013).
128. Luanpitpong, S. *et al.* Mitochondrial superoxide mediates doxorubicin-induced keratinocyte apoptosis through oxidative modification of ERK and Bcl-2 ubiquitination. *Biochem. Pharmacol.* **83**, 1643–1654 (2012).
129. Li, D., Ueta, E., Kimura, T., Yamamoto, T. & Osaki, T. Reactive oxygen species (ROS) control the expression of Bcl-2 family proteins by regulating their phosphorylation and ubiquitination. *Cancer Sci* **95**, 644–650 (2004).
130. Li, J. *et al.* Ferroptosis: past, present and future. *Cell Death Dis.* **11**, 88 (2020).
131. Ferguson, G. D. & Bridge, W. J. The glutathione system and the related thiol network in *Caenorhabditis elegans*. *Redox Biol.* **24**, 101171 (2019).
132. Chung, W. J. Inhibition of Cystine Uptake Disrupts the Growth of Primary Brain Tumors. *J. Neurosci.* **25**, 7101–7110 (2005).
133. Forman, H. J., Zhang, H. & Rinna, A. Glutathione: Overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis. *Mol Asp. Med* **30**, 1–12 (2009).
134. Halliwell, B. & Gutteridge, J. *Free Radicals in Biology and Medicine*. (Oxford University

Press, 1999).

135. Townsend, D. M., Tew, K. D. & Tapiero, H. The importance of glutathione in human disease. *Biomed. Pharmacother.* **57**, 145–155 (2003).
136. Fack, F. *et al.* Altered metabolic landscape in IDH-mutant gliomas affects phospholipid, energy, and oxidative stress pathways. *EMBO Mol. Med.* **9**, 1681–1695 (2017).
137. Zhang, J., F.G. Stevens, M. & D. Bradshaw, T. Temozolomide: Mechanisms of Action, Repair and Resistance. *Curr. Mol. Pharmacol.* **5**, 102–114 (2012).
138. Rocha, C. R. R., Kajitani, G. S., Quinet, A., Fortunato, R. S. & Menck, C. F. M. NRF2 and glutathione are key resistance mediators to temozolomide in glioma and melanoma cells. *Oncotarget* **7**, (2016).
139. Dewick, P. *Essentials of Organic chemistry. For students of pharmacy, medicinal chemistry and biological chemistry.* (John Wiley & Sons, Inc., 2006).
140. Castillo-Arellano, J. I. *et al.* Jacareubin inhibits FcεRI-induced extracellular calcium entry and production of reactive oxygen species required for anaphylactic degranulation of mast cells. *Biochem. Pharmacol.* **154**, 344–356 (2018).
141. Yodhnu, S., Sirikatitham, A. & Wattanapiromsakul, C. Validation of LC for the Determination of α-Mangostin in mangosteen peel extract: A tool for quality assessment of *Garcinia mangostana* L. *J. Chromatogr. Sci.* **47**, 185–189 (2009).
142. Chen, Y., Mehok, A. R., Mant, C. T. & Hodges, R. S. Optimum concentration of trifluoroacetic acid for reversed-phase liquid chromatography of peptides revisited. *J. Chromatogr. A* **1043**, 9–18 (2004).
143. Zook, C. D. & Busta, F. F. TOTAL VIABLE COUNTS | Microscopy. En *Encyclopedia of Food*

Microbiology 2176–2180 (Elsevier, 1999). doi:10.1006/rwfm.1999.4010

144. Imiela, A., Surmacki, J. & Abramczyk, H. Novel strategies of Raman imaging for monitoring the therapeutic benefit of temozolomide in glioblastoma. *J. Mol. Struct.* 128381 (2020). doi:10.1016/j.molstruc.2020.128381
145. Eruslanov, E. & Kusmartsev, S. Identification of ROS Using Oxidized DCFDA and Flow-Cytometry. En *Advanced Protocols in Oxidative Stress II* (ed. Armstrong, D.) 57–72 (Humana Press, Totowa, NJ, 2010). doi:10.1007/978-1-60761-411-1_4
146. Rahman, I., Kode, A. & Biswas, S. K. Assay for quantitative determination of glutathione and glutathione disulfide levels using enzymatic recycling method. *Nat. Protoc.* **1**, 3159–3165 (2006).
147. Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248–254 (1976).
148. Niles, A. L., Moravec, R. A. & Riss, T. L. Caspase Activity Assays. En *Apoptosis and Cancer* (eds. Mor, G. & Alvero, A.) 137–150 (Humana Press, 2008). doi:10.1007/978-1-59745-339-4_11
149. Snyder, L. R., Glajch, J. L. & Kirkland, J. J. *PRACTICAL HPLC METHOD*. Wiley-Interscience **2nd ed**, (1997).
150. Westerman, P. W., Gunasekera, S. P., Uvais, M., Sultanbawa, S. & Kazlauskas, R. Carbon-13 NMR study of naturally occurring xanthenes. *Org. Magn. Reson.* **9**, 631–636 (1977).
151. Rodríguez Cano Mercado, J. Tesis de licenciatura: *Evaluación de la citotoxicidad de xantonas naturales y sus derivados acetilados y metilados en líneas celulares tumorales*. (Facultad de Química, UNAM, 2004).

