



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**“MECANISMOS MOLECULARES DE ALFA MANGOSTINA  
EN COMBINACIÓN CON CISPLATINO EN TUMORES DE  
CÁNCER CÉRVICO-UTERINO”.**

**TESIS**

**PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

**QUÍMICA DE ALIMENTOS**

**PRESENTA:**

**MIRIAM ABIGAIL ROJAS ALARCÓN**



**CD. MÉXICO**

**AÑO 2017**



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: FRANCISCO JAVIER PLASENCIA DE LA PARRA**

**VOCAL: JOSÉ PEDRAZA CHAVERRI**

**SECRETARIO: JAZMÍN MARLEN PÉREZ ROJAS**

**1er. SUPLENTE: CLAUDIA TERESA TOVAR PALACIO**

**2° SUPLENTE: SARA MARGARITA GARZA AGUILAR**

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

**INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGÍA. TORRE DE INVESTIGACIÓN,  
LABORATORIO DE FARMACOLOGÍA, AV. SAN FERNANDO No. 22, COL.  
SECCIÓN XVI DELEGACIÓN TLALPAN, C.P. 14080, CDMX**

**LOS RESULTADOS FUERON PARCIALMENTE MOSTRADOS EN EL VI  
CONGRESO DE LA RAMA DE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO EN BIOLOGÍA  
Y MEDICINA DE LA SOCIEDAD MEXICANA DE BIOQUÍMICA 2017 EN ATLIXCO,  
PUEBLA. Y EN LA 4ª REUNIÓN ANUAL DEL COLEGIO MEXICANO PARA LA  
INVESTIGACIÓN DEL CÁNCER 2017 EN PUEBLA, MÉXICO.**

**ASESOR DEL TEMA:**

**JAZMIN MARLEN PÉREZ ROJAS**

---

**SUSTENTANTE:**

**MIRIAM ABIGAIL ROJAS ALARCÓN**

---

## ÍNDICE

<b>ÍNDICE DE GRÁFICOS, FIGURAS Y TABLAS</b>	<b>iii</b>
<b>ABREVIATURAS</b>	<b>iv</b>
<b>1. RESUMEN</b>	<b>1</b>
<b>2. ANTECEDENTES</b>	<b>3</b>
<b>2.1 CÁNCER</b>	<b>3</b>
<b>2.2 CÁNCER CÉRVICO-UTERINO</b>	<b>4</b>
<b>2.3 TRATAMIENTO</b>	<b>9</b>
2.3.1 CISPLATINO	9
<b>2.4 MANGOSTÁN</b>	<b>13</b>
2.4.1 CARACTERÍSTICAS BOTÁNICAS	13
2.4.2 COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL FRUTO DEL MANGOSTÁN	14
2.4.3 USOS DEL MANGOSTÁN	16
<b>2.5 ALFA-MANGOSTINA</b>	<b>16</b>
<b>2.6 ACTIVIDAD ANTICANCERÍGENA DE <math>\alpha</math>-M</b>	<b>17</b>
2.6.1 APOPTOSIS	17
2.6.2 VÍA INTRÍNSECA	18
6.2.2.1 FAMILIA DE PROTEÍNAS Bcl2	20
6.2.2.1.1 MIEMBROS “ANTI-APOPTÓTICOS”	20
6.2.2.1.2 MIEMBROS “PRO-APOPTÓTICOS”	20
6.2.2.1.3 MIEMBROS “sólo BH3”	21
2.6.3 ALFA-MANGOSTINA Y CÁNCER	21
<b>2.7 ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE</b>	<b>23</b>
2.7.1 SUPERÓXIDO DISMUTASA	24
2.7.2 CATALASA	24
2.7.3 GLUTATIÓN PEROXIDASA	25
<b>3. JUSTIFICACIÓN</b>	<b>26</b>

<b>4. HIPÓTESIS</b>	<b>27</b>
<b>5. OBJETIVOS</b>	<b>27</b>
<b>5.1 OBJETIVO GENERAL</b>	<b>27</b>
<b>5.2 OBJETIVOS PARTICULARES</b>	<b>27</b>
<b>6. METODOLOGÍA</b>	<b>28</b>
<b>6.1 MATERIAL BIOLÓGICO</b>	<b>28</b>
<b>6.2 DESARROLLO EXPERIMENTAL</b>	<b>28</b>
6.2.1 EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS	28
6.2.2 CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS	29
6.2.3 WESTERN BLOT	29
6.2.4 AISLAMIENTO DE ÁCIDO RIBONUCLEICO	30
6.2.5 CUANTIFICACIÓN E INTEGRIDAD DEL RNA	30
6.2.6 TRANSCRIPTASA REVERSA (TR)	32
6.2.7 AMPLIFICACIÓN POR REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR) EN TIEMPO REAL	32
6.2.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	33
<b>7. RESULTADOS</b>	<b>34</b>
<b>7.1 PROTEÍNAS DE LA VÍA APOPTÓTICA</b>	<b>34</b>
<b>7.2 PROTEÍNAS ANTIOXIDANTES</b>	<b>36</b>
<b>7.3 CUANTIFICACIÓN E INTEGRIDAD DEL RNA</b>	<b>38</b>
<b>7.4 EXPRESIÓN GÉNICA DE PROTEÍNAS ANTIOXIDANTES</b>	<b>40</b>
<b>8. DISCUSIÓN</b>	<b>42</b>
<b>9. CONCLUSIÓN</b>	<b>44</b>
<b>10. ANEXO I</b>	<b>45</b>
<b>11. REFERENCIAS</b>	<b>47</b>

## ÍNDICE DE GRÁFICOS, FIGURAS Y TABLAS

<i>Figura 1. Desarrollo del cáncer.</i>	3
<i>Figura 2. Anatomía del aparato reproductor femenino.</i>	5
<i>Figura 3. Estimación de la tasa de incidencia de CaCu, estandarizado por edad a nivel mundial.</i>	7
<i>Figura 4. Ilustración anatómica de los estadios de CaCu.</i>	8
<i>Figura 5. Estructura química del CDDP.</i>	10
<i>Figura 6. Modos de acción de cisplatino.</i>	11
<i>Figura 7. Maduración organoléptica del mangostán.</i>	14
<i>Figura 8. Estructura química de las principales xantonas aisladas del mangostán.</i>	16
<i>Figura 9. Activación apoptótica a través de la vía intrínseca.</i>	19
<i>Figura 10. Análisis de RNA realizado con el sistema Agilent 2200 TapeStation.</i>	31
<i>Reacción 1. Reducción univalente del oxígeno.</i>	24
<i>Reacción 2. Reducción del radical anión superóxido.</i>	24
<i>Reacción 3. Reducción del peróxido de hidrógeno por catalasa (CAT).</i>	25
<i>Reacción 4. Reducción de peróxidos por glutatión peroxidasa (GPx).</i>	25
<i>Tabla 1 Incidencia, mortalidad y prevalencia (5 años) de 10 principales tipos de cáncer en mujeres a nivel mundial.</i>	4
<i>Tabla 2 Estimación de incidencia y muerte en mujeres mexicanas de todas las edades.</i>	7
<i>Tabla 3 Valor nutrimental del fruto del mangostán.</i>	15
<i>Tabla 4. Actividad anticancerígena de <math>\alpha</math>-M in vitro e in vivo.</i>	22
<i>Tabla 5. Secuencia de primers.</i>	28
<i>Tabla 6. Concentración de RNA (ng/<math>\mu</math>L) y pureza.</i>	38
<i>Gráfico 1. El tratamiento de la combinación de <math>\alpha</math>-M+CDDP modifica la vía apoptótica en tumores de cáncer de cérvix.</i>	35
<i>Gráfico 2. Efecto de <math>\alpha</math>-M, CDDP y la combinación en los niveles de las proteínas antioxidantes en tumores de CaCu.</i>	37
<i>Gráfico 3. Valor de RIN que muestra la integridad de cada RNA extraído por la técnica de trizol.</i>	39
<i>Gráfico 4. Efecto de <math>\alpha</math>-M, CDDP y la combinación en la expresión de RNA de proteínas antioxidantes.</i>	41
<i>Gráfico 5. Curva melt.</i>	46

## ABREVIATURAS

°C	Grados Celsius.
•OH	Radical hidroxilo.
α-M	Alfa-Mangostina.
ACS	American Cancer Society.
AIF	Factor inductor de apoptosis.
AMPK	Proteína quinasa activada por adenosin monofosfato.
ANOVA	Análisis de varianza.
Apaf-1	Factor 1 activador de la proteasa apoptótica.
ARN	Ácido ribonucleico.
ATM	Ataxia telangiectasia mutada.
ATP	Adenosin trifosfato.
ATR	Proteína relacionada con RAD3.
Bax	Proteína X asociada a Bcl2.
Bcl2	Proteína 2 del linfoma de células B.
BSA	Albúmina de Suero Bovino.
CaCu	Cáncer cérvico-uterino.
Caspasa	ácido aspártico cisteinil proteasa.
CAD	DNasa activada por caspasa.
CAT	Catalasa.
CDDP	Cis-diaminodicloroplatino II o cisplatino.
CHEK 1	Punto de control cinasa 1.
DDR	Respuesta al daño del DNA.
DNA	Ácido desoxirribonucleico.
DNasa I	Deoxiribonucleasa I.
dNTPs	Desoxinucleótidos trifosfato.
DSB	Rupturas de DNA de cadena sencilla y doble.
DTT	Ditiotreitol.
EROs	Especies reactivas de oxígeno.
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación.
FIGO	Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia.

GPC	Guía de Práctica Clínica.
GPx	Glutación peroxidasa.
GSH	Glutación reducido.
GSSG	Glutación oxidado.
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrógeno.
HPRT1	Hipoxantina fosforribosiltransferasa 1.
IAP	Inhibidores de las proteínas de apoptosis.
IARC	Agencia Internacional para la Investigación del cáncer.
IMSS	Instituto Mexicano del Seguro Social.
MAPK	Proteína quinasas activadas por mitógenos.
mM	Mili-Molar.
MOMP	Permeabilización de la membrana externa mitocondrial.
NO	Óxido nítrico.
NOM	Norma Oficial Mexicana.
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Radical anión superóxido.
OMS	Organización Mundial de la Salud.
PB	Pares de bases.
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa.
PMM	Potencial de membrana mitocondrial.
PVDF	Fluoruro de polivinilideno.
RIN	Número de integridad de RNA.
RNA	Ácido ribonucleico.
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio.
Smac	Segundo activador de caspasa derivado de la mitocondria.
SOD	Superóxido Dismutasa.
TBS-T	Amortiguador de tris-solución salina y tween-20.
TNM	Tumor, Nódulo linfático y Metástasis.
TR	Transcriptasa reversa.
V	Volts.
VPH	Virus del papiloma humano.



## 1. RESUMEN

El cáncer cérvico-uterino (CaCu) es una alteración celular originada en el epitelio del cuello uterino, que se manifiesta inicialmente a través de lesiones intraepiteliales precursoras de alto y bajo grado con un avance lento y progresivo hacia cáncer invasor. En México, a pesar de las estrategias preventivas, esta neoplasia, continúa siendo la segunda causa de muerte en mujeres. El tratamiento de primera línea para el CaCu es la quimioterapia a base de platino como cisplatino (CDDP). Sin embargo, este ocasiona serios efectos secundarios como: cardiotoxicidad, hepatotoxicidad, neurotoxicidad y principalmente la nefrotoxicidad y la quimioresistencia. La Alfa-mangostina ( $\alpha$ -M) es una xantona derivada del extracto etanólico del pericarpio de *Garcinia mangostana* Linn. A este compuesto se le han atribuido propiedades antioxidantes, anti-inflamatorias y anticarcinógenas, entre otras. Previamente se demostró que  $\alpha$ -M aumenta la citotoxicidad de CDDP en células tumorales y con poco efecto sobre el tejido renal; este efecto se relacionó con el aumento de las especies reactivas de oxígeno (EROs), la apoptosis, y la modificación en el ciclo celular.

El objetivo de este trabajo fue determinar si el mecanismo que opera es a través del incremento de proteínas pro-apoptóticas y disminución de proteínas antioxidantes, se utilizaron tumores de ratones hembras atímicos, a los cuales se les desarrolló un xenotransplante donde se formaron 4 grupos, control,  $\alpha$ -M, CDDP y la combinación de  $\alpha$ -M+CDDP. Los tumores se homogenizaron para la extracción y cuantificación de proteínas por la técnica de Bradford, los niveles de proteínas se determinaron por la técnica de Western blot con electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) al 12%, se utilizó actina como proteína de carga. Se midieron las proteínas apoptóticas proteína 2 del linfoma de células B (Bcl2), proteína X asociada a Bcl2 (Bax), y pro-ácido aspártico cisteinil proteasa (caspasa)-3, así como las proteínas antioxidantes catalasa (CAT), superóxido dismutasa (SOD) y glutatión peroxidasa (GPx). También se estudiaron los niveles de transcripción de estas proteínas antioxidantes por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando como gen endógeno Hipoxantina fosforribosiltransferasa 1 (HPRT1).

Se observó una importante participación de la vía apoptótica en el tratamiento de la combinación de  $\alpha$ -M+CDDP, donde se observa un aumento de Bax, una disminución de Bcl2, así como el aumento indirecto de caspasa-3.

También se observó la participación de la vía antioxidante, donde se encontró una disminución en los niveles de CAT y un aumento significativo en los niveles de SOD y GPx, en los tumores de los ratones tratados con la combinación  $\alpha$ -M+CDDP, estos resultados no correlacionaron con los niveles génicos, por lo que no se observó una relación entre la expresión génica y los niveles de proteína.

En este trabajo se concluye que la disminución del tamaño tumoral en los ratones tratados con la combinación de  $\alpha$ -M+CDDP interviene en la síntesis de proteínas de la vía intrínseca de la apoptosis y de las enzimas antioxidantes, sin presentar una relación en la expresión génica de las enzimas antioxidantes, lo que potencia el efecto del CDDP.

A futuro se quiere estudiar la participación de las vías de señalización que participan en la resistencia a fármacos como la familia MDR1/ABCB1, vías de supervivencia celular y proliferación como PI3K/AKT y las proteína quinasa activadas por mitógenos (MAPK).

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 CÁNCER

El cáncer es un término genérico que se utiliza para designar múltiples enfermedades. Es un trastorno caracterizado por un desequilibrio entre la proliferación celular y los mecanismos normales de muerte celular, siendo así un proceso de crecimiento y diseminación incontrolada de las células, capaces de invadir y destruir los tejidos adyacentes, así como diseminarse hacia órganos distantes deteriorando su función (metástasis) (Granados-García *et al.*, 2016; Organización mundial de la salud, OMS, 2017b).

El cáncer inicia con la transformación de una sola célula (Figura 1), que puede ser originada por factores externos y factores genéticos. Dentro de los factores externos se encuentra el índice de masa corporal elevado, la deficiencia en el consumo de frutas y verduras, la falta de actividad física, consumo de tabaco y alcohol, e infecciones causadas por virus como el de la hepatitis B y C, y el virus del papiloma humano (VPH), etc (OMS, 2017a).

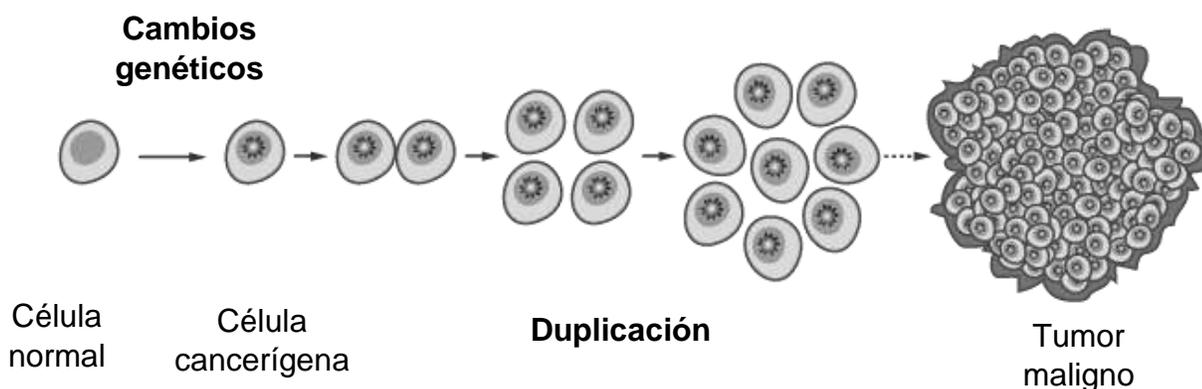


Figura 1. Desarrollo del cáncer. Fuente: Canadian Cancer Society (CCS) (2017).

El cáncer es una de las principales causas de muerte en el mundo. De acuerdo con la Agencia Internacional para la Investigación del cáncer (IARC, *International Agency for Research on Cancer*) las neoplasias que causan un mayor número de incidencia y muerte en mujeres a nivel mundial son: el cáncer de mama, el colorrectal, el de pulmón, el cáncer

cérvico-uterino (CaCu), y el de estómago (Tabla 1). Donde el cáncer de mama, el colorrectal y el CaCu encabezan la lista de prevalencia a 5 años (IARC, 2012).

*Tabla 1. Incidencia, mortalidad y prevalencia (5 años) de 10 principales tipos de cáncer en mujeres a nivel mundial.*

Tipo de cáncer	Número de casos		
	Incidencia	Mortalidad	Prevalencia (5 años)
Mama	1 671 149	521 907	6 232 108
Colorrectal	614 304	320 294	1 590 151
Pulmón	583 100	491 223	626 382
Cérvico-uterino	527 624	265 672	1 547 161
Estómago	320 301	254 103	507 340
Útero	319 605	76 160	1 216 504
Ovario	238 719	151 917	586 624
Tiroides	229 923	27145	934 805
Hígado	228 082	224 492	179 825
Linfoma no Hodgkin	168 098	84 266	369 475

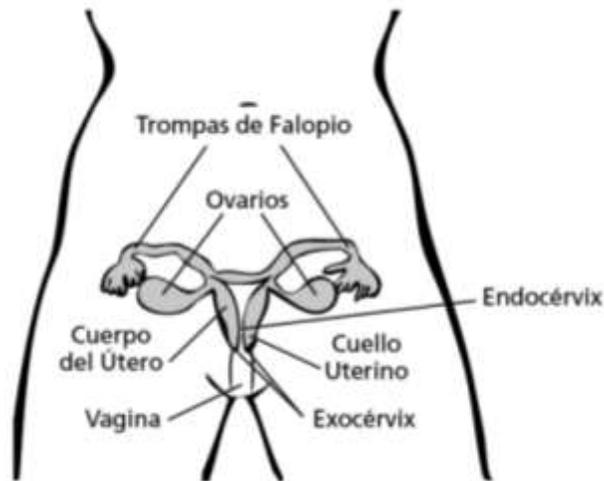
Fuente: IARC (2012).

