



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**EVALUACIÓN IN-VITRO DE LOS EFECTOS TERAPÉUTICOS DE ALFA
MANGOSTINA Y CISPLATINO EN CÁNCER CÉRVICO UTERINO**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA DE ALIMENTOS

PRESENTA

AUREA RAQUEL GONZÁLEZ MACÍAS

MÉXICO, D.F.

AÑO 2015





Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Atonatiu Edmundo Gómez Martínez

VOCAL: José Guillermo de Jesús Aguilar Osorio

SECRETARIO: Jazmin Marlen Pérez Rojas

SUPLENTE 1: María Eva González Trujano

SUPLENTE 2: Jorge Arturo Aburto Anell

LUGAR DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Laboratorio de Farmacología en la Torre de Investigación del
Instituto Nacional de Cancerología, Av. San Fernando # 22, Col. Sección XVI,
Delegación Tlalpan, México, D.F., C.P. 14080

Esta tesis fue apoyada por la beca PROBEI otorgada por la Comisión Coordinadora de
Institutos Nacionales y Hospitales de Alta Especialidad, así como la beca 178946
otorgada por el Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología.

Los resultados fueron parcialmente mostrados en el XXX Congreso Nacional de
Bioquímica 2014 en la ciudad de Guadalajara y en la IV Reunión La Investigación en el
INCAN 2015 en la ciudad de México.

Asesor del tema:

Jazmin Marlen Pérez Rojas

Sustentante:

Aurea Raquel González Macías

Abreviaturas

°C	Grado Celsius
7-AAD	7-Aminoactinmiocina
α-M	Alfa mangostina
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
AV	Anexina V
CaCu	Cáncer cérvico uterino
CDDP	Cisplatino/ Cisdiaminodicloro platino (II)
CI ₅₀	Concentración inhibitoria media
cm	Centímetros
CO ₂	Dióxido de carbono
DCFH	5,6-carboxidiclorofluoresceina
DCFH-DA	5,6-carboxi-diclorodihidrofluoroscein-diacetato
DMEM	Medio Eagle Modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
EROs	Especies Reactivas de oxígeno
g/mol	Gramos sobre mol
h	Horas
IARC	Agencia Internacional para la Búsqueda en Cáncer
IC	Índice de combinación
KCl	Cloruro de Potasio
KDa	Kilodaltons
KH ₂ PO ₄	Fosfato mono potásico
m	Metros
mm	Milímetros
mM	Mili Molar
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2, 5-difenil-2H-tetrazolio
Na ₂ HPO ₄	Fosfato di sódico

NaCl	Cloruro de Sodio
OMS	Organización Mundial de la Salud
rpm	Revoluciones por minuto
SSA	Secretaría de Salud
TOPO	Topoisomerasa
VPH	Virus del Papiloma Humano

Contenido

Resumen.....	- 1 -
Antecedentes	- 3 -
Cáncer a nivel mundial	- 3 -
Cáncer cérvicouterino	- 5 -
Cáncer cérvicouterino en México	- 10 -
Tratamiento.....	- 12 -
Cisplatino	- 13 -
Mangostán	- 14 -
El fruto mangostán	- 14 -
Alfa mangostina	- 17 -
El fruto mangostán y su importancia contra el cáncer.....	- 20 -
Hipótesis	- 21 -
Objetivo	- 21 -
Objetivos particulares.....	- 21 -
Materiales y métodos	- 22 -
Reactivos	- 22 -
Cultivo celular	- 22 -
Evaluación de la viabilidad celular	- 23 -
Concentración Inhibitoria media.....	- 23 -
Diseño experimental	- 24 -
Isoblograma.....	- 24 -
Índice de combinación	- 24 -
Medición de especies reactivas de oxígeno.....	- 25 -

Medición de apoptosis	- 25 -
Análisis estadístico	- 26 -
Resultados	- 27 -
Discusión.....	- 41 -
Conclusión	- 44 -
Bibliografía	- 45 -

Índice de gráficos, ilustraciones y tablas

GRÁFICO 1 EFECTO DE CDDP CON LA TÉCNICA MTT.....	- 28 -
GRÁFICO 2 EFECTO DE CDDP CON LA TÉCNICA CRISTAL VIOLETA.	- 28 -
GRÁFICO 3 EFECTO DE A-M CON LA TÉCNICA MTT.	- 30 -
GRÁFICO 4 EFECTO DE A-M CON LA TÉCNICA CRISTAL VIOLETA.....	- 30 -
GRÁFICO 5 ISOBOLOGRAMA	- 31 -
GRÁFICO 6 COMBINACIONES CON Co-INCUBACIÓN	- 32 -
GRÁFICO 7 COMBINACIONES CON PRE-INCUBACIÓN.	- 33 -
GRÁFICO 8 DISTRIBUCIÓN POBLACIONAL DE GENERACIÓN DE EROS CON Co-INCUBACIÓN.....	- 37 -
GRÁFICO 9 DISTRIBUCIÓN POBLACIONAL DE GENERACIÓN DE EROS CON PRE-INCUBACIÓN	- 37 -
GRÁFICO 10 PRODUCCIÓN RELATIVA DE EROS CON Co-INCUBACIÓN	- 39 -
GRÁFICO 11 PRODUCCIÓN RELATIVA DE EROS CON PRE-INCUBACIÓN.....	- 39 -
GRÁFICO 12 DISTRIBUCIÓN POBLACIONAL DE APOPTOSIS CON PRE-INCUBACIÓN.....	- 40 -
GRÁFICO 13 TIPOS DE APOPTOSIS PRODUCIDA POR TRATAMIENTOS	- 40 -

ILUSTRACIÓN 1 UBICACIÓN DEL CÉRVIX Y PROGRESIÓN DE LESIONES CANCEROSAS EN LA ZONA DE TRANSFORMACIÓN.....	- 6 -
ILUSTRACIÓN 2 TASAS DE INCIDENCIA MUNDIAL DE CACU	- 7 -
ILUSTRACIÓN 3 MAPA REGIONAL DE RIESGOS RELATIVOS DE MORTALIDAD EN MÉXICO POR CACU	- 11 -
ILUSTRACIÓN 4 PORCENTAJE DE MORBILIDAD DE LA POBLACIÓN MEXICANA POR TUMORES MALIGNOS.....	- 12 -
ILUSTRACIÓN 5. ESTRUCTURA QUÍMICA DEL CISPLATINO (CDDP)	- 13 -
ILUSTRACIÓN 6. FRUTO MANGOSTÁN.....	- 15 -
ILUSTRACIÓN 7 ESTRUCTURAS QUÍMICAS XANTONA, FLAVONOIDE, TRITERPENO, BENZOFENONA.....	- 16 -
ILUSTRACIÓN 8 ESTRUCTURA QUÍMICA DE LAS PRINCIPALES XANTONAS AISLADAS DEL MANGOSTÁN.....	- 18 -
ILUSTRACIÓN 9 TRANSFORMACIÓN DEL MTT A FORMAZAN POR LAS CÉLULAS VIABLES	- 23 -
ILUSTRACIÓN 10 IMÁGENES DE LA LÍNEA CELULAR HELA DESPUÉS DEL TRATAMIENTO CON CDDP	- 29 -
ILUSTRACIÓN 11 IMÁGENES DE LA LÍNEA CELULAR HELA DESPUÉS DEL TRATAMIENTO CON A-M	- 31 -
TABLA 1 INCIDENCIA Y MORTALIDAD DE DISTINTOS TIPOS DE CÁNCER EN MUJERES	- 4 -
TABLA 2 ESTRATIFICACIÓN FIGO DEL CACU	- 9 -
TABLA 3 NÚMERO DE NUEVOS CASOS ESTIMADOS EN MÉXICO.....	- 11 -
TABLA 4 VALORES NUTRIMENTALES DEL FRUTO MANGOSTÁN	- 16 -
TABLA 5 ÍNDICES DE COMBINACIÓN PARA LAS COMBINACIONES EN Co-INCUBACIÓN.....	- 35 -
TABLA 6 ÍNDICES DE COMBINACIÓN PARA LAS COMBINACIONES EN PRE-INCUBACIÓN.....	- 36 -

Resumen

El cáncer cérvico-uterino (CaCu) es la segunda causa de muerte en la población femenina adulta de México y la cuarta a nivel mundial; dentro de los tratamientos más empleados se encuentra el uso de derivados del platino como el cisplatino (CDDP), cuyo mecanismo de acción es la generación de aductos inter e intra catenarios en el ADN, impidiendo su duplicación y generando apoptosis celular, sin embargo genera varios efectos adversos, principalmente la nefrotoxicidad.

El mangostán es un árbol tropical del sur de Asia, su fruto es rojo oscuro por fuera con un centro blanco, suave y jugoso. Dentro de los compuestos presentes en el fruto se han encontrado diferentes xantonas como garciana E, 8-deoxigartanina, la α -, β - y γ -Mangostina que han mostrado tener actividad biológica. La α -Mangostina (α -M) es la xantona más abundante y la más estudiada, destaca por su actividad antioxidante, antitumoral y antiinflamatoria.

El proyecto inició por el hecho de que pacientes, en afán de mejorar su situación de salud, consumen productos como jugos con extracto de mangostán, sin tomar en cuenta que pueden interferir con el tratamiento clínico que llevan. El objetivo del proyecto fue evaluar si α -M en combinación con CDDP puede actuar de forma sinérgica en un cultivo de células de CaCu humano y estudiar su posible mecanismo de acción.

Para determinarlo se utilizó una línea celular HeLa, se expusieron de manera independiente a distintas concentraciones de α -M y CDDP para evaluar el efecto citotóxico. Posteriormente se realizó un isoblograma para exponer a las células con combinaciones de ambos fármacos en dos esquemas de tratamiento: Coincubación y Preincubación, evaluando la viabilidad celular con MTT, se determinó el índice de combinación con la ecuación de Chou-Talalay y se midió la generación de especies reactivas de oxígeno (EROs) y apoptosis causada por los tratamientos.

Después de la experimentación se obtuvo que la Concentración Inhibitoria media para α -M y CDDP fue $19.7 \pm 1.0 \mu\text{M}$ y $29.7 \pm 1.3 \mu\text{M}$ respectivamente. El índice de combinación obtenido en ambos esquemas de tratamiento en su mayoría fue mayor a 1, por lo que las combinaciones de ambos fármacos no inhibieron el crecimiento ni la viabilidad celular teniendo por lo tanto una interacción antagónica. Las combinaciones de α -M y CDDP seleccionadas no produjeron mayor cantidad de EROs en comparación con los tratamientos individuales de los fármacos, también aumentaron los porcentajes de producción de apoptosis temprana.

Se concluye que α -M es un agente antitumoral mejor que CDDP en un determinado intervalo de concentración, pero interfiere en la actividad antineoplásica de CDDP cuando es administrada de manera simultánea. Las combinaciones probadas de α -M y CDDP mostraron no tener efectos sinérgicos cuando se administra conjuntamente y efectos aditivos cuando α -M se administra primero sobre la línea celular de cáncer de cérvix. Sin embargo es necesario realizar los ensayos *in-vivo* para establecer el mejor esquema de tratamiento.

Antecedentes

Cáncer a nivel mundial

Como lo define la Organización Mundial de la Salud (OMS), la palabra “*cáncer*” es un término genérico que designa un amplio grupo de enfermedades que pueden afectar a cualquier parte del organismo. Una de las características más importantes del cáncer es la multiplicación rápida de células anormales que se extienden más allá de sus límites habituales y pueden propagarse a otros órganos, proceso conocido como metástasis. (OMS, 2014)

A nivel mundial, los cánceres con mayor incidencia y mortalidad en la población femenina registrados en el 2012 por GLOBOCAN se muestran en la tabla 1, el cáncer de mama, colorrectal, pulmón y cérvico uterino fueron, en ese orden, los tipos de cáncer de mayor incidencia y mortalidad, sumando alrededor del 50% de todos los casos. (GLOBOCAN, 2012).

Cada año cerca de 12 millones de personas son diagnosticadas con algún tipo de cáncer. En el 2012 causó 8.2 millones de defunciones a nivel mundial e investigadores estiman que para el 2030 se diagnosticarán 21 millones de casos nuevos, 17 millones de personas morirán y 75 millones de personas vivirán diagnosticados en todo el mundo con algún tipo de cáncer (Popat, 2013).

Tabla 1 Incidencia y mortalidad de distintos tipos de cáncer en mujeres a nivel mundial

Tipo de cáncer	Incidencia		Mortalidad	
	Número de casos	Porcentaje (%)	Número de casos	Porcentaje (%)
Cerebro, sistema nervioso	116 605	1.8	83 006	2.3
Cérvico uterino	527 624	7.9	265 672	7.5
Colorrectal	614 304	9.2	320 294	9.0
Esófago	132 776	2.0	118 952	3.4
Estómago	320 301	4.8	254 103	7.2
Hígado	228 082	3.4	224 492	6.3
Labio, cavidad oral	101 398	1.5	47 413	1.3
Laringe	18 775	0.3	10 115	0.3
Leucemia	151 289	2.3	114 150	3.2
Linfoma Hodking	27 430	0.4	10 006	0.3
Linfoma no Hodking	168 098	2.5	84 266	2.4
Mama	1 671 149	25.1	521 907	14.7
Melanoma de piel	111 481	1.7	24 098	0.7
Mieloma múltiple	51 782	0.8	36 928	1.0
Nasofaringe	25 795	0.4	15 075	0.4
Otras partes de la faringe	27 256	0.4	18 507	0.5
Ovario	238 719	3.6	151 917	4.3
Páncreas	159 711	2.4	156 564	4.4
Pulmón	583 100	8.8	491 223	13.8
Riñón	123 936	1.9	52 604	1.5
Sarcoma de Kaposi	15 225	0.2	9 616	0.3
Tiroides	229 923	3.5	27 145	0.8
Útero	319 605	4.8	76 160	2.1
Vejiga	99 413	1.5	42 033	1.2
Vesícula biliar	101 257	1.5	82 484	2.3
Todos los cánceres menos cáncer de piel	6 663 001	100.0	3 548 190	100.0

Fuente: GLOBOCAN 2012 (IARC) (27/01/2015)

Cáncer cérvicouterino

El cáncer cérvicouterino, carcinoma de cérvix o cáncer de cuello de útero (CaCu) se origina en las células que revisten el cuello uterino (parte inferior del útero y que conecta con la vagina). La parte más cercana al cuerpo del útero se llama endocérvix compuesto por células glandulares, mientras que la parte próxima a la vagina se le conoce como exocérvix el cual está cubierto por células escamosas; la zona en la que convergen se le conoce como zona de transformación, la cual cuenta con ambos tipos de células, esta zona cambia por el envejecimiento y el número de partos de la mujer.

