



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

XANTONAS COMO AGENTES COADYUVANTES EN EL TRATAMIENTO DEL CÁNCER DE
MAMA

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

L. N. LARA SOTELO GALIA

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. JANICE GARCÍA QUIROZ

FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

COMITÉ TUTOR: DRA. ROCÍO ÁNGELES GARCÍA BECERRA

FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

DR. ALFONSO LEÓN DEL RÍO

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

CD. MX., ENERO, 2020



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.

COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA

OFICIO CPCB/017/2020

ASUNTO: Oficio de Jurado

M. en C. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día **07 de octubre de 2019** se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** en el campo de conocimiento de **Biología Experimental** de la estudiante **LARA SOTELO GALIA** con número de cuenta **518002529** con la tesis titulada "**XANTONAS COMO AGENTES COADYUVANTES EN EL TRATAMIENTO DEL CÁNCER DE MAMA**", realizada bajo la dirección de la **DRA. JANICE GARCÍA QUIROZ**, quedando integrado de la siguiente manera:

Presidente: DRA. LORENZA DÍAZ NIETO
Vocal: DR. LUIS ARTURO BAIZA GUTMAN
Secretario: DR. ALFONSO LEÓN DEL RÍO
Suplente: DR. MARIANO MARTÍNEZ VÁZQUEZ
Suplente: DR. HERIBERTO PRADO GARCÍA

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 06 de enero de 2020

COORDINADOR DEL PROGRAMA



DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA



COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
UNIDAD DE POSGRADO

Edificio D, 1º Piso. Circuito de Posgrados, Ciudad Universitaria
Alcaldía Coyoacán. C. P. 04510 CDMX

Tel. (+5255)5623 7002 <http://pcbiol.posgrado.unam.mx/>

Agradecimientos

Al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada (CVU 736881).

A mi tutora la Dra. Janice García Quiroz.

A los miembros de mi comité tutorial, la Dra. Rocío Ángeles García Becerra y el Dr. Alfonso León Del Río.

Agradecimientos

A mis padres, Carmen y Gabriel, son mis pilares, nada sería posible sin ustedes y su inmenso amor hacia mí, su gran ejemplo me guía en todas las etapas de mi vida.

A mis abuelos, María y Cirilo, que siempre me motivan, espero se sientan orgullosos.

A mi tutora la Dra. Janice García, por su esfuerzo, dedicación, paciencia y todo el conocimiento, es para mí un ejemplo a seguir.

A todos los compañeros y excompañeros del laboratorio 1 del Departamento de Biología de la Reproducción del INCMNSZ, por el apoyo y los conocimientos, sobre todo a Ameyali, Adriana, Nohemí, Isela, Mariana, Yazmín, Tatiana, Gabriela, David y el Sr. Luis.

A los investigadores del Departamento de Biología de la Reproducción del INCMNSZ, la Dra. Lorenza Díaz Nieto y Dr. Euclides Avila Chávez por el conocimiento, observaciones y apoyo en el desarrollo del proyecto.

A la Dra. Mayel Chirinos y Dr. David Barrera, por su conocimiento y observaciones.

A la Dra. María de Jesús Ibarra Sánchez y al Dr. José Esparza López de la Red de Apoyo a la Investigación-UNAM por la donación de las células MBCDF y MBCDF-D5.

Al Dr. Heriberto Prado García del Departamento de Enfermedades Crónico-Degenerativas del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias por el conocimiento, observaciones y apoyo en el desarrollo del proyecto.

Al Dr. Fernando Larrea Gallo, jefe del Departamento de Biología de la Reproducción del INCMNSZ, por permitirme formar parte de este gran equipo.

A la Universidad Nacional Autónoma de México por abrirme las puertas al conocimiento y a sus aulas, me siento orgullosa de pertenecer a esta magna institución.

Dedicatoria:

A mis papas, los amo infinitamente, soy muy afortunada.

ÍNDICE

	Página
Abreviaturas	
Lista de tablas	
Lista de figuras	
Lista de fórmulas	
Resumen	1
Abstract	3
1 Introducción	5
1.1. Cáncer de mama	6
1.2. Incidencia y mortalidad del cáncer de mama	7
1.3. Clasificación anatómica del cáncer de mama	8
1.3.1. Carcinoma ductal	9
1.3.2. Carcinoma lobulillar	9
1.4. Clasificación molecular del cáncer de mama	9
1.4.1 Cáncer de mama luminal A	11
1.4.2 Cáncer de mama luminal B	11
1.4.3 Cáncer de mama triple negativo (TN)	11
1.4.4 Cáncer de mama HER-2/neu	12
1.5. Tratamiento del cáncer de mama	12
1.5.1. Tratamiento local	12
1.5.2. Tratamiento sistémico	13
1.5.2.1. Agentes quimioterapéuticos	13
1.5.2.1.1. 5-Fluorouracilo	14
1.6. Compuestos naturales como agentes adyuvantes de la quimioterapia convencional	17
1.6.1. Mangostán	17
1.6.2. Xantonas	18
1.6.3. α -mangostina y cáncer de mama	20
1.6.4. Xantonas en combinación con agentes antineoplásicos	22
2 Justificación	24
3 Hipótesis	25
4 Objetivos	26
5 Metodología	27
5.1. Reactivos	27

5.2.	Líneas celulares	27
5.3.	Estudios de proliferación	28
5.4.	Determinación de la toxicidad de la α -mangostina en células mononucleares de sangre periférica (PBMC).	29
5.5.	Determinación de las concentraciones inhibitorias (CI), del índice de combinación (IC) y de la fracción afectada (FA)	29
5.6	Análisis del ciclo celular	31
5.7.	Análisis estadístico	32
6	Resultados	33
6.1.	La α -mangostina inhibió la proliferación de manera dependiente de la concentración en las líneas celulares de cáncer de mama	33
6.2.	La α -mangostina no ejerce efectos citotóxicos en las PBMC	36
6.3.	El 5-fluorouracilo inhibió la proliferación del panel de líneas celulares de cáncer de mama	37
6.4.	El efecto antiproliferativo al combinar la α -mangostina con el 5-fluorouracilo fue mayor que la monoterapia	39
6.5.	Efecto de los tratamientos solos o en combinación en la distribución del ciclo celular	42
7	Discusión	46
8	Conclusión	52
9	Perspectivas	53
10	Literatura citada	54

Abreviaturas

BRCA1	Gen “ <i>breast cancer 1</i> ”
CDI	Carcinoma ductal invasivo
CDIS	Carcinoma ductal <i>in situ</i>
CI	Concentraciones inhibitorias
CI ₂₀	Concentración inhibitoria al 20%
CI ₅₀	Concentración inhibitoria al 50%
CK	Citoqueratina
CLI	Carcinoma lobulillar invasivo
CLIS	Carcinoma lobulillar <i>in situ</i>
C MAX	Concentración máxima
D.E.	Desviación estándar
DMAE	Degeneración macular asociada a la edad
EGFR	Receptor tipo 1 del factor de crecimiento epidérmico humano
EPEM	Extracto etanólico del pericarpio del mangostán
FA	Fracción afectada
FdUMP	Monofosfato de fluordesoxiuridina
FUdR	Fluordesoxiuridina
FUR	Fluorouridina
HER-2/neu	Receptor tipo 2 del factor de crecimiento epidérmico humano
IC	Índice de combinación
nm	Nanómetros
PBMC	Células mononucleares de sangre periférica
PHA	Fitohemaglutinina
PRPP	Fosforribosil pirofosfato
RE	Receptor de estrógenos
RP	Receptor de progesterona
RNS	Especies reactivas de nitrógeno
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SEM	Error estándar
SRB	Sulforrodamina B
T MAX	Tiempo máximo
TN	Triple negativo
TNF	Factor de necrosis tumoral
TTP	Trifosfato de timidina
UTP	Trifosfato de uridina