## 2.2 CÁNCER CÉRVICO-UTERINO

El cuello uterino es la parte fibromuscular inferior del útero. El tamaño y forma del cuello uterino varía según la edad, número de partos y el ciclo hormonal de la mujer. El cuello uterino conecta el cuerpo del útero con la vagina, la parte del cuello uterino más cercana al cuerpo del útero se llama *endocérvix* y la parte próxima a la vagina, es el *exocérvix* (o *ectocérvix*) (Figura 2) (American Cancer Society, ACS, 2016).

El endocérvix está cubierto por epitelio cilíndrico o glandular (una sola capa). El exocervix presenta dos labios: anterior y posterior, estas estructuras se delimitan por el orificio cervical externo recubierto por epitelio escamoso estratificado no queratinizante (lo constituyen cuatro capas). La zona de transformación es donde el epitelio glandular ha sido o está siendo reemplazado con el nuevo epitelio escamoso metaplásico, este fenómeno es considerado normal, sin embargo, cuando se presentan lesiones

intraepiteliales o cambios displásicos se observa signos de carcinogénesis cervical. Es por ello que la Guía de Práctica Clínica (GPC) S-146-08 del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) define CaCu como una alteración celular originada en el epitelio del cuello uterino, manifestándose inicialmente, a través de lesiones intraepiteliales precursoras de bajo y alto grado, de avance lento y progresivo hacia cáncer invasor (cuando la lesión traspasa la membrana basal) (Secretaría de Salud, 2011).



*Figura 2. Anatomía del aparato reproductor femenino. Los órganos del aparato reproductor femenino incluyen las trompas de Falopio, Los ovarios, el cuerpo del útero, el cuello uterino y la vagina. Fuente: ACS (2016).*

Los dos tipos más comunes de CaCu son el *carcinoma de células escamosas* y el *adenocarcinoma*. Donde el carcinoma escamoso es el de mayor incidencia dentro de este tipo de neoplasia y el adenocarcinoma solo se presenta en un 10% de la población, pero es el más agresivo (Sellors y Sankaranarayanan, 2003; Gómez-Fernández, 2007; Tatti, 2008; ACS, 2016).

La presencia del VPH es la principal causa que desencadena el CaCu. El VPH es un virus de ácido desoxirribonucleico (DNA, por sus siglas en inglés) circular de doble cadena de casi 8 000 pares de bases (PB) y pertenece a la familia Papilloma viridae, pertenece al grupo 1 de la clasificación de Baltimore (Baltimore, 1971). Hay más de 150 genotipos, de estos, 15 causan CaCu. El VPH que afecta el tracto genital inferior se deriva

de cinco especies: alfa 5 (VPH Tipos 26,51, 69, 82), alfa 6 (VPH Tipos 53, 30, 56), alfa 7 (VPH Tipos 18, 39, 45, 59, 68, 70), alfa 9 (VPH Tipos 16, 31, 33, 35, 52, 58, 67) y alfa 10 (VPH Tipos 6,11, 13, 44, 74). Los tipos de VPH más frecuentes asociados con displasias de alto grado en todo el mundo son los tipos 16 y 18 que infectan al epitelio cercano a la zona de transformación del cuello uterino (Carter *et al.*, 2011; Seiden, 2012). La muerte celular programada en la infección por VPH, es interferida a través de p53 por el oncogen E6 por el bloqueo del ciclo celular inducido por el inhibidor de la cinasa dependiente de la ciclina p21 y por Bax. Se sabe que p53 es inactivada por la oncoproteína supresora del VPH E6, la cual se une a la proteína p53, y promueve su degradación, por lo que su función se altera durante la infección con VPH de alto riesgo, sin que se produzca una verdadera mutación del gen (Uchiyama *et al.*, 1997). Las proteínas E6 y E7 del VPH, son importantes por sus propiedades oncogénicas ya que tienen la capacidad de inmortalizar y transformar las células del cuello uterino y por otra parte mantendrán el ambiente celular para que el genoma viral pueda subsistir mientras no se encuentre incorporado en los cromosomas (García-Tamayo *et al.*, 2009). Las infecciones por el VPH en mujeres son asintomáticas, las lesiones pre neoplásicas pueden identificarse después de 20 años, sin embargo en algunas mujeres puede presentarse entre 5 y 10 años, esto depende de los factores de riesgo como son: la iniciación sexual a edad temprana, el número de parejas sexuales y las relaciones con parejas sexuales promiscuas, mala alimentación, el consumo de tabaco y alcohol, entre otras (Einstein *et al.*, 2001; ACS, 2016).

Esta neoplasia es la cuarta más frecuente a nivel mundial en mujeres en países en vías de desarrollo. El CaCu causa más de 266 000 defunciones anuales, donde el 87% es en países subdesarrollados. La incidencia de CaCu es en particular alta en mujeres que viven en América Central, Sudamérica, el Caribe y sur y este de África (Figura 3). La tendencia de la mortalidad es descendente debido a una menor incidencia de la enfermedad por la mejora en las condiciones sociales y la respuesta de los sistemas de salud, sin embargo, en México el CaCu continúa siendo la segunda causa de muerte por cáncer en la mujer (Seiden, 2012; Secretaría de Salud, 2015).

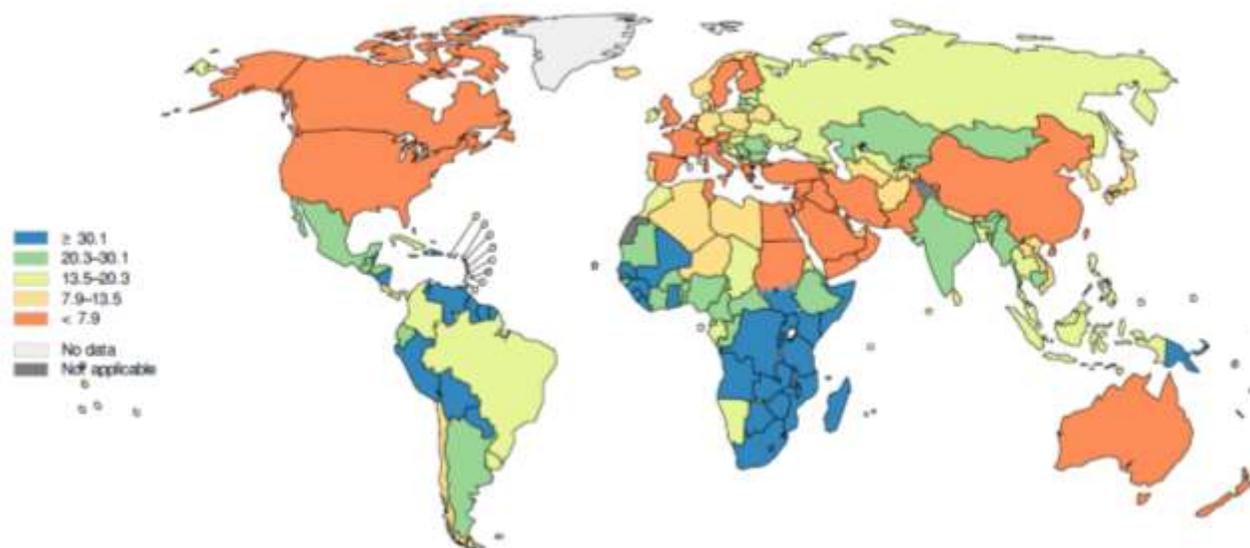


Figura 3. Estimación de la tasa de incidencia de CaCu, estandarizado por edad a nivel mundial.

Fuente: IARC (2012).

En nuestro país se estima una incidencia de 13 960 casos (Tabla 2). En el año 2012, se registraron 3 771 defunciones en mujeres de 25 años, mientras que para mujeres mayores de 25 años se registraron 4 056 defunciones con una tasa de mortalidad de 11.9 defunciones por cada 100 000 mujeres. Los datos anteriores nos señalan que, a pesar de los avances de los programas de detección temprana y prevención establecidos por la secretaría de salud, la mortalidad en este tipo de neoplasia continúa situándose dentro de las primeras posiciones tanto en nuestro país como a nivel mundial (Secretaría de salud, 2015; Instituto Nacional de las Mujeres, 2015).

Tabla 2. Estimación de incidencia y muerte en mujeres mexicanas de todas las edades.

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

Fuente: IARC, (2012).

La clasificación del CaCu se basa en dos sistemas: el sistema tumor, nódulo linfático y metástasis (TNM) del Comité Estadounidense Conjunto sobre el cáncer y la Federación

Internacional de Ginecología y Obstetricia (FIGO), ambos se basan en el tamaño del tumor, su localización, el tipo de células (adenocarcinoma o carcinoma de células escamosas), la diseminación a ganglios linfáticos cercanos, la diseminación fuera del sistema reproductor femenino para estadificar la neoplasia y el grado del tumor.

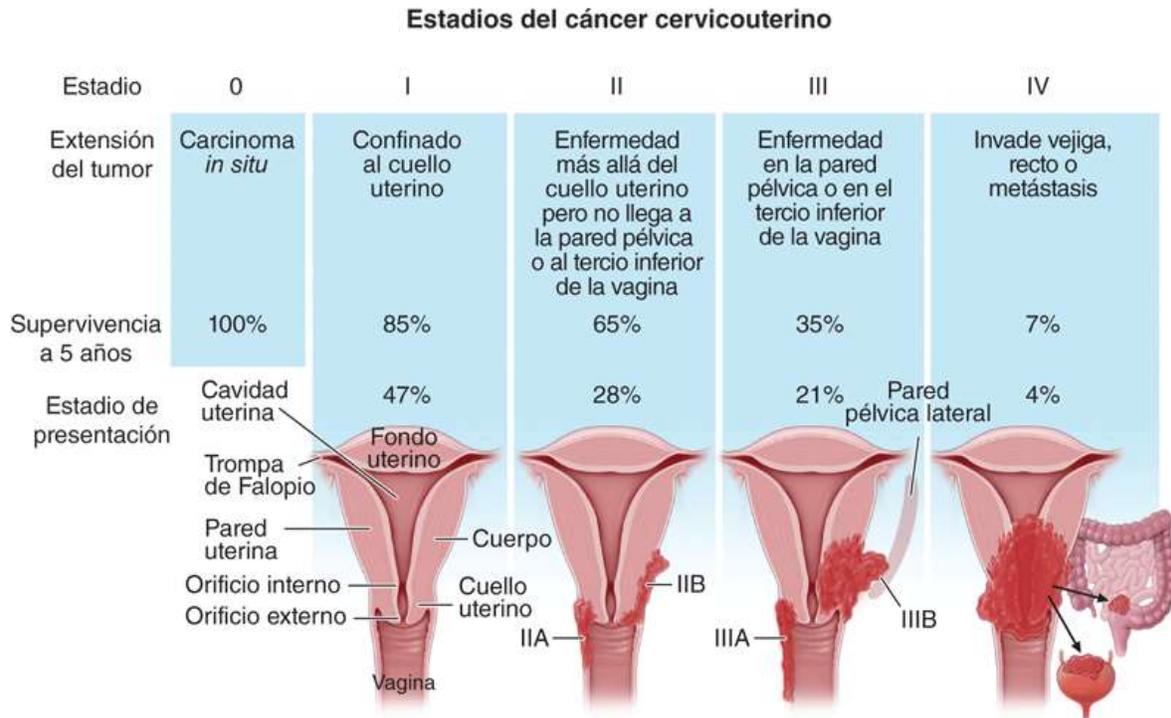


Figura 4. Ilustración anatómica de los estadios de CaCu definido por localización, extensión del tumor, frecuencia de presentación y supervivencia. Fuente: Seiden (2012).

La estadificación del CaCu como se muestra en la figura 4, depende de los hallazgos patológicos. En el estadio 0 es Carcinoma *in situ* primario, para el estadio I el cáncer está estrictamente confinado al cérvix, la extensión del cuerpo debe ser descartada, está dividido en estadio IA donde el carcinoma invasivo puede ser diagnosticado sólo por microscopía y IB donde todas las lesiones son macroscópicamente visibles aproximadamente de 4 cm. En el estadio II el tumor invade más allá del útero, pero no alcanza la pared pélvica o al tercio inferior de la vagina, se divide en IIA donde no hay invasión parametrial y IIB con invasión parametrial obvia. El estadio III el tumor invade hasta la pared pélvica o el tercio inferior de la vagina, el estadio IIIA el tumor invade el tercio inferior de la vagina, no invade la pared pélvica y IIIB el tumor invade la pared pélvica que causa hidronefrosis o riñón no funcional. Finalmente el estadio IV el cáncer

se ha extendido más allá de la pelvis verdadera o infiltra la mucosa del recto y la vejiga, el estadio IVA es la invasión a órganos adyacentes y IVB metástasis a distancia (Secretaría de Salud, 2010).

## 2.3 TRATAMIENTO

El esquema de tratamiento empleado contra el CaCu depende del estadio en que se encuentra. Los principales tratamientos son la cirugía, la radioterapia y la quimioterapia y/o la combinación de ellos. De acuerdo a la Norma Oficial Mexicana (NOM)-014-SSA2-1994, menciona que en estadios tempranos (I y IIA) se recomienda un tratamiento conservador como la electrocirugía, la laserterapia, la crioterapia, la conicación con bisturí frío y la histerectomía parcial o total; mientras que para estadios avanzados se consideran tratamientos con radioterapia y quimioterapia (Secretaría de Salud, 2007).

En la radioterapia se utilizan rayos X o partículas de alta energía para destruir las células cancerosas, estas se pueden emplear sola o en combinación con la quimioterapia y/o la radiación interna o braquiterapia donde la fuente de radiación se coloca en la vagina o en el cuello uterino (ACS, 2016).

La quimioterapia consiste en la administración de fármacos vía intravenosa u oral, para la eliminación de células cancerosas. Debido a la elevada toxicidad de los fármacos anti-neoplásicos, la forma de administrarla es en ciclos (ACS, 2016).

### 2.3.1 CISPLATINO

El quimioterapéutico de primera línea utilizado para varios tipos de cáncer sólido, incluido el CaCu, es el cis-diaminodicloroplatino o cisplatino (CDDP) (Cohen y Lippard, 2001).

El CDDP es un compuesto de coordinación metálico con platino con una geometría planar cuadrada (Figura 5), es ligeramente soluble en agua y soluble en dimetilprimanida y N,N-dimetilformamida, tiene un peso molecular de 301,1 g/mol y una densidad de 3,74 g/cm<sup>3</sup> (Dasari y Tchounwou, 2014).

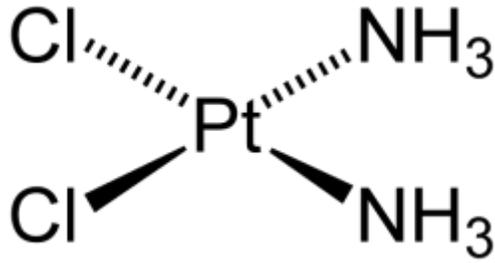


Figura 5. Estructura química del CDDP.

El mecanismo de acción del CDDP reportado es el siguiente: en el citoplasma los átomos de cloruro son desplazados por moléculas de agua, activándose así el CDDP dentro de la célula, los efectos antineoplásicos del CDDP han sido atribuidos a su capacidad de generar aductos con el nitrógeno 7 de las bases purinas del DNA (Galluzzi *et al.*, 2014), bloqueando el ciclo celular y activando la muerte celular por apoptosis o muerte celular programada. Por otra parte, el CDDP también aumenta la producción de especies reactivas de oxígeno (EROs) lo que daña a la mitocondria e induce apoptosis y la muerte de la célula (Ozben, 2007). Por lo tanto, parece haber múltiples mecanismos que subyacen al potencial citotóxico y antiproliferativo del cisplatino (Figura 6).

La principal vía de señalización que relaciona las lesiones de DNA inducidas por CDDP con la apoptosis consiste en la activación secuencial de la ataxia telangiectasia mutada (ATM) y la proteína relacionada con RAD3 (ATR, un sensor de daño en el DNA) y el punto de control cinasa 1 (CHEK1, el sustrato y río abajo efector de ATR), que a su vez fosforila la proteína de supresión del tumor TP53 en serina 20, lo que permite su estabilización. La TP53 activada ejerce funciones letales a través de mecanismos nucleares y citoplásmicos que finalmente conducen a la permeabilización mitocondrial de la membrana externa (MOMP) o al aumento de la señalización a través de receptores de muerte seguidos de muerte celular (Galluzzi *et al.*, 2011) En respuesta al cisplatino, CHEK1 además ha demostrado activar varias ramas del sistema de proteína quinasa activadas por mitógenos (MAPK), incluidas las mediadas por quinasas reguladas por señales extracelulares, cinasas N-terminales de c-JUN y proteínas quinasas activadas por estrés (Galluzzi *et al.*, 2012). El daño del DNA causado por CDDP activa las cascadas de respuesta al daño del DNA (DDR) que coordinan una interacción compleja de las vías

descendientes para determinar el destino celular, incluida la coordinación de la reparación del DNA, el ciclo celular y la apoptosis.