En circunstancias normales, las capas superiores se destruyen y descaman continuamente, la integridad del revestimiento se mantiene debido a la formación constante y ordenada de nuevas células en la capa basal. No obstante, cuando se presentan lesiones precancerosas o cancerosas, las células escamosas de la zona de transformación adoptan un aspecto anormal y se multiplican de manera desordenada, dando lugar a los dos tipos de CaCu más comunes, el carcinoma de células escamosas y el adenocarcinoma, el primero representa alrededor del noventa por ciento y el segundo el otro diez por ciento de los casos de CaCu (ACS, 2014). Todo lo anterior queda representado en la ilustración 1.

En el año 2005, la OMS registró más de 500 000 casos nuevos de CaCu. Se estima que un número superior al millón de mujeres padecen actualmente este tipo de cáncer en el mundo, la mayoría de las cuales no están diagnosticadas o carecen de acceso a tratamientos. En ese mismo año, alrededor de 260 000 mujeres fallecieron de la enfermedad y cerca del 95% de esas defunciones ocurrieron en países en desarrollo, por lo anterior el CaCu es una de las amenazas más graves para la vida de la mujer.

Como se muestra en la ilustración 2, queda ejemplificada de manera geográfica la distribución de incidencia de CaCu en todo el mundo con los casos registrados en el 2012, es importante destacar que en los países en vías de desarrollo como lo es México y América Latina, esta enfermedad es de alta incidencia, además de que en

países con limitado acceso a los servicios de salud la gravedad se ve incrementada, como en las zonas pobres del continente africano.

La causa principal de desarrollo del CaCu es por la infección con uno o más de los tipos oncogénicos o de alto riesgo del virus del papiloma humano (VPH). Los tipos más frecuentes que causan cáncer son las cepas 16 y 18, que se encuentran en el 70% de todos los cánceres cérvicouterinos (*Castelo-Fernández, 2013*). Otros tipos oncogénicos como el 31, 33, 45 y el 58 son menos frecuentes y su prevalencia puede variar. Los tipos de VPH de bajo riesgo son el 6 y el 11 y no se asocian con cáncer.

Las infecciones causadas por el VPH no tienen síntomas inmediatos. En una mujer con un sistema inmune sano la lesión puede tardar de 15 a 20 años en convertirse en cáncer, mientras que en una mujer con un sistema inmune débil, puede tardar de 5 a 10 años. Los síntomas aparecen una vez que el cáncer ha alcanzado etapas avanzadas y tienden a magnificarse.

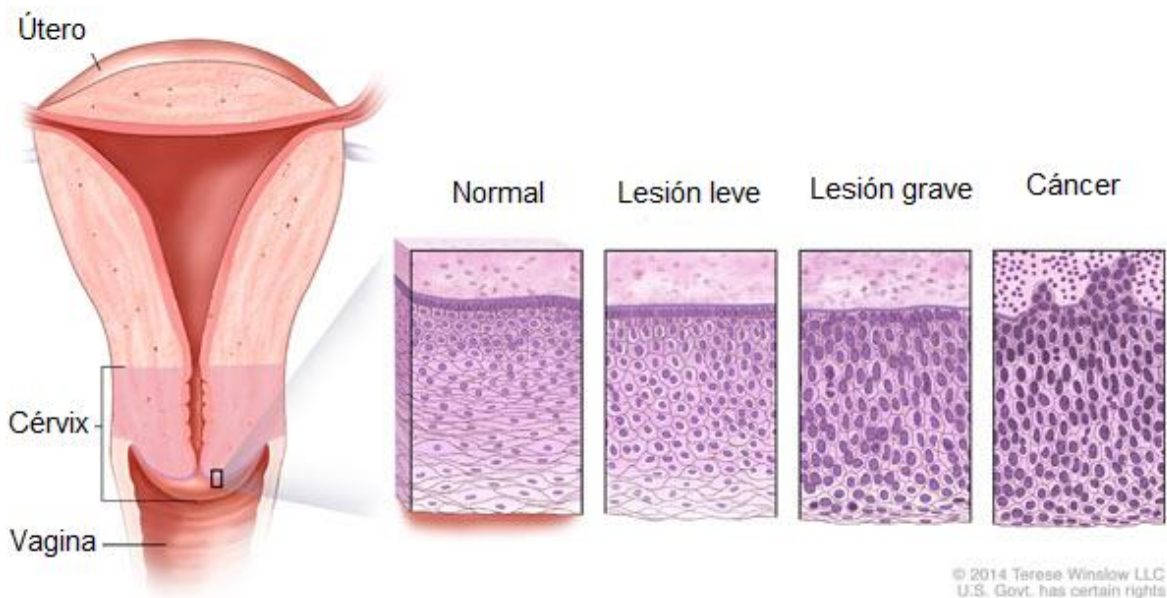


Ilustración 1 Ubicación del cérvix y progresión de lesiones cancerosas en la zona de transformación

(Imagen tomada y modificada de <http://www.cancer.gov/>)

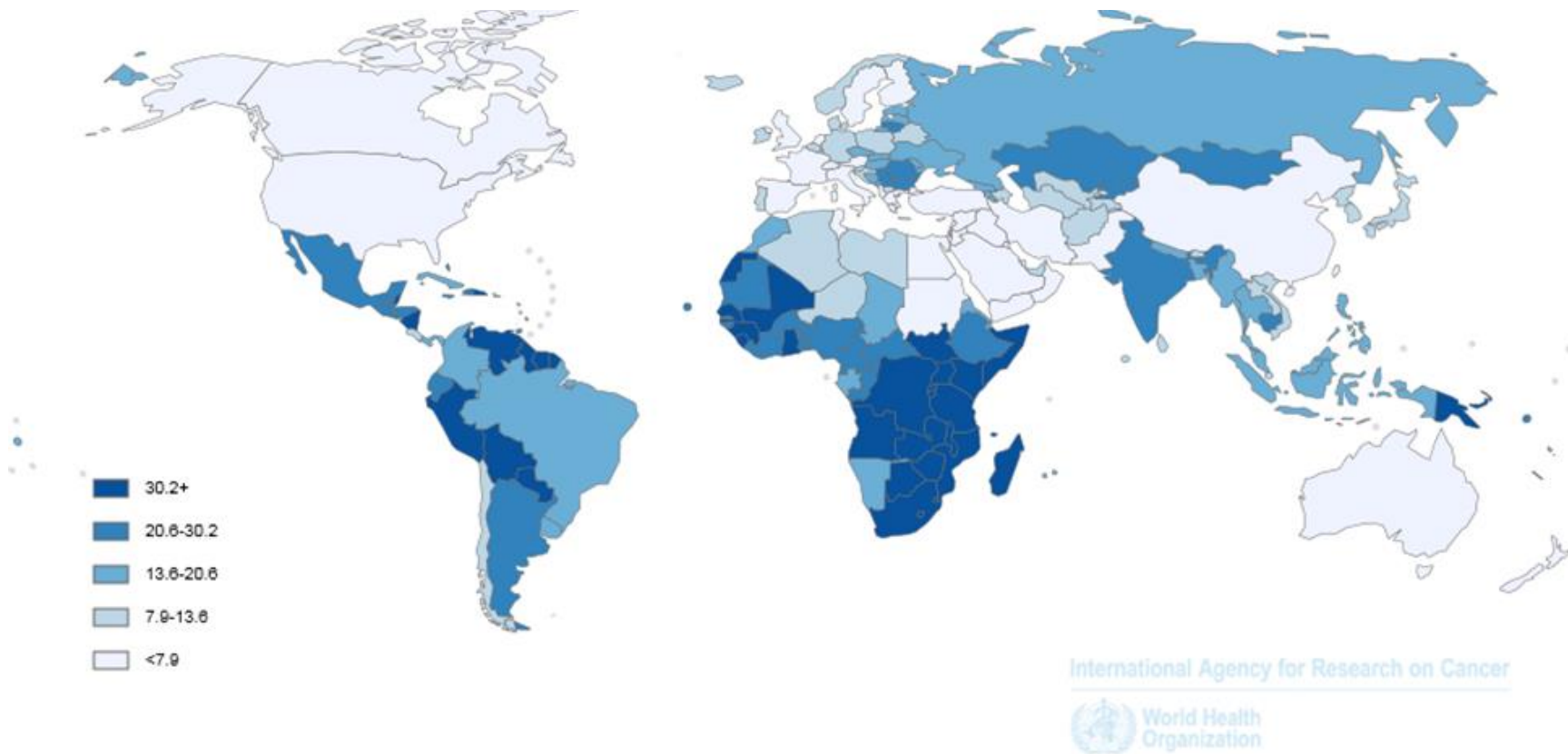


Ilustración 2 Tasas de incidencia mundial de cáncer cérvicouterino por 100 000 mujeres (de todas las edades), normalizadas según la edad. Fuente: GLOBOCAN 2011 (IARC)

Los determinantes principales de la infección por el VPH, están relacionados con el comportamiento sexual como lo son: la iniciación sexual a edad temprana, el número elevado de parejas sexuales y las relaciones con parejas sexuales promiscuas. No se han dilucidado los cofactores ni las condiciones que determinan que una infección por el VPH persista y progrese a cáncer, pero es posible que los siguientes desempeñen alguna función al respecto:

- Cofactores relacionados con el VPH:
 - Tipo vírico.
 - Infección simultánea por varios tipos oncogénicos.
 - Gran cantidad de virus (carga vírica).
- Cofactores relacionados con el huésped:
 - Estado inmunitario.
 - Número de partos: el riesgo aumenta con el mayor número de partos.
- Cofactores exógenos:
 - Tabaquismo.
 - Coinfección por el virus de inmunodeficiencia humana (VIH) u otros agentes de transmisión sexual, tales como el virus del herpes simple tipo 2 (VHS-2), *Chlamydia trachomatis* y *Neisseria gonorrhoeae*.
 - Uso a largo plazo (> 5 años) de anticonceptivos orales.

Los dos sistemas utilizados para clasificar la progresión del cáncer por etapas o estadios, son el sistema TNM (Tumor, Nódulo, Metástasis) del Comité Conjunto Estadounidense sobre el Cáncer y el sistema de la Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia, por sus siglas en inglés AJCC y FIGO respectivamente. El sistema TNM clasifica al CaCu tomando en cuenta tres factores: el tamaño o alcance del cáncer (T), si el cáncer se ha propagado a los nódulos linfáticos (N), y si se ha propagado a partes distantes (M). Los ginecólogos y los oncólogos ginecológicos utilizan el sistema de FIGO con mayor frecuencia por lo que es el que se usará en éste documento y será detallado en la tabla 2.

Tabla 2 Estratificación FIGO del CaCu

Estadio	Descripción
I	Enfermedad limitada al cérvix, no se ha diseminado a los ganglios linfáticos cercanos ni a sitios distantes.
IA	Afectación cervical visible solamente bajo microscopio.
IA1	Invasión máxima de 3 mm y extensión horizontal <7 mm. El cáncer no se ha propagado a los ganglios linfáticos cercanos ni a sitios distantes.
IA2	Invasión entre 3-5 mm y extensión horizontal <7 mm. El cáncer no se ha propagado a los ganglios linfáticos cercanos ni a sitios distantes.
IB	Confinado a cérvix pero visible macroscópicamente. Incluye los cánceres en etapa I si se han propagado a más de 5 mm de profundidad dentro del tejido conectivo del cuello uterino o tienen más de 7 mm de ancho.
IB1	El cáncer se puede ver pero no rebasa 4 cm. No se ha propagado a los ganglios linfáticos cercanos ni a sitios distantes.
IB2	El cáncer se puede ver y mide más de 4 cm. No se ha propagado a los ganglios linfáticos cercanos ni a sitios distantes.
II	Invasión a través del útero. Paredes pélvicas/tercio inferior de la vagina.
IIA	Afectación de las dos terceras partes superiores de la vagina, parametrios libres.
IIA1	Clínicamente visible con tamaño <4 cm.
IIA2	Clínicamente visible con tamaño >4 cm.
IIB	Afectación de las dos terceras partes superiores de la vagina, parametrios infiltrados.
III	Afectación del tercio inferior de la vagina, pelvis, hidronefrosis.
IIIA	Afectación del tercio inferior de la vagina, pared pélvica libre.
IIIB	Afectación pared pélvica, hidronefrosis, ganglios pélvicos positivos.
IVA	Vejiga o recto.
IVB	Diseminación a distancia, incluye ganglios paraaórticos.

Fuente: FIGO International Federation of Gynecology and Obstetrics, version 2009.

Cáncer cérvicouterino en México

Durante los últimos 25 años en México, los reportes oficiales muestran más de 100 000 muertes por CaCu y en el 2006 se registró como la segunda causa de muerte por tumores malignos en mujeres (*Palacio-Mejía 2009*). Si bien se ha visto que la mortalidad en el país ha decrecido gracias a los exámenes de detección temprana como el Papanicolaou y la disminución en las tasas de nacimiento (*Lazcano-Ponce, 2009*) el acceso a los programas de salud no es uniforme, las mujeres en desventaja social, es decir de edad avanzada, de zonas rurales o marginales, con capacidades diferentes, pobres e indígenas, tienen menos acceso a los servicios y como consecuencia son las más afectadas. Al sur de la república se estima que las mujeres tienen del doble al triple de riesgo de desarrollar la enfermedad como es mostrado en la ilustración 3.

De acuerdo con datos del Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI), en el 2011 los tumores malignos que afectaron a la población femenina mayor de 20 años se debieron al cáncer de mama con 25.4%, seguida por las neoplasias en órganos genitales con 18.4% que abarca el cuello uterino y de útero principalmente (*INEGI, 2014*). De manera gráfica se muestra en la ilustración 4, que el grupo poblacional más afectado es el de mujeres entre 45-49 años de edad, las cuales representan el 15.1% de las pacientes con tumores malignos en el país.

A lo largo del 2015, GLOBOCAN predice un aumento en la incidencia y mortalidad de nuevos casos de CaCu del 14.5 y 15.5% con respecto a lo obtenido en el 2012. En tan solo cinco años más al año actual predice un aumento del 28.5 y 35.8% respectivamente contra los datos del 2012, tal y como se muestra en la tabla 3.