152. Rocha, C. R. R., Kajitani, G. S., Quinet, A., Fortunato, R. S. & Menck, C. F. M. NRF2 and glutathione are key resistance mediators to temozolomide in glioma and melanoma cells. *Oncotarget* **7**, (2016).
153. Oliva, C. R., Moellering, D. R., Gillespie, G. Y. & Griguer, C. E. Acquisition of Chemoresistance in Gliomas Is Associated with Increased Mitochondrial Coupling and Decreased ROS Production. *PLoS One* **6**, e24665 (2011).
154. Groothuizen, F. S. & Sixma, T. K. The conserved molecular machinery in DNA mismatch repair enzyme structures. *DNA Repair (Amst)*. **38**, 14–23 (2016).
155. Li, G.-M. Mechanisms and functions of DNA mismatch repair. *Cell Res.* **18**, 85–98 (2008).
156. Akgül, S. *et al.* Intratumoural Heterogeneity Underlies Distinct Therapy Responses and Treatment Resistance in Glioblastoma. *Cancers (Basel)*. **11**, 190 (2019).
157. MacLeod, G. *et al.* Genome-Wide CRISPR-Cas9 Screens Expose Genetic Vulnerabilities and Mechanisms of Temozolomide Sensitivity in Glioblastoma Stem Cells. *Cell Rep.* **27**, 971–986.e9 (2019).
158. Rabé, M. *et al.* Identification of a transient state during the acquisition of temozolomide resistance in glioblastoma. *Cell Death Dis.* **11**, 19 (2020).
159. Kondo, T. Stem cell-like cancer cells in cancer cell lines. *Cancer Biomarkers* **3**, 245–250 (2007).
160. Kondo, T. Stem cell-like cancer cells in cancer cell lines. *Cancer Biomarkers* **3**, 245–250 (2007).
161. Sun, T. *et al.* Targeting glioma stem cells enhances anti-tumor effect of boron neutron capture therapy. *Oncotarget* **7**, 43095–43108 (2016).

162. Gesteira Ponce, A. *Diseño y desarrollo de un programa de farmacogenética en antipsicóticos enfocado al tratamiento de la esquizofrenia*. (Universidad de Santiago de Compostela, Facultad de Medicina., 2007).
163. Li, J. *et al.* Conservation and divergence of vulnerability and responses to stressors between human and mouse astrocytes. *Nat. Commun.* **12**, 3958 (2021).
164. Ling, Y. *et al.* Protective effects of parecoxib on rat primary astrocytes from oxidative stress induced by hydrogen peroxide. *J. Zhejiang Univ. B* **17**, 692–702 (2016).
165. Topf, U. *et al.* Quantitative proteomics identifies redox switches for global translation modulation by mitochondrially produced reactive oxygen species. *Nat. Commun.* **9**, 324 (2018).
166. Guo, Z., Gong, R., Jiang, Y. & Wan, X. Tetrapeptide–coumarin conjugate 3D networks based on hydrogen-bonded charge transfer complexes: gel formation and dye release. *Soft Matter* **11**, 6118–6124 (2015).
167. Mason, M. L. *et al.* pH-Controlled Chiral Packing and Self-Assembly of a Coumarin Tetrapeptide. *Langmuir* **35**, 12460–12468 (2019).
168. G-Biosciences. The protein's man blog. A discussion of protein research. *Tips for preventing protein aggregation and loss of protein solubility* (2019). Disponible en: <https://info.gbiosciences.com/blog/tips-for-preventing-protein-aggregation-loss-of-protein-solubility>.
169. Ewald, K. *Liquid Handling. Laboratory practice*. (Verlag Modern Industrie, 2005).
170. Sanger Institute. Cell Model Passports. *Model information: DBTRG-05MG* Disponible en: <https://cellmodelpassports.sanger.ac.uk/passports/SIDM00867>.