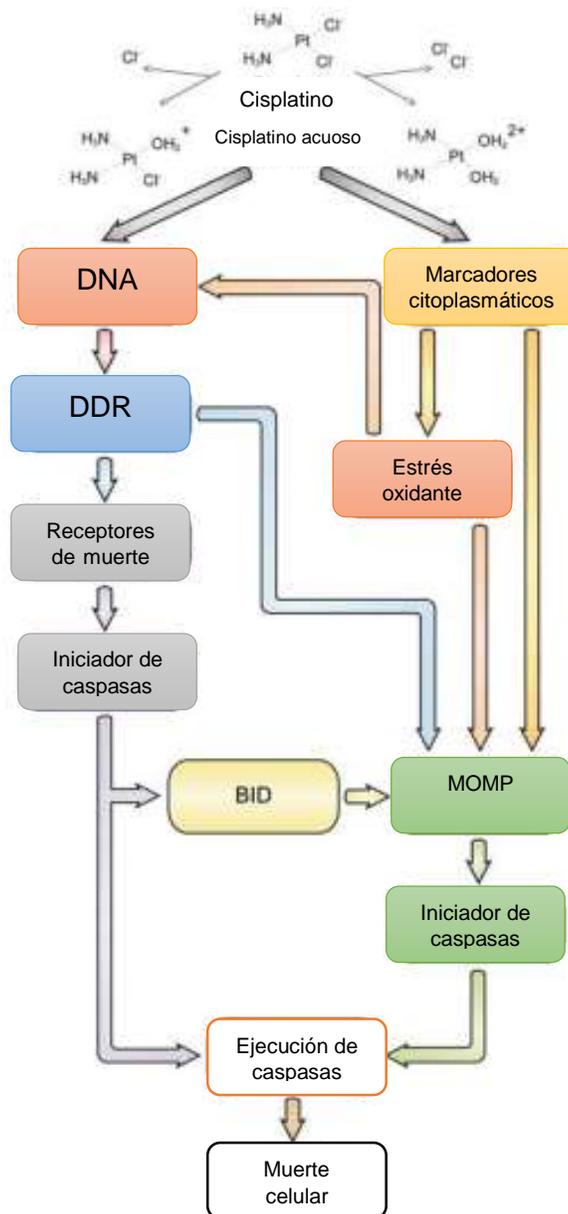


Figura 6. Modos de acción de cisplatino. El cisplatino intracelular se convierte rápidamente en agua y altamente reactivo. El cisplatino acuoso puede unir residuos de cisteína y metionina en proteínas y bases purinas de DNA. En el núcleo, esto conduce a la generación de aductos intercatenarios e intracatenarios que son reconocidos por la maquinaria sensible al daño del ADN. Si el grado de daño no se puede reparar, los aductos de cisplatino desencadenan la activación de una respuesta de daño al ADN (DDR) que con frecuencia implica la quinasa ATR, CHEK1 y CHEK2 y la proteína supresora del tumor TP53. A su vez, TP53 transactiva varios genes cuyos

*productos facilitan la permeabilización mitocondrial de la membrana externa (MOMP), desencadenando así la apoptosis intrínseca, así como genes que codifican componentes de la vía apoptótica extrínseca. MOMP (solo o con la contribución de las señales transducidas por el receptor de la muerte BID) desencadena la cascada de caspasas, así como múltiples mecanismos independientes de caspasa que finalmente sellan el destino de la célula. Varias otras vías de señalización vinculan el daño del DNA inducido por cisplatino a MOMP y muerte celular. En el citoplasma, la interacción entre cisplatino y GSH, metalotioneínas o proteínas mitocondriales como el VDAC resulta en el agotamiento de equivalentes reductores y/o sostiene directamente la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS). ROS puede desencadenar directamente MOMP o exacerbar el daño del DNA inducido por cisplatino, jugando así un papel doble en la citotoxicidad del cisplatino. Fuente: Galluzzi et al. (2012).*

La DDR se inicia en el sitio del daño del DNA por las proteínas quinasas tempranas (sensor): ATM ATR y DNA-PKcs. ATM está principalmente involucrado en la DDR a las rupturas de DNA de cadena sencilla y doble (DSB). Las DSB pueden caracterizarse por la detección de focos  $\gamma$ -H2Ax, que son los efectores río abajo de la ruta de DDR y se ha observado que se correlacionan directamente con el número de DSB y cuya persistencia se correlaciona con la supervivencia celular. La ATR es importante en la DDR para las rupturas de cadena única, que se cree que se desarrollan en el DNA dañado por CDDP a través del estrés de replicación. La función deteriorada de ATM o DNA-PKcs conduce a la radiosensibilización, mientras que la inhibición de ATR ha demostrado que sensibiliza algunas células al CDDP (Galluzzi *et al.*, 2012; Sears *et al.*, 2016).

A pesar de la alta eficacia del CDDP y su bajo costo, su uso es limitado debido a los severos efectos secundarios que presenta, tales como: cardiotoxicidad, daño hepático, daño neuronal, daño gastrointestinal y principalmente la nefrotoxicidad y la quimioresistencia (Molitoris y Finn, 2001; Pérez-Rojas *et al.*, 2009; Dasari y Tchounwou, 2014).

Por lo que actualmente se continúa con la búsqueda de nuevos compuestos, que solos o en combinación con este disminuya sus efectos secundarios sin afectar la toxicidad del antineoplásico. Dentro de estos compuestos está la alfa-mangostina ( $\alpha$ -M).

## 2.4 MANGOSTÁN

### 2.4.1 CARACTERÍSTICAS BOTÁNICAS

El mangostán (*Garcinia mangostana* Linn), pertenece a la familia Clusiaceae, es un árbol tropical del sureste de Asia que crece de 7 a 12 m de altura, su tronco es recto con una corona piramidal, su corteza es color marrón oscuro, por dentro su color es amarillo, de textura gomosa y latex amargo. Las hojas del árbol son de tallo corto, ovalados, oblongas o elípticas, gruesas, de color verde oscuro brillan por arriba y verde amarillo opaco por debajo, sus flores son de 4-5 cm de ancho, sus pétalos pueden ser de color verde amarillento bordeado de rojo o completamente rojos (Figura 7) (Morton, 1987).

La fruta se clasifica en climatéricas y no climatéricas, dependiendo del patrón respiratorio y producción de etileno durante la maduración organoléptica o de consumo. Las frutas climatéricas son las que incrementan su ritmo respiratorio y la producción de etileno lo que produce cambios en el color, sabor, aroma y textura, estos cambios son rápidos, intensos y variados, y se pueden presentar en la planta o después de ser cosechadas. Por el contrario, en las frutas no climatéricas, los procesos de desarrollo y maduración organoléptica son continuos y graduales; manteniendo éstas, en todo momento, hay niveles bajos de respiración y de producción de etileno, por lo que solo maduran para su consumo en la planta (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, FAO, 2007). El fruto del mangostán es un fruto no climatérico ya que debe madurar en el árbol pues no madurará después de la cosecha (Morton, 1987).

El fruto maduro del mangostán (Figura 7), es de color púrpura, puede o no contener semillas, tiene entre 6 a 8 segmentos triangulares de pulpa blanca, jugosa, suave, con un ligero sabor ácido, y es conocido como “La reina de las frutas” por sus propiedades sensoriales. Es cultivado principalmente en Tailandia, Malasia, Indonesia y Filipinas (Zhang *et al.*, 2017; Chin y Kinghorn, 2008; Morton, 1987).



Figura 7. Maduración organoléptica del mangostán. Fuente: Van Nooten (1863).

#### 2.4.2 COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL FRUTO DEL MANGOSTÁN

En la tabla 3 se muestra el análisis químico proximal de la fruta, donde se observa que la mayor parte del fruto está constituido por agua y carbohidratos, también contiene minerales como el hierro, que le atribuye propiedades para la reducción del anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) y el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) (Morton, 1987).

Los compuestos bioactivos conocidos como nutraceuticos, son aquellos compuestos no nutricionales contenidos en pequeñas cantidades, que son de origen vegetal y son vitales para el mantenimiento de la salud humana (Biesalski *et al.*, 2009; Patil *et al.*, 2009). A finales del siglo XX avances importantes sobre la composición de los alimentos para determinar actividades biológicas, contribuyó a la identificación de determinados componentes de la dieta (fitoquímicos) como factores potencialmente implicados en la prevención de procesos patológicos (Cárdenas *et al.*, 2014).

Tabla 3. Valor nutrimental del fruto del mangostán

(Por cada 100 g de porción comestible).

Calorías	60-63
Agua	80.2-84.9
Proteínas	0.50-0.60 g
Grasas	0.1-0.6 g
Carbohidratos	14.3-15.6 g
Azúcares totales (sacarosa, glucosa y fructosa)	16.42-16.82 g
Fibra	5.0-5.1 g
Ceniza	0.2-0.23 g
Calcio	0.01-8.0 mg
Fosforo	0.02-12.0 mg
Hierro	0.20-0.80 mg
Tiamina	0.03 mg
Ácido ascórbico	1.0 -2.0 mg

Fuente: Morton (1987).

El pericarpio del mangostán contiene una variedad de compuestos biológicamente activos como: xantonas, terpenos, antocianinas, taninos y fenoles (Shan *et al.*, 2011). Los principales compuestos bioactivos son las xantonas preniladas y oxigenadas (Figura 8), sin embargo se han derivado más de 68 compuestos tipo xantona (Pérez-Rojas *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2013; Shan *et al.*, 2011).

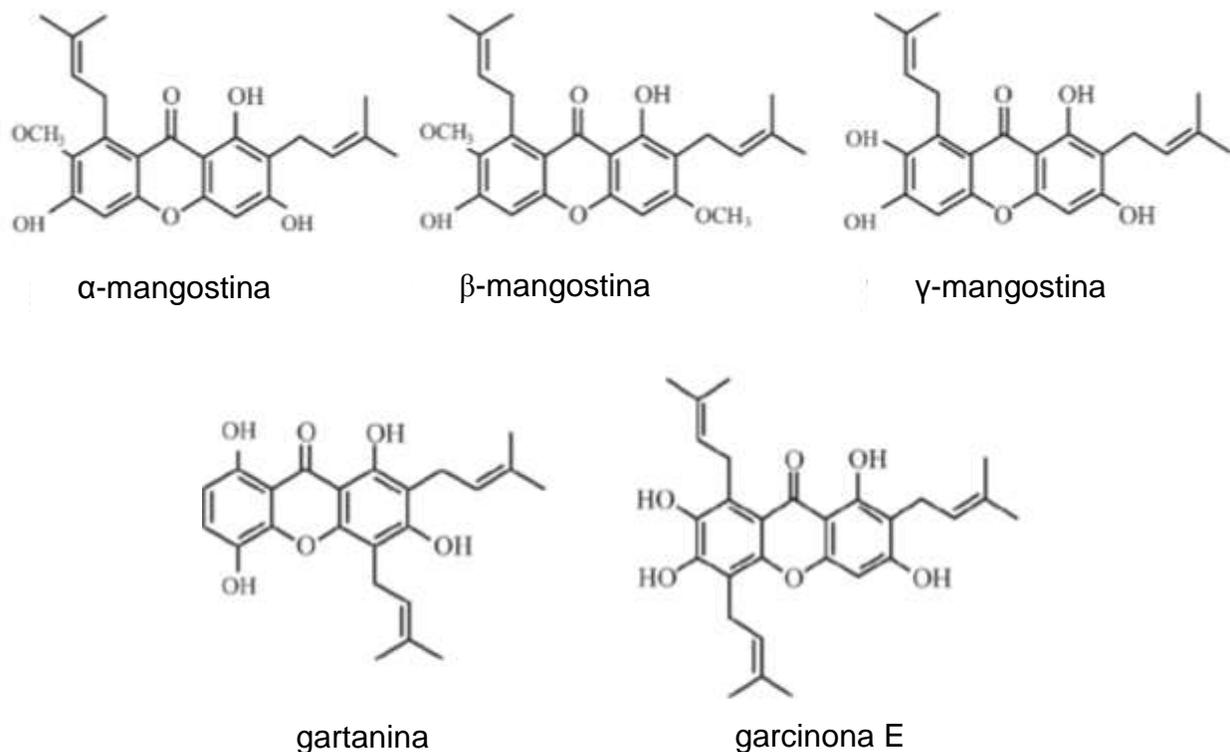


Figura 8. Estructura química de las principales xantonas aisladas del mangostán. Fuente: Shan *et al.* (2011).

### 2.4.3 USOS DEL MANGOSTÁN

Por varios años en el sureste de Asia, el pericarpio del mangostán se ha usado dentro de la medicina tradicional para el tratamiento infecciones de piel, úlceras, diarrea, amebiasis, inflamación y cicatrización de heridas (Farnsworth y Bunyapraphatsara, 1992; Pedraza-Chaverri *et al.*, 2008).

Diversos estudios han demostrado que estos compuestos poseen actividad: (a) antibacteriana (Chomnawang *et al.*, 2007), (b) fungicida (Gopalakrishnan *et al.*, 1997), (c) anti-inflamatorias (Shankaranaraya *et al.*, 1979), (d) antioxidantes (Pérez-Rojas *et al.*, 2009; Pedraza-Chaverri *et al.*, 2008), (e) neuroprotección (Weecharangsan *et al.*, 2006) y (f) anticancerígenas (Shan *et al.*, 2011).

### 2.5 ALFA-MANGOSTINA

La α-M es la xantona prenilada más abundante del mangostán (78%) y la más estudiada (Zhang *et al.*, 2017), se aisló por primera vez del pericarpio de la fruta por Schmid en

1855, pero fue hasta 1958 que Yates y Stout establecieron su estructura química (1,3,6-trihidroxi-7-metoxi-2,8-bis(3-metil-2-butenil)-9H-xanten-9-ona) tiene un peso molecular de 410.46 g/mol, es de color amarillo, es insoluble en agua, pero soluble en etanol, además, puede ser aislada de diversas partes del árbol del mangostán como la corteza y el latex (Jefferson *et al.*, 1970; Govindachart *et al.*, 1971; Mahabusarakam *et al.*, 2006). En diversos estudios se ha demostrado que esta molécula es uno de los fitoquímicos que presenta mayor actividad biológica como antioxidante, antiinfecciosa, anticancerígena y antidiabética; también posee propiedades neuroprotectoras, hepatoprotectoras, nefroprotectoras y cardioprotectoras (Sánchez- Pérez *et al.*, 2010; Ibrahim *et al.*, 2016). En este estudio nos basaremos en dos de sus propiedades: la anticancerígena y la antioxidante.

## 2.6 ACTIVIDAD ANTICANCERÍGENA DE $\alpha$ -M

En la actualidad se ha demostrado que el consumo de productos de origen natural tiene efectos benéficos para la salud (Ross-Watson y Preedy 2013; Griffiths *et al.*, 2016; Rauf *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2017). En los últimos años,  $\alpha$ -M ha demostrado inhibir el ciclo celular e inducir la apoptosis por la vía mitocondrial de varias líneas celulares de cáncer (Akao *et al.*, 2008; Alisha *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2013; Ibrahim *et al.*, 2014).

### 2.6.1 APOPTOSIS

La apoptosis es un proceso de muerte celular programada, caracterizado por su morfología como la disminución del volumen celular, condensación de cromatina, repliegues en la membrana plasmática, fragmentación de la cromatina, fragmentación del núcleo y formación de cuerpos apoptóticos (Savill y Fadok, 2000; Kurosaka *et al.*, 2003), y por ser un mecanismo bioquímico dependiente de energía, el cual puede ser desencadenado por dos vías principalmente: la vía intrínseca o mitocondrial y la vía extrínseca o muerte por receptores, sin embargo, existe una vía adicional que implica la citotoxicidad mediada por células T y la muerte por perforina-granzima dependiente de la célula. Esta vía puede inducir la apoptosis vía granzima B o granzima A. Las vías extrínseca, intrínseca y granzima B convergen en la misma vía terminal o de ejecución, que inicia por la escisión del ácido aspártico cisteinil proteasa (caspasa)-3 y da como resultado la fragmentación del DNA, la degradación de proteínas citoesqueléticas y

nucleares, la reticulación de proteínas, la formación de cuerpos apoptóticos, la expresión de ligandos para receptores de células fagocíticas y finalmente la captación por células fagocíticas. La vía de la granzima A activa una vía de muerte celular paralela, independiente de caspasa, a través de daño de DNA monocatenario (Elmore, 2007; Martinvalet *et al.*, 2005).

### 2.6.2 VÍA INTRÍNSECA

Esta vía implica estímulos iniciados en la mitocondria, estos estímulos producen cambios en la membrana mitocondrial que resulta en la MOMP, la pérdida del potencial de membrana mitocondrial (PMM) y la liberación de dos grupos de proteínas pro-apoptóticas, del espacio intermembranal al citosol (Figura 9) (Elmore, 2007).

El primer grupo de proteínas pro-apoptóticas activan la vía mitocondrial dependiente de caspasa y está conformado por el citocromo c, un componente de la cadena de transporte de electrones; el segundo activador de caspasa derivado de la mitocondria (Smac)/DIABLO y la serina proteasa mitocondrial HtrA2/Omi (Du *et al.*, 2000; Garrido *et al.*, 2006; Green y Reed, 1998).

Una vez liberado el citocromo c al citosol se une y activa al factor 1 activador de la proteasa apoptótica (Apaf-1, por sus siglas en inglés) aumentando la afinidad de ésta por adenosin trifosfato (ATP) así como procaspasa-9, formando un "apoptosoma" (Garrido, *et al.*, 2006). Dentro del apoptosoma se activa caspasa-9, permitiendo el proceso de caspasa 3 (Shi, 2002). Se ha informado que Smac/DIABLO y HtrA2/Omi promueven la apoptosis bloqueando la actividad de inhibidores de las proteínas de apoptosis (IAP) (van Loo *et al.*, 2002, Schimmer, 2004).

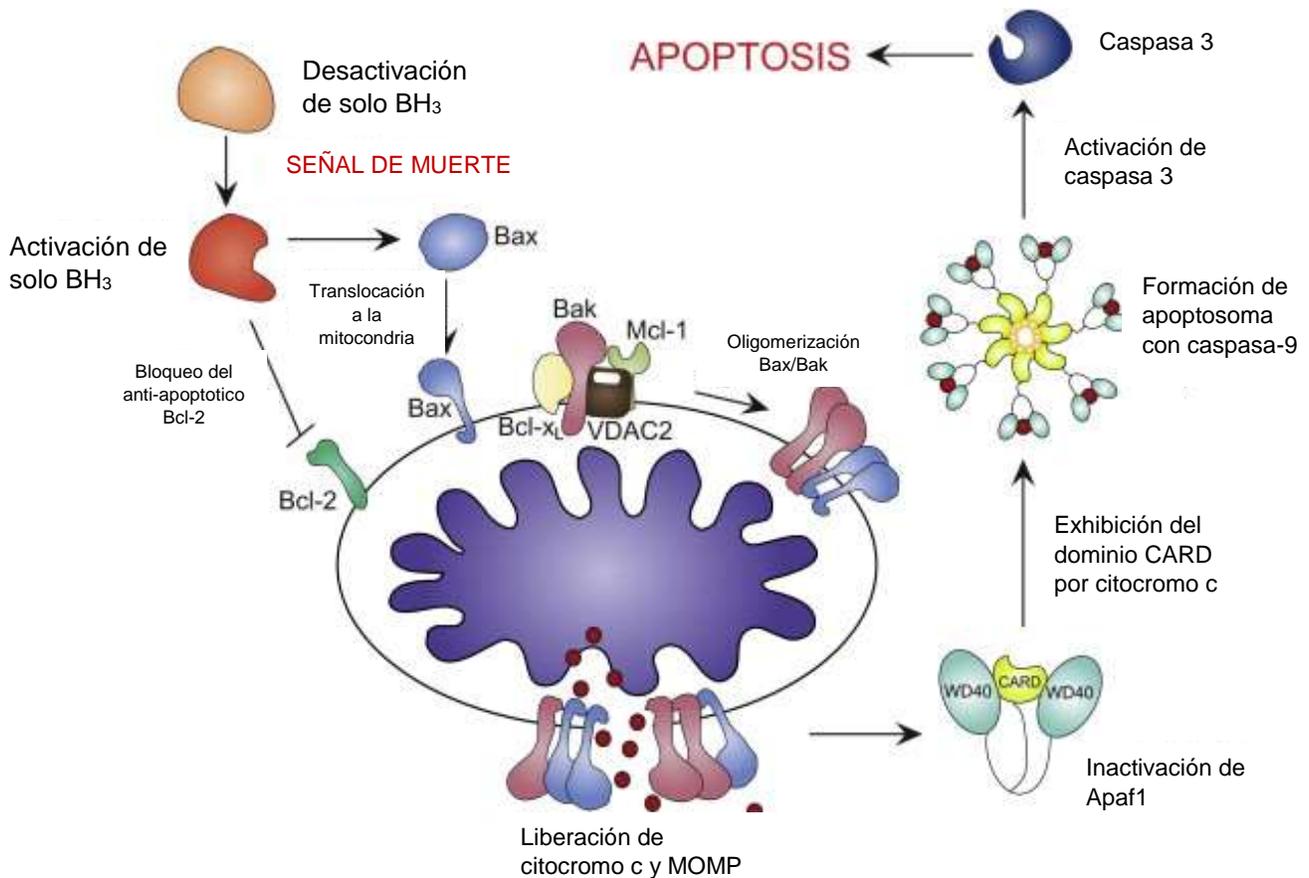


Figura 9. Activación apoptótica a través de la vía intrínseca. Los estímulos apoptóticos activan las proteínas de solo BH3, inactivando simultáneamente Bcl2 y activando la translocación de Bax a las mitocondrias. Fuente: Osellame et al. (2012).