Lista de tablas

- Tabla 1** Clasificación molecular del cáncer de mama
- Tabla 2** Xantonas presentes en el jugo del mangostán
- Tabla 3** CI_{20} y CI_{50} de la α -mangostina en el panel de líneas celulares de cáncer de mama
- Tabla 4** CI_{20} y CI_{50} del 5-fluorouracilo en el panel de líneas celulares de cáncer de mama
- Tabla 5** Porcentaje de muerte celular al co-incubar α -mangostina y 5-fluorouracilo

Lista de figuras

- Figura 1** Características fundamentales del cáncer
- Figura 2** Incidencia y mortalidad de neoplasias en la población femenina a nivel mundial y en México
- Figura 3** Estructura del 5-fluorouracilo y de las pirimidinas
- Figura 4** Mecanismo de acción del 5-fluorouracilo
- Figura 5** Estructura química de algunas de las xantonas más abundantes aisladas del pericarpio del mangostán
- Figura 6** Curvas de concentración-respuesta de la α -mangostina en un panel de líneas celulares de cáncer de mama
- Figura 7** Efecto de la α -mangostina en la viabilidad de células mononucleares de sangre periférica (PBMC)
- Figura 8** Curvas de concentración-respuesta del 5-fluorouracilo en un panel de líneas celulares de cáncer de mama
- Figura 9** Efecto de la combinación de α -mangostina y 5-fluorouracilo en la proliferación de las líneas celulares de cáncer de mama
- Figura 10** Índice de combinación *versus* fracción afectada en líneas celulares de cáncer de mama expuestas a distintos esquemas de combinación entre α -mangostina y 5-fluorouracilo
- Figura 11** Efecto de la α -mangostina y/o 5-fluorouracilo en la distribución del ciclo celular en un panel representativo de diversos fenotipos de cáncer de mama. Efecto de la α -mangostina y/o 5-fluorouracilo en la distribución del ciclo celular de las líneas celulares T-47D y MBCDF.
- Figura 12** Efecto de la α -mangostina y/o 5-fluorouracilo en la distribución del ciclo celular de las líneas celulares T-47D y MBCDF.

Lista de fórmulas

- Fórmula 1.** Fórmula para determinar el índice de combinación.
- Fórmula 2.** Fórmula para determinar la fracción afectada.

Resumen

Introducción: El cáncer de mama es la neoplasia maligna más común en la población femenina en edad reproductiva y constituye la primera causa de defunción por enfermedad neoplásica. Si bien el 5-fluorouracilo es utilizado convencionalmente como agente quimioterapéutico para el tratamiento de esta neoplasia, ofrece beneficios limitados a las pacientes debido a la alta toxicidad y a la quimioresistencia adquirida. Por lo que resulta evidente la necesidad de desarrollar una estrategia terapéutica que permita incrementar los efectos farmacológicos y disminuir los efectos tóxicos de la quimioterapia; en concordancia, su combinación con compuestos naturales con actividad antineoplásica puede ser útil ya que causan pocos efectos secundarios no deseados. Estudios recientes han demostrado que la xantona α -mangostina, principal componente del mangostán, posee efectos antineoplásicos potentes entre los que se incluyen, promover apoptosis, inhibir la proliferación celular e inhibir metástasis. Por lo anterior, hipotetizamos que la α -mangostina puede inhibir la proliferación de células de cáncer de mama y a la vez sinergizar los efectos antineoplásicos del 5-fluorouracilo. **Objetivo:** Evaluar el efecto antiproliferativo *per se* de la α -mangostina, así como en combinación con el 5-fluorouracilo en un panel de líneas celulares de cáncer de mama con distinto perfil de expresión molecular. **Materiales y métodos:** Se utilizaron las células T-47D (receptor de estrógenos +, RE+), MBCDF (HER-2/neu +), SUM-229PE (triple negativo, TN), MBCDF-D5 (TN) y HCC-1806 (TN). El efecto antiproliferativo de la α -mangostina (0-8 μ M) y del 5-fluorouracilo (0-6 μ M) se evaluó mediante el ensayo de sulforrodamina B (SRB). Las concentraciones inhibitorias (CI) al 20% y 50% se calcularon a partir de las curvas de concentración-respuesta de cada compuesto mediante análisis de regresión logística no lineal, se llevaron a cabo estudios de combinación y se calculó el índice de combinación (IC). Mediante citometría de flujo se determinó el efecto de los tratamientos en la distribución del ciclo celular y se evaluó la toxicidad de la α -mangostina en células no neoplásicas mediante la

técnica de XTT. **Resultados:** La α -mangostina y el 5-fluorouracilo inhibieron la proliferación de las líneas celulares de cáncer de mama de manera dependiente de la concentración; interesantemente, el mayor efecto se observó en las células TN. Con base en las CI, se desarrollaron los estudios de combinación y se determinó el IC, el cual indicó sinergismo en la mayoría de las líneas celulares de cáncer de mama. En lo referente al ciclo celular, con los esquemas de combinación evaluados se observó muerte celular en mayor proporción que la monoterapia. Además, se determinó que la α -mangostina no ejerce efectos tóxicos en células no neoplásicas **Conclusión:** La α -mangostina puede ser un excelente candidato como tratamiento adyuvante de la quimioterapia convencional y ofrece una alternativa terapéutica plausible y aplicable para el manejo del cáncer de mama.

Abstract

Introduction: Breast cancer is the most common malignancy in the female population of reproductive age, it is the leading cause of death due to neoplastic disease. Although 5-fluorouracil is conventionally used as a chemotherapeutic agent for the treatment of this neoplasm, it offers limited benefits to patients due to high toxicity and acquired chemoresistance. Therefore, the need to develop a therapeutic strategy that increases the pharmacological effects and reduces the toxic effects of chemotherapy is evident; accordingly, their combination with natural compounds with antineoplastic activity may be useful since they cause few side effects. Recent studies have shown that the α -mangostin has potent antineoplastic effects, including promoting apoptosis, inhibiting cell proliferation and metastasis. Therefore, we hypothesize that α -mangostin can inhibit the proliferation of breast cancer cells and at the same time synergize the antineoplastic effects of 5-fluorouracil. **Objective:** To evaluate the antiproliferative effect of α -mangostin alone and in combination with 5-fluorouracil in a panel of breast cancer cell lines with different molecular profile. **Materials and methods:** T-47D (RE +), MBCDF (HER-2 / neu +), SUM-229PE (triple negative, TN), MBCDF-D5 (TN) and HCC-1806 (TN) cells were used. The antiproliferative effect of α -mangostin (0-8 μ M) and 5-fluorouracil (0-6 μ M) was assessed by the sulforhodamine B (SRB) assay. Inhibitory concentrations (IC) at 20% and 50% were calculated from the concentration-response curves of each compound by non-linear logistic regression analysis, combination studies were carried out and the combination index (CI) was calculated with the formula of Chou-Talalay. The effect of the treatments on the cell cycle distribution was determined by flow cytometry and the toxicity of α -mangostin in non-neoplastic cells was evaluated using the XTT technique. **Results:** The α -mangostin and 5-fluorouracil inhibited the proliferation of breast cancer cell lines in a dose-dependent manner; interestingly, the greatest effect was observed in the TN cells. The combination of α -mangostin and 5-fluorouracil was more effective to inhibit cell proliferation than the monotherapy and based on the CI the

antiproliferative effect in the most of the breast cancer cell lines was synergistic. Regarding the cell cycle, the combination of α -mangostin with 5-fluorouracil induced a higher percentage of cells in SubG1 phase when compared to monotherapy. In addition, it was determined that α -mangostin does not exert toxic effects in non-neoplastic cells **Conclusion:** The α -mangostin can be an excellent candidate for adjuvant treatment of conventional chemotherapy and offers a plausible and applicable therapeutic alternative for the management of breast cancer.