171. Lan, F. *et al.* Sulforaphane reverses chemo-resistance to temozolomide in glioblastoma cells by NF- κ B-dependent pathway downregulating MGMT expression. *Int. J. Oncol.* **48**, 559–568 (2016).
172. Lee, J. E., Lim, J. H., Hong, Y. K. & Yang, S. H. High-Dose Metformin Plus Temozolomide Shows Increased Anti-tumor Effects in Glioblastoma *in vitro* and *in vivo* Compared with Monotherapy. *Cancer Res. Treat.* **50**, 1331–1342 (2018).
173. Khazaei, M., Pazhouhi, M. & Khazaei, S. Temozolomide and tranilast synergistic antiproliferative effect on human glioblastoma multiforme cell line (U87MG). *Med. J. Islam. Repub. Iran* **33**, 235–242 (2019).
174. Afshari, A. R. *et al.* Cytotoxic effects of auraptene against a human malignant glioblastoma cell line. *Avicenna J. phytomedicine* **9**, 334–346 (2019).
175. Zhang, P., Chen, X.-B., Ding, B.-Q., Liu, H.-L. & He, T. Down-regulation of ABCE1 inhibits temozolomide resistance in glioma through the PI3K/Akt/NF- κ B signaling pathway. *Biosci. Rep.* **38**, (2018).