El segundo grupo de proteínas pro-apoptóticas se liberan de la mitocondria durante la apoptosis, es un evento tardío que ocurre después de que la célula se ha comprometido a morir. Dentro de este grupo está el factor inductor de apoptosis (AIF, por sus siglas en inglés), el cual se transloca al núcleo y causa la fragmentación del DNA en pedazos y la condensación de la cromatina nuclear periférica (Joza et al., 2001); la endonucleasa G que también se trasloca al núcleo donde escinde la cromatina nuclear para producir fragmentos de DNA oligonucleosómicos (Li et al., 2001). AIF y la endonucleasa G funcionan ambas de una manera independiente de caspasa y al ser una condensación nuclear temprana se conoce como condensación de "etapa I" (Susin et al., 2000). Otra proteínas pro-apoptótica es la deoxiribonucleasa (DNasa) activada por caspasa (CAD) que es liberada posteriormente de la mitocondria y transloca al núcleo, donde, después de la escisión por caspasa-3, conduce a la fragmentación del DNA oligonucleosómico, a

esta posterior y más pronunciada condensación de cromatina se denomina condensación de "etapa II" (Susin *et al.*, 2000; Elmore, 2007).

#### 6.2.2.1 FAMILIA DE PROTEÍNAS Bcl2

El control y la regulación de estos eventos mitocondriales apoptóticos se produce a través de miembros de proteínas de la familia de proteína 2 del linfoma de células B (Bcl2) (Cory y Adams, 2002). La proteína supresora de tumores p53 tiene un papel crítico en la regulación de la familia Bcl2 (Schuler y Green, 2001). La familia de proteínas Bcl2 rige la permeabilidad de la membrana mitocondrial y puede ser pro-apoptótica o antiapoptótica. Hasta la fecha, se han identificado un total de 25 genes en la familia Bcl2, estas proteínas son esenciales, para determinar si la célula se compromete a la apoptosis o aborta el proceso. Se cree que el principal mecanismo de acción de la familia de proteínas Bcl2 es la regulación de la liberación del citocromo c a través de la alteración de la MOMP (Elmore, 2007). Los miembros de esta familia se caracteriza por tener alguno de los dominios de homología de Bcl2 conocidos como dominios BH (BH1, BH2, BH3 y BH4), debido a esto la familia se puede dividir en tres sub-familias (Bras *et al.*, 2005).

##### 6.2.2.1.1 MIEMBROS "ANTI-APOPTÓTICOS"

Las proteínas anti-apoptóticas incluyen Bcl2, Bcl-x, Bcl-XL, Bcl-XS, Bcl-w, BAG, Mcl-1 y Bfl-1, estas proteínas interfieren en la apoptosis mediante la unión de miembros pro-apoptóticos. Bcl2 fue el primer ejemplo de un oncogén que inhibe la muerte celular en lugar de promover la proliferación, fue descrito como un proto-oncogen que se activa como resultado de una translocación cromosómica que aparecen en linfomas foliculares humanos de células B, es por ello que se denomina Bcl2 (linfoma de células B), esta proteína se encuentra anclada en la membrana del retículo endoplasmático y en la membrana externa mitocondrial (Vaux *et al.*, 1988; Nijhawan *et al.*, 2000; Saikumar y Venkatachalam, 2009)

##### 6.2.2.1.2 MIEMBROS "PRO-APOPTÓTICOS"

Las proteínas pertenecientes a este grupo son: Bcl-10, proteína X asociada a Bcl2 (Bax), Bak, Bok, Bik y Blk. Estas proteínas ejercer función apoptótica mediante la MOMP, que produce la liberación de las proteínas pro-apoptóticas. La proteína Bax se encuentra localizada en el citosol en forma de monómero, tras su activación se desplaza a la

membrana mitocondrial donde induce la MOMP, por otro lado Bak es una proteína integrada en la membrana externa mitocondrial que se encuentra presente en forma de oligómeros (Garrido *et al.*, 2006).

#### 6.2.2.1.3 MIEMBROS “sólo BH3”

Esta subfamilia está conformada por Bid, BimL, Bad, Noxa, Bmf, Puma y HrK. Bad también puede heterodimerizar con Bcl-XI o Bcl2, neutralizando su efecto protector y promoviendo la muerte celular (Yang *et al.*, 1995), la proteína Puma juega un papel importante en la apoptosis mediada por p53. Se ha demostrado que, la sobreexpresión de Puma se acompaña de una mayor expresión de Bax, Noxa es también un mediador candidato de la apoptosis inducida por p53, esta proteína puede localizarse en la mitocondria e interactuar con miembros de la familia Bcl2 anti-apoptóticos, resultando en la activación de la caspasa-9 (Osellame *et al.*, 2012). Puesto que tanto Puma como Noxa son inducidos por p53, podría mediar la apoptosis que se produce por el daño genotóxico o la activación del oncogén (Elmore, 2007).

#### 2.6.3 ALFA-MANGOSTINA Y CÁNCER

En varios estudios tanto *in vitro* como *in vivo* (Tabla 4) ha usado  $\alpha$ -M como compuesto anticancerígeno. Los primeros efectos anticancerígenos fueron observados en varias líneas celulares de leucemia y se observó que a bajas concentraciones había inhibición o retardo de la proliferación celular. En otros tipos de cáncer se observó la disminución en el tamaño del tumor (Shibata *et al.*, 2011; Watanapokasin *et al.*, 2011; Johnson *et al.*, 2012; Hsieh *et al.*, 2013), por otro lado se ha observado que en cáncer de lengua  $\alpha$ -M interviene en la vía de Bcl2, disminuyendo las proteínas anti-apoptóticas (Bcl2) y aumentando las pro-apoptóticas (Bax, Caspasas) (Lee *et al.*, 2016).

Tabla 4. Actividad anticancerígena de  $\alpha$ -M *in vitro* e *in vivo*.

Tipo de cáncer	Mecanismo/Efecto	Referencia
<i>in vitro</i>		
Cáncer de colon, células HCT116.	Aumento de caspasa-3, disminución del PMM, disminución expresión AKT/NF- $\kappa$ B, disminución AKT fosforilado.	Alisha <i>et al.</i> (2012)
Melanoma, células SK-MEL-28.	Aumento en la expresión de caspasa 8 y 9, aumento de citocromo c y disminución en el PMM.	Wang <i>et al.</i> (2013)
Cáncer de mama, células MDAMB-231.	Disminución PMM, aumento en la expresión de caspasas 7, 8, 9 y 3, aumento de ERO, disminución Bcl2 y aumento de Bax.	Ibrahim <i>et al.</i> (2014)
Cáncer de mama, células MCF-7.	Aumento en la expresión de caspasas 7, 8 y 9, aumento de Bax y p53, disminución en la expresión de Bcl2, Bid y ER $\alpha$	Won <i>et al.</i> (2014)
CaCu, células HeLa	Aumento de apoptosis y producción de EROs, arresto del ciclo celular.	Pérez-Rojas <i>et al.</i> (2016)
CaCu, células SiHa y HeLa	Disminución del PMM, aumento en la expresión de caspasa 9 y 3, citocromo c y Bax, disminución de Bcl2, aumento de EROs	Lee <i>et al.</i> (2017)
<i>in vivo</i>		
Glioblastoma maligno xenotransplante de células GBM8401 en ratones desnudos Balb/cA-v.	Inhibición del crecimiento tumoral por la fosforilación de AMPK e inducción de autofagia.	Chao <i>et al.</i> (2011)
Cáncer de colon xenotransplante de células HCT116, ratones atímicos NCR nu/nu.	Inhibición de crecimiento tumoral, disminución de vasos sanguíneos en el tumor.	Aisha <i>et al.</i> (2012)
Carcinoma mucoepidermoide de lengua xenotransplante células YD15 en ratones atímicos.	Disminución del volumen tumoral. Disminución de la expresión Ki-67.	Lee <i>et al.</i> (2016)
CaCu xenotransplante células HeLa en ratones hembras atímicos.	Pre-incubación de $\alpha$ -M produce disminución del volumen tumoral.	Pérez-Rojas <i>et al.</i> (2016)

CaCu: cáncer cérvico-uterino; Caspasa: ácido aspártico cisteinil proteasa; PMM: Potencial de membrana mitocondrial; NF- $\kappa$ B: Factor nuclear  $\kappa$ B; EROs: Especies reactivas de oxígeno; Bcl2: Proteína 2 del linfoma de células B; Bax: Proteína X asociada a Bcl2; AMPK: proteína quinasa activada por adenosin monofosfato.

También se ha encontrado que una pre-incubación de  $\alpha$ -M a concentraciones de 10 y 15  $\mu$ M aumenta la actividad citotóxica de CDDP en un cultivo de células HeLa, a través de aumentar la apoptosis celular. Estos autores también realizaron estudios *in vivo* donde encontraron que la pre-administración de  $\alpha$ -M también aumenta la actividad antitumoral del CDDP en xenotransplantes de CaCu, al disminuir el volumen tumoral y al aumentar el tiempo de duplicación de las células (Pérez-Rojas *et al.*, 2016; Pérez-Rojas *et al.*, 2009). Otros tipos de cáncer en los cuales se ha observado que  $\alpha$ -M tiene efecto antitumoral ha sido en melanoma, el cáncer más agresivo de piel; cáncer de mama, la primera causa de muerte a nivel mundial en la mujer; cáncer de próstata; cáncer de colorectal, tercera causa de muerte a nivel mundial, entre otros (IARC, 2012; Siegel *et al.*, 2014).

## 2.7 ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

Un antioxidante es cualquier sustancia que retarde, prevenga o remueva el daño oxidante a una molécula blanco (Halliwell y Gutteridge, 2015). Los antioxidantes son donadores de electrones a centros moleculares que son susceptibles de perder electrones y por lo tanto de la formación de radicales libres y de iniciar cadenas de oxidación (Dinkova-Kostova y Talalay, 2010), por lo tanto tiene un papel fisiológico importante en el cuerpo.

Durante el metabolismo normal del cuerpo hay una producción de antioxidantes como: glutatión, ubiquinol y ácido úrico, sin embargo al haber un aumento de EROs hay un desequilibrio conocido como estrés oxidante entre EROs y defensas antioxidantes, por lo que, los agentes antioxidantes deben ser suministrados en la dieta. Una variedad de antioxidantes se encuentra presente en frutas, verduras, jugos y té (Lobo *et al.*, 2010).

Las EROs son una gran variedad de moléculas derivadas de la reducción univalente incompleta del oxígeno (Reacción 1). Pueden ser o no radicales libres (un radical libre es una especie que posee uno o más electrones desapareados y que puede existir independiente) entre las más comunes debido a su alta reactividad química son: radical hidroxilo ( $\cdot$ OH),  $O_2^{\cdot-}$ ,  $H_2O_2$  y óxido nítrico (NO). El desequilibrio entre EROs y antioxidantes ocasiona peroxidación lipídica, oxidación de algunas enzimas, así como una oxidación y degradación de proteínas (Matés *et al.*, 1999; Cárdenas-Rodríguez y Pedraza-Chaverri, 2006). Los principales agentes antioxidantes endógenos encargados depurar EROs del

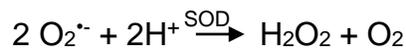
organismo como:  $O_2^{\cdot-}$  y otros radicales libres, son: superóxido dismutasa (SOD), glutatión peróxidasa (GPx) y catalasa (CAT).



*Reacción 1. Reducción univalente del oxígeno. Fuente: Matés (2000).*

### 2.7.1 SUPERÓXODO DISMUTASA

El  $O_2^{\cdot-}$  es producido por diversos sistemas enzimáticos como NADPH oxidasa, xantina oxidasa (degradación de purinas), ciclooxigenasa, lipooxigenasa, óxido nítrico sintasa y citocromo P450 y en la vía no enzimática por la cadena de transporte de electrones de la mitocondria, donde el oxígeno es el último aceptor de electrones, y la enzima citocromo c oxidasa, en el complejo IV de transporte de electrones, reduce el oxígeno a agua por la adición de cuatro protones y cuatro electrones, sin embargo ocasionalmente se filtra un electrón y genera bajos niveles de superóxido son constantemente generados por la respiración aerobia, este superóxido reduce Hierro (III) a Hierro (II), el cual se libera en los sitios de almacenamiento para reaccionar con  $H_2O_2$  y generar  $\cdot OH$ . SOD convierte  $O_2^{\cdot-}$  en  $H_2O_2$  y oxígeno molecular (Reacción 2) (Matés, 2000; Cárdenas-Rodríguez y Pedraza-Chaverri, 2006).

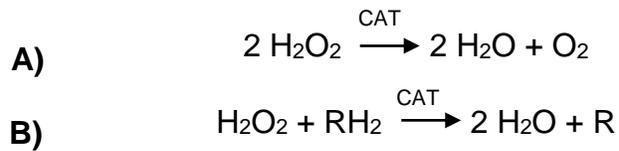


*Reacción 2. Reducción del radical anión superóxido.*

En el humano, esta enzima se encuentra: en el citoplasma como Cu,Zn-SOD, en la mitocondria como Mn-SOD, y en el fluido extracelular como Cu,Zn-SOD.

### 2.7.2 CATALASA

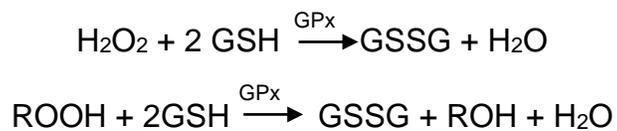
La CAT es una homoenzima tetramérica que consiste en cuatro subunidades idénticas de 60 kDa acopladas en forma tetraédrica. Esta enzima reacciona con  $H_2O_2$  para formar oxígeno y agua (Reacción 3a); también esta enzima presenta actividad de peroxidasa con donantes de hidrógeno (metanol, etanol, ácido fórmico, entre otros) y un mol de peróxido (Reacción 3b). La CAT se encuentra en todas las células aeróbicas principalmente en peroxisomas y mitocondrias (Matés, 2000; Cárdenas-Rodríguez y Pedraza-Chaverri, 2006).



*Reacción 3. Reducción del peróxido de hidrógeno por CAT. A) actividad de CAT (catalasa); B) actividad de peroxidasa.*

### 2.7.3 GLUTATIÓN PEROXIDASA

La GPx es una seleno enzima presente varias isoformas en mamíferos. Se encuentra en el citoplasma, la mitocondria y la membrana plasmática. La GPx citosólica, mitocondrial y extracelular (GPx1, GPx2, GPx3, respectivamente) reduce los hidroperóxidos de ácidos grasos y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> usando glutatión (GSH), por otro lado la GPx presente en la membrana plasmática (GPx4) puede reducir directamente los hidroperóxidos de ácidos grasos y de colesterol, que se producen durante la oxidación de fosfolípidos y lipoproteínas. En general, esta enzima cataliza la reducción de una variedad de hidroperóxidos (ROOH y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) usando GSH. Los productos que se obtienen son glutatión oxidado (GSSG) y agua (Reacción 4) (Matés, 2000; Cárdenas-Rodríguez y Pedraza-Chaverri, 2006).



*Reacción 4. Reducción de peróxidos por glutatión peroxidasa (GPx).*

### 3. JUSTIFICACIÓN

En México el CaCu continúa siendo la 2<sup>a</sup> causa de muerte en la mujer; el quimioterapéutico de primera línea utilizado para esta neoplasia es el CDDP, desafortunadamente tiene severos efectos secundarios, principalmente la nefrotoxicidad y la quimioresistencia. Es por ello que se continúa con la búsqueda de nuevas alternativas que ayuden a contrarrestar los efectos secundarios sin afectar el efecto citotóxico del mismo. La  $\alpha$ -M es una xantona aislada del árbol del mangostán, que posee varias actividades biológicas incluyendo la antioxidante y la anticancerígena, entre otras. Previamente en nuestro laboratorio se encontró que  $\alpha$ -M tiene la capacidad de proteger al tejido renal del daño ocasionado por el CDDP sin afectar su farmacocinética; además, también se encontró que la pre-incubación de  $\alpha$ -M induce un efecto sinérgico cuando se combina con el CDDP *in vitro* e *in vivo* al realizar xenotransplantes de CaCu en ratones hembras atímicos. Por lo que nos surge la siguiente pregunta: ¿Cuál será el mecanismo por el cual la  $\alpha$ -M protege el tejido renal y al mismo tiempo evita la proliferación de las células cancerígenas? Por lo que, este trabajo sólo se enfocó al mecanismo por el cuál  $\alpha$ -M en conjunto con el CDDP evita el crecimiento y proliferación de tumores de CaCu.

Para este trabajo se utilizaron los tumores de los ratones a los cuales se les implantaron  $5 \times 10^6$  células HeLa (CaCu) en ratones hembra atímicos BALB/c (20-25 g peso corporal). Una vez que el tumor alcanzó un tamaño aproximado de 150 mm<sup>3</sup>, los ratones se dividieron en cuatro grupos: (1) control: administrado con 0,5% de carboximetil-celulosa vía oral, (2) el grupo tratado con  $\alpha$ -M, vía oral a una dosis de 12.5 mg/Kg (suspendido en carboximetilcelulosa al 0,5%), (3) el grupo tratado con CDDP, vía intraperitoneal (3 mg/kg) y (4) el grupo con el tratamiento combinado  $\alpha$ -M+CDDP. La  $\alpha$ -M se administró durante cuatro días antes de la administración CDDP durante cuatro semanas, el CDDP se administró una vez a la semana por cuatro ciclos (cuatro semanas). La evaluación en el crecimiento del tumor y el peso corporal se realizó durante 10 semanas.

## 4. HIPÓTESIS

Si la combinación de  $\alpha$ -M+CDDP disminuye el tamaño tumoral de CaCu, entonces el mecanismo involucrado es el aumento en los niveles de proteínas pro-apoptóticas y la disminución de las enzimas antioxidantes.

## 5. OBJETIVOS

### 5.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar el mecanismo por el cual  $\alpha$ -M aumenta el efecto citotóxico del CDDP en tumores de CaCu.

### 5.2 OBJETIVOS PARTICULARES

1. Evaluar si la administración de  $\alpha$ -M modifica la expresión de la vía apoptótica intratumoral.
2. Estudiar la influencia de  $\alpha$ -M sobre la expresión génica y proteica de enzimas antioxidantes.