Ilustración 3 Mapa regional de riesgos relativos de mortalidad en México por CaCu (Imagen tomada de Palacio-Mejía et al., 2009)

Tabla 3 Número de nuevos casos estimados en México de todas las edades

Año	Incidencia	Mortalidad
2012	13 960	4 769
2015	15 988	5 511
2020	17 940	6 480

Fuente: GLOBOCAN 2012 (IARC) (15.1.2015)

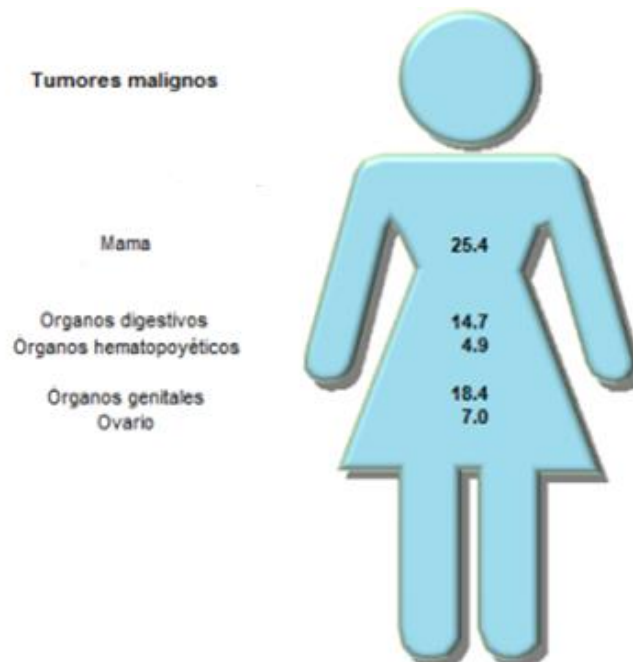


Ilustración 4 Porcentaje de morbilidad hospitalaria de la población de 20 años o más, por principales tumores malignos. 2011.

Fuente: SSA (2012). Base de egresos hospitalarios 2011. Procesó INEGI.

Tratamiento

El tratamiento debe adaptarse según lo que mejor convenga para la paciente de acuerdo a su estadio, el tratamiento recomendado para etapas tempranas es local ya sea conización o histerectomía parcial o total. Cuando la enfermedad es localmente avanzada se utilizan tratamientos como la radioterapia y la quimioterapia, también se puede usar una combinación de ambas, es decir el uso de quimio-radioterapia.

La radioterapia se aplica sobre el tumor y utiliza energía ionizante dañando y destruyendo las células cancerosas.

La quimioterapia utiliza la aplicación de fármacos para destruir las células cancerosas. El fármaco utilizado con mayor frecuencia es el cisplatino y está incluido en la Lista modelo de medicamentos esenciales de la OMS.

Cisplatino

El Cisplatino o cisdiaminodicloroplatino (II) (CDDP) como se muestra en la ilustración 5, es el fármaco utilizado en la quimioterapia estándar para CaCu localmente avanzado, se usa también en el tratamiento de tumores de ovario, testiculares, pulmón, cabeza y cuello (Tiseo, 2007).

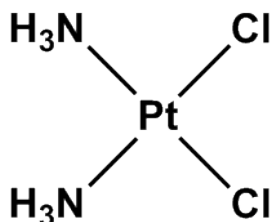


Ilustración 5. Estructura química del cisplatino (CDDP)

El CDDP es un fármaco tipo alquilante de bajo peso molecular (301.1 g/mol) cuyo efecto citotóxico se deriva, principalmente, de la inhibición de la síntesis de ADN. El mecanismo de acción del CDDP involucra la producción de las moléculas activas cis-[PtCl(H₂O)(NH₃)₂]⁺ y cis-[Pt(H₂O)₂(NH₃)₂]²⁺ al ser solvatadas. Los principales aductos formados por CDDP con el ADN son guanina-guanina (G-G) intercatenaria a través del enlace de coordinación del platino con el nitrógeno 7 de las guaninas. El nitrógeno 7 de las guaninas son los sitios con mayor densidad electrónica y por tanto accesibles al ataque electrofílico por el platino (García-Ramos, 2013). Lo anterior detiene el ciclo celular y activa el proceso de apoptosis.

La apoptosis es un proceso de muerte celular que requiere la activación de genes por lo que también recibe el nombre de muerte celular programada. La cascada de señalización provoca que la célula no pierda la integridad de la membrana. Se ha demostrado que las alteraciones en la apoptosis son un mecanismo fundamental para el desarrollo del cáncer, participando desde etapas iniciales en la carcinogénesis, en el fenómeno metastásico y en la respuesta a tratamientos antineoplásicos como la quimioterapia (Alfaro-Moreno, 2000).

A las dosis habitualmente empleadas en clínica para pacientes con CaCu (40-170mg/m² semanal) las mayores concentraciones de platino se alcanzan en hígado y riñón, sin embargo también se puede depositar en vejiga, páncreas, bazo, intestino, corazón, pulmón, cerebro y cerebelo. El CDDP puede unirse a diversas proteínas como el glutatión y la albúmina, aminoácidos como la metionina y cisteína, y a nucleótidos formando complejos de peso molecular superior a 50 KDa, sin embargo la unión a proteínas hace que pierda su actividad antineoplásica (*Ramón-López, 2012*).

Su uso es asociado a varios efectos secundarios que dependen de la dosis y el tiempo de exposición, tendiendo a presentar efectos acumulativos. Los más frecuentes son fiebre, leucopenia, trombocitopenia, anemia, anorexia, náuseas, vómitos, diarrea, deterioro auditivo, nefrotoxicidad e hiperuricemia.

Mangostán

El mangostán (*Garcinia mangostana* L.) es un árbol tropical originario del sur de Asia como la India, Myanmar, Malasia, Filipinas, Sri Lanka, Tailandia, entre otros. Pertenece a la familia Clusiaceae y puede llegar a medir de 6-25 m de altura. La corteza del árbol tiene color marrón oscuro o casi negro, por dentro su color es amarillo, de textura gomosa, con látex amargo. Este árbol tiene hojas de tallo corto, ovadas, oblongas, gruesas, de color verde oscuro brillante arriba y de color verde amarillento y opaco debajo. (*Morton, 1987*). Al árbol le toma 10 años alcanzar la madurez necesaria para dar frutos, una vez alcanzada produce alrededor de 400 frutas por árbol (*Gutiérrez-Orozco, 2013*).

El pericarpio de la fruta del mangostán ha sido utilizado como parte de la medicina tradicional en el sureste de Asia donde desde hace muchos años se usa para el tratamiento de infecciones de la piel, heridas, disentería amebiana, diarrea y cólera (*Pedraza-Chaverri, 2008*).

El fruto mangostán

El mangostán (ilustración 6) es un fruto climatérico (clasificación dada por los cambios que se producen durante la maduración del fruto, un fruto climatérico incrementa su tasa de respiración y producción de etileno durante la maduración ocasionando cambios en el

color, aroma, textura, sabor y otros atributos bioquímicos y fisiológicos, *Lelièvre, 1997*), es nombrada como “la reina de las frutas” y su consumo es principalmente en fresco.

La cáscara tiene un color púrpura oscuro a rojizo. La porción comestible de la fruta es blanca, suave y jugosa, con un sabor ligeramente ácido y dulce con agradable aroma. (*Yu, 2007*)

El análisis químico proximal de la porción comestible de la fruta, como se muestra en la tabla 4, resulta que en su mayoría está constituida por agua y carbohidratos; es abundante en fósforo, el cual en el organismo interviene en la división celular, la formación de tejidos y el metabolismo celular. También contiene cobre y zinc los cuales actúan como cofactores de la enzima superóxido dismutasa, ésta tiene la función de reducir el ion superóxido (O_2^-) en peróxido de hidrógeno (H_2O_2).

El fruto en su totalidad es fuente de varios compuestos bioactivos como las xantonas, flavonoides, triterpenos y benzofenonas (*Chin Y., 2008*) de las cuales sus estructuras químicas quedan representadas en la ilustración 7.

Un compuesto bioactivo en los alimentos es aquel constituyente no nutritivo presente naturalmente en pequeñas cantidades dentro de un alimento. Estos compuestos son ampliamente estudiados por sus efectos en la salud, principalmente contra enfermedades crónicas no transmisibles como las enfermedades cardiovasculares, respiratorias, diabetes y cáncer (*Kris-Etherton, 2002*).



Ilustración 6. Fruto mangostán, al fondo fruto completo y al frente corte de la cáscara para exponer la parte comestible.

*Tabla 4 Valores nutrimentales del fruto mangostán
(Por 100g de la fracción comestible)*

Agua	80.9 g	Fósforo	14.0 mg
Contenido energético	76.0 cal	Hierro	0.50 mg
Proteínas	0.5 g	Cobre	0.11 mg
Grasas	0.2 g	Zinc	0.10 mg
Carbohidratos	18.4 g	B1 (Tiamina)	0.09 mg
Fibra	1.7 g	B2 (Riboflavina)	0.06 mg
Cenizas	0.2 g	B3 (Niacina)	0.10 mg
Calcio	9.0 mg	Vitamina C	2.0 mg

Fuente: Anon (2004) Frutas en Tailandia. Departamento de extensión agricultura. Ministerio de cooperación y agricultura, Bangkok. Tailandia.

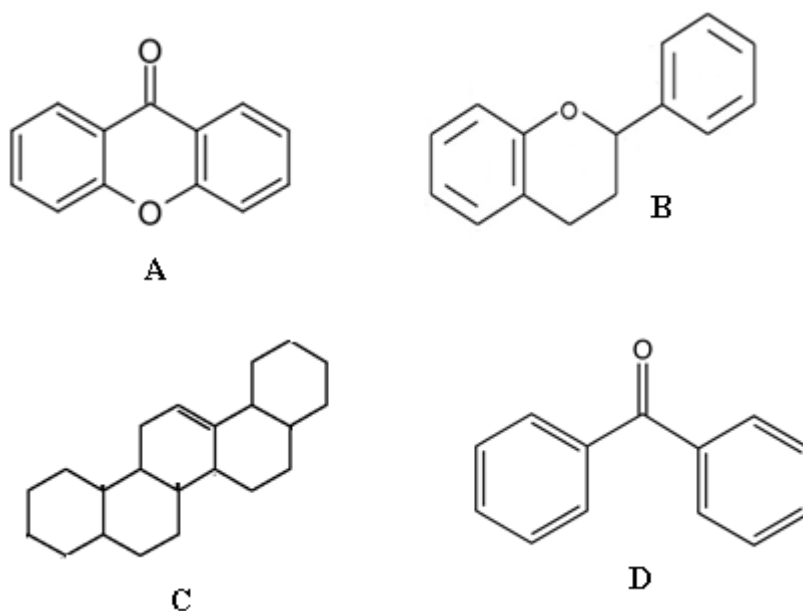


Ilustración 7 Estructuras químicas de los principales compuestos activos extraídos del fruto mangostán. (A) Xantona, (B) Flavonoide, (C) Triterpeno, (D) Benzofenona.

Las xantonas han sido aisladas del pericarpio del mangostán, su estructura química está compuesta por un sistema tricíclico aromático (C₆-C₃-C₆) y son clasificadas en cinco grandes grupos (*Jiang, 2004*):

- Xantonas simples oxigenadas.
- Glicósidos de xantonas.
- Xantonas preniladas y sus derivados.
- Xantonolignoides.
- Xantonas misceláneas.

En diversos estudios se ha demostrado que las xantonas obtenidas de la fruta mangostán tienen actividad biológica importante. Las xantonas más estudiadas son α , β y γ mangostina, garcinona E, 8-desoxigartanina y gartanina como se muestra en la ilustración 8. Algunas de las actividades documentadas de estos compuestos son: antioxidante, antitumoral, antialérgica, antiinflamatoria, antiviral, bactericida y fungicida (*Yu, 2007*).

Alfa mangostina

La xantona presente en mayor proporción en el fruto mangostán es la alfa mangostina (α -M) (ilustración 8) la cual pertenece al grupo de xantonas preniladas. Fue aislada por primera vez por Schmid en 1855, después de alrededor de cien años, Yates & Stout en 1958 se dedicaron a caracterizarla encontrando que la α -M era un residuo color amarillo (410. 46 g/mol) obtenido principalmente del pericarpio de la fruta, establecieron su actividad óptica, su fórmula molecular, la naturaleza y posición de las cadenas laterales, las vías de degradación y las relaciones estructurales.

La α -M es considerada un fitoquímico, o molécula extraída a partir de una fuente vegetal, y por su impacto en la salud es considerada también un compuesto bioactivo. Sin embargo no es considerada un nutriente ya que para ello necesita proveer al organismo de energía, ser precursor de síntesis de macromoléculas u otros componentes que intervengan en la diferenciación normal de las células, en su crecimiento, renovación, reparación o defensa, debe ser requerido para la señalización, como cofactor o ser determinante en la estructura o función de la integridad de algún órgano (*Go, 2003*). Por

definición, tampoco es considerada un medicamento ya que el concepto engloba a toda sustancia que tenga efecto terapéutico y se presente en forma farmacéutica (jarabes, tabletas, pomadas, etc.)