1. Introducción

El cáncer es una enfermedad heterogénea causada en gran parte por anomalías en el genoma y el epigenoma (Berdasco and Esteller, 2010), dichas anomalías conducen a las células a un cambio en su estructura, función y ciclo celular, lo que conlleva al desarrollo de células neoplásicas, las cuales comparten diferentes características fundamentales, como son: 1) autosuficiencia en las señales de crecimiento, 2) insensibilidad a las señales de anti-crecimiento, 3) evasión de la apoptosis, 4) promoción de la angiogénesis, 5) replicación ilimitada, 6) invasión de tejido y metástasis, 7) desregulación energética y 8) evasión del sistema inmunológico, además reconocen la promoción de la inflamación, e inestabilidad genómica y mutacional como características habilitadoras del entorno, las cuales conducen al desarrollo de estas características fundamentales (figura 1). La convergencia de estos procesos biológicos conlleva a la iniciación, promoción y progresión de enfermedades neoplásicas (Hanahan and Weinberg, 2011). Las enfermedades neoplásicas son de las primeras causas de muerte a nivel mundial y en el 2018 se le atribuyeron 9.55 millones de defunciones (Globocan, 2018, <https://gco.iarc.fr/>, fecha de consulta 17 de junio de 2019). De los diferentes tipos de cáncer, el de mama es la neoplasia maligna más común en la población femenina en edad reproductiva y constituye la primera causa de defunción por enfermedad neoplásica tanto en México como en el mundo (Knaul et al., 2009).



Figura1. Características fundamentales del cáncer. La célula pierde características propias de su tejido de origen, así como funciones básicas y desarrolla un microambiente favorecedor para la proliferación celular. Hanahan y Weinberg postulan que para que una neoplasia se desarrolle las células tienen que estimular su crecimiento, resistir a señales inhibitorias, evadir apoptosis, tener potencial replicativo ilimitado, poseer la capacidad de generar nuevos vasos sanguíneos, la habilidad de invadir y migrar a otros tejidos, promover un ambiente pro-inflamatorio, haber desarrollado una desregulación metabólica con aumento de la demanda de glucosa, tener una tasa de mutaciones superior al promedio y además deben de ser capaces de evadir al sistema inmunológico. Tales características son conocidas como características fundamentales del cáncer. Adaptado de: (Hanahan and Weinberg, 2011).

1.1. Cáncer de mama

El cáncer de mama ocurre cuando un grupo de células de la glándula mamaria crece descontroladamente e invade al tejido aledaño hasta formar un nódulo mamario o tumoración. La aparición de nódulos en la glándula mamaria se debe en gran porcentaje a condiciones benignas, siendo más frecuentes los fibroadenomas, los quistes mamarios, los lipomas, las placas fibrosas y la necrosis grasa; sin embargo, en algunos casos el nódulo palpable en la glándula mamaria es cáncer, capaz de invadir tejido y promover metástasis (Medina-Franco, 2012).

1.2. Incidencia y mortalidad del cáncer de mama

En nuestro país el 46% de las mujeres afectadas con cáncer de mama lo presentan antes de los 50 años. Esto contrasta con lo observado en Estados Unidos, donde la edad promedio en la que se presenta esta enfermedad es de 63 años y en países europeos, la mayor incidencia es en mujeres postmenopáusicas (Rodríguez-Cuevas et al., 2001).

De acuerdo a las estadísticas de Globocan 2018, a nivel mundial se registraron 2,088,849 nuevos casos de cáncer de mama y 626,676 defunciones (figura 2, panel superior). En México se reportaron 27,283 nuevos casos y 6,884 defunciones (figura 2, panel inferior) que representa una razón de mortalidad-incidencia del 25.23% (Globocan, 2018, <https://gco.iarc.fr/>, fecha de consulta 17 de junio de 2019). Si bien, la incidencia de cáncer de mama es mayor en países desarrollados, la mortalidad por dicho cáncer es más elevada en países en vías de desarrollo como México (de la Vara-Salazar et al., 2011). Lo anterior en comparación con lo observado en Estados Unidos, cuya incidencia fue de 232,714 nuevos casos y 43,909 defunciones con una razón mortalidad-incidencia de 18.5% (Globocan, 2018, <https://gco.iarc.fr/>, fecha de consulta 17 de junio de 2019).

Tanto la incidencia como la mortalidad por carcinoma mamario han mostrado a nivel mundial una tendencia creciente. En México, a partir del 2006 el riesgo de morir por cáncer de mama aumentó en comparación al riesgo de morir por cáncer cervicouterino, constituyendo la primera causa de defunción por enfermedad neoplásica en la población femenina en edad reproductiva (Knaul et al., 2009; de la Vara-Salazar et al., 2011).

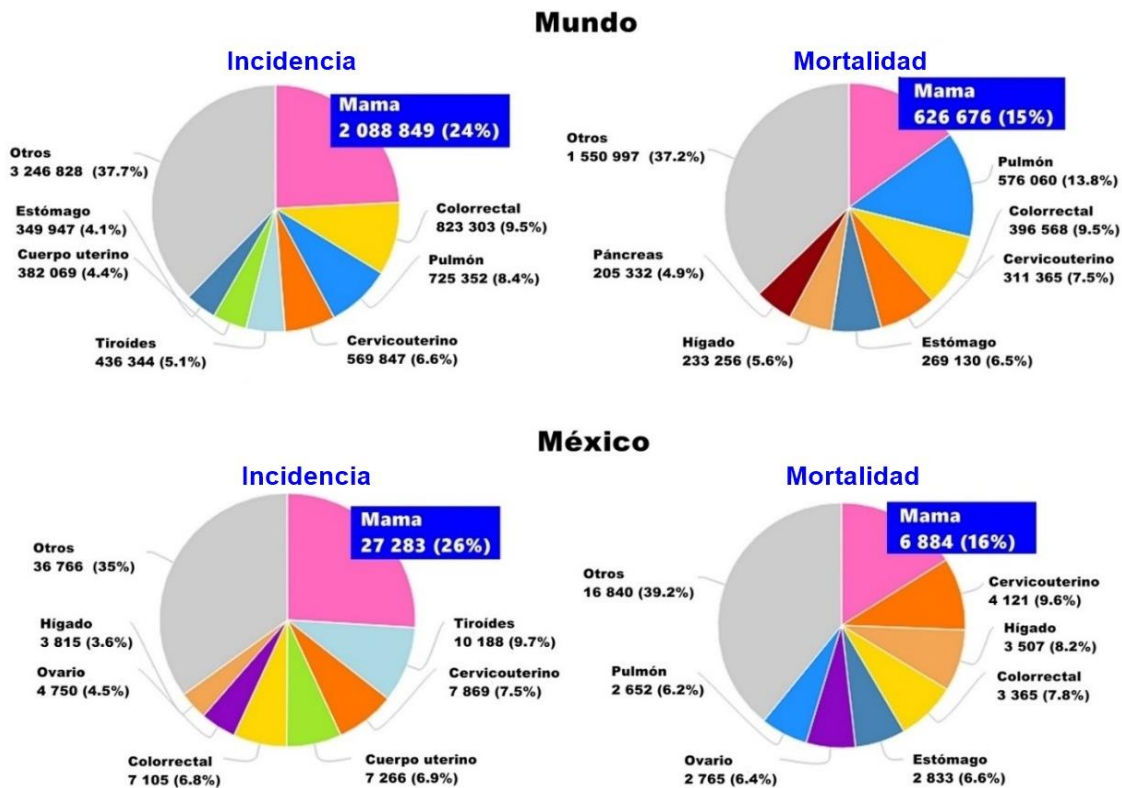


Figura 2. Incidencia y mortalidad de neoplasias en la población femenina a nivel mundial y en México. Entre paréntesis se indica el porcentaje de incidencia o mortalidad con respecto al total de neoplasias. El cáncer de mama se denota en color rosa. Adaptado de: Globocan, 2018, <https://gco.iarc.fr/>, fecha de consulta 17 de junio de 2019).