## 6. METODOLOGÍA

### 6.1 MATERIAL BIOLÓGICO

Se utilizaron los tumores de los xenotransplantes de CaCu de los ratones tratados con  $\alpha$ -M, CDDP y la combinación  $\alpha$ -M+CDDP (Pérez-Rojas *et al.*, 2016).

Los anticuerpos usados para western blot fueron obtenidos de Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Dallas, TX, EUA), con la excepción del anticuerpo vs catalasa que se obtuvo de Calbiochem (Darmstadt, Alemania).

**Primers:** Se diseñaron los primers que se utilizaron para la expresión génica de la vía antioxidante, se utilizó el software Primer Express™ v.3.0.1 (Thermo Scientific Inc, EUA) para la amplificación de cada una de las enzimas antioxidantes (Tabla 5) y el gen endógeno (Hipoxantina fosforribosiltransferasa 1, HPRT1).

*Tabla 5. Secuencia de primers*

<i>Primers</i>	<i>Secuencias</i>	<i>PB (producto)</i>
HPRT1	F: 5´-AGG GTG TTT ATT CCT CAT GG-3´ R: 5´-CAC AGA GGG CTA CAA TGT G-3´	PB: 100
SOD-2	F: 5´-TTG GCC AAG GGA GAT GTT ACA-3´ R: 5´-TTT GAT GGC TTC CAG CAA CTC-3´	PB: 150
GPx 1/2	F: 5´-ACC ACG GTC GAC TAC A-3´ R: 5´-CCG GAC GTA CTT GAG GGA ATT-3´	PB: 150
CAT	F: 5´-GAT AGC CTTCGA CCC AAG CA-3´ R: 5´-GCA CGG TAG GGA CAG TTC ACA-3´	PB: 150

### 6.2 DESARROLLO EXPERIMENTAL

#### 6.2.1 EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS

Se pesaron de 50-60 mg de tejido tumoral de cada grupo experimental (n=4 por cada grupo), en seguida se realizó un homegenado de cada tumor, se añadieron 4  $\mu$ l de amortiguador de lisis (RIPA) por cada gramo de tejido. Previamente, al amortiguador se

le adicionó un cocktail de inhibidores de fosfatasa, proteasas y metaloproteasas (Thermo Scientific Inc.), las muestras se centrifugaron a 16,090 x g durante 15 min a 4°C; se separó el sobrenadante donde se cuantificó la concentración de proteínas usando el método de Bradford (Bio-Rad, 2016).

### 6.2.2 CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

El método de Bradford se basa en la unión del colorante Azul de Coomassie (Coomassie® Brilliant Blue G-250) a residuos de aminoácidos básicos y aromáticos, especialmente arginina, esta unión produce un cambio de color de rojo a azul, los complejos del colorante con las proteínas tiene una elevado coeficiente de extinción molar y sensibilidad, la unión del colorante a la proteína es un proceso rápido (2 min) lo que hace que el proceso sea rápido y no requiera tiempo crítico para el ensayo (Bradford, 1976; Bio-Rad, 2016). La muestra se cuantificó a una longitud de onda de 570 nm. Las muestras se leyeron por duplicado.

La concentración de proteínas se calculó a partir de una curva estándar de albúmina de suero bovino (BSA) 1 mg/mL, a una absorbancia de 570 nm, por duplicado.

### 6.2.3 WESTERN BLOT

Las proteínas se separaron mediante una electroforesis en un gel de dodecil sulfato de sodio-poliacrilamida (SDS-PAGE) al 12 y 15%, este porcentaje varía dependiendo del peso de la proteína, en cada pozo se utilizaron 30 µg/µL de muestra, el gel concentrador se corrió durante 20 min a 80 Volts (V) y el gel de separación se corrió durante 2 h. a 100 V, posteriormente, las proteínas se transferieron a membranas de fluoruro de polivinilideno (PVDF) con un tamaño de poro de 0.45 µm (Amersham™ Hybond™) las membranas se activaron con metanol, agua y metanol más amortiguador de transferencia, se realizó una transferencia semi-seca durante 45 min a 10 V. Las membranas se bloquearon con leche libre de grasa al 5% con amortiguador de tris-solución salina y tween-20 al 0.1% (TBS-T) durante 1 h. con la finalidad de evitar uniones inespecíficas. Después del bloqueo las membranas se incubaron con los siguientes anticuerpos β-actina (1:2000), SOD-2 (1:000), CAT (1:000), GPx-1/2 (1:200), Bax (1:200), Bcl2 (1:200) y pro-caspasa-3 (1:200) durante toda la noche a 4°C, con agitación constante. En seguida las membranas se incubaron el anticuerpo secundario: ratón o

conejo, dependiendo del origen del anticuerpo primario, durante 1 h. a 25°C con agitación, se lavaron las membranas con TBS-T, y se detectaron las bandas con reactivos de quimioluminiscencia (ECL plus) (Pierce, Rockford, IL, EUA) y el equipo C-Digit (LI-COR, Inc, NE, EUA);  $\beta$ -actina se usó como control de carga, la densidad de la banda se cuantificó usando el programa ImageJ (NIH, Bethesda, MD, EUA).

#### 6.2.4 AISLAMIENTO DE ÁCIDO RIBONUCLEICO

Se utilizaron de 50-60 mg de tejido tumoral de cada grupo experimental (n=6) a los cuales se les añadieron 500  $\mu$ L de trizol (TRIzol™ Reagent; Thermo Scientific Inc.) y 100  $\mu$ L de cloroformo, se agitó vigorosamente por inversión, logrando una emulsión, esta se dejó reposar por 3 min a temperatura ambiente, se centrifugaron las muestras a 16,090 x g durante 15 min a 4°C, se separó la fase acuosa en otro tubo y se mezcló con 250  $\mu$ L de isopropanol, con el fin de precipitar el ácido ribonucleico (RNA, por sus siglas en inglés), se incubaron a temperatura ambiente durante 10 min, posteriormente se centrifugó a 16,090 x g durante 10 min a 4°C, se eliminó el sobrenadante por decantación, el botón obtenido se lavó y purificó con 500  $\mu$ L de etanol al 70%, se centrifugó a 7,150 x g durante 5 min a 4°C y se eliminó la mayor cantidad de etanol. Finalmente el botón se resuspendió en 20  $\mu$ L agua libre nucleasas (Thermo Scientific Inc.).

#### 6.2.5 CUANTIFICACIÓN E INTEGRIDAD DEL RNA

Se determinó la concentración de RNA (ng/ $\mu$ L) a partir de 2  $\mu$ L de muestra de RNA, los cuales se cuantificaron en el equipo NanoDrop™ ONE (Thermo Scientific). Se utilizó la relación 260/280 y 260/230 para evaluar la pureza del RNA, se consideró RNA puro en un intervalo de 2.0-2.2.

Para determinar la integridad del RNA, se utilizó el reactivo RNA Screen Tape, el equipo y Software Agilent 2200 TapeStation (Agilent Technologies, Inc.). Se hizo la mezcla de 4  $\mu$ L de amortiguador RNA Screen Tape con 1  $\mu$ L de muestra de RNA. Se calienta la muestra a 72°C durante 3 min, pasado este tiempo la muestra se colocó en hielo durante 2 min, se corre la muestra en un gel microcapilar para ser separada en el equipo 2200 TapeStation, esta separación se detectó por fluorescencia inducida por láser y se cuantificó para obtener un electroferograma en el software 2200 TapeStation.

Para el análisis de calidad de RNA en R6K ScreenTape se obtiene un número de integridad de RNA (RIN) equivalente, este valor está entre 1 y 10, donde 10 representan la muestra de RNA de la más alta calidad (Figura 10) (©Agilent Technologies, Inc. 2012; Padmanaban, 2016).

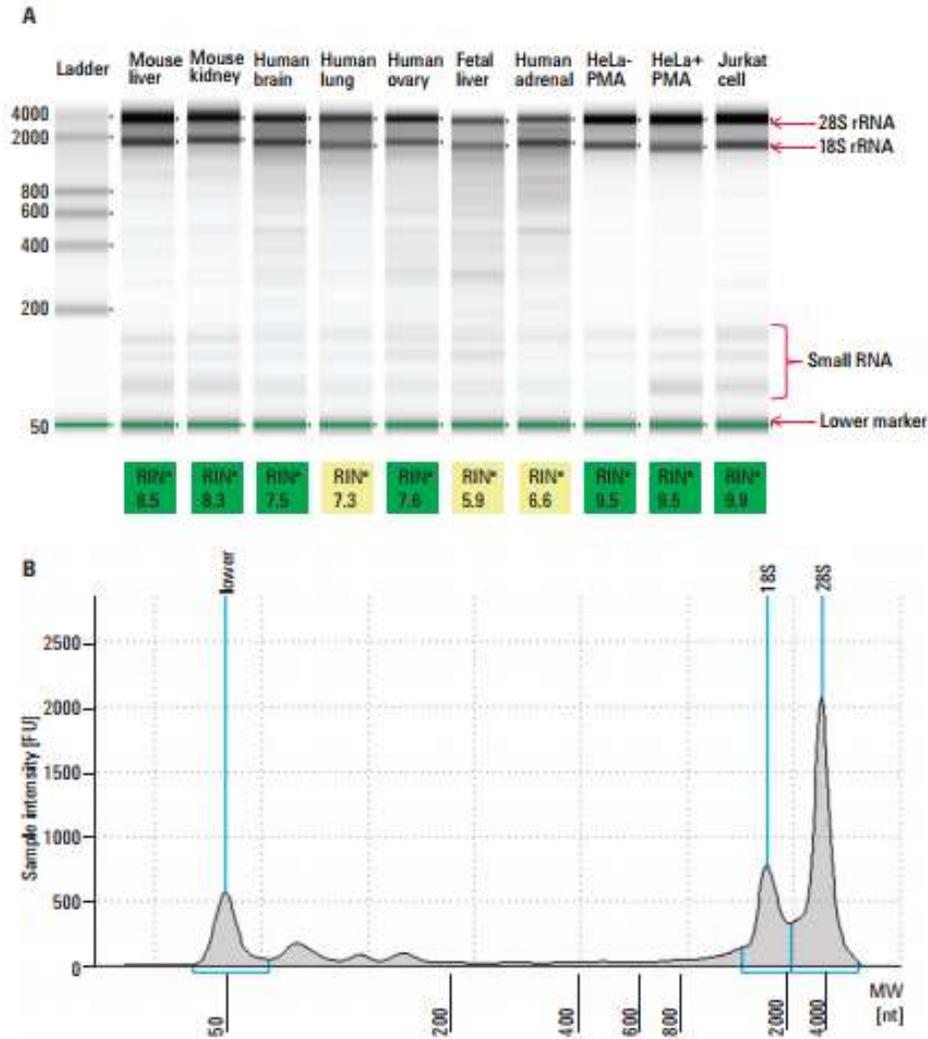


Figura 10. Análisis de RNA realizado con el sistema Agilent 2200 TapeStation. A) Gel con muestra diferentes muestras de RNA. B) Electroferograma representativo del RNA total de la célula HeLA tratada con PMA, se indican los picos 18 / 28S. Fuente: Padmanaban (2016).

Toda la manipulación de la muestra y de los reactivos se hizo en hielo, así como se aseguró que todas las áreas de trabajo y reactivos fueran libres de RNasas. El RNA obtenido se conservó a  $-70^{\circ}\text{C}$ .

### 6.2.6 TRANSCRIPTASA REVERSA (TR)

Las muestras se trataron con DNasa I (Invitrogen). Se utilizaron 2  $\mu\text{g}$  de RNA con la finalidad de eliminar la presencia de DNA genómico. Una vez tratada la muestra con DNasas se volvió a cuantificar el RNA. Se utilizarón 2.5  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  de RNA de cada muestra, para la TR se usó el Kit SuperScript® IV (Reverse Transcriptase Invitrogen). Las condiciones establecidas para una reacción fueron:

- Alineación de hexámeros: 50  $\mu\text{M}$  random hexámeros (1  $\mu\text{L}$ ), 10 mM desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs) (1  $\mu\text{L}$ ), 2.5  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  de RNA, se completó a un volumen de 11  $\mu\text{L}$  con agua libre de RNasa, se calentó a 65°C por 5 min, posteriormente se incubó en hielo.
- Polimerización DNA: Amortiguador 5x SuperScript IV (4  $\mu\text{L}$ ), 100 mM ditioneitol (DTT) (1  $\mu\text{L}$ ) y SuperScript® IV Reverse Transcriptase (200 U/ $\mu\text{L}$ ) (1  $\mu\text{L}$ ), se incubó a 23°C por 10 min, seguido de 55°C por 10 min.
- Desactivación de la enzima: 80°C por 10 min.

Toda la manipulación de muestra y reactivos se hizo en hielo. El cDNA obtenido se conservó a -20°C.

### 6.2.7 AMPLIFICACIÓN POR REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR) EN TIEMPO REAL

Con los cDNA obtenidos de la TR se realizó un PCR en tiempo real, se utilizaron las condiciones establecidas por el fabricante para una reacción se utilizarón: 12.5  $\mu\text{L}$  de Master Mix SYBR Green/ROX qPCR (2x) (Thermo Scientific), 10.5  $\mu\text{L}$  de agua libre de RNasas, 0.5  $\mu\text{L}$  de cada primer (Forward and reverse) y 1  $\mu\text{L}$  de cDNA. Los reactivos se mezclaron y se continuó con el siguiente protocolo:

- Fase de desnaturalización del DNA: 95°C por 10 min.
- Fase de alineamiento del DNA (temperaturas óptimas para cada primer) 40 ciclos: 95°C por 15 s; 60°C (SOD-2); 58°C (CAT) y 61°C (GPx) por 30 s.
- Curva melt: 95°C por 15 s; 60°C por 1 min y 95°C por 15 min.

Estas condiciones se establecieron en el equipo Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System.

### 6.2.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados se expresaron como la media  $\pm$  SD de la media de tres experimentos independientes. Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía seguida por la prueba post hoc Student Newman Keuls para múltiples comparaciones. Se utilizó el software GraphPad Prism 4 (San Diego, CA, EUA). Las diferencias se consideraron significativas con una  $P \leq 0.05$ .

## 7. RESULTADOS

### 7.1 PROTEÍNAS DE LA VÍA APOPTÓTICA

Se determinó la participación de la vía apoptótica en la disminución del crecimiento tumoral de xenotransplantes de CaCu de los ratones tratados con  $\alpha$ -M, CDDP y la combinación  $\alpha$ -M+CDDP. Se exploraron las proteínas: Bax, Bcl2, pro-caspasa-3 y como control  $\beta$ -actina, en los tumores de los cuatro grupos (control,  $\alpha$ -M, CDDP y la combinación de ellos, descritos en metodología).

En el gráfico 1A se presentan los niveles de la proteína pro-apoptótica Bax en los grupos control,  $\alpha$ -M, CDDP y  $\alpha$ -M+CDDP, donde se encontró un aumento significativo en el grupo tratado con CDDP (0.5 veces más); mientras que en el grupo tratado con la combinación de  $\alpha$ -M+CDDP el aumento en los niveles de esta proteína fue todavía mayor (2 veces más) en comparación con el grupo control. Del lado derecho se presenta un western blot representativo de las proteínas Bax y  $\beta$ -actina.

El gráfico 1B se presentan los niveles de Bcl2, la proteína anti-apoptótica, en los grupos control,  $\alpha$ -M, CDDP y  $\alpha$ -M+CDDP. Se observa que tanto el tratamiento con CDDP y la combinación hay una disminución significativa (0.5 veces menos) con respecto al grupo control; sin observar cambios en el grupo tratado sólo con  $\alpha$ -M. Del lado derecho se presenta un western blot representativo de las proteínas Bcl2 y  $\beta$ -actina.

La cuantificación indirecta de caspasa-3 se presenta en el gráfico 1C. Al cuantificar los niveles de expresión de la proteína pro-caspasa-3 en los grupos control,  $\alpha$ -M, CDDP y  $\alpha$ -M+CDDP, se observa una disminución significativa tanto en los tratamiento individuales ( $\alpha$ -M y CDDP) como en la combinación ( $\alpha$ -M+CDDP) con respecto al grupo control. Del lado derecho se presenta un western blot representativo de las proteínas pro-caspasa-3 y  $\beta$ -actina.

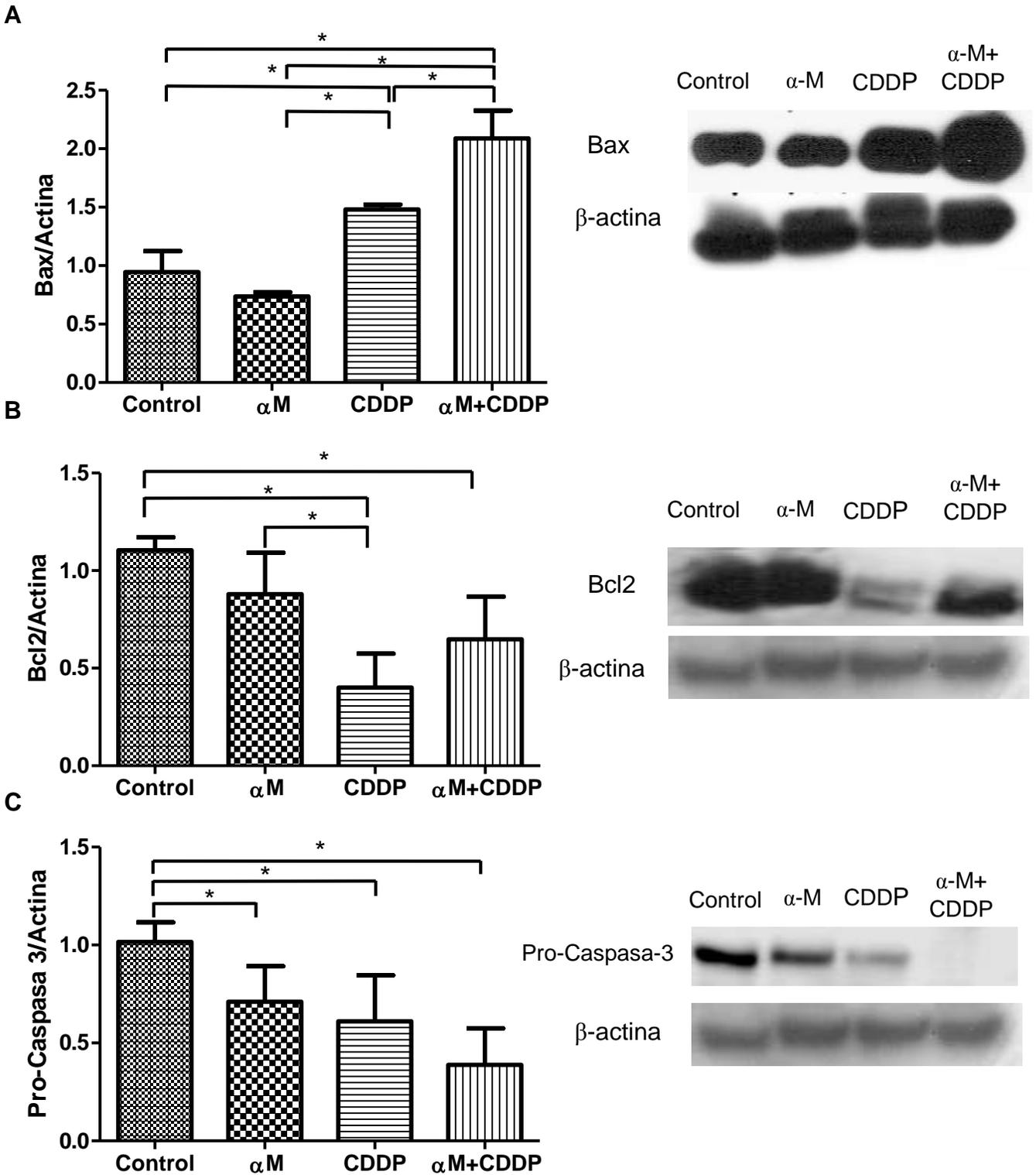


Gráfico 1. El tratamiento de la combinación de  $\alpha$ -M+CDDP modifica la vía apoptótica en tumores de cáncer de cérvix. Proteínas apoptóticas (A) Bax, (B) Bcl2 y (C) Pro-caspasa-3.  $\alpha$ -M, alfa-mangostina; CDDP, cisplatino. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  desviación estándar de 4 experimentos independientes. Donde \* es  $P < 0.05$ .