10. MATERIAL SUPLEMENTARIO.

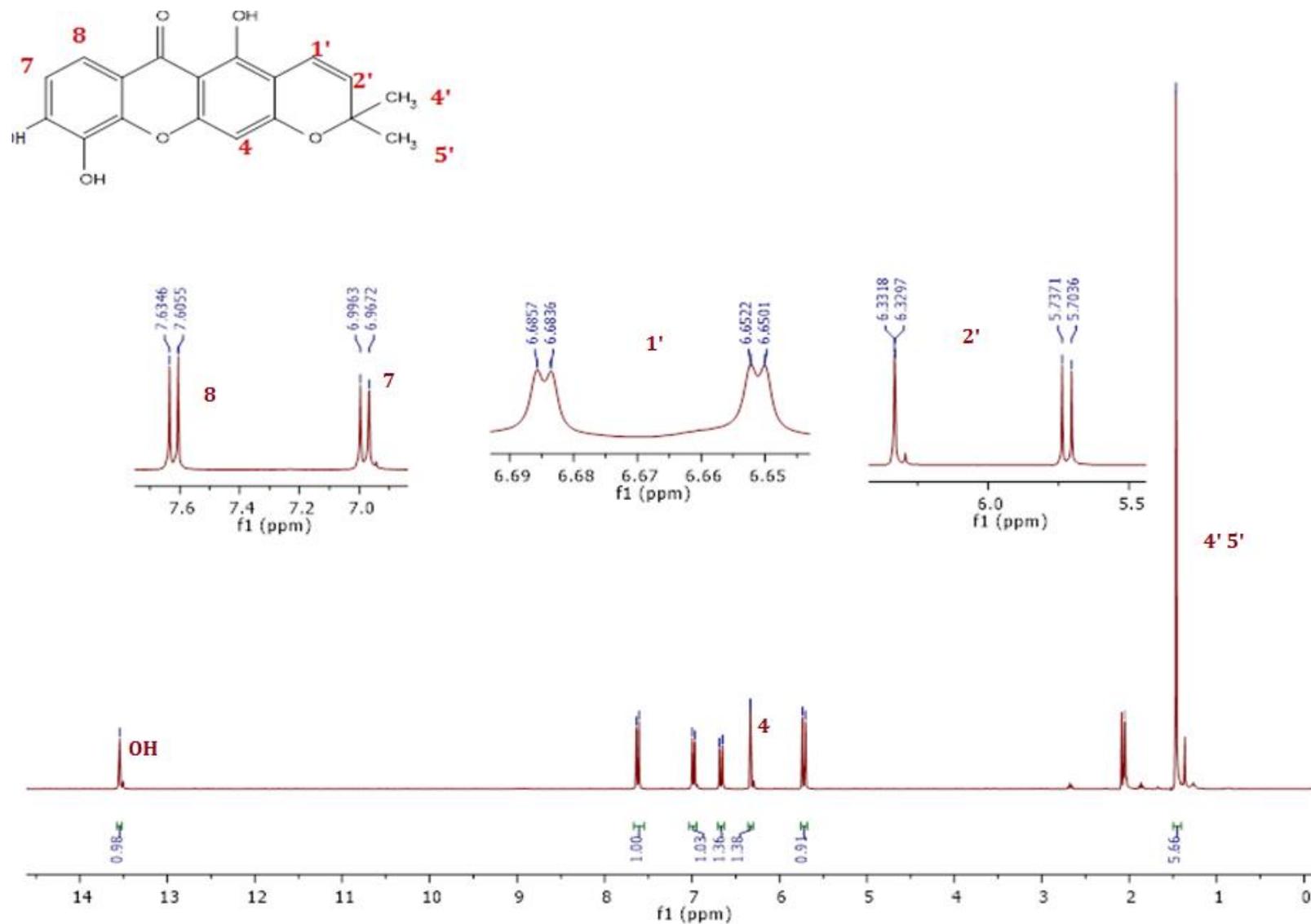


Figura Suplementaria 1. Espectro de resonancia magnética nuclear de hidrógeno de las fracciones 15 y 17 de la segunda columna. Se aprecian los picos correspondientes a la xantona III.

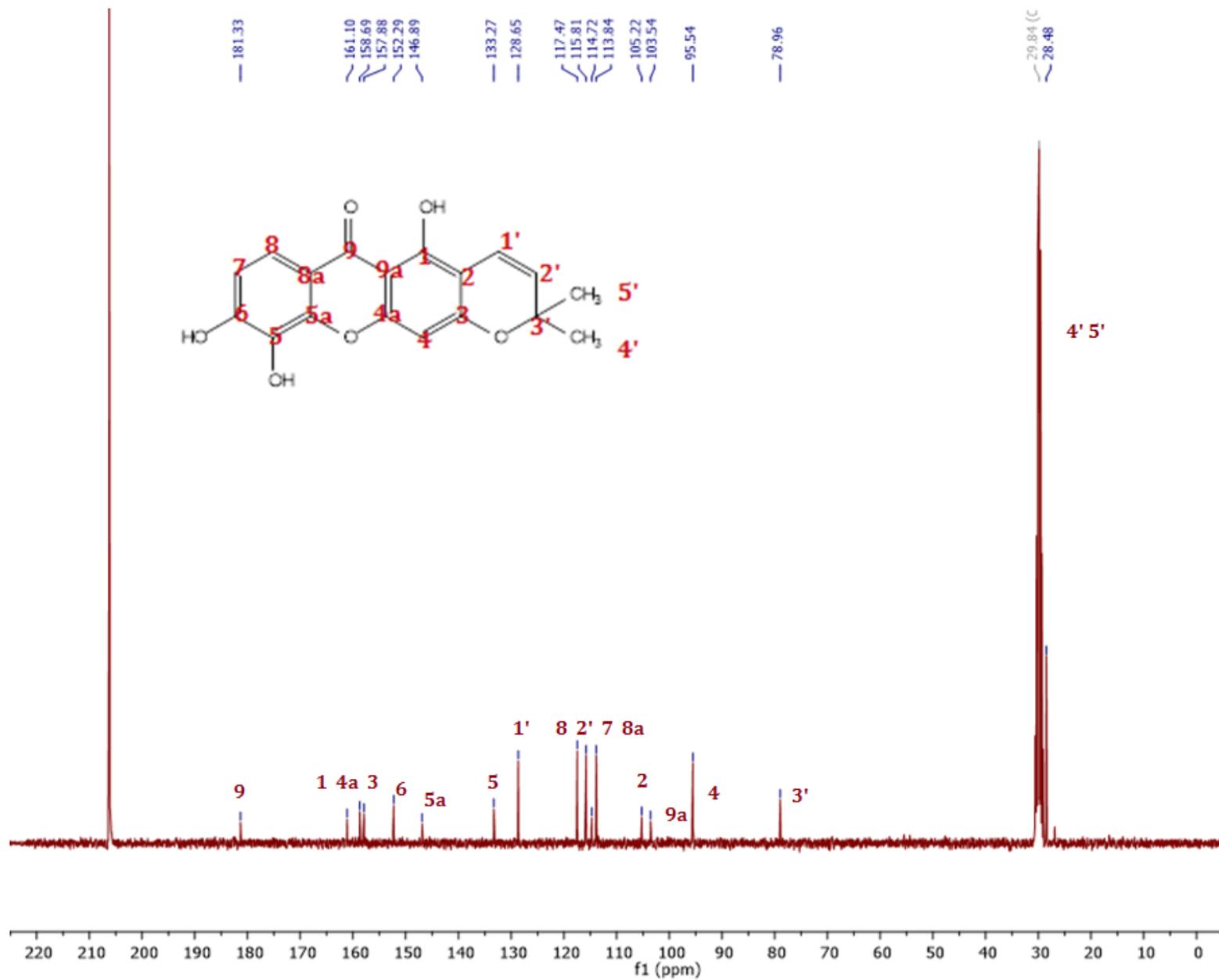


Figura Suplementaria 2. Espectro de resonancia magnética nuclear de carbono de las fracciones 15 y 17 de la segunda columna. Se observan los picos correspondientes a la xantona III.