Una vez detectada la neoplasia, se determina el estadio clínico en el que ésta se encuentra con base en el tamaño del tumor, la invasión a ganglios y el número de metástasis; además, se establece la clasificación anatómica del cáncer de mama (Trujillo-Zamudio et al., 2006; Edge and Compton, 2010).

1.3. Clasificación anatómica del cáncer de mama

El cáncer de mama se clasifica de acuerdo a la región de la glándula mamaria que se ve afectada, en ductal o lobulillar (Bharat et al., 2009).

1.3.1. Carcinoma ductal

El carcinoma ductal es el más frecuente, representa aproximadamente el 80% de los casos de cáncer de mama y comienza en las células epiteliales de los conductos galactóforos, encargados de conducir la leche desde los lobulillos hasta el pezón. Este tipo de carcinoma puede ser ductal *in situ* o ductal invasivo (Brandan and Villaseñor-Navarro, 2006). El carcinoma ductal *in situ* (CDIS) se encuentra confinado a la capa basal y conforme avanza la neoplasia las células van perdiendo diferenciación, por lo que un CDIS de bajo grado (bien diferenciado) puede progresar a un CDIS de alto grado (13 al 15 %) (Hong et al., 2018), y este eventualmente se transformará en un CDIS con micro invasión y más tarde a carcinoma ductal invasivo (CDI) que ha invadido tejido próximo (Trujillo-Zamudio et al., 2006; Lee et al., 2012).

1.3.2. Carcinoma lobulillar

El carcinoma lobulillar es el segundo tipo de cáncer de mama más frecuente con una incidencia del 10% aproximadamente. Este tipo de cáncer se desarrolla en los lobulillos (encargados de la producción de la leche) y puede presentarse como carcinoma lobulillar *in situ* (CLIS), el cual se encuentra confinado a la membrana basal, o carcinoma lobulillar invasivo (CLI) que es el que ya invadió tejido aledaño (Lee et al., 2012).

Además de la clasificación anatómica se establece la clasificación molecular del cáncer de mama de acuerdo al perfil de expresión molecular que presentan las células neoplásicas.

1.4. Clasificación molecular del cáncer de mama

El análisis del perfil genético de una larga serie de tumores de mama estableció que existen principalmente cuatro diferentes tipos moleculares de esta neoplasia, donde la presencia de receptores hormonales ocupa un papel clave

para dicha clasificación (Sorlie et al., 2001; Zepeda-Castilla et al., 2008; Schnitt, 2010; Anderson et al., 2014; Esparza-Lopez et al., 2017).

Existen tumores de mama receptor de estrógenos positivo (RE+) y receptor de estrógenos negativo (RE-), como se muestra en la tabla 1. Los tumores RE+ tienen un patrón que concuerda con el componente epitelial luminal de la glándula mamaria, de donde deriva su nombre y dentro de los cuales se encuentran el cáncer de mama luminal A y luminal B. Dentro de los tumores RE- se encuentran los de tipo basal o triple negativo (TN) y aquellos positivos al receptor tipo 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER-2/neu) (Zepeda-Castilla et al., 2008).

Tabla 1. Clasificación molecular del cáncer de mama

	Subtipo	Inmunofenotipo
RE+	Luminal A	RE+, RP+, baja expresión de Ki-67 (<14%)
	Luminal B	Luminal HER-2/neu +: RE + y/o PR + y HER-2/neu + y bajo Ki67 (> 14%) Luminal HER-2/neu -: RE + y/o PR +, HER-2/neu – y alto Ki67 (< 14%)
RE-	Triple negativo	RE–, PR–, HER-2/neu –, y CK5/6 y/o EGFR+, disfunción de la vía BRCA1 y mutaciones en p53.
	HER-2/neu	RE-, RP-, HER-2/neu +

Dónde: Receptor de estrógenos (RE), receptor de progesterona (RP), receptor tipo 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER-2/neu), receptor tipo 1 del factor de crecimiento epidérmico humano (EGFR), Ki-67 (proteína que promueve proliferación celular), citoqueratina (CK), *breast cancer 1* (BRCA1, de sus siglas en inglés). Los símbolos + y – indican presencia o ausencia de la proteína, respectivamente. Existen 2 tipos de luminal B, uno con presencia de HER-2/neu y baja expresión de Ki-67, y el otro tipo carente de HER-2/neu y alta expresión de Ki-67 (Adaptado de Schnitt et al., 2010).

1.4.1. Cáncer de mama luminal A

El cáncer de mama luminal A es el más frecuente, corresponde al 67% de todos los tumores. Este tipo de cáncer muestra alta expresión de genes que codifican para el RE y receptor de progesterona (RP). No expresa al HER-2/neu y muestra baja expresión del marcador de proliferación Ki-67 (Zepeda-Castilla et al., 2008; Anderson et al., 2014; Kohler et al., 2015).

1.4.2. Cáncer de mama luminal B

Existen dos subtipos de tumores mamarios clasificados como luminal B, el primer subtipo expresa los marcadores moleculares de RE, RP y HER-2/neu. No obstante, la mayoría de estos tumores presenta bajos niveles de expresión de receptores hormonales, alta expresión de Ki-67 (< 14%) y sus células están poco diferenciadas; mientras que el segundo subtipo no expresa HER-2/neu, presenta bajos niveles de expresión de receptores hormonales y baja expresión de Ki-67 (> 14%) (Schnitt, 2010; Anderson et al., 2014; Kohler et al., 2015).

1.4.3. Cáncer de mama triple negativo (TN)

El cáncer de mama de tipo basal representa al 23% de los casos de cáncer de mama en México y es nombrado así debido a que tiene un patrón de expresión similar a las células epiteliales basales y microepiteliales normales del tejido mamario. También se conoce como triple negativo (TN) ya que no expresa genes que codifican para los RE, RP o al HER-2/neu. Este subtipo se asocia más con alta expresión de citoqueratinas 5/6 y 17, expresión del receptor tipo 1 del factor de crecimiento epidérmico humano (EGFR), tirosina cinasa del epitelio mamario (C-kit), factores de crecimiento de hepatocito e insulina, calponina 1, caveolina y laminina (Sorlie et al., 2001, Schnitt, 2010) . También presentan disfunción de la vía BRCA1 y mutaciones en p53 (Sorlie et al., 2001; Zepeda-Castilla et al., 2008; Anderson et al., 2014; Kohler et al., 2015). Este subtipo de cáncer de mama por

ser TN no es susceptible a tratamientos dirigidos convencionales; no obstante, presenta alta sensibilidad a la quimioterapia (Zepeda-Castilla et al., 2008).

1.4.4. Cáncer de mama HER-2/neu

Este subtipo de cáncer de mama sobre expresa los genes ERBB2 y GRB7, que codifican para el receptor HER-2/neu y para la proteína adaptadora 7 que interactúa con receptores tirosina cinasa. Este tipo de cáncer puede ser positivo o no al RE y sobre expresa al gen que codifica para Ki-67 (Anderson et al., 2014; Kohler et al., 2015)

Actualmente, el diagnóstico del cáncer de mama es cada vez más preciso, lo que permite seleccionar a las pacientes para uno u otro tratamiento basándose en el perfil de expresión molecular de cada tumor en particular.

1.5. Tratamiento del cáncer de mama

El tratamiento del cáncer de mama abarca procedimientos locales y sistémicos. Los locales son la cirugía y la radioterapia; mientras que la quimioterapia, la terapia inmunológica y la terapia hormonal constituyen los tratamientos sistémicos y se utilizan de forma complementaria a los métodos locales.

1.5.1. Tratamiento local

En los estadios tempranos del cáncer de mama, la cirugía es el tratamiento fundamental y asociado a la radioterapia pueden controlar la enfermedad en la mayoría de los casos (Imigo et al., 2011). Dependiendo del estadio de la neoplasia, la cirugía puede ser de tipo conservadora o radical (extirpación completa de la glándula mamaria). En lo que respecta a la radioterapia, ésta es crucial para pacientes con cáncer de mama a las que se les practicó cirugía conservadora y para aquellas con enfermedad metastásica (Chavarri-Guerra et al., 2012).