## 7.2 PROTEÍNAS ANTIOXIDANTES

Como  $\alpha$ -M es un compuesto antioxidante, se evaluaron diferentes proteínas antioxidantes: SOD, CAT y GPx. En los tumores de CaCu de los ratones tratados con  $\alpha$ -M, CDDP y la combinación  $\alpha$ -M+CDDP.

En el Gráfico 2A se observa la cantidad de la proteína SOD en los grupos control,  $\alpha$ -M, CDDP y  $\alpha$ -M+CDDP. Solo se observó un aumento significativo en el grupo de la combinación con respecto al grupo control (0.4 veces), mientras que, en los tratamientos individuales no se encontraron diferencias significativas. Del lado derecho se presenta un western blot representativo de las proteínas SOD y  $\beta$ -actina.

En el gráfico 2B se presentan los niveles de CAT en los grupos control,  $\alpha$ -M, CDDP y  $\alpha$ -M+CDDP, se encontró que el tratamiento de la combinación  $\alpha$ -M+CDDP disminuyó los niveles de expresión de CAT (0.5 veces menos respecto al grupo control), sin encontrar cambios significativos en los tratamientos individuales. Del lado derecho se presenta un western blot representativo de las proteínas CAT y  $\beta$ -actina.

Por el contrario cuando se analizó la expresión de la proteína GPx (Gráfico 2C), se encontró un aumento significativo en el grupo de  $\alpha$ -M+CDDP en comparación con el grupo control (0.5 veces respecto al control), sin encontrar diferencias en los tratamientos individuales. Del lado derecho se presenta un western blot representativo de las proteínas GPx y  $\beta$ -actina.

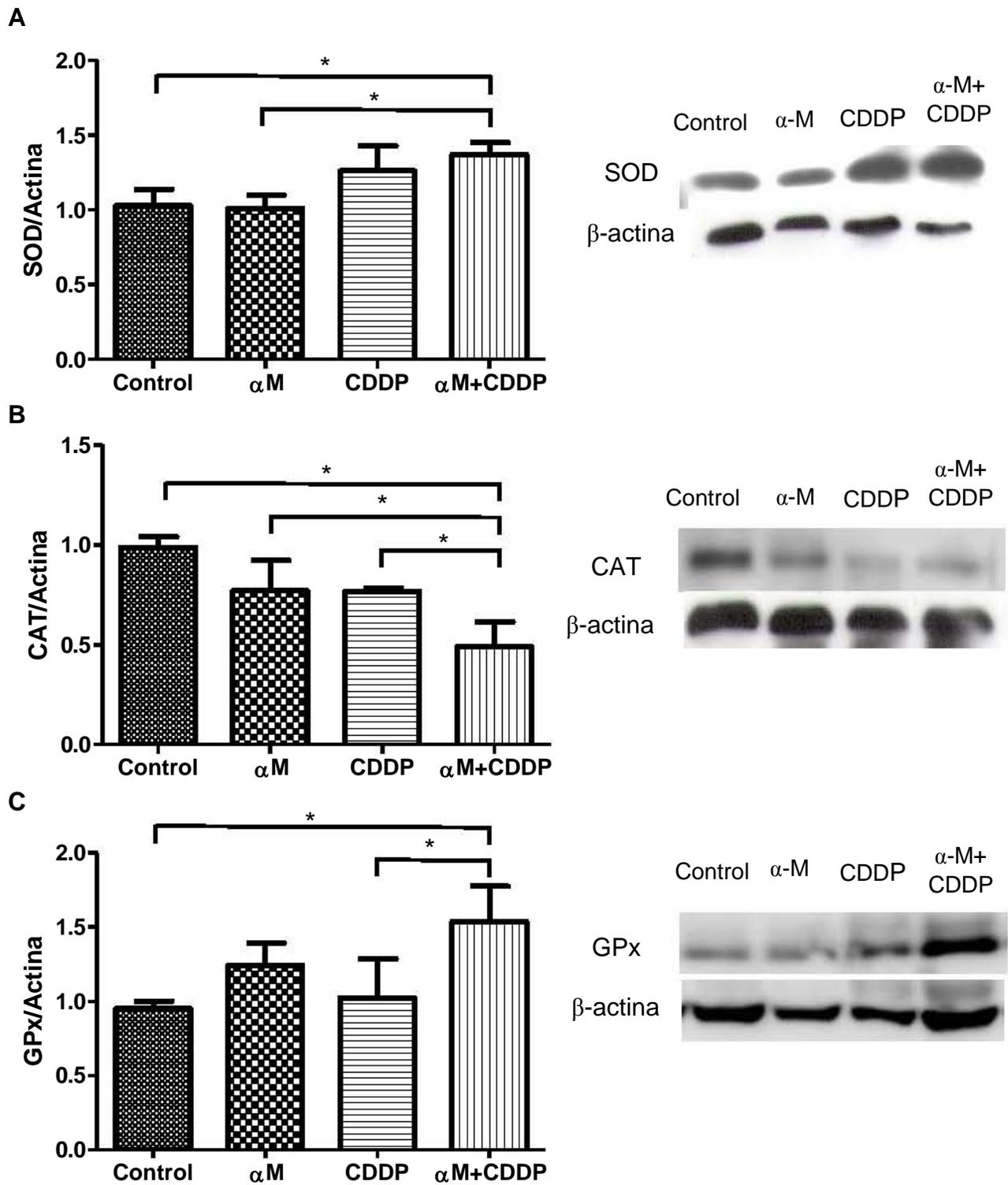


Gráfico 2. Efecto de  $\alpha$ -M, CDDP y la combinación en los niveles de las proteínas antioxidantes en tumores de CaCu. Proteínas antioxidantes (A) SOD, superóxido dismutasa; (B) CAT, Catalasa; y (C) GPx, glutatión peroxidasa.  $\alpha$ -M, alfa-mangostina; CDDP, cisplatino. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  desviación estándar de 3 experimentos independientes. Donde \*  $P < 0.05$ .

### 7.3 CUANTIFICACIÓN E INTEGRIDAD DEL RNA

En la tabla 6 se presenta la concentración del RNA (ng/μL) y las relaciones 260/280 y 260/230 correspondientes a cada muestra, obtenidos en el equipo NanoDrop™ ONE (Thermo Scientific), se observa que los valores de cada relación son cercanas a 2, lo que indica que el RNA obtenido está puro.

*Tabla 6. Concentración de RNA (ng/μL) y pureza.*

TRATAMIENTO	MUESTRA	CONCENTRACIÓN. (ng/μl)	RELACIÓN	
			260/280	260/230
CONTROL	R5	984.4	2.14	2.18
	R17	1254.2	1.9	2.24
	R20	728.6	2.33	2.24
	R40	1694.7	1.7	2.82
	R18	613.1	2.45	2.22
	R36	763.2	2.05	2.25
α-M	R11	962	2.05	2.21
	R6	1450.2	1.74	2.03
	R24	1706.9	1.71	1.78
	R37	524.9	2.75	1.73
	R21	522	2.5	2.22
	R12	920.8	2.04	2.15
CDDP	R25	1427.8	2.02	2.19
	R44	640.8	2.46	2.21
	R48	396.7	2.02	2.05
	R31	911.7	2.17	2.16
	R4	396.9	2.46	2.44
	R19	1005.1	1.99	2.19
α-M+CDDP	R39	1781.6	1.74	1.74
	R22	378.9	2.26	2.42
	R27	1319	1.92	2.01
	R43	474.1	2.56	2.16
	R14	478.8	2.62	2.4
	R9	277.3	2.35	2.42

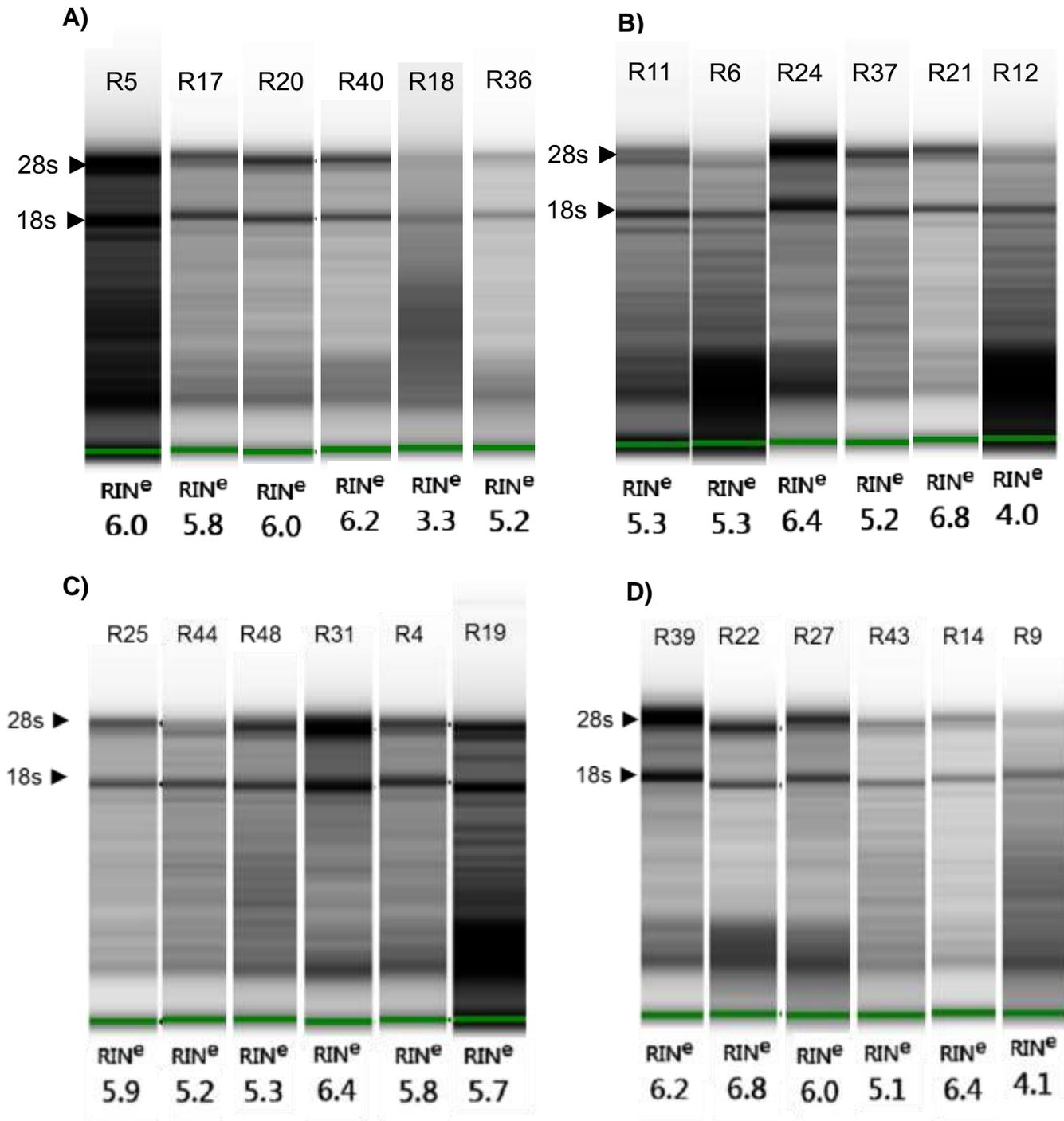


Gráfico 3. Valor de RIN que muestra la integridad de cada RNA extraído por la técnica de trizol. Se muestran los grupos: (A) Control; (B) α-M, alfa mangostina; (C) CDDP, Cisplatino; (D) α-M+CDDP. Las bandas revelan la integridad de las subunidades 28 y 18s del RNA.

En el gráfico 3 se observa el RNA total separado por electroforesis y resaltan las bandas correspondientes a los RNA ribosomales 28 y 18s, lo que indica su integridad, también

se muestra el valor de RIN de cada muestra correspondiente a los 4 grupos, control,  $\alpha$ -M, CDDP,  $\alpha$ -M+CDDP. El valor mínimo obtenido fue 3.3 y máximo 6.8.

#### 7.4 EXPRESIÓN GÉNICA DE PROTEÍNAS ANTIOXIDANTES

Una vez obtenido el cDNA se realizó PCR en tiempo real para obtener los niveles transcritos de las proteínas de la vía antioxidante: SOD-2, CAT y GPx1/2 en los tumores de ratones de CaCu tratados con  $\alpha$ -M, CDDP y la combinación de ellos, usando como gen endógeno HPRT1. Las curvas melt de cada experimento se observan en el Anexo I.

En el gráfico 4A se presenta los niveles de transcritos de SOD-2 en los grupos control,  $\alpha$ -M, CDDP y  $\alpha$ -M+CDDP. Se encontró una disminución significativa en los grupos de  $\alpha$ -M y la combinación con respecto al grupo control (0.5 veces menos).

En el gráfico 4B se presenta los niveles de transcritos de CAT, en los grupos control,  $\alpha$ -M, CDDP y  $\alpha$ -M+CDDP, por el contrario se observa que el tratamiento de CDDP y la combinación presenta un aumento de 0.7 y 0.5 veces, respectivamente, con respecto al grupo control, esta diferencia alcanzó significancia, sin observar cambios significativos en el tratamiento de  $\alpha$ -M.

Finalmente el Gráfico 4C representa los niveles de transcrito de GPx en los grupos control,  $\alpha$ -M, CDDP y  $\alpha$ -M+CDDP. Se observa una disminución significativa en los grupos de  $\alpha$ -M y  $\alpha$ -M+CDDP con respecto al grupo control.

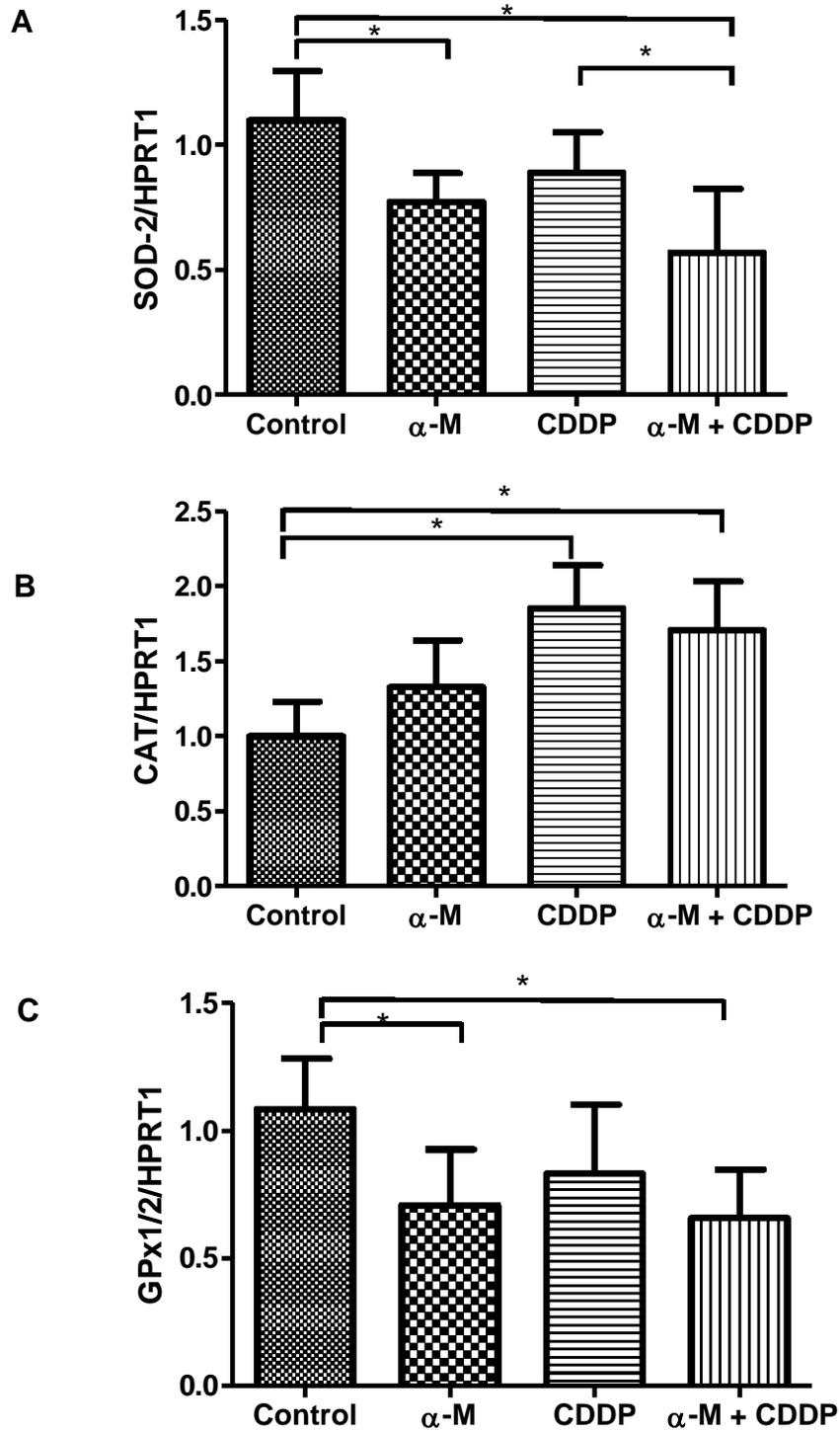


Gráfico 4. Efecto de  $\alpha$ -M, CDDP y la combinación en la expresión de RNA de proteínas antioxidantes (A) SOD-2, superóxido dismutasa 2; (B) CAT, Catalasa; y (C) GPx, glutatión peroxidasa, determinada por PCR en tiempo real en tumores de CaCu.  $\alpha$ -M, alfa-mangostina; CDDP, cisplatino; RNA, ácido ribonucleico. Los valores se presentan como la media  $\pm$  desviación estándar de 6 experimentos independientes. Donde \* es  $P < 0.05$ .