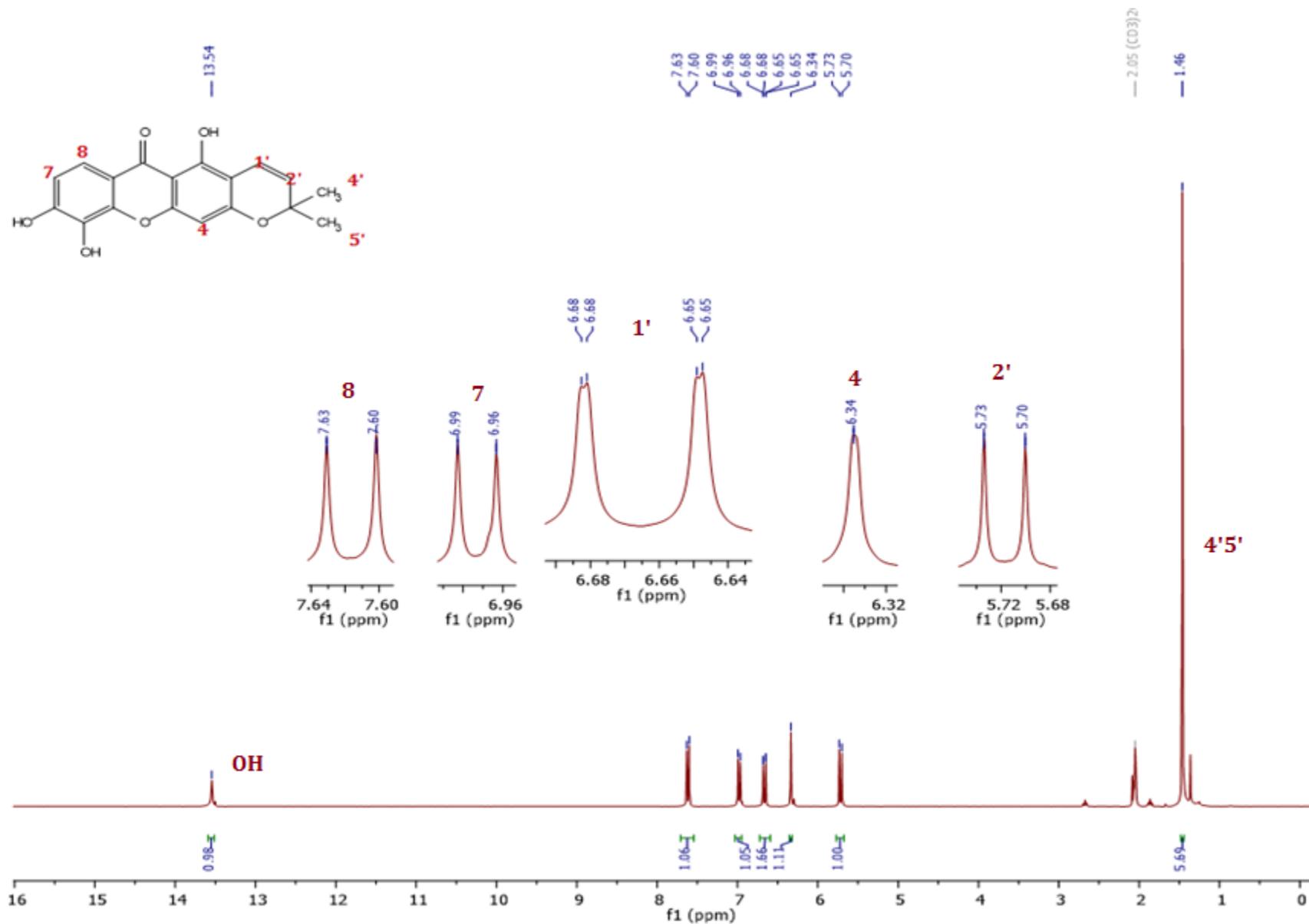


Figura Suplementaria 3. Espectro de resonancia magnética nuclear de hidrógeno de la fracción 16 de la segunda columna. Se aprecian los picos correspondientes a la xantona III.