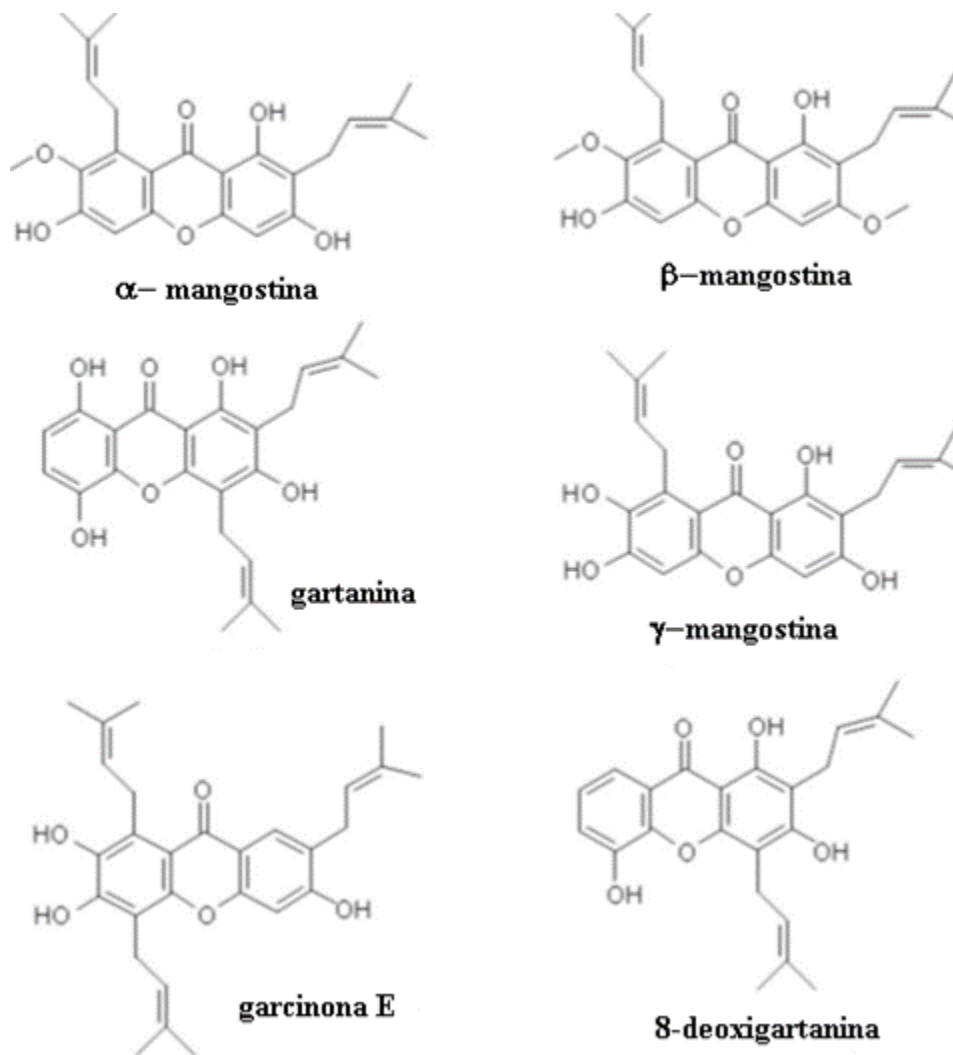


Ilustración 8 Estructura química de las principales xantonas aisladas del mangostán (Imagen tomada y modificada de Pedraza-Chaverri et al., 2008)

El mangostán junto con otros frutos como el liche, el arándano, la granada, el noni y el kiwi dorado, por mencionar algunos, pertenece a un nuevo grupo denominado por los medios de comunicación como “súper frutas”, el cual es definido como “alimento rico en nutrientes que se considera tiene un beneficio para la salud y el bienestar del consumidor” (*Oxford Dictionary, 2015*). Estas frutas se caracterizan por poseer un sabor agradable, además de ser fuente en gran proporción de compuestos bioactivos, principalmente de antioxidantes.

Un antioxidante con función biológica se define como aquella sustancia que presente en concentraciones muy pequeñas, comparadas con la de un sustrato oxidable, disminuye o evita la oxidación del mismo. Tales sustancias pueden tener acción directa por medio de la neutralización de los radicales libres, o indirecta a través de sistemas enzimáticos con capacidad para su neutralización (*Barbosa, 2008*).

Las especies reactivas de oxígeno (EROs) están implicadas en la proliferación celular, en vías de señalización y en la respuesta de mecanismos de defensa. En varias enfermedades, entre ellas el cáncer, el desequilibrio entre oxidantes y antioxidantes lleva a la generación de grandes cantidades de EROs o el decremento de la velocidad de neutralización de estos, provocando la oxidación y la pérdida de función en biomoléculas como proteínas, lípidos y ADN (*Barbosa, 2008*).

Los productos que contienen jugo o extracto de mangostán han tenido un gran crecimiento en el mercado de bebidas funcionales, tanto que en el 2008 resultaron en ventas en los Estados Unidos de América por más de 200 millones de dólares. (*Sloan, 2010*). La tendencia señala que después de la era de los productos “light” y de “dieta” los consumidores ahora se mueven a la tendencia de productos “naturales”. El uso de extractos botánicos, vitaminas y minerales en bebidas se ha vuelto muy popular, así como la búsqueda de ingredientes para combatir enfermedades como el cáncer (*De-Cock, 2002*). Sin embargo, es importante destacar: para que un producto tenga éxito, los beneficios a la salud siempre deben ser respaldados con datos científicos, la falta de regularizaciones formales en la mayor parte del mundo (incluido nuestro país) puede dar lugar a declaraciones engañosas o falsas.

El fruto mangostán y su importancia contra el cáncer

La combinación ideal de fármacos sería aquella que actúe de forma sinérgica contra las células cancerosas sin incrementar la toxicidad sistémica (*Reynolds, 2005*). El término sinergismo se refiere al efecto que tiene una combinación de fármacos (tóxica o benéfica) que es numéricamente mejor que el efecto obtenido por los fármacos de manera individual (*Tallarida, 2000*). Hoy en día el número de fármacos disponibles para el tratamiento clínico continua en aumento, para el CaCu la Agencia de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos de América, por sus siglas en inglés FDA, prueba la combinación de CDDP con otros fármacos coadyuvantes (*Larasati, 2014*).

En la bibliografía se han documentado distintos trabajos donde se ha probado el uso de α -M como compuesto anticancerígeno, antitumoral y como protector de distintos efectos adversos producidos por la quimioterapia. Un ejemplo de ello es en el trabajo de *Pérez-Rojas et al, 2009* el cual reporta el efecto renoprotector que tiene el uso de α -M cuando se les induce nefrotoxicidad con CDDP a ratas. Se encontró que α -M es capaz de atenuar la lesión túbulo-renal tanto estructural como funcional sin alterar la farmacocinética del CDDP, el mecanismo de acción reportado por los autores fue la atenuación del estrés oxidativo ocasionado por la catalasa.

El presente proyecto inició por el hecho de que pacientes, en afán de mejorar su situación de salud y bajo la promesa de productos milagro, consumen la amplia gama de marcas presentes en el mercado, como los jugos que contienen extracto de mangostán, sin tomar en cuenta que estos productos pueden interferir de alguna manera con el tratamiento clínico que llevan.

Hipótesis

Si α -M tiene un efecto antitumoral y no interfiere con la farmacocinética del CDDP, entonces la exposición conjunta de ambos compuestos disminuirá la supervivencia celular a concentraciones bajas y se disminuirá la toxicidad producida por CDDP.

Objetivo

Evaluar si α -M en combinación con CDDP puede actuar de forma sinérgica en un cultivo de células de cáncer cérvico uterino humano y su posible mecanismo de acción.

Objetivos particulares

- Cultivar y mantener células de CaCu humano (HeLa).
- Realizar curvas dosis-respuesta de CDDP y α -M.
- Realizar un isoblograma para proponer las posibles combinaciones de los fármacos.
- Realizar la curva dosis-respuesta de las combinaciones seleccionadas.
- Calcular el índice de combinación para todas las combinaciones probadas.
- Determinar la unión de anexina V a fosfatidil serina como un indicador de apoptosis y la generación de EROs en citoplasma por citometría de flujo.

Materiales y métodos

Reactivos

La α -M fue donada por el laboratorio del Dr. José Pedraza Chaverri, la cual fue extraída con el método descrito por *Márquez-Valadez et al* en el 2009; para su uso *in-vitro* fue disuelta en dimetilsulfóxido (DMSO, MP Biomedicals), la concentración del disolvente en el medio de cultivo no excedió en ningún caso más del 15% v/v el cual no tuvo efecto significativo sobre el crecimiento de las células. El CDDP (Sigma-Aldrich) fue solubilizado con solución salina y en ambos casos los compuestos fueron mantenidos en stocks de 1 mM a -20°C hasta el momento de su utilización.

Cultivo celular

Se utilizaron células HeLa obtenidas de la Colección Americana de Cultivos (ATCC) las cuales provienen de un adenocarcinoma humano de cérvix con la cepa 18 del VPH. Fueron mantenidas de manera rutinaria en frascos con cara plana de 75 cm² a 37°C en incubación bajo una atmósfera húmeda con 5% de CO₂ con medio de cultivo Eagle modificado (DMEM, Gibco) suplementado al 10% con suero fetal bovino. Todos los procedimientos se llevaron a cabo en condiciones estériles en una campana de flujo laminar.

Una vez que las células alcanzaron la confluencia del 80%, se realizaron lavados con solución de fosfatos (PBS, NaCl 136.89 mM, KCl 2.68 mM, Na₂HPO₄ 10.15 mM, KH₂PO₄ 1.76 mM, Gibco) a pH 7.4. Se despegaron las células con solución de fosfatos con EDTA (PBS-EDTA, 1mM), se centrifugaron a 2000 rpm por 10 minutos y se resuspendieron en medio DMEM para hacer los experimentos o mantener el cultivo.

Para los experimentos, las células se lavaron con PBS, se despegaron con PBS-EDTA, se contaron en un contador de células automatizado TC20™ (BIO-RAD) con azul de tripano (BIO-RAD), y se sembraron en placas de 96 pozos de manera que cada pozo contara con 1x10⁴ células/100µL de medio. Después de 24 horas de haber sido sembradas se expusieron a los tratamientos.

Evaluación de la viabilidad celular

Se utilizó la técnica del colorante catiónico cristal violeta, el cual interactúa con los fosfolípidos de la membrana celular dejándolas teñidas, se revela con ácido acético al 33% y se lee la absorbancia con un lector de ELISA a 570 nm.

También se evaluó la viabilidad funcional con bromuro de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2, 5-difenil-2H-tetrazolio (MTT, Sigma-Aldrich). Como se muestra en la ilustración 9, este ensayo se basa en la utilización de una sal de tetrazolio, la cual es biotransformada sólo por las células viables a formazan utilizando la enzima deshidrogenasa mitocondrial. El formazan se precipita en un compuesto púrpura que se solubiliza con propanol ácido y se lee a 570 nm.

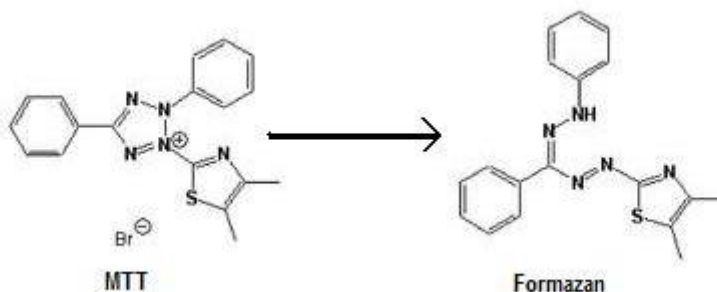


Ilustración 9 Transformación del MTT a formazan por las células viables

Concentración Inhibitoria media

Para la determinación de la concentración inhibitoria media (CI₅₀) de α -M y CDDP, las células fueron expuestas a concentraciones de 0 a 80 μ M para α -M y de 0 a 120 μ M para CDDP durante 24 horas, posteriormente se evaluó su viabilidad con la técnica cristal violeta o MTT, normalizando la respuesta con respecto al control. Las concentraciones empleadas se seleccionaron con el fin de cubrir en su totalidad el espectro de la respuesta.

Diseño experimental

Las combinaciones de CDDP y α -M se hicieron siguiendo dos modelos de tratamiento: Co-incubación y Pre-incubación. El primero se refiere a la exposición de las células con las combinaciones posibles entre 2, 5, 10, 15, 25, 30 y 50 μ M de CDDP y 5, 10, 15, 25, 30 y 60 μ M de α -M de manera simultánea durante 24 horas. El segundo tiene por finalidad sensibilizar a las células, primero por 24 horas a las concentraciones señaladas de α -M, retirar el tratamiento y después exponer por 24 horas a las concentraciones señaladas de CDDP.

Isoblograma

Un isoblograma es una representación teórica del posible comportamiento que tendrán dos compuestos elaborada a partir de los valores CI_{50} , estos se colocan en los ejes de un plano cartesiano y son unidos por una línea recta que representa todas las posibles combinaciones que tendrían teóricamente el mismo efecto que la utilización de uno solo. La zona por debajo de la línea recta representa combinaciones con posibles comportamientos sinérgicos, la zona por arriba de la línea recta representa las combinaciones con un posible efecto antagónico o tóxico en las células. Las combinaciones que se encuentran sobre la línea recta representan todas las posibles combinaciones con un efecto aditivo.

Índice de combinación

El sinergismo o antagonismo real fue determinado calculando el índice de combinación (IC) usando la ecuación desarrollada en 1987 por Chou-Talalay (*Ting-Chao, 2010*) para evaluar el comportamiento de la combinación de dos compuestos con vías de acción similar o independiente. La ecuación considera:

$$IC = \left(\frac{D1}{D1_x} \right) + \left(\frac{D2}{D2_x} \right) + \alpha \left(\frac{D1D2}{D1_x D2_x} \right)$$

Donde D1 y D2 indican las concentraciones empleadas, $D1_x$ y $D2_x$ las concentraciones necesarias para alcanzar el efecto observado, $\alpha=1$ para mecanismos mutuamente no excluyentes (mecanismos similares). $IC<1$ indica un efecto sinérgico, $IC>1$ indica un efecto antagónico, $IC=1$ indica un efecto aditivo.

Medición de especies reactivas de oxígeno

Se sembraron en placas de 6 pozos, 2×10^5 células/3mL de medio por pozo, exponiendo a las células a los siguientes tratamientos: control negativo, control positivo (H_2O_2 1 mM/24h), CI_{50} de α -M, CI_{50} de CDDP y las combinaciones 2 μ M de CDDP con 10 y 15 μ M de α -M con el modelo de Pre y Co-incubación. Posteriormente se hicieron dos lavados con PBS, se despegaron las células con PBS-EDTA, se contaron con azul de tripano en un contador de células (TC20™, BIO-RAD) y se centrifugaron a 2000 rpm durante 8 minutos. 500 células/ μ L se resuspendieron en PBS, y se incubaron por 30 minutos a 37°C en oscuridad junto con el reactivo diacetato de 5,6-carboxidiclorodihidrofluorosceína (DA-DCFH, Invitrogen) 10 μ M. La fluorescencia emitida fue detectada por citometría de flujo, con el equipo guava easyCyte™ (Millipore), se leyeron 5000 eventos por muestra utilizando el canal verde. Los datos fueron analizados con el software guava InCyte (Millipore).