## 8. DISCUSIÓN

Este proyecto se enfocó en dilucidar la participación de la vía apoptótica y antioxidante en xenotransplantes de CaCu de ratones tratados con  $\alpha$ -M y CDDP, debido a que el CaCu continúa siendo un problema de salud pública en nuestro país y en países en vías de desarrollo, aun con los programas de detección temprana y de prevención se continúa diagnosticando en estadios avanzados a pesar de ser de avance lento y progresivo sin presentar síntomas en estadios tempranos (IARC, 2012). Aunado a que el tratamiento de primera línea para el CaCu (CDDP) ocasiona severos efectos adversos dañando principalmente el riñón (Hanigan y Devarajan, 2003), sin embargo se ha demostrado que  $\alpha$ -M protege el riñón del efecto del CDDP (Pérez-Rojas *et al.*, 2009). Por lo otro lado, en varios estudios se ha demostrado que  $\alpha$ -M induce la muerte celular apoptótica, suprime el crecimiento tumoral, la invasión y la metástasis en algunos tipos de cáncer, a través de la participación de diferentes vías de señalización que involucra la supervivencia y la proliferación celular.

Los resultados del presente estudio han demostrado que la combinación de  $\alpha$ -M+CDDP induce la disminución del volumen tumoral, a través de la activación de la vía intrínseca de la apoptosis con un aumento de Bax, una disminución de Bcl2 y un aumento de caspasa-3 (medido de forma indirecta al cuantificar el propéptido pro-caspasa-3) (Gráfico 1). Estos resultados sugieren que  $\alpha$ -M produce una alteración en las proteínas que afectan a la mitocondria llevando a la célula a una muerte por apoptosis, lo que correlaciona con los diversos estudios tanto *in vitro* como *in vivo*. Lee y colaboradores encontraron que  $\alpha$ -M por sí sola tiene efecto anticancerígeno al ver un aumento en los niveles de Bax y citocromo c, así como una disminución de Bcl2 en células de CaCu (HeLa y SiHa) a una concentración de 20  $\mu$ M de  $\alpha$ -M (Lee *et al.*, 2017), la modificación de estas proteínas también se ha visto en otros tipos de cáncer como en células de cáncer de colon (Watanapokasin *et al.*, 2011), en células de cáncer de mama (Won *et al.*, 2014), entre otros. En este trabajo, el efecto que presentó en los tumores de los ratones tratados solo con  $\alpha$ -M se observó únicamente una disminución en la proteína pro-caspasa-3, sin observar cambios significativos en las otras proteínas (Gráfico 1C).

Por otra parte, los resultados obtenidos por CDDP en los niveles de proteínas apoptóticas correlacionan con lo que ya estaba descrito en la literatura un aumento de Bax y caspasa-3 y una disminución de Bcl2 (Dasari y Tchounwou, 2014), sin embargo, no hay estudios que exploren el mecanismo de la combinación de  $\alpha$ -M con agentes antineoplásicos, y se observa que la combinación de  $\alpha$ -M+CDDP potenció el aumento en los niveles de Bax y de pro-caspasa-3 (Gráfico 3A y 3C) y manteniendo bajos los niveles de Bcl2 (Gráfico 3B).

Una vez que se encontró que la combinación de  $\alpha$ -M+CDDP aumentan los niveles de expresión de las proteínas pro-apoptóticas y disminuye la proteína anti-apoptótica se analizó la participación de las enzimas antioxidantes en el aumento de la citotoxicidad del CDDP, ya que  $\alpha$ -M es considerado como un potente agente antioxidante, y además porque, previamente se demostró que la combinación de  $\alpha$ -M+CDDP en ensayos *in vitro* produjo un aumento de EROs en las células HeLa (Pérez-Rojas *et al.*, 2016).

Las enzimas antioxidantes se encargan de mantener en equilibrio la generación de EROs, nitrógeno y los radicales libres. El aumento de estas especies por una parte ayudan a que se lleven varios procesos biológicos como la glucólisis (en citosol), ciclo de Krebs (matriz mitocondrial) y fosforilación oxidativa (espacio intermembranal de la mitocondria), en esta última se lleva a cabo la oxidación de acarreadores de electrones reducidos como NADH y FADH<sub>2</sub> y en el transporte de electrones hasta el O<sub>2</sub> para formar agua y la síntesis de ATP a partir de ADP (Cárdenas-Rodríguez y Pedraza-Chaverri, 2006). En este trabajo se determinaron las proteínas SOD, CAT y GPx debido a que son las principales enzimas involucradas en la reducción del oxígeno. Cabe mencionar que las EROs también pueden inducir apoptosis a través de la vía intrínseca (Ozben, 2007), estas facilitan la liberación del citocromo c y activan proteínas estabilizadoras de los poros (Bcl2 y Bcl-xL) y también pueden inhibir estas proteínas (Dasari y Tchounwou, 2014). En este trabajo se encontró que los niveles proteicos en los tumores de los ratones tratados con la combinación de  $\alpha$ -M+CDDP aumentan los niveles de SOD, disminuyen CAT y aumentan GPx (Gráfico 2); el aumento en SOD y GPx parecería paradójico a los resultados esperados, debido a que estas enzimas regulan los niveles de radicales libres y las EROs en el organismo, así como participan en la reducción univalente del oxígeno, por lo que se esperaba la disminución de ellas; una explicación al aumento en los niveles

de SOD indica un incremento en la producción de  $H_2O_2$  lo que mantendría la muerte celular, aunado a esto, la disminución en la producción de CAT evita la reducción de  $H_2O_2$  en agua, lo que mantiene la cantidad de  $H_2O_2$  induciendo muerte celular. A pesar de haber un aumento en la enzima GPx, que también se encarga de reducir el  $H_2O_2$ , este aumento no llega a ser suficiente para reducir todo el  $H_2O_2$  acumulado en la célula. Por lo que, nos sugiere que al haber un incremento en  $H_2O_2$  reacciona con los fosfolípidos de la membrana celular que genera peroxidación lipídica, lo que conduce a la célula a la muerte.

Al observar una importante participación de la vía antioxidante en el efecto de la disminución del tumor de los ratones tratados con la combinación de  $\alpha$ -M+CDDP, se decidió evaluar la expresión génica de estas enzimas. En la tabla 6 se observa que el RNA obtenido presenta una alta pureza con una relación 260/280 y 260/230 cercana a 2, así como en el gráfico 3 se observa la integridad del RNA para obtener resultados de PCR más confiables.

El aumento de SOD, la disminución de CAT y el aumento de GPx son resultados completamente opuestos a los mostrados en los niveles de proteína, estos resultados nos sugieren una posible modificación en la activación transcripcional reflejada por la tasa de recambio de RNA. También sugiere que la disminución en las enzimas SOD y GPx y el aumento de CAT se está dando para mantener un equilibrio de estas proteínas, de tal manera que ya no se codifique más para esas proteínas (Hernández-Alarcón *et al.*, 2003).

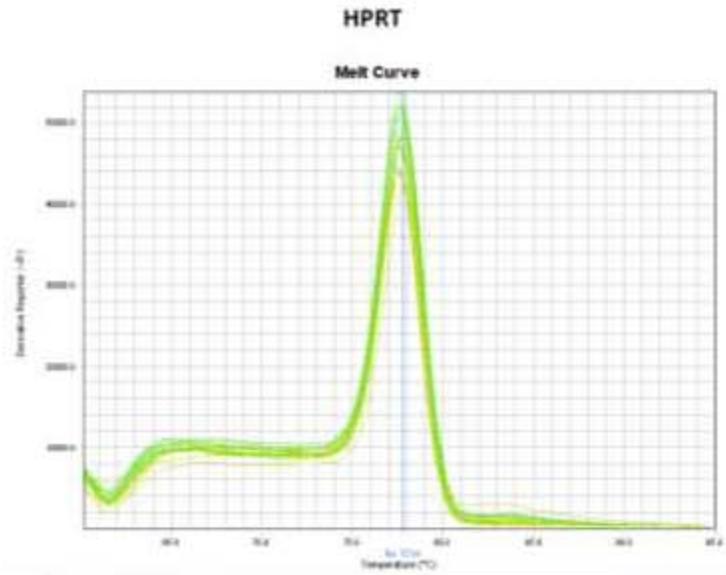
Los resultados obtenidos en este proyecto proporcionan una nueva perspectiva sobre el mecanismo molecular de  $\alpha$ -M en combinación con CDDP, y sugiere que en la disminución del tamaño tumoral, no sólo se ve involucrada la vía intrínseca de la apoptosis, si no también revela la intervención de enzimas antioxidantes.

## 9. CONCLUSIÓN

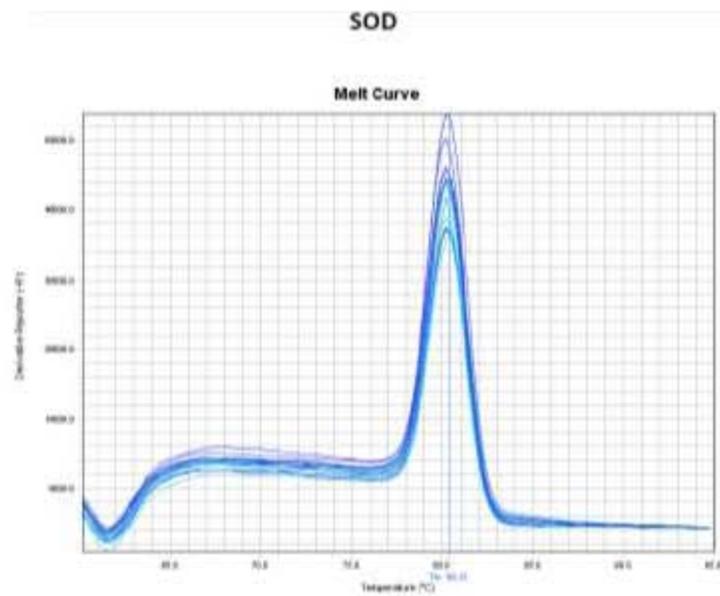
Uno de los mecanismos por el cual la  $\alpha$ -M incrementa la sensibilidad al tratamiento con CDDP es por la participación de la vía apoptótica intrínseca y la vía antioxidante, sin presentar una relación en los niveles de transcripción de las proteínas antioxidantes.

# 10. ANEXO I

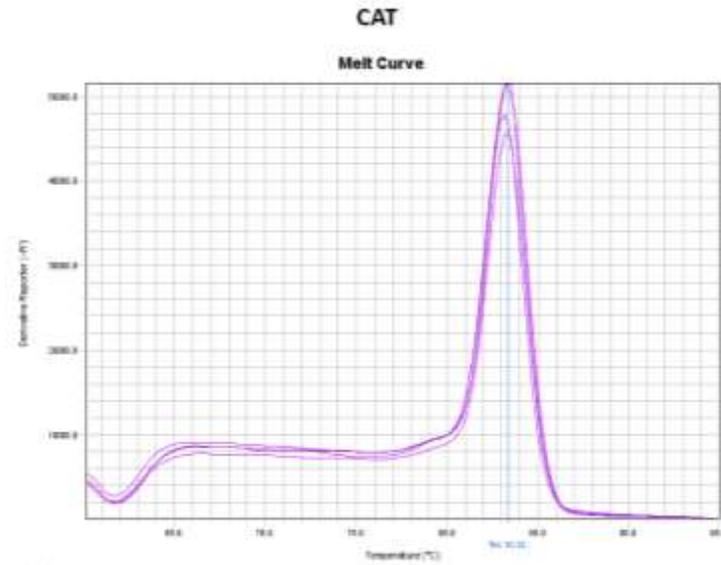
**A**



**B**



C



D

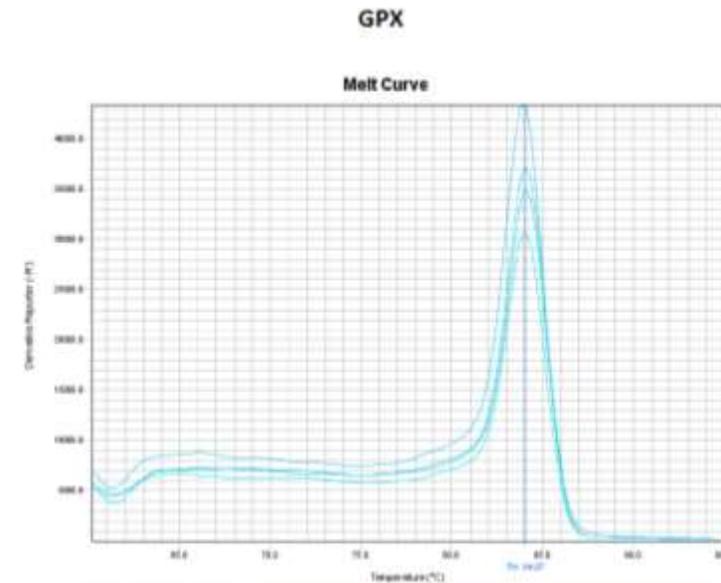


Gráfico 5. Curva melt. A través de estas gráficas se confirma que cada producto tiene una temperatura específica para obtener un solo producto. (A) HPRT1, Hipoxantina fosforribosiltransferasa 1; (B) SOD-2, superóxido dismutasa 2; (C) CAT, Catalasa; y (D) GPx, glutatión peroxidasa.

## 11. REFERENCIAS

- ACS. (2016). Cáncer de cuello uterino. [En línea] (Actualizado Enero 2016). Disponible en: <https://www.cancer.org/es/cancer/cancer-de-cuello-uterino.html> [Último acceso el 29 de Mayo de 2017].
- Agilent Technologies, Inc. (2012). Agilent 2200 TapeStation User Manual. . [En línea] (Actualizado 2012). Disponible en: [http://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/public/G2964-90001\\_TapeStationPalpatine\\_USR\\_EN.pdf](http://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/public/G2964-90001_TapeStationPalpatine_USR_EN.pdf) [Último acceso el 05 de Octubre de 2017].
- Aisha AF, Abu-Salah KM, Ismail Z, Majid AM. (2012) *In vitro* and *in vivo* anti-colon cancer effects of Garcinia mangostana xanthonex extract. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 12, 104.
- Akao, Y., Nakagawa, Y., Inuma, M., Nozawa, Y. (2008). Anti-cancer effects of xanthonex from pericarps of mangosteen. *International Journal of Molecular Sciences*, 9, 355-370.
- Baltimore, D. (1971). Expression of animal virus genomes. *Bacteriological Reviews*, 35(3), 235–241.
- Biesalski H., Dragsted L., Elmadfa I., Grossklaus R., Muller M., Schrenk D., Walter P, Weber P. (2009). Bioactive compounds: Safety and efficacy. *Special article Nutrition*, 25 (12), 1206–1211.
- Bio-Rad. (2016). Protein Assay. [En línea] (Actualizado 2017). Disponible en: [http://www.bio-rad.com/LifeScience/pdf/Bulletin\\_9004.pdf](http://www.bio-rad.com/LifeScience/pdf/Bulletin_9004.pdf) [Último acceso el 11 de Septiembre de 2017].
- Bradford, M. (1976). A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.
- Bras, M., Queenan, B., Susin, S.A. (2005). Programmed cell death via mitochondria: different modes of dying. *Biochemistry*, 70, 231-239.

- Cárdenas, G.D., Arrazola, G., Villalba, M. (2014) Tropical Fruits: Source of Natural Compounds Bioactives Food Industry. *Ingenium*, 17, 29-40.
- Cárdenas-Rodríguez, N., Pedraza-Chaverri, J. (2006). Especies reactivas de oxígeno y sistemas antioxidantes: aspectos básicos. *Educación Química*, 17(2), 164-173.
- Carter, J.R., Ding, Z., Rose, B.R. (2011). HPV infection and cervical disease: A review. *Australian and New Zealand Journal of Obstetrics and Gynaecology*, 51, 103-108.
- CCS. (2017). What is cáncer? [En línea] (Actualizado Enero 2017). Disponible en: <http://www.cancer.ca/en/cancer-information/cancer-101/what-is-cancer/how-cancer-starts-grows-and-spreads/?region=on> [Último acceso el 04 de Agosto de 2017].
- Chao, A.C., Hsu, Y.L., Liu, C.K., Kuo, P.L. (2011).  $\alpha$ -Mangostin, a dietary xanthone, induces autophagic cell death by activating the AMP-activated protein kinase pathway in glioblastoma cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 2086–2096.
- Chin, Y.W., y Kinghorn, A.D. (2008). Structural Characterization, Biological Effects, and Synthetic Studies on Xanthenes from Mangosteen (*Garcinia mangostana*) a Popular botanical Dietary Supplement. *Mini-reviews in Organic Chemistry*, 5(4), 355-364.
- Chomnawang, M.T., Surassmo, S., Nukoolkarn, V.S., Gritsanapan W. (2007). Effect of *Garcinia mangostana* on inflammation caused by *Propionibacterium acnés*. *Fitoterapia*, 78, 401–408.
- Cohen, S.M., Lippard, S.J. (2001). Cisplatin: from DNA damage to cancer chemotherapy. *Progress in Nucleic Acid Research Molecular Biology*, 67, 93-130.
- Cory, S., Adams, J.M. (2002). The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nature Reviews Cancer*, 2, 647–656.

- Dasari, S., Tchounwou, P.B. (2014). Cisplatin in cancer therapy: Molecular mechanisms of action. *European Journal of Pharmacology*, 740, 364-378.
- Dinkova-Kostova, A.T., y Talalay, P. (2010). NAD(P)H:quinone acceptor oxidoreductase 1 (NQO1), a multifunctional antioxidant enzyme and exceptionally versatile cytoprotector. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 501(1), 116–123.
- Du, C., Fang, M., Li, Y., Li, L., Wang, X. (2000). Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell*, 102, 33-42.
- Einstein, M.H., Burk, R.D. (2001) Persistent human papillomavirus infection: Definitions and clinical implications. *Papillomavirus Report*, 12(5), 119-123.
- Elmore, S. (2007). Apoptosis: A Review of Programmed cell Death. *Toxicologic Pathology*, 35(4), 495-516.
- FAO. (2007). Manual de manejo postcosecha de frutas tropicales. [En Línea] (Actualizado 2007). Disponible en: <http://www.fao.org/3/a-ac304s.pdf> [Último acceso el 01 de Septiembre 2017].
- Farnsworth, N.R., Bunyaphatsara, N. (1992). Thai Medicinal Plants Recommended for Primary Health Care System. *Medicinal Plant Information Center*, 160-162.
- Galluzzi L, Morselli E, Kepp O, Vitale I, et al. (2011). Mitochondrial liaisons of p53. *Antioxidants and Redox Signaling*, 15, 1691–1714.
- Galluzzi, L., Senovilla, L., Vitale, I., Michels, J., et al. (2012). Molecular mechanisms of cisplatin resistance. *Oncogene*, 31,1869-1883.
- Galluzzi, L., Vitale, I., Michels, J., Brenner, C., Szabadkai, G., Harel-Bellan, A., et al. (2014). Systems biology of cisplatin resistance: past, present and future. *Cell Death Disease*, 5, e1257.
- García-Tamayo, J., Molina, J., Blaseo-Olaetxea, E. (2009). Importancia de los estudios de inmunohistoquímica en el diagnóstico y la evaluación pronóstica de la

neoplasia intraepitelial y el cáncer cervical. Revisión. *Investigación clínica*, 50(2), 241-250.