1.5.2. Tratamiento sistémico

El tratamiento sistémico puede ser de tipo hormonal y/o con agentes quimioterapéuticos. En lo referente al tratamiento hormonal, éste se basa en la expresión de receptores hormonales. Para el tratamiento del cáncer de mama RE+, el tamoxifeno y el fulvestrant son los fármacos más comunes y efectivos; sin embargo, en nuestro país solo el 57% de los tumores de mama expresan al RE, más del 50% de éstos pierden su expresión en tumores recurrentes y alrededor de un tercio de los tumores metastásicos RE+ desarrollan resistencia al tamoxifeno. Por otro lado, pacientes cuyos tumores sobre expresan al HER-2/neu responden eficazmente a la terapia con anticuerpos anti-HER-2/neu, como lo es el trastuzumab (Chavarri-Guerra et al., 2012).

Desafortunadamente en nuestro país, aproximadamente el 23% de las pacientes con cáncer de mama no expresan los receptores hormonales ni al receptor HER-2/neu, dichos tumores denominados triple negativos, son considerados agresivos, metastásicos, de pobre pronóstico y las opciones de tratamiento se limitan al uso de la quimioterapia (Cheang et al., 2008; Chavarri-Guerra et al., 2012).

1.5.2.1. Agentes quimioterapéuticos

La quimioterapia se refiere al tratamiento farmacológico de enfermedades neoplásicas a través de productos químicos, está indicada en pacientes de alto riesgo, cuando las neoplasias no son accesibles a la extirpación quirúrgica o cuando se encuentran diseminadas en forma de metástasis. Además, se administra como complemento de la terapia hormonal, de la terapia inmunológica, de la intervención quirúrgica y de la radioterapia con el objetivo de atacar las micrometástasis. La función de los agentes quimioterapéuticos es causar una lesión citotóxica letal que interfiera con las capacidades necesarias para el crecimiento y la progresión tumoral, impidiendo así la replicación de las células neoplásicas en cualquier parte del cuerpo. Lo ideal es que estos fármacos solo

interfieran con los procesos celulares únicos de las células malignas; sin embargo, la mayoría de los agentes quimioterapéuticos no reconocen de manera específica a las células neoplásicas, sino que más bien afectan todas las células del organismo que proliferan, tanto normales como anormales, limitando su uso dado sus efectos secundarios no deseados (Moo et al., 2018).

En el sistema de salud mexicano se utilizan principalmente dos esquemas de quimioterapia para combatir el cáncer de mama; el empleado por el Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), que administra 8 ciclos de politerapia, compuesta por 5-fluorouracilo, epirrubicina y ciclofosfamida. Mientras que el del Seguro Popular, se basa en el estándar internacional de 4 ciclos de 5-fluorouracilo, doxorubicina y ciclofosfamida, seguida de 12 dosis semanales de paclitaxel (Chavarri-Guerra et al., 2012). Con base en lo anterior, el 5-fluorouracilo es ampliamente utilizado para el tratamiento del cáncer de mama.

1.5.2.1.1. 5-Fluorouracilo

El 5-fluorouracilo es un análogo de las bases nitrogenadas timina y uracilo (figura 3), las cuales participan en la formación de los nucleótidos naturales timidilato y uridilato, respectivamente.

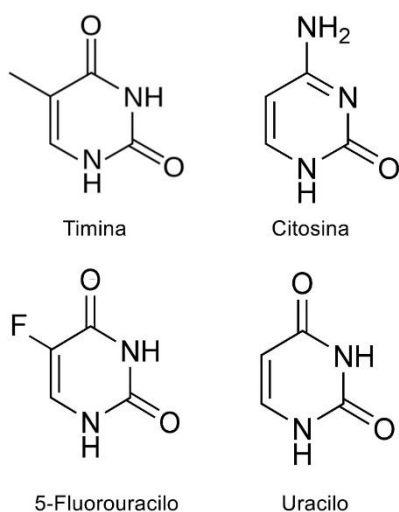


Figura 3. Estructura del 5-fluorouracilo y de las pirimidinas.

Las bases nitrogenadas timina, citosina y uracilo tienen como estructura base al anillo de pirimidina, por lo que son consideradas bases pirimidínicas. En lo referente al 5-fluorouracilo y con base en su estructura, este se clasifica como análogo de la timina y del uracilo, cuya diferencia es un átomo de flúor en la posición C5. El 5-fluorouracilo actúa como falso metabolito en la síntesis de nucleótidos pirimidínicos lo que genera ácidos nucleicos inestables. Adaptado de <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/f6627?lang=es®ion=MX>, fecha de acceso 06 de febrero del 2019.

Este agente quimioterapéutico actúa como falso nucleótido, promueve la formación de floxuridilato (trifosfato de floxuridina) y fluorodesoxiuridilato (trifosfato de fluorodesoxiuridina), nucleótidos no naturales que se incorporan en el RNA y DNA, generando ácidos nucleicos inestables; o bien, ejerce su efecto antineoplásico al inhibir la actividad de la enzima timidilato sintasa. El mecanismo de acción se describe en la Figura 4 (Brunton et al., 2006; Parker, 2009).

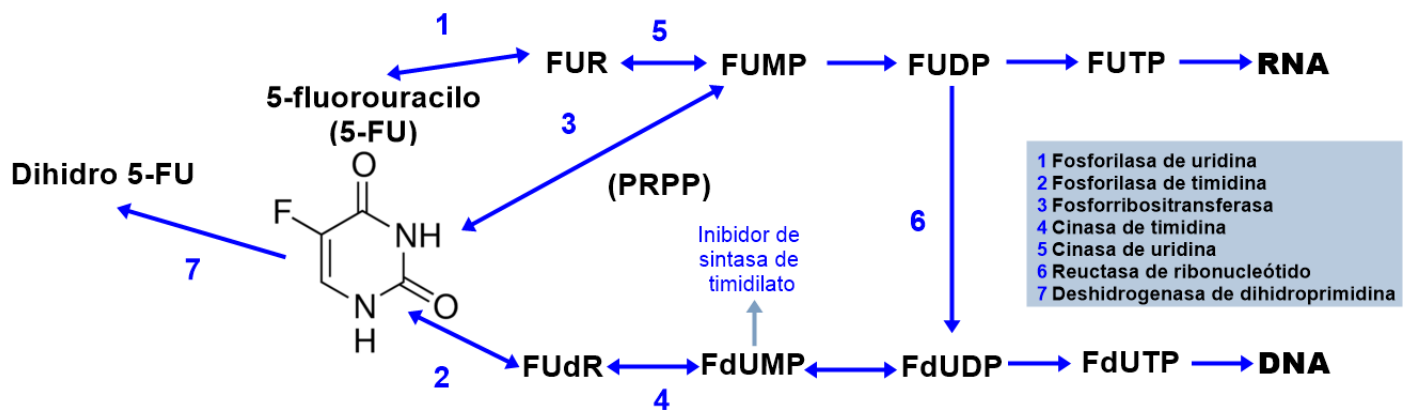


Figura 4. Mecanismo de acción del 5-fluorouracilo. El 5-fluorouracilo (5-FU) debe convertirse en el nucleótido correspondiente a fin de ejercer su actividad citotóxica. El 5-FU puede convertirse en fluorouridina (FUR) por la fosforilasa de uridina (1), y luego en monofosfato de floxuridina (FUMP) por la cinasa de uridina (5) o reaccionar directamente con el fosforribosil pirofosfato (PRPP) para formar FUMP, el cual se puede di o trifosfatar e incorporar en el RNA como falso trifosfato de uridina (UTP). El 5-FU también puede convertirse por la fosforilasa de timidina (2) en fluorodesoxiuridina (FUdR) y a continuación por la cinasa de timidina (4) en monofosfato de fluorodesoxiuridina (FdUMP), cuya interacción con la timidilato sintasa (TS) bloquea la síntesis de trifosfato de timidina (TTP), un constituyente necesario del DNA. Al parecer, la incorporación de fluorodesoxiuridilato, desoxiuridilato o ambos, en el DNA iniciará la acción del proceso de reparación, lo que puede dar por resultado la rotura de la cadena de DNA, ya que se requiere TTP, pero no hay como resultado de la inhibición de la TS. Adaptado de (Brunton et al., 2006).