Medición de apoptosis

Se sembraron en placas de 6 pozos, 2×10^5 células/3mL de medio por pozo, exponiendo a las células a los siguientes tratamientos: control negativo, CI_{50} de CDDP, CI_{50} de α -M y las combinaciones 2 μ M de CDDP con 10 y 15 μ M de α -M con el modelo de Pre-incubación. Posteriormente se hicieron dos lavados con PBS, se despegaron con PBS-EDTA, se contaron con azul de tripano en un contador de células (TC20™, BIO-RAD) y se centrifugaron a 2000 rpm durante 8 minutos. 500 células/ μ L se resuspendieron en PBS. Se incubaron por 20 minutos a temperatura ambiente en oscuridad junto con el reactivo comercial guava-nexin (Guava-Technologies) que contiene a la proteína Anexina V (AV) y al colorante 7-aminoactinomicina D (7-AAD). La detección fue realizada por citometría de

flujo, se leyeron 10000 eventos con el equipo guava easyCyte™ (Millipore) y los datos fueron analizados con el software guavaNexin, (Millipore).

Análisis estadístico

Los datos son mostrados como la media de los experimentos \pm error estándar de la media. Las comparaciones estadísticas fueron realizadas utilizando un análisis de varianza (ANOVA) de una vía utilizando la prueba *post hoc* Student Newman-Keuls para comparaciones múltiples con $P < 0.05$ para considerar diferencia significativa. Para el análisis estadístico de las combinaciones de los compuestos se calculó el área bajo la curva y posteriormente se comparó con respecto a los tratamientos. Todas las gráficas fueron realizadas con el software Sigma Plot 10.0 y el análisis estadístico con el software GraphPad Prism 5.0.

Resultados

Se determinó la citotoxicidad de CDDP y α -M sobre las células HeLa en varias concentraciones por 24 horas como fue descrito en materiales y métodos. En CDDP se observó una disminución en el porcentaje de la viabilidad celular de manera dependiente a la concentración como se muestra en el gráfico 1 (técnica de MTT) y 2 (técnica cristal violeta), observando que a mayor concentración del fármaco la viabilidad celular disminuía. La CI_{50} obtenida fue de $29.7 \pm 1.3 \mu\text{M}$ determinado con la técnica de MTT y se corroboró con la técnica de cristal violeta.

En la ilustración 10 se pueden observar las células HeLa después de 24 horas de exposición al CDDP, transcurrido este tiempo se ha perdido la unión celular, la densidad poblacional ha descendido por la aparición de cuerpos apoptóticos y fragmentos celulares que se desprenden durante el proceso de muerte, se aprecia también un cambio en la forma e integridad de las células remanentes debido al daño ocasionado por el fármaco.

Grafico 1. Efecto de CDDP
 $f = a/(1 + \exp(-(x-x_0)/b))$

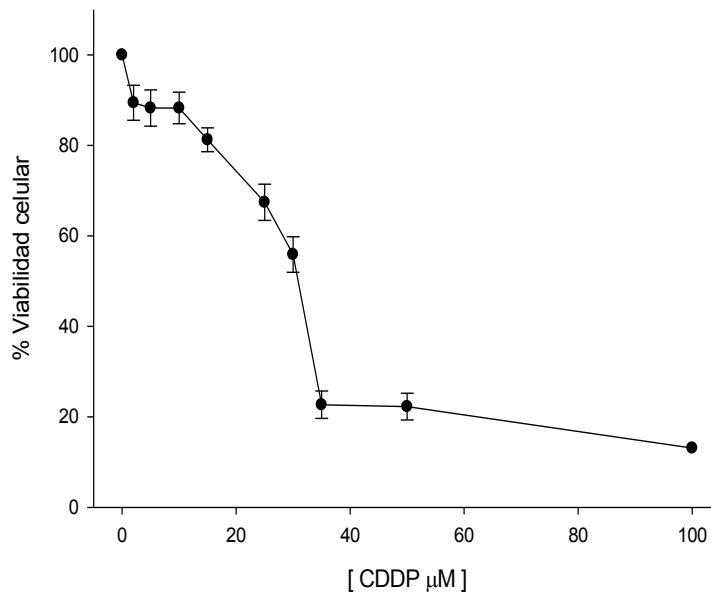


Gráfico 1 Efecto de CDDP con la técnica MTT

Los datos son expresados como la media de 8 repeticiones + error estándar de 13 experimentos

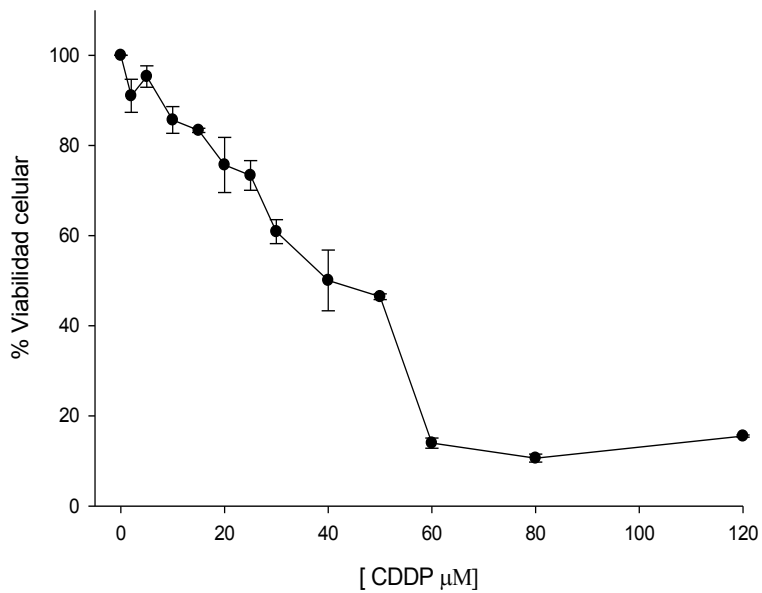


Gráfico 2 Efecto de CDDP en la línea celular con la técnica cristal violeta

Los datos son expresados como la media de 8 repeticiones \pm error estándar de 4 experimentos independientes.



Ilustración 10 Imágenes de la línea celular HeLa después del tratamiento con CDDP

(A) Células control (sin ningún tratamiento) (B) Células después de 24 horas con 30 μM de CDDP.

Posteriormente se determinó el efecto citotóxico causado por $\alpha\text{-M}$, en el gráfico 3 (técnica MTT) y 4 (técnica cristal violeta) se muestra el comportamiento del porcentaje de viabilidad que tienen las células HeLa después de su exposición durante 24 horas a diferentes concentraciones. Se observa como en el caso anterior una disminución de la viabilidad celular dependiente de la dosis a partir de 15 μM . La CI_{50} obtenida experimentalmente fue de $19.7 \pm 1.0 \mu\text{M}$, valor que concuerda con lo reportado anteriormente en el trabajo de Mizushima *et al* (2013) con $19.1 \pm 1.9 \mu\text{M}$ en la misma línea celular.

En la ilustración 11 se aprecia la comparación entre células control y las células remanentes después de 24 h con $\alpha\text{-M}$, se observó una pérdida en la unión celular y se disminuyó la cantidad de células adheridas.

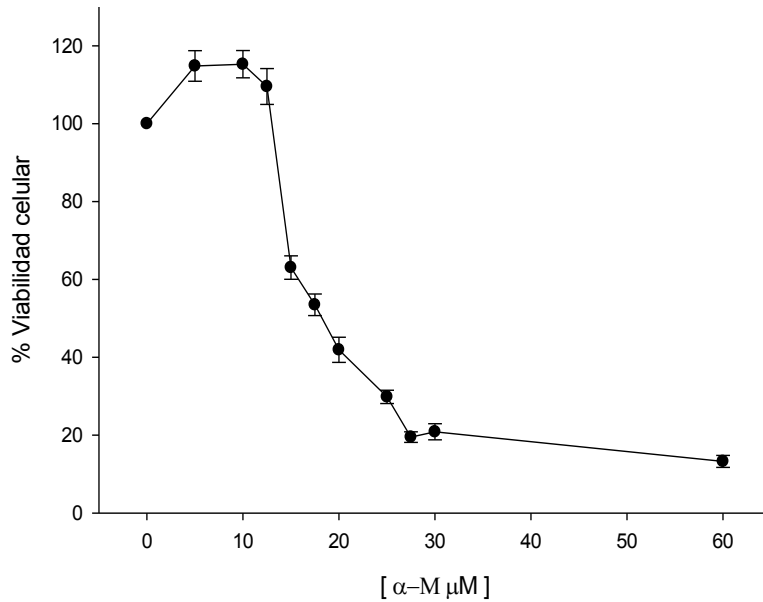


Gráfico 3 Efecto de α -M con la técnica MTT

Los datos son expresados como la media de 8 repeticiones \pm error estándar de 10 experimentos independientes. Se muestra la regresión no lineal de tipo sigmoidea de 3 parámetros ($r^2=0.95$)

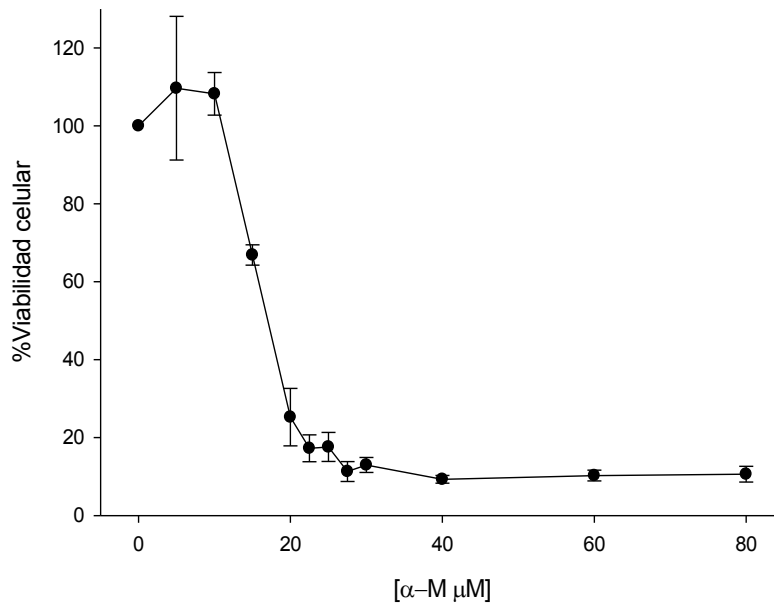


Gráfico 4 Efecto de α -M con la técnica cristal violeta

Los datos son expresados como la media de 8 repeticiones \pm error estándar de 4 experimentos independientes. Se muestra la regresión no lineal de tipo sigmoidea de 3 parámetros ($r^2=0.98$)



Ilustración 11 Imágenes de la línea celular HeLa después del tratamiento con α -M

(A) Control (sin tratamiento). (B) Células después de 24 horas con 20 μ M de α -M

El gráfico 5 muestra la construcción del isoblograma, así como los tratamientos seleccionados para probar en cultivo celular. Sumados a estos puntos también se usaron combinaciones altas (50 μ M de CDDP con 25, 30 y 60 μ M de α -M) para corroborar su funcionamiento y cubrir el mayor espectro de respuesta.

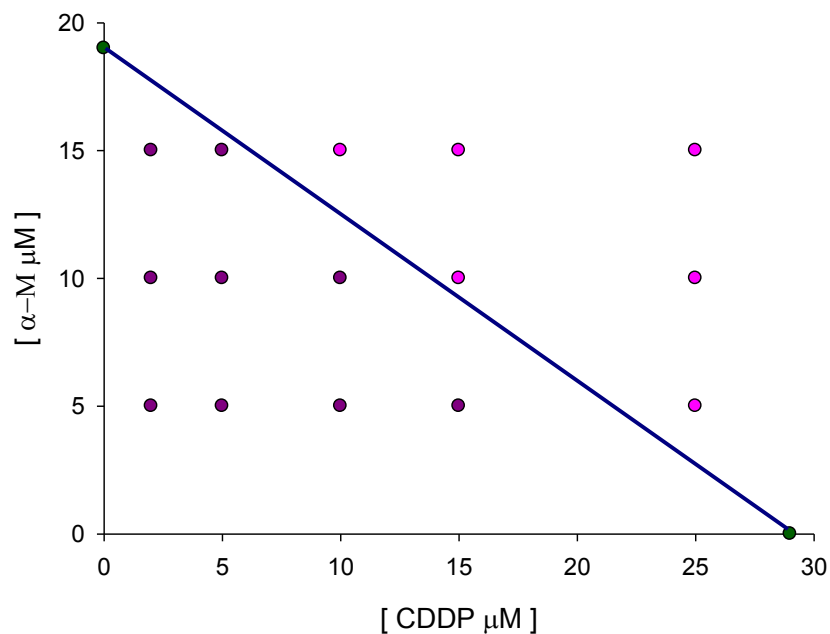


Gráfico 5 Isoblograma

■ Posibles combinaciones sinérgicas, ■ Posibles combinaciones antagónicas.

Tanto α -M como CDDP se le adicionaron al medio para alcanzar la concentración señalada de cada uno, y fueron expuestas de esta manera a las células, teniendo así un modelo de Co-incubación. Como se ve en el gráfico 6 las distintas combinaciones de CDDP con las concentraciones por debajo de la CI_{50} de α -M tuvieron porcentajes altos de viabilidad celular. Las combinaciones con 5 y 10 μ M de α -M rebasaron la viabilidad del tratamiento de CDDP solo, inclusive a concentraciones altas de éste, teniendo en todos los casos porcentajes de viabilidad mayores al 60%. Las combinaciones de CDDP con 15 μ M de α -M mantuvieron un efecto estático sobre el cultivo celular obteniendo un efecto promedio de 65%. Las combinaciones con concentraciones por encima del valor de las CI_{50} de ambos compuestos tuvieron un efecto letal sobre las células.