- Garrido, C., Galluzzi, L., Brunet, M., Puig, P.E., Didelot, C., Kroemer, G. (2006). Mechanisms of cytochrome c release from mitochondria. *Cell Death & Differentiation*, 13,1423-1433.
- Gómez-Fernández, J. (2007). *Patología benigna y lesiones premalignas de cervix*. Servicio de Obstetricia y Ginecología, Hospital Universitario Virgen de las Nieves Granada. [En Línea] (Actualizado Junio 2007). Disponible en: [http://www.hvn.es/servicios\\_asistenciales/ginecologia\\_y\\_obstetricia/ficheros/cr07.patologia\\_benigna\\_cervix.pdf](http://www.hvn.es/servicios_asistenciales/ginecologia_y_obstetricia/ficheros/cr07.patologia_benigna_cervix.pdf) [Último acceso el 1º de Junio de 2017].
- Gopalakrishnan, G., Banamathi, B., Suresh, G. (1997). Evaluation of the antifungal activity of natural xanthenes from *Garcinia mangostana* and their synthetic derivatives. *Journal of Natural Products*, 60(5), 519-524.
- Govindachari, T.R., Kaluanaraman, P.S., Muthukumaraswamy, N. (1971). Xanthenes of *Garcinia mangostana* Linn. *Tetrahedron*, 27(16), 3919-3926.
- Granados-García, M., Arrieta-Rodríguez, O.G., Meneses-García, A.A. (2016). Cáncer. En: M. Granados-García, O.G. Arrieta-Rodríguez y J. Hinojosa-Gómez eds. *TRATAMIENTO DEL CÁNCER. Oncología médica, quirúrgica y radioterapia*. México: Manual Moderno, 1.
- Green, D.R., Reed, J.C. (1998). Mitochondria and apoptosis. *Science*, 281, 1309-1312.
- Griffiths, K., Aggarwal, B.B., Singh, R.B., Buttar, H.S., et al. (2016). Food Antioxidants and Their Anti-Inflammatory Properties: A Potential Role in Cardiovascular Diseases and Cancer Prevention. *Diseases*, 4(3), 28.
- Halliwell, B. y Gutteridge, M.C. (2015). *Free radicals in biology and medicine*. Quinta Edición. OXFORD University Press, USA.
- Hanigan, M.H., Devarajan, P. (2003). Cisplatin nephrotoxicity: molecular mechanisms. *Molecular Cancer Therapeutics*, 1, 47-61.

- Hernández-Alarcón, A., Pasquetti-Ceccatelli, A., Zúñiga-Rivera, A., Meléndez-Mier, G. (2003). Recambio proteínico interórgano. *Revista de Endocrinología y Nutrición*, 11 (3), 129-135.
- Hsieh, SC., Huang, M.H., Cheng, C.W., Hung, J.H., Yang, S.F., Hsieh, Y.H. (2013).  $\alpha$ -Mangostin induces mitochondrial dependent apoptosis in human hepatoma SK-Hep-1 cells through inhibition of p38 MAPK pathway. *Apoptosis*, 18, 1548-1560.
- IARC. (2012). GLOBAL CANCER OBSERVATORY. CANCER TODAY. [En Línea] (Actualizado 2012). Disponible en: <http://gco.iarc.fr/today/home> [Último acceso el 15 de Junio 2017].
- Ibrahim, M.Y., Hashim, N.M., Mariod, A.A., Mohan, S., *et al.* (2016).  $\alpha$ -Mangostin from *Garcinia mangostana* Linn: an updated review of its pharmacological properties. *Arabian Journal of Chemistry*, 3, 317–329.
- Ibrahim, M.Y., Mohod, H.N., Mohan, S., Abdulla, M.A., *et al.* (2014). Involvement of NF- $\kappa$ B and HSP70 signaling pathways in the apoptosis of MDA-MB-231 cells induced by a prenylated xanthone compound,  $\alpha$ -mangostin, from *cratoxylum arborescens*. *Drug Design, Development and Therapy*, 8, 2193-2211.
- Instituto Nacional de Mujeres. (2015). Cáncer de mama y cérvico-uterino. [En Línea] (Actualizado 2015). Disponible en: [http://estadistica.inmujeres.gob.mx/formas/tarjetas/cama\\_cacu.pdf](http://estadistica.inmujeres.gob.mx/formas/tarjetas/cama_cacu.pdf) [Último acceso el 16 de Junio de 2017].
- Jefferson, A., Quillinan, A.J., Scheimann, F., Sim, K.Y. (1970). Isolation of  $\gamma$ -mangostin from *Garcinia mangostana* and preparation of the natural mangostins by selective demethylation. *Australian Journal of Chemistry*, 23, 2539-2543.
- Johnson, J.J., Petiwala, S.M., Syed, D.N., Rasmussen, J.T., *et al.* (2012).  $\alpha$ -Mangostin, a xanthone from mangosteen fruit, promotes cell cycle arrest in prostate cancer and decreases xenograft tumor growth. *Carcinogenesis*, 33, 413-419.

- Joza, N., Susin, S.A., Daugas, E., Stanford, W.L., Cho, S.K., Li, C.Y., *et al.* (2001). Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. *Nature*, 410,549–554.
- Kurosaka, K., Takahashi, M., Watanabe, N., Kobayashi, Y. (2003). Silent cleanup of very early apoptotic cells by macrophages. *Journal of Immunology*, 171, 4672-4679.
- Lee, H. N., Jang, H. Y., Kim, H. J., Shin, S. A., *et al.* (2016). Antitumor and apoptosis-inducing effects of  $\alpha$ -mangostin extracted from the pericarp of the mangosteen fruit (*Garcinia mangostana* L.) in YD-15 tongue mucoepidermoid carcinoma cells. *International Journal of Molecular Medicine*, 37(4), 939–948.
- Lee, C.H., Ying, T.H., Chiou, H.L., Hsieh, S.C., *et al.* (2017). Alpha-mangostin induces apoptosis through activation of reactive oxygen species and ASK1/p38 signaling pathway in cervical cancer cells. *Oncotarget*, 8(29), 47425–47439.
- Li, L.Y., Luo, X., Wang, X. (2001). Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature*, 412, 95–99.
- Lobo, V., Patil, A., Phatak, A., Chandra, N. (2010). Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human Health. *Pharmacognosy Review*, 4(8), 118-126.
- Mahabusarakam, W., Kiah, K., Wilairat, P., Taylor, W. (2006). Prenylated xanthenes as potential antiplasmodial substances. *Planta Médica*, 72, 912-916.
- Martinvalet, D., Zhu, P., Lieberman, J. (2005). Granzyme A induces caspase-independent mitochondrial damage, a required first step for apoptosis. *Immunity*, 22:355–70.
- Matés, J.M., Pérez-Gómez, C., Núñez de Castro, I. (1999). Antioxidant enzymes and human diseases. *Clinical Biochemistry*, 32, 595–603.
- Matés, J.M. (2000). Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. *Toxicology*, 153, 83-104.

- Molitoris, A.B. y Finn, F. (2001). *Acute Renal Failure: A companion to Brenner and Rector's The Kidney*. Philadelphia, Pennsylvania: Saunders.
- Morton, J. (1987). Mangosteen. En: J.F. Morton eds. *Fruits of warm climates*. Miami, FL: ISBN, 301-304. Disponible en: <http://screening.iarc.fr/colpo.php?lang=3> [Último acceso el 29 de Mayo de 2017].
- Nijhawan, D., Honarpour, N., Wang, X. (2000). Apoptosis in neural development and disease. *Annual Review of Neuroscience*, 23, 73–87.
- OMS. (2017a). Datos y cifras sobre el cáncer. [En Línea] (Actualizado 2017). Disponible en: <http://www.who.int/cancer/about/facts/es/> [Último acceso el 15 de Junio de 2017].
- OMS. (2017b). Temas de salud, cáncer. [En Línea] (Actualizado 2017). Disponible en: <http://www.who.int/topics/cancer/es/> [Último acceso el 10 de Abril de 2017].
- Osellame, L.D., Blacker, T., Duchon, M.R. (2012). Cellular and molecular mechanisms of mitochondrial function. *Best Practice & Research clinical Endocrinology & Metabolism*, 26, 7.
- Ozben, T. (2007) Oxidative stress and apoptosis: Impact on cancer therapy. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 96(9), 2181-2196.
- Padmanaban, A. (2016). RNA Quality Control Using the Agilent 2200 TapeStation System – Assessment of the RIN<sup>e</sup> Quality Metric. Application Note. *Agilent technologies*. [En Línea] (Actualizado Marzo 2016). Disponible en: <http://www.agilent.com/cs/library/applications/5991-0023EN.pdf> [Último acceso el 05 de Octubre de 2017].
- Patil, B., Jayaprakasha, G., Chidambara, K., Vikram, A. (2009). Bioactive compounds: historical perspectives, opportunities, and challenges. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(18), 8142–8160.
- 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(10), 3227-3239.

- Pérez-Rojas, J.M., Cruz, C., García-López, P., Sánchez-González D.J., Martínez-Martínez, C.M., Ceballos, G., *et al.* (2009). Renoprotection by  $\alpha$ -mangostin is related to the attenuation in renal oxidative/nitrosative stress induced by cisplatin nephrotoxicity. *Free Radical Research*, 43(11), 1122-1132.
- Pérez-Rojas, J.M., González-Macías, R., González-Cortés, J., Jurado, R., Pedraza-Chaverri, J., García-López, P. (2016). Synergic effect of  $\alpha$ -masgostin on the cytotoxicity of cisplatin in a cervival cáncer model. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016, 7981397.
- Rauf, A., Imran, M., Sileria, H.A.R., Ahmad, B. *et al.* (2017). A comprehensive review of the health perspectives of resveratrol. *Food and Function*, doi: 10.1039/c7fo01300k.
- Ross-Watson, R. y Preedy, V.R. (2013). Bioactive Compounds in Heart Disease. En: S. Batchu, K. Chaudhary, G. Wiebe, J. Seubert. *Bioactive Food as Dietary Interventions for Cardiovascular Disease*. University of Alberta, Canada: Academic Press, Cap. 28.
- Saikumar, P. y Venkatachalam M.A. (2009). Apoptosis and Cell Death. *Basic Concepts of Molecualr Pathology*, 4, 29-40.
- Sánchez-Pérez, Y., Morales-Bárcenas, R., García-Cuellar, C.M., López-Marure, R., *et al.* (2010). The alpha-mangostin prevention on cisplatin-induced apoptotic death in LLC-PK1 cells is associated to an inhibition of ROS production and p53 induction. *Chemico-Biological Interactions*, 188(1), 144-150.
- Savill, J., Fadok, V. (2000). Corpse clearance defines the meaning of cell death. *Nature*, 407(6805), 784-788.
- Schimmer, A.D. (2004). Inhibitor of apoptosis proteins: translating basic knowledge into clinical practice. *Cancer Research*, 64, 7183–7190.
- Schmid, W. (1855) Ueber das Mangostin. *Justus Liebigs Annalen der Chemie*, 93, 83-88.

- Schuler, M., Green, D.R. (2001). Mechanisms of p53-dependent apoptosis. *Biochemical Society Transactions*, 29, 684–688.
- Sears, C.R., Cooney, S.A., Chin-Sinex, H., Mendonca, M.S., Turchi, J.J. (2016). DNA damage response (DDR) pathway engagement in cisplatin radiosensitization of non-small cell lung cancer. *DNA Repair*, 40, 35–46.
- Secretaría de Salud. (2007). *Modificación a la Norma Oficial Mexicana NOM-014-SSA2-1994, Para la prevención, detección, diagnóstico, tratamiento, control y vigilancia epidemiológica del cáncer cérvico uterino*. [En línea] (Actualizado 31 de Mayo de 2007). Disponible en: <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/m014ssa294.pdf> [Último acceso el 13 de Febrero de 2017].
- Secretaría de Salud. (2010). IMSS-333-09. Diagnóstico y tratamiento del cáncer cervicouterino. [En línea] (Actualizado 2010). Disponible en: [http://www.cenetec.salud.gob.mx/descargas/gpc/CatalogoMaestro/433\\_GPC\\_Ca\\_cervicouterino/GER\\_Cxncer\\_cervicouterino.pdf](http://www.cenetec.salud.gob.mx/descargas/gpc/CatalogoMaestro/433_GPC_Ca_cervicouterino/GER_Cxncer_cervicouterino.pdf) [Último acceso el 09 Agosto 2017].
- Secretaría de Salud. (2011). GPC S-146-08. Prevención y detección oportuna del cáncer cérvico uterino en el primer nivel de atención. [En línea] (Actualizado Diciembre 2011). Disponible en: <http://www.imss.gob.mx/sites/all/statics/guiasclinicas/146GER.pdf> [Último acceso el 25 de Noviembre de 2016].
- Secretaría de Salud. (2015). Programa de Acción Específico Prevención y Control del Cáncer de la Mujer 2013-2018. Estadística de Cáncer de Mama y Cáncer Cérvico Uterino. [En línea] (Actualizado 08 de Septiembre de 2015). Disponible en: <http://www.gob.mx/salud/acciones-y-programas/informacion-estadistica> [Último acceso el 08 de Septiembre de 2016].
- Seiden, M. (2012). Tumores Ginecológicos. En: D. Longo, A. Fauci, D. Kasper, S. Hauser, J. Jameson y J. Loscalzo eds. *Harrison. Principios de medicina interna*. Volumen 1, 18ª edición. New York: McGRAW-HILL. 810-816.

- Sellors, J.W., Sankaranarayanan R. (2003). Introducción a la anatomía del cuello uterino. En: J.W. Sellors y R. Sankaranarayanan eds. *La colposcopia y el tratamiento de la neoplasia intraepitelial cervical: Manual para principiantes*. Lyon, Francia: IARC, 1-12. Disponible en: <http://screening.iarc.fr/colpo.php?lang=3> [Último acceso el 29 de Mayo de 2017].
- Shankaranaraya, D., Gopalakrishnan, C., Kameswaran, L. (1979). Pharmacological profile of mangostin and its derivatives. *Archives Internationales de Pharmacodynamie et de Thérapie*, 239(2), 257-269.
- Shan, T., Ma, Q., Guo, K., Liu, J., Li, W., Wang, F., Wu, E. (2011). Xanthones from Mangosteen Extracts as Natural Chemopreventive Agents: Potential Anticancer Drugs. *Current Molecular Medicine*, 11(8), 666-677.
- Shi, Y. (2002). Mechanisms of Caspase Activation and Inhibition during Apoptosis. *Molecular Cell*, 9, 459-470.
- Shibata, M.A., Iinuma, M., Morimoto, J., Kurose, H., et al. (2011).  $\alpha$ -Mangostin extracted from the pericarp of the mangosteen (*Garcinia mangostana* Linn) reduces tumor growth and lymph node metastasis in an immunocompetent xenograft model of metastatic mammary cancer carrying a p53 mutation. *BMC Medicine*, 9, 69.
- Siegel, R., Ma, J., Zou, Z., Jemal, A. (2014) Cancer statistics. *A Cancer Journal for clinicians*, 64, 9-29.
- Susin, S.A., Daugas, E., Ravagnan, L., Samejima, K., et al. (2000). Two distinct pathways leading to nuclear apoptosis. *The Journal of Experimental Medicine*, 192, 571–580.
- Tatti, S. (2008). Sección 1 Anatomía, citología e histología del cuello uterino, la vagina y la vulva normales y patológicos. Ecosistema vaginal. *Colposcopia y patologías del tracto genital inferior. En la era de la vacunación*. Buenos Aires: Editorial Medica Panamericana.

- Uchiyama, M., Iwasaka, T., Matsuo, N., Hachisuga, T., *et al.* (1997). Correlation between Human Papillomavirus Positivity and p53 Gene Overexpression in Adenocarcinoma of the Uterine Cervix. *Gynecologic Oncology*, 65, 23-29.
- van Loo, G., van Gurp, M., Depuydt, B., Srinivasula, S.M., Rodriguez, I., Alnemri E.S., *et al.* (2002). The serine protease Omi/HtrA2 is released from mitochondria during apoptosis. Omi interacts with caspase-inhibitor XIAP and induces enhanced caspase activity. *Cell Death & Differentiation*, 9, 20–26.
- Van Nooten, B.H. (1863). "Fleurs, Fruits et Feuillages Choisis de l'île de Java" Peints D'Après Nature" [Selected Flowers, Fruit and Foliage from the Island of Java] [En línea] (Actualizado 2006). Disponible en: <http://bibliodyssey.blogspot.mx/2006/07/fruits-of-java.html> [Último acceso 01 Septiembre 2017).
- Vaux, D.L., Cory, S., Adams J.M. (1988). Bcl2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature*, 335, 440–442.
- Wang, J.J., Zhang, W., Sanderson B. (2013). Altered mRNA Expression Related to the Apoptotic Effect of Three Xanthenes on Human Melanoma SK-MEL-28 Cell Line. *BioMed Research International*, 715603. <http://doi.org/10.1155/2013/715603>.
- Watanapokasin, R., Jarinthanan, F., Nakamura, Y., Sawasjirakij, N., Jaratrungtawe, A., Suksamrarn, S. (2011). Effects of  $\alpha$ -mangostin on apoptosis induction of human colon cancer. *World Journal of Gastroenterology*, 17(16), 2086-2095.
- Weecharangsan, W., Opanasopit, P., Sukma, M., Ngawhirunpat, T., Sotanaphun, U., Siripong, P. (2006). Antioxidative and Neuroprotective Activities of Extracts from the Fruit Hull of Mangosteen (*Garcinia mangostana* Linn.). *Medical Principles and Practice*, 15, 281-287.
- Won, Y.S., Lee, J.H., Kwon, S.J., Kim, J.Y., *et al.* (2014)  $\alpha$ -Mangostin induced apoptosis is mediated by estrogen receptor  $\alpha$  in human breast cancer cells. *Food and Chemical Toxicology*, 22, 246-251.

- Yang, E., Zha, J., Jockel, J., Boise, L.H., Thompson, C.B., Korsmeyer, S.J. (1995). Bad, a heterodimeric partner for BclXL and Bcl2, displaces Bax and promotes cell death. *Cell*, 80, 285–291.
- Yates, P., Stout, G.H. (1958). The Structure of Mangostin. *Journal of the American Chemical Society*, 80(7), 1691-1700.
- Zhang, K-j., Gu, Q-l., Yang, K., Ming, X-j., Wang, J-x. (2017). Anticarcinogenic Effects of  $\alpha$ -Mangostin: A Review. *Planta Medica*, 83(3-04), 188-202.