Para el tratamiento del cáncer de mama, la dosis de 5-fluorouracilo es de 500-600 mg/m² de superficie corporal como bolo intravenoso y se repite cada 3-4 semanas según sea necesario y normalmente es de 6 ciclos (Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios, https://cima.aemps.es/cima/pdfs/es/ft/71868/71868_ft.pdf, fecha de consulta 12 julio de 2019). El 5-fluorouracilo exhibe efectos secundarios que afectan considerablemente la calidad de vida de las pacientes, los primeros síntomas indeseables se observan en el sistema gastrointestinal, e incluyen náuseas, vómitos, ulceraciones mucosas en la totalidad del tubo digestivo que pueden originar hemorragia gastrointestinal, mucositis, diarrea fulminante, choque y muerte. También el 5-fluorouracilo, exhibe acción mielosupresora que incluye neutropenia, trombocitopenia, leucopenia, agranulocitosis, pancitopenia y anemia, lo que incrementa el riesgo de padecer infecciones. Es muy frecuente observar alopecia, alteraciones en las uñas, dermatitis, así como aumento de la pigmentación y atrofia de la piel. Además, puede ocurrir el síndrome de eritrodisestesis palmo-plantar (síndrome mano-pie), que consiste en eritema, descamación, dolor y sensibilidad al tacto de las palmas de las manos y las plantas de los pies. Asimismo, se han publicado manifestaciones neurológicas, como síndrome cerebeloso agudo y mielopatía; o bien, pueden surgir trastornos cardíacos, en particular anomalías isquémicas en el electrocardiograma, angina de pecho como dolor torácico agudo, arritmias, infarto al miocardio, isquemia del miocardio, miocarditis, insuficiencia cardíaca, miocardiopatía dilatada y choque cardíaco principalmente, aumentando con ello la morbi-mortalidad del paciente. (Stein et al., 1995; Grem, 1997; Focaccetti et al., 2015) (Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios, https://cima.aemps.es/cima/pdfs/es/ft/71868/71868_ft.pdf, fecha de consulta 12 julio de 2019). Además de la alta toxicidad del 5-fluorouracilo, también se puede generar quimioresistencia, la cual es proporcional a la dosis y al tiempo de exposición al fármaco; los mecanismos mediante los cuales esto ocurre incluyen pérdida o disminución de la actividad de las enzimas necesarias para la activación

del fármaco, amplificación de la timidilato sintasa o mutación a una forma que no es inhibida por el monofosfato de fluorodesoxiuridina (Brunton et al., 2006).

La quimioterapia en general ha sido aplicada por muchos años; no obstante, ofrece beneficios limitados a las pacientes debido a la alta toxicidad y a la quimioresistencia adquirida; sin embargo, su uso es imprescindible, sobre todo en aquellas pacientes que no se benefician de una terapia dirigida.

Por otra parte, compuestos naturales con actividad antineoplásica pueden fungir como agentes coadyuvantes de la quimioterapia tradicional, con el fin de satisfacer una necesidad crítica referente a la toxicidad del tratamiento, así como de incrementar el efecto antineoplásico, disminuir las dosis y con ello los efectos secundarios y el desarrollo de resistencia.

1.6. Compuestos naturales como agentes adyuvantes de la quimioterapia convencional

Al respecto, muchas plantas tienen actividades biológicas interesantes con aplicaciones terapéuticas potenciales, como lo es el mangostán.

1.6.1. Mangostán

El mangostán (*Garcinia Mangostana Linn*), es un árbol cultivado en el bosque tropical de algunas naciones del Sureste de Asia cuya fruta, pericarpio, hojas y corteza han sido usadas como medicina tradicional por cientos de años para el tratamiento de artritis, cistitis, eczema, fiebre, dolor abdominal, estomatitis, diarrea, disentería, afecciones genito-urinarias, prurito, heridas infectadas, supuración y úlceras crónicas. Las xantonas el principal componente del mangostán han sido implicadas en tales efectos (Akao et al., 2008).

1.6.2. Xantonas

Las xantonas, una familia de polifenoles isoprenilados tricíclicos (figura 5) exhiben gran variedad de propiedades farmacológicas (Pedraza-Chaverri et al., 2008; Gutierrez-Orozco and Failla, 2013) como efectos antioxidantes (Marquez-Valadez et al., 2009; Pedraza-Chaverri et al., 2009), antialérgicos (Chairungrilerd et al., 1996), antivirales (Choi et al., 2014; Tarasuk et al., 2017), antifúngicos (Kaomongkolgit et al., 2009), antibacteriales (Linuma et al., 1996; Sivaranjani et al., 2017), antiinflamatorios (Bumrungpert et al., 2010; Gutierrez-Orozco et al., 2013) y anticancerígenos (Akao et al., 2008), tales propiedades se asocian con su estructura tricíclica, pero varían dependiendo de la naturaleza y/o posición de los diferentes sustituyentes (Akao et al., 2008; Pedraza-Chaverri et al., 2008). En la naturaleza han sido descritas 1000 xantonas y aproximadamente 55 de éstas se han aislado del pericarpio del mangostán; no obstante, las más abundantes son la α -mangostina, garcinona D, γ -mangostina, garcinona C, garcinona E, 1,6-dihidroxi-metoxi-dimetil-piranona, 8-deoxigartanina, gartanina, β -mangostina, y tovilifina B (tabla 2) (Pedraza-Chaverri et al., 2008, Chitchumroonchokchai et al., 2012). En particular la α -mangostina es la única xantona que se detecta en suero después de la ingesta de 60 mL de jugo del mangostán (Chitchumroonchokchai et al., 2012).

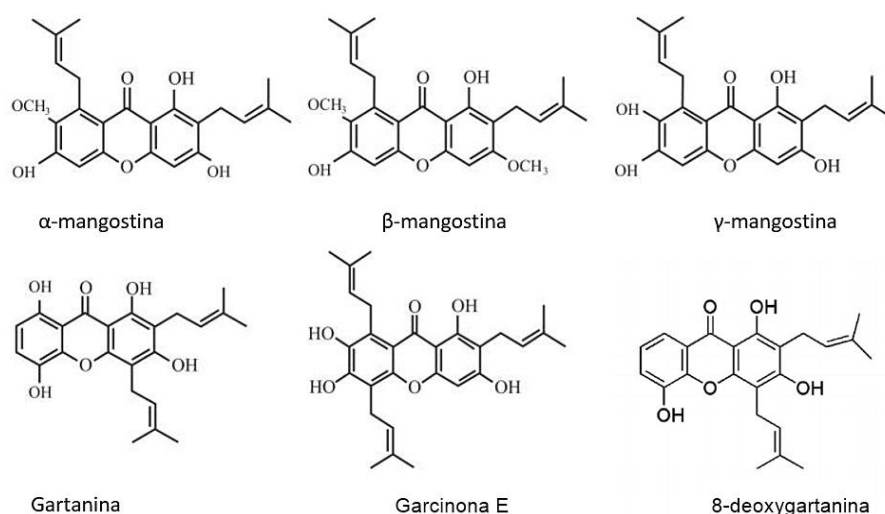


Figura 5. Estructura química de algunas de las xantonas más abundantes aisladas del pericarpio del mangostán. Adaptado de: (Shan et al., 2011).