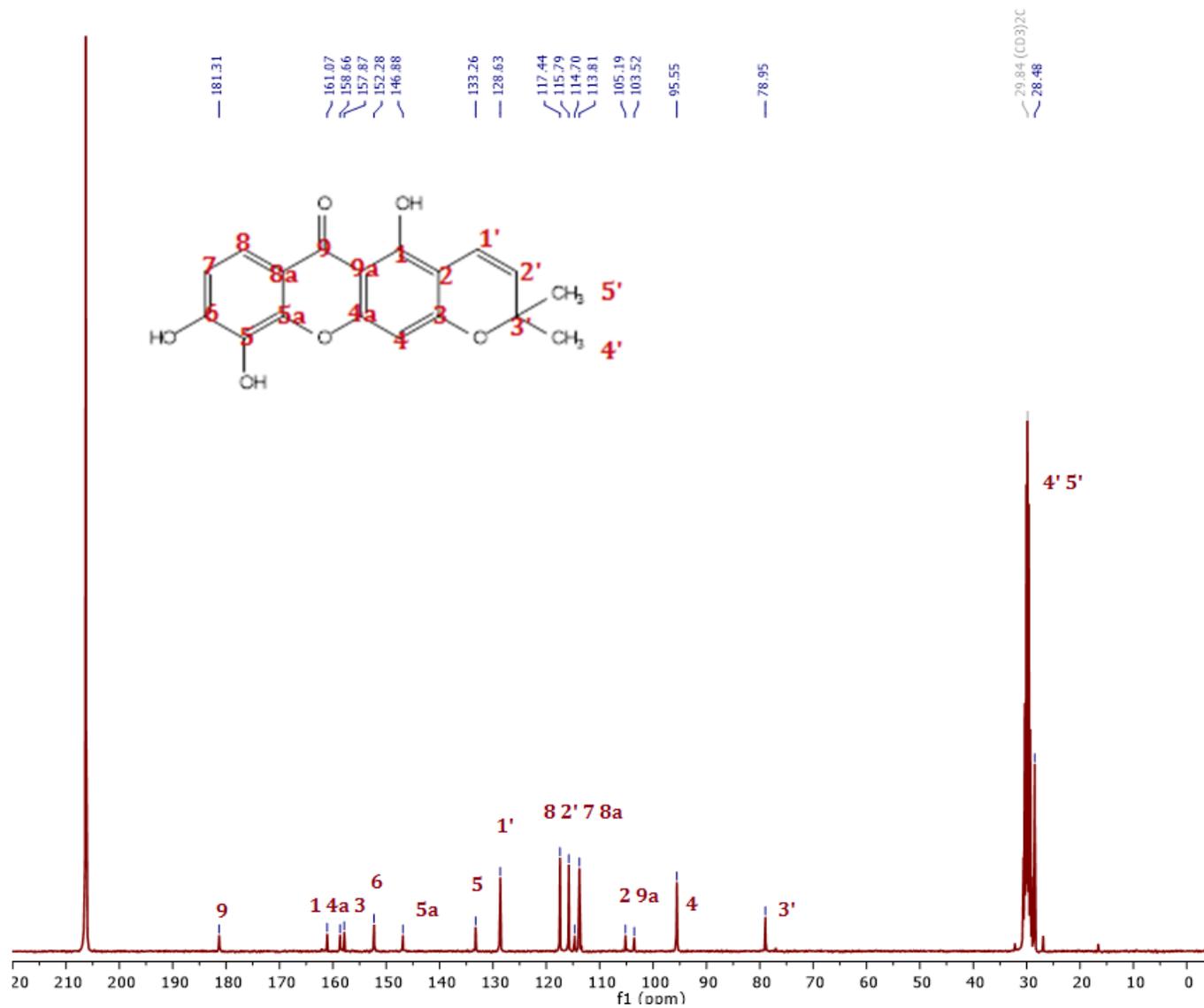


Figura Suplementaria 4. Espectro de resonancia magnética nuclear de carbono de la fracción 16 de la segunda columna. Se aprecian los picos correspondientes a la xantona III.