El análisis estadístico del área bajo la curva muestra que todos los tratamientos tienen diferencia significativa con respecto al control de CDDP menos las combinaciones con 15 μ M de α -M

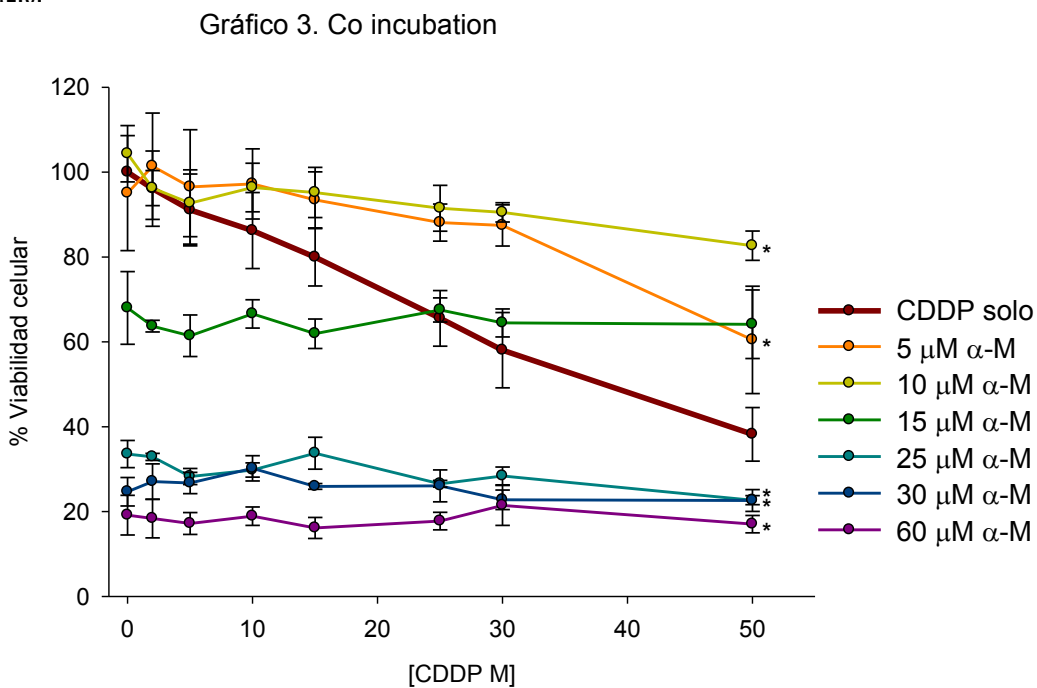


Gráfico 6 Combinaciones con Co-Incubación.

Los datos son expresados como la media de 2 repeticiones \pm error estándar de 3 experimentos independientes realizados con la técnica de MTT. ($P < 0.05$ con respecto al control de CDDP solo).*

Se probó posteriormente otro esquema de tratamiento, exponiendo a las células por 24 horas con las concentraciones señaladas de α -M, pasado este tiempo se removió el medio y se expusieron a las concentraciones indicadas de CDDP por 24 horas, teniendo un modelo de sensibilización o Pre-incubación.

Como se muestra en el gráfico 7 la viabilidad celular de los tratamientos disminuyó con respecto al tratamiento de Co-incubación, todas las combinaciones mostraron tener diferencia estadísticamente significativa con respecto al control de CDDP menos las combinaciones con 5 μ M de α -M, es decir, ambos tratamientos tuvieron el mismo efecto. Las combinaciones de CDDP con 10 y 15 μ M de α -M mostraron tener una disminución dependiente de la dosis de manera significativa con respecto al control de CDDP, mientras las combinaciones de CDDP con 25, 30 y 60 μ M de α -M mostraron tener un efecto letal independiente de la concentración de CDDP, estos tres tratamientos tuvieron diferencias significativas con respecto al control pero no entre sí

Gráfico 4. Pre incubation

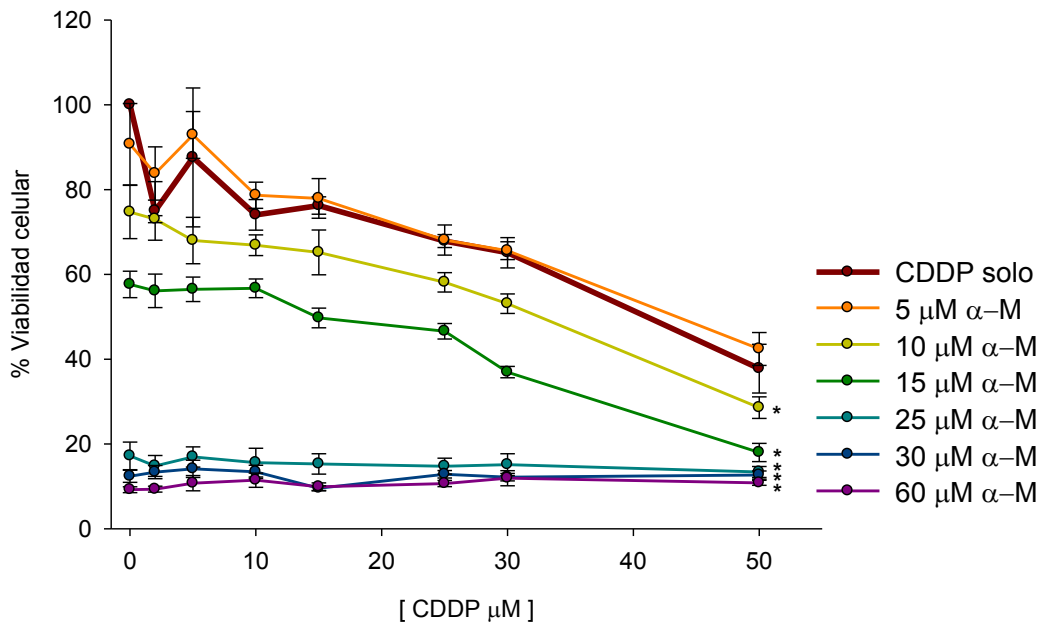


Gráfico 7 Combinaciones con Pre-Incubación.

Los datos son expresados como la media de 2 repeticiones \pm error estándar de 3 experimentos independientes realizados con MTT. (* $P < 0.05$ con respecto al control de CDDP solo).

Los resultados de ambos modelos se analizaron con la ecuación de Chou-Talalay para definir de manera matemática el comportamiento de las combinaciones, el IC se calculó considerando un mecanismo mutuamente no excluyente (mecanismos diferentes).

La mayoría de las combinaciones del modelo de Co-incubación tuvieron un IC mayor a 1, es decir, comportamiento antagónico o tóxico, los resultados obtenidos se muestran en la tabla 5. El efecto citotóxico observado en las combinaciones que tuvieron por lo menos un componente con concentración mayor al valor de CI_{50} de alguno de los dos compuestos, se lo atribuimos principalmente al efecto del compuesto en mayor proporción y no necesariamente al efecto de la combinación.

Para el modelo de Pre-incubación, los IC mostraron comportamientos antagónicos, junto con algunos comportamientos sinérgicos y aditivos como se muestra en la tabla 6. De estos resultados se eligieron las combinaciones de 2 μ M de CDDP con 10 y 15 μ M de α -M para los posteriores estudios por ser un ejemplo de sinergismo en la primera combinación y por obtener un porcentaje de viabilidad alrededor del 50% con concentraciones bajas de los compuestos en la segunda combinación.

Posteriormente se midió la generación de EROs, utilizando citometría de flujo y evaluando los tratamientos de CI_{50} de α -M y CDDP (20 y 30 μ M respectivamente), las combinaciones de 2 μ M de CDDP con 10 y 15 μ M de α -M, las cuales serán referidas de aquí en adelante como 2 con 10 y 2 con 15 y los controles positivos correspondientes para cada prueba. El modelo de Pre-incubación mostró mejores resultados en la disminución de viabilidad celular comparados con el modelo de Co-incubación, sin embargo se evaluaron los dos modelos de tratamiento para una mejor comparación de lo observado.

Tabla 5 Índices de combinación para las combinaciones en Co-Incubación

CDDP	α -M	CDDP	α -M	% viabilidad	IC $\alpha=1$	Interpretación
D1 (μ M)	D2 (μ M)	D1 _x (μ M)	D2 _x (μ M)			
15	5	3	12	93.47	> 5	Antagónico
25	5	9	13	88.12	4.2	Antagónico
30	5	10	13	87.42	4.6	Antagónico
50	5	25	18	60.46	2.8	Antagónico
5	10	4	12	92.67	3.2	Antagónico
25	10	5	12	91.49	> 5	Antagónico
30	10	7	13	90.53	> 5	Antagónico
50	10	14	14	82.66	> 5	Antagónico
2	15	24	18	63.70	1.0	Aditivo
5	15	25	18	61.44	1.2	Aditivo
10	15	23	17	66.59	1.7	Antagónico
15	15	25	18	61.92	1.9	Antagónico
25	15	22	17	67.51	3.0	Antagónico
30	15	24	17	64.46	3.2	Antagónico
50	15	24	17	64.14	4.8	Antagónico
2	25	38	23	32.89	1.2	Aditivo
5	25	40	24	28.27	1.3	Antagónico
10	25	39	23	29.80	1.6	Antagónico
15	25	37	23	33.74	1.9	Antagónico
25	25	41	24	26.54	2.3	Antagónico
30	25	40	24	28.39	2.6	Antagónico
50	25	43	25	22.68	3.3	Antagónico
2	30	41	24	27.07	1.4	Antagónico
5	30	41	24	26.74	1.5	Antagónico
10	30	39	23	30.21	1.9	Antagónico
15	30	41	24	25.92	2.0	Antagónico
25	30	41	24	26.05	2.6	Antagónico
30	30	43	25	22.77	2.7	Antagónico
50	30	44	25	22.60	3.7	Antagónico
2	60	46	26	18.36	2.4	Antagónico
5	60	47	27	17.19	2.6	Antagónico
10	60	46	26	18.91	3.0	Antagónico
15	60	48	27	16.12	3.2	Antagónico
25	60	46	27	17.77	4.0	Antagónico
30	60	44	26	21.46	4.6	Antagónico
50	60	47	27	17.04	> 5	Antagónico

Dónde: D1 y D2 son las concentraciones empleadas, D1_x y D2_x son las concentraciones individuales necesarias para alcanzar el efecto observado (% viabilidad), IC es el índice de combinación, $\alpha = 1$ mecanismos mutuamente no excluyentes. Algunos valores fueron eliminados de la tabla por ser matemáticamente indeterminados.

Tabla 6 Índices de combinación para las combinaciones en Pre-Incubación

CDDP	α -M	CDDP	α -M	% viabilidad	IC $\alpha=1$	Interpretación
D1 _(μM)	D2 _(μM)	D1 _{x(μM)}	D2 _{x(μM)}			
2	5	13	14	83.78	0.6	Sinérgico
5	5	4	12	92.89	2.2	Antagónico
10	5	16	15	78.67	1.1	Aditivo
15	5	17	15	77.91	1.5	Antagónico
25	5	22	17	68.11	1.8	Antagónico
30	5	23	17	65.59	2.0	Antagónico
50	5	33	21	42.42	2.1	Antagónico
2	10	20	16	73.03	0.8	Sinérgico
5	10	22	17	67.98	1.0	Aditivo
10	10	23	17	66.87	1.3	Antagónico
15	10	23	17	65.18	1.6	Antagónico
25	10	27	18	58.13	2.0	Antagónico
30	10	29	19	53.09	2.1	Antagónico
50	10	40	24	28.58	2.2	Antagónico
2	15	27	19	56.11	0.9	Aditivo
5	15	27	19	56.48	1.1	Aditivo
10	15	28	19	56.72	1.5	Antagónico
15	15	30	20	49.73	1.6	Antagónico
25	15	32	20	46.60	2.1	Antagónico
30	15	36	22	36.95	2.1	Antagónico
50	15	46	26	18.00	2.3	Antagónico
2	25	49	28	14.83	1.0	Aditivo
5	25	47	27	16.95	1.1	Aditivo
10	25	48	27	15.60	1.3	Antagónico
15	25	48	27	15.29	1.5	Antagónico
25	25	49	28	14.76	1.9	Antagónico
30	25	48	27	15.12	2.1	Antagónico
50	25	50	28	13.40	2.8	Antagónico
2	30	50	28	13.37	1.1	Aditivo
5	30	49	28	14.15	1.3	Antagónico
10	30	50	28	13.43	1.5	Antagónico
15	30	54	30	9.55	1.6	Antagónico
25	30	50	28	12.84	2.1	Antagónico
30	30	51	29	12.16	2.3	Antagónico
50	30	51	28	12.68	3.1	Antagónico
2	60	54	30	9.34	2.1	Antagónico
5	60	53	29	10.74	2.3	Antagónico
10	60	52	29	11.45	2.7	Antagónico
15	60	54	30	9.91	2.9	Antagónico
25	60	53	29	10.66	3.5	Antagónico
30	60	52	29	11.93	3.9	Antagónico
50	60	53	29	10.83	4.9	Antagónico

Se determinó la generación de EROs producidas con ambos modelos de tratamiento, en los gráficos 8 y 9 se muestran con una línea punteada la señal del control y en sólido la señal del tratamiento indicado, se observó el aumento de EROs generadas en el corrimiento hacia la derecha de la señal o en el incremento del número de células que presentan la cantidad de fluorescencia emitida. Se observó que los tratamientos incrementaron la generación de EROs con respecto al control en todos los casos y en ambos modelos de tratamiento.

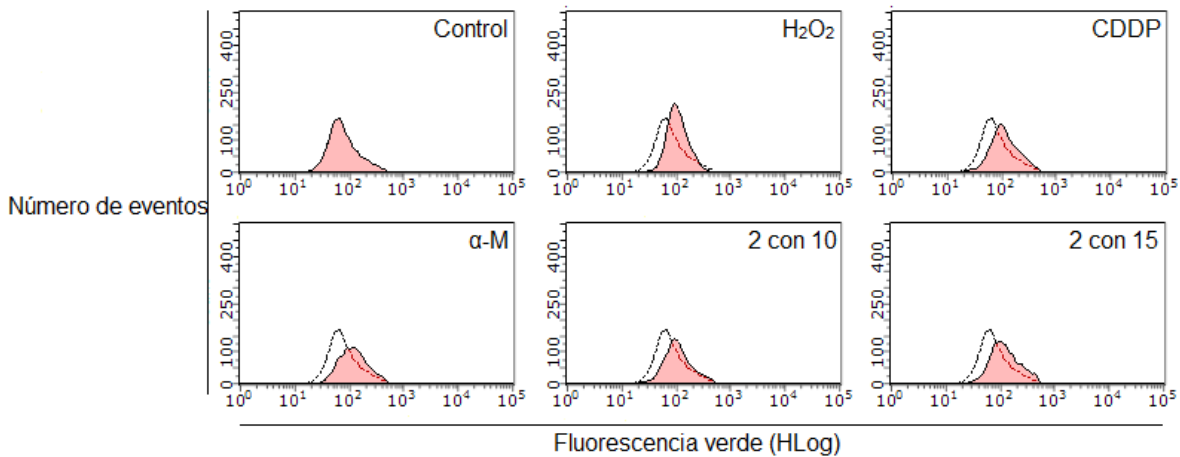


Gráfico 8 Distribución poblacional de generación de EROs con Co-incubación

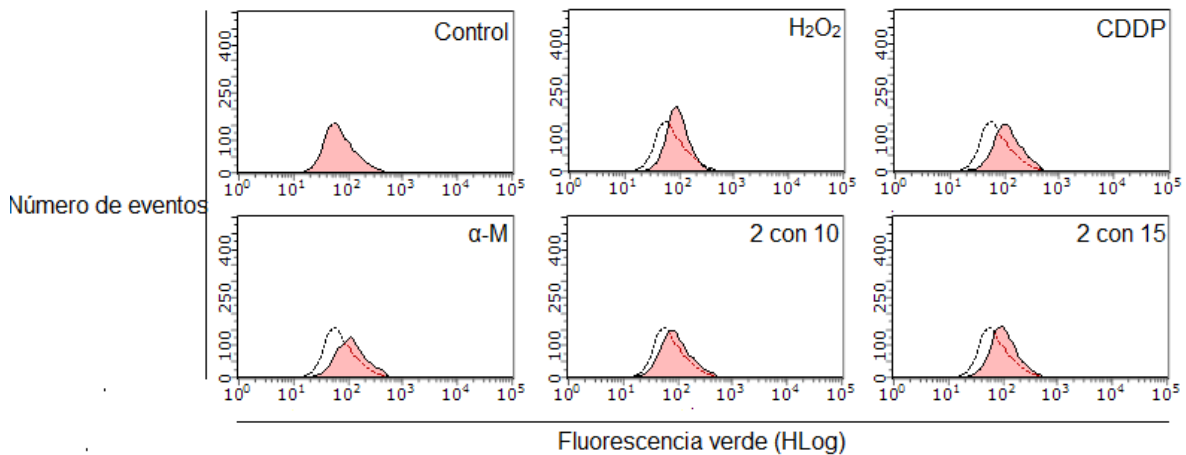


Gráfico 9 Distribución poblacional de generación de EROs con Pre-incubación

Para el análisis de los datos se normalizaron tomando en cuenta la fluorescencia emitida con respecto al número de células que lo hicieron, estos datos son representados en los gráficos 10 y 11, mostrando con una línea de referencia el control. Con el modelo de Co-incubación se obtuvo un aumento estadísticamente significativo con respecto al control en la producción relativa de EROs con los tratamientos de CI_{50} de CDDP y α -M. Las combinaciones en cambio mostraron una tendencia de aumento conforme al control pero una disminución en la producción de EROs con respecto de los tratamientos individuales.