Tabla 2. Xantonas presentes en el jugo del mangostán

Xantona	Abundancia (%)
α - mangostina	59.9
Garcinona D	10.2
γ - mangostina	6.5
Garcinona C	5.5
Garcinona E	5.1
1,6-dihidroxi-metoxi-dimetil-piranona	3.6
8-Deoxigartanina	3.1
Gartanina	2.8
β - mangostina	2.3
Tovofillin B	1.1

En la tabla se muestran algunas de las xantonas contenidas en el jugo del mangostán así como el porcentaje en el cual se encuentran presentes. Adaptado de: (Chitchumroonchokchai et al., 2012).

En lo referente al potencial antineoplásico de las xantonas, éste se ha observado en células de leucemia (Matsumoto et al., 2003), feocromocitoma (Sato et al., 2004), glioblastoma (Chao et al., 2011), osteosarcoma (Krajarng et al., 2012), melanoma (Xia et al., 2016), cáncer de colon (Nabandith et al., 2004), cáncer de próstata (Johnson et al., 2012), cáncer de páncreas (Lei et al., 2014; Verma et al., 2016; Kim et al., 2017), cáncer de pulmón (Phan et al., 2018), carcinoma hepatocelular (Ho et al., 2002), carcinoma epidermoide de boca (Fukuda et al., 2017), adenocarcinoma gástrico (Shan et al., 2014), cáncer de ovario (Ittiudomrak et al., 2019), cáncer cervicouterino (Perez-Rojas et al., 2016; El Habbash et al., 2017; Lee et al., 2017) y cáncer de mama (Moongkarndi et al., 2004; Shibata et al., 2011; Kurose et al., 2012; Scolamiero et al., 2018).

1.6.3. α -mangostina y cáncer de mama

En lo referente al cáncer de mama, existen múltiples estudios en los que se han evidenciado que la α -mangostina interviene en procesos implicados en la prevención del cáncer de mama, jugando un papel oncoprotector y antineoplásico. En células SK-BR-3 el extracto metanólico del pericarpio de la fruta del mangostán inhibe la proliferación celular de una manera dependiente de la concentración con una CI_{50} de $9.25 \pm 0.64 \mu\text{g/mL}$ (Moongkarndi et al., 2004). Jung y colaboradores en el 2006 determinaron que la α -mangostina ($CI_{50}=1 \mu\text{g/mL}$; $2.44 \mu\text{M}$) inhibe la formación de lesiones preneoplásicas de un cultivo de glándula mamaria de ratón inducidas por 7,12 dimetilbenzoantraceno (Jung et al., 2006). En las células BC-1 la α -mangostina ($CI_{50} = 0.92 \mu\text{g/mL}$; $2.24 \mu\text{M}$), exhibe el efecto citotóxico más potente, en comparación a otras xantonas e incluso la actividad citotóxica es mayor que el fármaco estándar elipticina ($CI_{50} = 1.46 \mu\text{g/mL}$) (Suksamrarn et al., 2006). En células BJMC3879 la α -mangostina inhibe la viabilidad celular de manera dependiente de la concentración (0-18 μM), incrementa el número de células en la fase G1, suprime el número de células en las fases S y G2/M y muestra un incremento significativo de células apoptóticas, lo cual se correlacionó con el incremento de la actividad de las caspasas 3, 9 y 8 (con 8 μM de α -mangostina) y una disminución en el potencial de membrana mitocondrial (Shibata et al., 2011). En células T-47D, la α -mangostina inhibe la proliferación celular, promueve la fragmentación del DNA, la condensación nuclear, el aumento de las caspasas 3 y 9, disfunción mitocondrial, liberación del citocromo C, disminución de la fosforilación del RE, HER-2/neu, PI3K, Akt y ERK1/2, y un aumento en la fosforilación de JNK1/2 y p38. Lo anterior indica que la α -mangostina induce apoptosis e inhibe la proliferación celular asociada con las vías de señalización de HER-2/neu/PI3K/Akt y MAPK (Kritsanawong et al., 2016). En las células MCF-7 (RE+) y MDA-MB-231 (RE-), la α -mangostina ($CI_{50}= 3.57 \mu\text{M}$ y $3.35 \mu\text{M}$, respectivamente) disminuye la viabilidad celular de manera dependiente de la

concentración a las 24 horas de tratamiento. Lo anterior se debe a que este fitofármaco suprime la expresión y actividad de la enzima ácido graso sintasa (FAS), la cual es requerida para la síntesis *de novo* de los ácidos grasos intracelulares, necesarios para múltiples procesos como la proliferación celular (Li et al., 2014). La α -mangostina también induce la apoptosis al incrementar los niveles del producto de escisión de poli ADP ribosa polimerasa (PARP) y aumentar la expresión de proteínas proapoptóticas de la familia Bcl-2 (Li et al., 2014; Kritsanawong et al., 2016). Por el contrario, Won y colaboradores mostraron que la línea celular MDA-MB-231 solo fue sensible a altas concentraciones de α -mangostina (10 μ M), por lo que sugieren que el RE es requerido para que la xantona inhiba el crecimiento celular (Won et al., 2014), lo cual difiere de lo observado por Li y colaboradores (Li et al., 2014). Particularmente, en células hormonodependientes (SK-BR-3), la α -mangostina ($CI_{50}=20.66 \mu$ M) inhibe el crecimiento celular al disminuir la actividad de la aromatasa, la cual es requerida para la síntesis de estrógenos y la vía principal para la proliferación de este fenotipo (Balunas et al., 2008). Considerando lo anterior, existe clara controversia con respecto al efecto antiproliferativo de las xantonas en células hormonodependientes y no hormonodependientes, lo cual necesita ser clarificado.

En lo referente a los estudios *in vivo*, el extracto de panaxantona (α -mangostina 75-85% y γ -mangostina 5-15%) a 2500 y 5000 ppm suprime el crecimiento tumoral y metástasis en ratones xenoinjertados con BJMC3879, línea celular altamente metastásica (Doi et al., 2009). Al xenoinjertar la línea celular modificada BJMC3879-Luc2 (altamente metastásica y con mutación en p53), la α -mangostina (10 mg/kg/día) administrada en la dieta, también disminuye el volumen tumoral así como el número de metástasis a nódulo linfático y pulmón (Shibata et al., 2011).

Por otra parte, estudios recientes han puntualizado que los fitoquímicos incluidos en los vegetales y frutas podrían modular la eficacia de fármacos antineoplásicos y el metabolismo de estos.

1.6.4. Xantonas en combinación con agentes antineoplásicos

Existen diversos estudios donde se ha probado la combinación de la α -mangostina con agentes antineoplásicos, concluyendo que la combinación inhibe en mayor medida la proliferación con respecto a la monoterapia.

Al respecto, la combinación de α -mangostina con agentes antineoplásicos inhiben la proliferación en mayor medida que la monoterapia en: células de cáncer de colon DLD-1 [α -mangostina (2.5 μ M) y 5-fluorouracilo (2.5 μ M)] (Akao et al., 2008), células de cáncer cervicouterino HeLa [α -mangostina (1.6 μ M) más cisplatino (1.3 μ M)] (Perez-Rojas et al., 2016), células de cáncer de páncreas MIA PaCa-2 [α -mangostina (8.71 μ M) más gemcitabina (28.95 μ M)](Kim et al., 2017), células de melanoma SK-MEL-2 [α -mangostina (8.14 μ M) y sorafenib (3.61 μ M)] y SK-MEL-30 [α -mangostina (7.78 μ M) y sorafenib (3.91 μ M)] (Xia et al., 2016).

Recientemente, Laksmiani publicó un estudio llevado a cabo en la línea celular MCF-7, donde combinó el extracto etanólico del pericarpio del mangostán (EPPM) con la doxorrubicina (agente quimioterapéutico para el tratamiento del cáncer de mama) y observó que dicha combinación mejoró el efecto antineoplásico del agente citotóxico. Cuando las células se trataron con doxorrubicina (750 nM) la viabilidad celular fue de ~94.89%, pero al combinarse con el EPPM (22.5 μ g/mL) disminuyó drásticamente hasta 16.91% (Laksmiani, 2019).