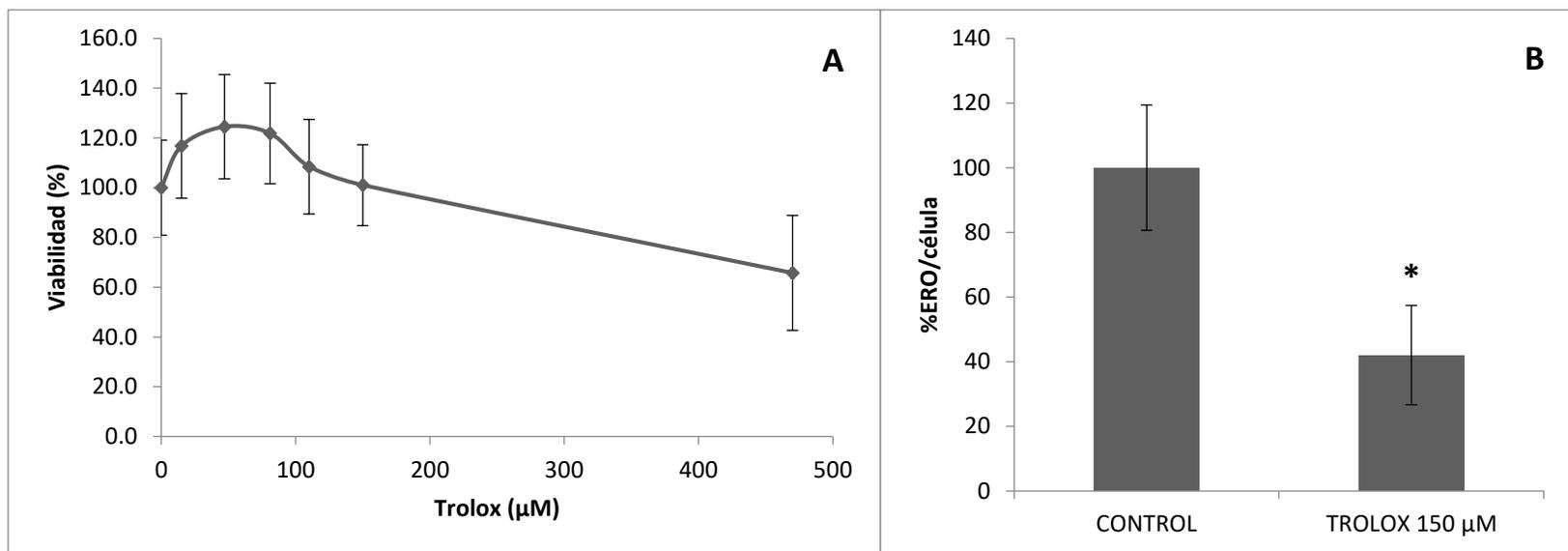


Figura Suplementaria 5. Efecto del antioxidante Trolox en la viabilidad celular y en la concentración de ERO, en la línea celular DBTRG-05. A) Para los estudios de co-tratamiento con jacareubina, se seleccionó la concentración de Trolox 150 μM, pues, a esta concentración la viabilidad no cambia. La viabilidad se evaluó por el ensayo FDA. B) Empleando la sonda carboxi-DCFDA, se corroboró el efecto antioxidante de Trolox 150 μM. Ambas gráficas muestran promedio ± EE, n=3. Para evaluar diferencias en los niveles de ERO, se empleó una prueba T de una cola. * p<0.05 vs Control.