Al cambiar el modelo a Pre-incubación el valor de la producción relativa aumenta, atribuido principalmente a un mayor tiempo de experimentación, se obtuvo diferencia significativa con respecto al control con todos los tratamientos salvo con la combinación 2 con 10.

Dado que el modelo de Pre-incubación fue con el que se obtuvo menor viabilidad celular con las combinaciones, se eligió para determinar la apoptosis generada por los tratamientos, mostrando los resultados en el gráfico 12, en él se muestra los diagramas de distribución poblacional de las células después de los tratamientos en distintas etapas, en la parte inferior izquierda se encuentran las células viables o no apoptóticas (AV^- , $7-AAD^-$), en la parte inferior derecha las células en apoptosis temprana (AV^+ , $7-AAD^-$), en la parte superior izquierda los escombros nucleares (AV^- , $7-AAD^+$) y en la parte superior derecha las células en etapas tardías de apoptosis (AV^+ , $7-AAD^+$).

En el gráfico 13 se muestra la apoptosis total generada por los tratamientos, distinguiéndose entre apoptosis temprana y tardía. Hubo en todos los casos una diferencia estadísticamente significativa entre los tratamientos y el control, sin embargo en las combinaciones hay un aumento en la producción de apoptosis temprana con respecto al control y los tratamientos de CDDP y α -M individuales, lo cual se relaciona con los datos de viabilidad celular previamente mostrados.

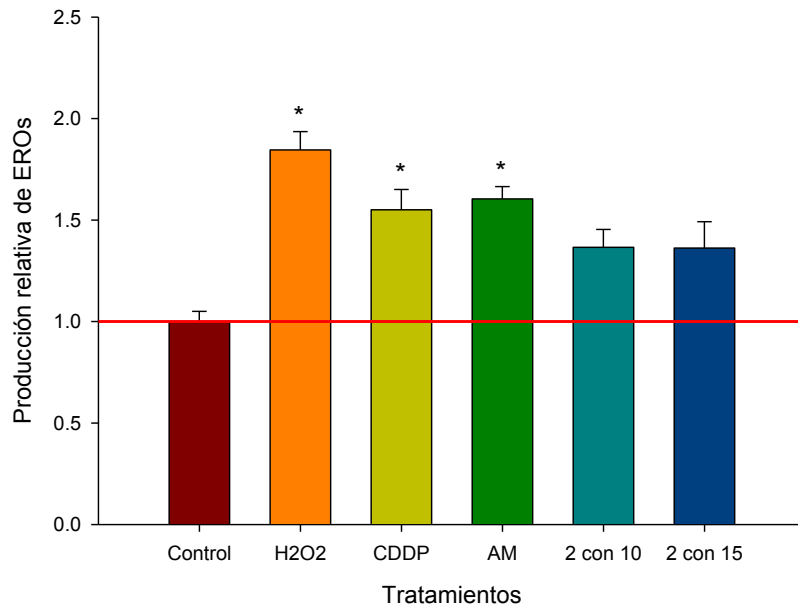


Gráfico 10 Producción relativa de EROs con Co-incubación

Los datos son expresados como la media ± error estándar de 4 experimentos

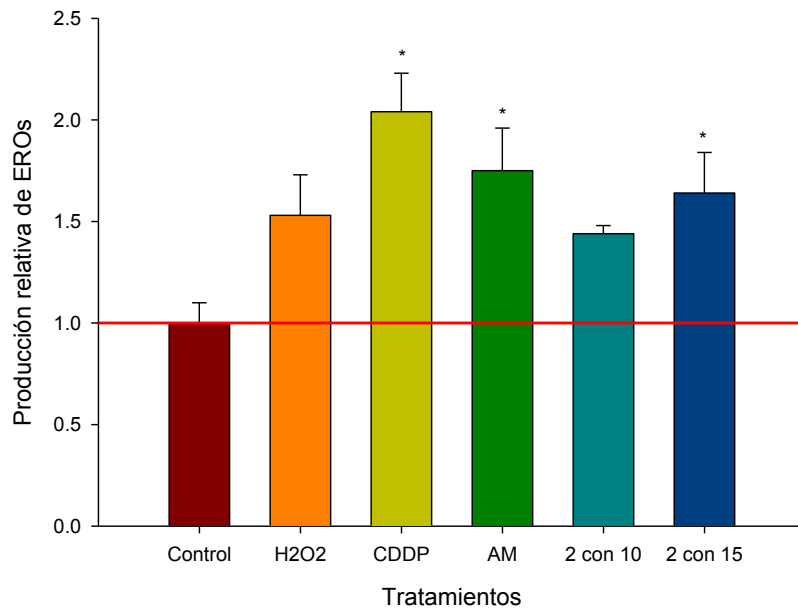


Gráfico 11 Producción relativa de EROs con Pre-incubación

Los datos son expresados como la media ± error estándar de 3 experimentos independientes. (* $P < 0.05$ con respecto al control)

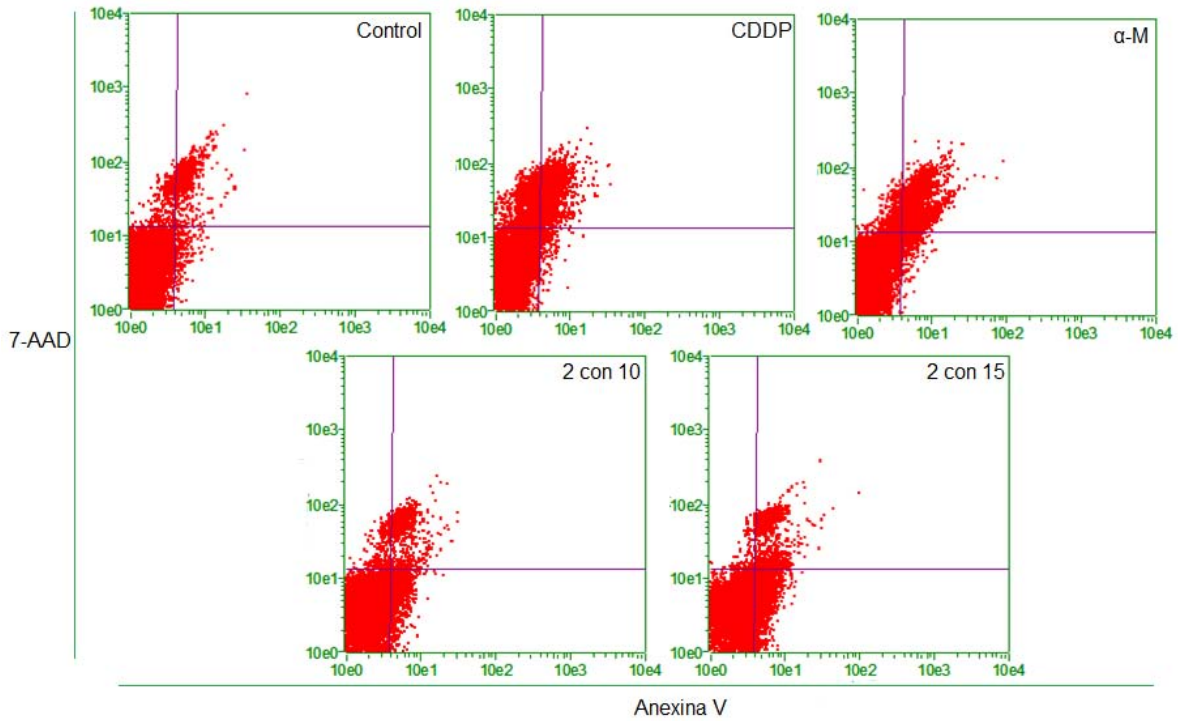


Gráfico 12 Distribución poblacional de apoptosis con Pre-incubación

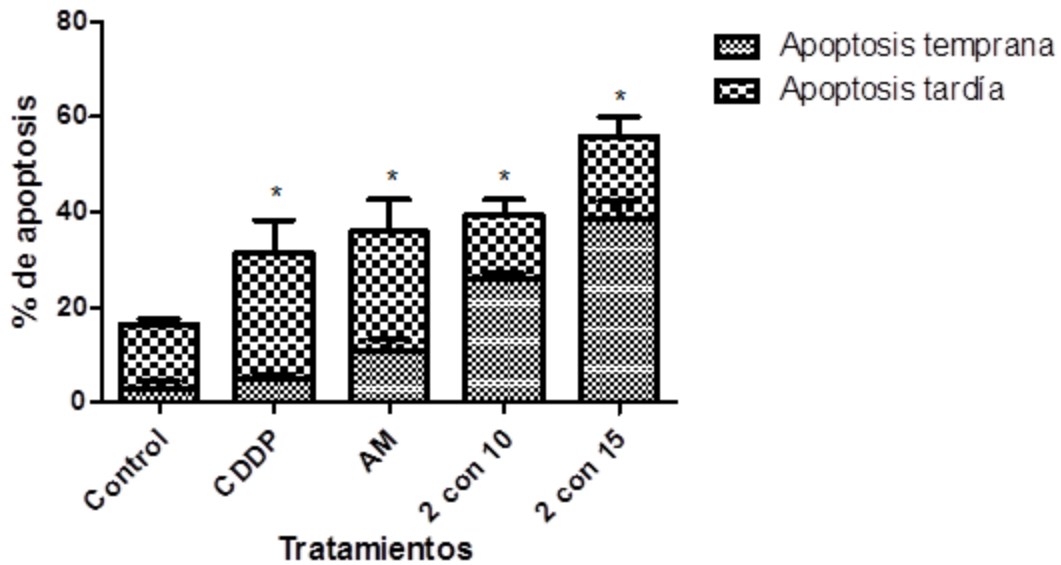


Gráfico 13 Tipos de apoptosis producida por tratamientos

Los datos son expresados como la media \pm error estándar de 3 experimentos independientes. (* $P < 0.05$ con respecto al control)

Discusión

El CaCu es aún un problema grave de salud a nivel mundial y en especial en aquellos países en vías de desarrollo como el nuestro (*López-Saavedra, 2006*). Esta enfermedad es de lenta progresión por lo que la mayoría de las pacientes son diagnosticadas en estadíos avanzados. La quimioterapia basada en CDDP se considera el tratamiento estándar, sin embargo su uso se asocia a diversos efectos secundarios por lo que nuevas modalidades de tratamiento deben ser investigadas (*Cetina, 2006*).

A lo largo de los últimos años, se ha reportado el efecto preventivo y terapéutico contra el cáncer de diversos fitoquímicos derivados de plantas comestibles o fuentes alimenticias como la capsaicina (presente en los pimientos), la curcumina (presente en la cúrcuma), el resveratrol (presente en las uvas), el licopeno (presente en el jitomate), entre otros (*Young-Joon, 2003*) como el aceite esencial de canela (*Larasati, 2014*) y la α -M (*Pedraza-Chaverri, 2008*).

Se ha demostrado que α -M (presente en el mangostán) induce muerte celular por apoptosis en distintas líneas celulares como HL60, K562, NB4 (leucemia, *Matsumoto, 2004*), DLD-1 (cáncer de colón, *Matsumoto, 2005*), 22Rv1, PC3 (cáncer de próstata, *Johnson, 2012*) y MDA-MB231 (cáncer de mama, *Kurose, 2011*).

Por ello en el presente estudio se decidió evaluar si α -M, derivado de una fuente alimenticia, ayuda a mejorar la respuesta del tratamiento estándar en una línea de CaCu. Encontrándose que α -M tiene un efecto de inhibición en la proliferación de las células mayor al de CDDP, 19 μ M vs 29 μ M respectivamente (Gráfico 1, 2, 3 y 4). Sin embargo al hacer las combinaciones con concentraciones por debajo de las CI_{50} individuales, el porcentaje de viabilidad celular no disminuyó más allá del 40% aún con concentraciones altas de CDDP, lo cual indica que α -M tiene un efecto protector sobre las células contra la acción del CDDP.

Además al exponer a las células a concentraciones bajas como lo son 5, 7.5 y 10 μ M de α -M el efecto sobre la viabilidad celular no es tóxico, por el contrario, los porcentajes de

viabilidad celular son semejantes al del control y en la mayoría de los casos se ve incrementado con respecto al mismo, lo cual indica que a concentraciones bajas α -M evita cualquier daño o estrés natural que puede ocurrir durante el cultivo y por ello se obtienen porcentajes de viabilidad más altos. Este efecto de sobrevida con respecto al control se ha reportado también en células epiteliales no cancerosas (*Johnson, 2012*).

El mecanismo por el cual α -M tiene efecto sobre las células aún no ha sido vislumbrado por completo, se ha reportado que la ruta por la cual se cree que α -M tiene efecto es al inhibir las enzimas topoisomerasas (*Mizushima, 2013*) las cuales son requeridas en la segregación de cromosomas para la célula hija. Se ha sugerido otro mecanismo sobre cinasas, principalmente sobre el gen CDK4 (*Johnson, 2012*) que codifica para las proteínas en la división celular. Con base en lo anterior, es posible que el mecanismo de acción de α -M sea mutuamente excluyente al de CDDP, es decir, ambos compuestos en un rango de 0 a 20 μ M actúan por vías diferentes. Con base a las referencias suponemos que la eficacia del uso de fitoquímicos depende de la concentración y el modelo de tratamiento empleado, ya que de esto depende la modulación intracelular de las vías de señalización (*Akao, 2008*)

Se ha reportado también que α -M disminuye la viabilidad celular promoviendo el arresto del ciclo celular en la fase G1, afectando la expresión de ciclinas, CDC2 Y p27 (*Matsumoto, 2005*). Con los resultados obtenidos en el presente estudio se observó que α -M promueve la apoptosis y en combinación con CDDP promueve principalmente la apoptosis temprana (gráfico 13).

Al exponer a las células a las combinaciones de CDDP y α -M en el modelo de Co-incubación (gráfico 6), el efecto del antineoplásico se ve disminuido en la mayoría de los casos, esto sugiere que α -M a concentración de 5 y 10 μ M podría tener un efecto dominante en la combinación con CDDP, que se ve disminuido al aumentar la concentración, esto podría ser porque α -M con su estructura aromática puede estar reaccionando con alguno de los intermediarios del CDDP, o subproductos de su acción, evitando la propagación de la reacción, impidiendo el efecto y por tanto evitando la muerte de la célula cancerosa. Por el contrario al exponer a las células a las combinaciones de

ambos compuestos con Pre-incubación (gráfico 7), se encontró que la viabilidad celular disminuía con respecto al modelo anterior, presentando en la mayoría de los casos un comportamiento aditivo.

Las combinaciones con efecto sinérgico ($IC < 0.9$, tabla 5 y 6) se obtuvieron con concentraciones por debajo de la CI_{50} de cada uno de los compuestos, sin embargo el porcentaje de viabilidad celular resultó ser alto comparado a lo que se buscaba (porcentaje de viabilidad menor al 50%). Lo ideal sería que la exposición conjunta de CDDP con α -M tuviera el mismo efecto de inhibición en las células cancerosas que el CDDP solo, pero a dosis menores de ambos, ya que las implicaciones clínicas serían menores efectos secundarios.

La capacidad antioxidante de α -M es la característica más estudiada y reportada de este compuesto, por lo que se decidió medir la generación de EROs causada por los tratamientos. Las combinaciones mostraron generar menos EROs con respecto a los controles en el modelo de Co-incubación (grafico 10), mientras que al cambiar de modelo a Pre-incubación (gráfico 11), la producción de EROs se aumenta con concentraciones de 15 μ M de α -M, es decir actúa como un pro oxidante, y en concentraciones 10 μ M de α -M presenta un efecto antioxidante por lo que la producción de EROs se retarda.

Se cuantificó el porcentaje de apoptosis solo en el modelo de Pre-incubación debido a que se observaron mejores resultados en la muerte celular y en la generación de EROs. Las combinaciones seleccionadas 2 con 10 y 2 con 15, mostraron producir mayor apoptosis con respecto al control (gráfico 13). Se observó que α -M disminuye el efecto citotóxico de CDDP al mantener a las células mayor tiempo en apoptosis temprana, lo que nos sugiere que se necesita mayor tiempo de exposición de α -M para producir mayor muerte en las células, lo cual se correlaciona con nuestros resultados de viabilidad celular (grafico 7).

Es necesario para futuros trabajos analizar la señalización bioquímica que ocurre después del tratamiento para identificar la ruta por la cual α -M ejerce su acción en esta línea celular, así como evaluar la respuesta en un modelo *in-vivo* y determinar el esquema de tratamiento que tenga un mayor efecto benéfico sobre la actividad antitumoral.

Es importante decir que se deben tomar en cuenta las interacciones entre los medicamentos de quimioterapia y otras medicinas, vitaminas, medicamentos de venta sin receta y suplementos alimenticios ya que en algunos pacientes estas interacciones pueden empeorar los efectos secundarios mientras que en otros pueden interferir con la eficacia de la quimioterapia, por lo anterior pensamos que el efecto que conlleva la utilización de α -M en sus diversas formas presentes en el mercado (jugos, tés y bebidas saborizadas) podría representar una decaída en el estado de salud de la paciente o un lento avance en su tratamiento de quimioterapia por las evidencias mostradas a lo largo del presente trabajo.

Conclusión

La α -M es un agente antitumoral mejor que CDDP en un intervalo de concentración mayor a 10 μ M ya que de lo contrario interfiere en la actividad antineoplásica de CDDP cuando es administran de manera simultánea. La mayoría de las combinaciones probadas de α -M y CDDP mostraron no tener efectos sinérgicos cuando se administran conjuntamente y algunas combinaciones mostraron efectos aditivos cuando α -M sensibiliza a la línea celular de cáncer de cérvix.

Bibliografía

- ACS. American Cancer Society. Cáncer de cuello uterino (cervical). 2014 (Consultado en mayo del 2015 en: <http://www.cancer.org/acs/groups/cid/documents/webcontent/002288-pdf.pdf>)
- Akao Y., Nakagawa Y., Iinuma M. & Nozawa Y. 2008. Anti-Cancer Effects of xanthones from Pericarps of Mangosteen. *International Journal of Molecular Sciences*. 9: 355-370.
- Alfaro-Moreno E., García-Cuellar C. & Dueñas-González A. 2000. Métodos de determinación de la apoptosis, aplicaciones y limitaciones. *Rev Inst Nal Cancerol (Mex)*. 46 (4): 275-280.
- Barbosa K.F.B., Bressan J. Zulet M.A. & Martínez J.A. 2008. Influencia de la dieta sobre marcadores plasmáticos de estrés oxidativo en humanos. *An Sist Sanit Navar*. 31(3): 259-280.
- Castelo-Fernández B., Redondo-Sánchez A., Gómez-Raposo C. & Cruz-Castellanos P. 2013. Cáncer de Cérvix y endometrio. *Medicine*. 11(27): 1649-1658.
- Cetina L., Wegman T., García-Arias A., Candelaria M. & Dueñas-González A. 2006. Radiosensibilizantes en Cáncer Cérvicouterino. *Cancerología*. 1: 4-29.
- Chin Y. & Kinghorn A.D. 2008. Structural characterization, biological effects, and synthetic studies on xanthines from mangosteen (*Garcinia mangostana*), a popular botanical dietary supplement. *Mini Rev. Org. Chem*. 5: 355-364.
- De-Cock P. & Bechert C. 2002. Erythritol. Functionality in noncaloric functional beverages. *Pure Appl. Chem*. 74 (7): 1281-1289.
- García-Ramos J. C., Galindo-Murillo R., Cortés-Guzmán & Ruiz-Azuara L. 2013. Metal-Based Drug-DNA Interactions. *J. Mex. Chem. Soc*. 57(3): 245-259.

- GLOBOCAN. International Agency for Research on Cancer. Fact Sheets Population. 2012. (Consultado en enero 2015 en: http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_population.aspx).
- Go V. L. W., Batrum R. R. & Wong D. A. 2003. Diet, Nutrition and Cancer prevention: The Postgenomic Era. *The Journal of Nutrition*. 3830-3836.
- Gutierrez-Orozco, F. & Failla, M. 2013. Biological Activities and Bioavailability of Mangosteen Xanthonones: A Critical Review of the Current Evidence. *Nutrients*. 5: 3163-3183.
- INEGI. Instituto Nacional de Estadística y Geografía. "Estadísticas a propósito de... Día mundial contra el cáncer (4 de febrero). 2014. (Consultado en enero 2015 en: <http://www.inegi.org.mx/inegi/contenidos/espanol/prensa/contenidos/estadisticas/2014/cancer11.pdf>).
- Jiang D. J., Dai Z. & Li Y. J. 2004. Pharmacological effects of xanthonones as cardiovascular protective agents. *Cardiovascular Drug Reviews*. 22: 91-102.
- Johnson J. J., Petiwala S. M., Syed D. N., Rasmussen J.T., Adhami V. M., Siddiqui I. A., Kohl A. M. & Mukhtar Hasan. 2012. α -Mangostin, a xanthone from mangosteen fruit, promotes cell cycle arrest in prostate cancer and decreases xenograft tumor growth. *Carcinogenesis*. 33(2): 413–419.
- Kris-Etherton P. M., Hecker K. D., Bonanome A., Coval S. M., Binkoski A. E., Hilpert K. F., Griel A. E. & Etherton T. D. 2002. Bioactive compounds in Foods: Their role in the Prevention of Cardiovascular Disease and Cancer. *The American Journal of Medicine*. 113: 71-88.
- Kurose H., Shibata M. A., Iinuma M. & Otsuki Y. 2012. Alterations in Cell Cycle and Induction of Apoptotic Cell Death in Breast Cancer Cells Trated with α -Mangostin Extracted from Mangosteen Pericarp. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 2012: 1-9.

- Larasati Y. A., Putri D. D. P., Utomo R. Y., Hermanwan A. & Meiyanto E. 2014. Combination of Cisplatin and Cinnamon Essential Oil Inhibits HeLa Cells Proliferation through Cell Cycle Arrest. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 4(12): 14-19.
- Lazcano-Ponce E. & Allen-Leigh B. 2009. Innovation in Cervical Cancer Prevention and Control in México. *Archives of Medical Research*. 40: 486-492.
- Lelièvre J.M., Latché A., Jones B., Bouzayen M. & Pech J. C. 1997. Ethylene and fruit ripening. In: *Physiologia Plantarum*. pp:727-739 Denmark.
- López-Saavedra A. & Lizano Soberón M. 2006. Cáncer Cérvicouterino y el Virus del Papiploma Humano: La Historia que no termina. *Cancerología*. 1: 31-55.
- Marquez-Valadez B., Lugo-Huitron R., Valdivia-Cerda V., Miranda Ramírez L. R., Pérez-DelaCruz V., González-Cuahutencos O., Rivero-Cruz I., Mata R., Santamaria A. & Pedraza-Chaverri J. 2009. The natural xantone α -mangostin reduces oxidative damage in rat brain tissue. *Nutritional Neuroscience*. 12(1): 35-42.
- Matsumoto K., Akao Y., Ohguchi K. Ito Tetsuro, Tanaka T., Iinuma M. & Nozawa Y. 2005. Xanthenes induce cell-cycle arrest and apoptosis in human colon cancer DLD-1 cells. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 13: 6064-6069.
- Matsumoto K., Akao Y., Yi H., Ohguchi K., Ito Tetsuro, Tanaka T., Kobayashi E., Iinuma M. & Nozawa Y. 2004. Preferential target is mitochondria in α -mangostin-induced apoptosis in human leukemia HL60 cells. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 12: 5799-5806.
- Mizushima, Y., Kuriyama, I., Nakahara, T., Kawashima, Y. & Yoshida, H. 2013. Inhibitory effects of α -mangostin on mammalian DNA polymerase, topoisomerase, and human cancer cell proliferation. *Food and Chemical Toxicology*. 59: 793-800.

- Morton J. 1987. Mangosteen. From: Fruits of warm climates. 301-304. Edited by: Julia F. Morton. Miami, FL.
- OMS. World Health Organization. Media Centre. Cancer. Fact sheet N° 297. Updated November 2014 (Consultado en enero 2015 en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>).
- Palacio-Mejía L. S., Lazcano-Ponce E., Allen-Leigh B. & Hernández-Ávila M. 2009. Diferencias regionales en la mortalidad por cáncer de mama y cérvix en México entre 1979 y 2006. *Salud Pública Méx.* 2009; 51 (2): 208-219.
- Pedraza-Chaverri J., Cárdenas-Rodríguez N., Orozco-Ibarra M. & Pérez-Rojas J. M. 2008. Medicinal properties of mangosteen (*Garcinia mangostana*). *Food and Chemical Toxicology.* 46: 3227-3239.
- Pérez-Rojas J., Cruz C., García-López P., Sánchez-González D., Martínez-Martínez C., Ceballos G., Espinosa M., Meléndez-Zajgla J. & Pedraza-Chaverri J. 2009. Renoprotection by α -mangostin is related to the attenuation in renal oxidative/nitrosative stress induced by cisplatin nephrotoxicity. *Free Radic Res.* 43: 1122-1132.
- Popat K., McQueen K. & Freeley T. W. 2013. The global burden of cancer. *Best Practice & Research clinical Anaesthesiology.* 27: 399-408.
- Ramón-López, A., Escudero-Ortiz, V., Carbonell, V., Pérez-Ruixo, J. & Valenzuela, B. 2012. Farmacocinética poblacional de cisplatino aplicada a la personalización de su dosificación en pacientes oncológicos. *Farmacia Hospitalaria.* 36(5): 392-402.
- Raynolds C. P. & Maurer B. J. 2005. Evaluating Response to Antineoplastic Drug Combinations in Tissue Culture Models. From: *Methods in Molecular Medicine.* 110: 173-183. Edited by: R. D. Blumenthal Humana Press Inc., Totowa, NJ.
- Sloan E.W. 2010. Getting ahead of curve: Phytochemicals. *Nutraceutical World.* 13: 16-17.

- Tallarida R. J., Midic U., Lamarre N. S. & Obradovic Z. 2012. Searching for Synergism Among Combinations of Drugs of Abuse and the Use of Isobolographic Analysis.
- Ting-Chao C. 2010. Drug Combination Studies and Their Synergy Quantification Using the Chou-Talalay Method. *Cancer Research*. 70: 440-446.
- Tiseo M. & Ardizzoni A. 2007. Cisplatin or carboplatin in the treatment of non-small cell lung cancer: a comprehensive review. *Oncology Reviews*. 1: 162-169.
- Young-Joon S. 2003. Cancer Chemoprevention with dietary phytochemicals. *Nature Reviews*. 3:768-780.
- Yu L., Zhao M., Yang B., Zhao Q. & Jiang Y. 2007. Phenolics from hull of *Garcinia mangostana* fruit and their antioxidant activities. *Food Chemistry*. 104: 176-181.