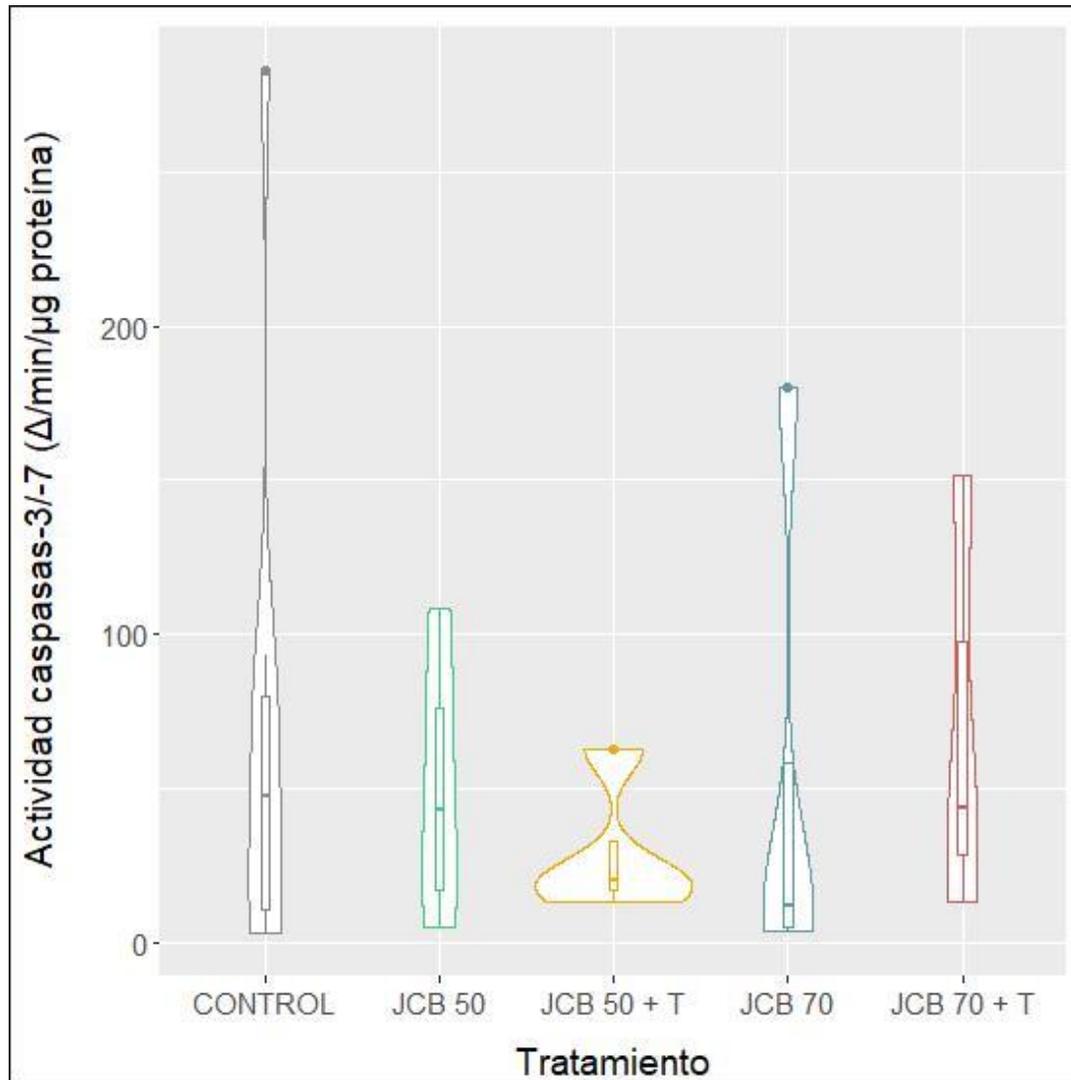


Figura Suplementaria 6. Distribución de los datos de actividad de las caspasas-3 y -7. Los datos se presentan en gráficos de violín, que incluyen gráficas de densidad (contornos), así como rangos intercuartiles, medianas, máximos y mínimos (en los diagramas de caja). La presencia de outliers sólo en ciertos grupos y la diferencia en las formas de la distribución se deben a un diseño incompleto (cada experimento independiente no incluyó a todos los tratamientos) con presencia de efecto batch para cada experimento independiente. En estos casos, para analizar datos no transformados, se puede hacer una comparación, no sólo de las medianas, sino también de las frecuencias relativas de cada

grupo para cierto valor de actividad, lo cual se hace comparando el grosor del gráfico en ese punto (por ejemplo, una muestra con actividad de ~105 es más probable que sea una muestra del grupo JCB 50 que un control). Sin embargo, es importante destacar que esto sólo aplica para grupos que tienen proporciones parecidas de los distintos efectos aleatorios.

Tabla Suplementaria 1. Alteraciones génicas y cromosómicas comunes en la clínica presentes en la línea celular DBTRG-05. ^{83,170}

Alteraciones génicas	
Oncogén/Gen supresor de tumores	Alteración
<i>CDKN2A</i>	Delección
<i>CDK4</i>	Amplificación
<i>EGFR</i>	Amplificación
Alteraciones cromosómicas	
Cromosoma	Alteración
7	Ganancia
10	Pérdida

Tabla Suplementaria 2. Concentración inhibitoria media (CI₅₀) para temozolomida en distintas líneas celulares de glioblastoma. Estas concentraciones se obtuvieron, en los respectivos estudios, incubando las células con temozolomida por 48 horas.

Línea celular	CI₅₀ (μM)
U251	851 ¹⁷¹ , 500 ¹⁷² . $\bar{x} = 676$
U87	702 ¹⁷¹ , 495 ¹⁷³ , 460 ¹⁷⁴ , 400 ¹⁷⁵ , 25 ¹⁴⁴ , 50 ¹⁷² . $\bar{x} = 355$
LN229	954 ¹⁷¹
U373	483 ¹⁷¹
A172	400 ¹⁷⁵