Es necesario establecer una nueva estrategia terapéutica que represente mayor probabilidad de éxito y menor frecuencia e intensidad de efectos secundarios no deseados. Las xantonas pudieran actuar como agentes coadyuvantes de la quimioterapia convencional, no obstante es necesario un análisis farmacológico que permita determinar la interacción entre estos

compuestos con la finalidad de discernir si el efecto en conjunto es de tipo sinérgico, aditivo o antagónico. En referencia al cáncer de mama, el uso *per se* de la xantonas en el tratamiento de esta neoplasia o en combinación con agentes quimioterapéuticos, puede ser de suma utilidad para el manejo de la enfermedad, no obstante, aún se requieren más estudios preclínicos y clínicos. Con base en lo anterior decidimos evaluar el efecto antineoplásico *per se* de la α -mangostina y en combinación con el agente quimioterapéutico 5-fluorouracilo en un panel completo de líneas celulares representativas de los diferentes fenotipos moleculares de cáncer de mama.

2. Justificación

El cáncer de mama representa un problema en materia de salud pública dado que ocupa el primer lugar en incidencia y mortalidad en la población femenina tanto en México como en el mundo y su tratamiento tiene altos costos. Con base en lo anterior, el cáncer de mama representa un desafío en materia de salud pública, por lo que resulta evidente la necesidad de desarrollar nuevas estrategias de prevención y de tratamiento. Si bien la quimioterapia ha sido utilizada por muchos años, esta ofrece beneficios limitados a las pacientes debido a la alta toxicidad; sin embargo, su uso es imprescindible sobre todo en aquellas pacientes que no se benefician de una terapia dirigida y su única opción de tratamiento es el uso de estos agentes citotóxicos. El desarrollo de una nueva estrategia terapéutica para el tratamiento del cáncer es una de las áreas más desafiantes en investigación; sin embargo, lo que se busca en la clínica es dar a las pacientes un coctel de medicamentos que permita incrementar el efecto antineoplásico, disminuir las dosis e incidir sobre diversas vías de supervivencia tumoral que podrían ser utilizadas por las células neoplásicas como opciones para escapar al tratamiento.

2. Hipótesis

La α -mangostina inhibirá la proliferación de células de cáncer de mama independientemente del fenotipo celular y sinergizará los efectos antineoplásicos del agente quimioterapéutico 5-fluorouracilo.

3. Objetivos

Objetivo general

Evaluar el efecto antineoplásico de la α -mangostina *per se* o en combinación con el 5-fluorouracilo en un panel de células de cáncer de mama con diferente perfil de expresión molecular.

Objetivos particulares

- Evaluar el efecto de la α -mangostina y del 5-fluorouracilo *per se* en la proliferación de las líneas celulares de cáncer de mama de T-47D (RE+), MBCDF (HER-2/neu), SUM-229PE (TN), MBCDF-D5 (TN) y HCC-1806 (TN).
- Determinar las concentraciones inhibitorias al 20% (CI₂₀) y 50% (CI₅₀) de cada compuesto para inhibir la proliferación celular.
- Determinar la citotoxicidad de la α -mangostina en células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de donadores sanos.
- Evaluar el efecto en conjunto de la α -mangostina con el 5-fluorouracilo en la proliferación celular.
- Determinar el tipo de interacción farmacológica entre la α -mangostina y el 5-fluorouracilo (efecto sinérgico, aditivo o antagónico).
- Evaluar el efecto de la α -mangostina sola o en combinación con el 5-fluorouracilo en la progresión del ciclo celular.

4. Metodología

A continuación, se describe la metodología utilizada para el desarrollo del presente proyecto.

5.1. Reactivos

Los medios de cultivo, suero fetal de bovino (SFB), Trizol® y los oligonucleótidos para la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR) se adquirieron de Invitrogen (Carlsbad, CA, EUA). Las sondas moleculares, placas, sistema de retrotranscripción (RT) y el kit de XTT (sal de 2,3-Bis (2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazolo-5-caboxanilida) de Roche (Roche Applied Science, Penzberg, UBA, DEU). Mientras que la α -mangostina y la sulforrodamina B (SRB) se obtuvieron de SIGMA-ALDRICH (St Louis, MO, EUA).

5.2. Líneas celulares

Los experimentos se llevaron a cabo en líneas celulares de cáncer de mama T-47D (RE+), MBCDF (HER-2neu), MBCDF-D5 (TN), HCC-1806 (TN) y SUM-229PE (TN). Las células T-47D, MBCDF, MBCDF-D5 y HCC-1806 se cultivaron en el medio RPMI y las células SUM-229PE en medio HAM'S-F12. Todos los medios se suplementaron con 100 U/ml de penicilina, 100 μ g/ml streptomycin y 5% de SFB inactivado; al medio de SUM-229PE, además, se le adicionaron 5 μ g/ml de insulina, 1 μ g/ml de hidrocortisona y HEPES (10 mM). Mientras que al medio de las células HCC-1806 además se le adicionó 2.5 mg/ml de glucosa, 1.5 mg/ml de bicarbonato, HEPES (100 mM) y piruvato de sodio (100 mM). El mantenimiento celular, así como los procedimientos experimentales se llevaron a cabo a 37°C bajo atmósfera húmeda, 5% de CO₂ y 95% de aire. Las células MBCDF y MBCDF-D5 fueron donadas por la Dra. María de Jesús Ibarra-Sánchez y el Dr. José Esparza-López del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán. Brevemente, el cultivo primario MBCDF se generó a partir de explantes obtenidos de una mastectomía radical de una paciente

diagnosticada con carcinoma ductal infiltrante en estadio IV con metástasis ósea (Esparza-López et al., 2013). De las células MBCDF se derivó una clona la cual se nombró MBCDF-D5 (Esparza-López et al., 2017). Las líneas celulares T-47D, HCC-1806 y SUM-229PE fueron adquiridas de ATCC (Manassas, VA, EUA).

5.3. Estudios de proliferación

Las células se sembraron en placas de 96 pozos a razón de 500-1000 células por pozo, 24 horas después se adicionó el medio de tratamiento (DMEM F12 con 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml streptomycin y 5% de SFB inactivado tratado con carbón dextrán) conteniendo el vehículo (DMSO), la α -mangostina (el intervalo de concentraciones evaluado en T-47D, MBCDF y SUM-229PE fue de 0.5 a 8µM, en MBCDF-D5 y HCC-1806 fue de 0.1 a 8µM) y el 5-fluorouracilo (el intervalo de concentraciones evaluado en T-47D y MBCDF fue de 0.1 a 6µM, en MBCDF-D5, HCC-1806 0.02-6µM y SUM-229PE fue de 0.02 a 6µM) o la combinación de ambos y se incubaron durante 6 días. Al cabo de este tiempo, la proliferación celular se evaluó mediante el ensayo colorimétrico basado en la SRB, que en condiciones ácidas se fija selectivamente a los aminoácidos básicos de las proteínas, proporcionando el índice del contenido de proteína celular. Brevemente, las células se fijaron con ácido tricloroacético (TCA) al 10% e incubaron por 1 hora a 4°C, posteriormente se realizaron tres lavados con 100 µl de agua y una vez secas las placas se adicionó la SRB (disuelta en ácido acético al 0.057%), e incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. El colorante sin unir se eliminó mediante tres lavados con ácido acético al 1%; mientras que el colorante unido a las proteínas se extrajo de las células viables por agitación con solución alcalina Tris base (10 mM, pH 10.5) (Skehan et al., 1990; Vichai and Kirtikara, 2006). La densidad óptica del colorante disuelto se leyó a 492 nm en un lector multimodal de microplacas (Synergy HT, BioTek, VT, EUA). Los valores de absorbancia se normalizaron con respecto al vehículo, al cual se le dio arbitrariamente el valor de 100.

5.4. Determinación de la toxicidad de la α -mangostina en células mononucleares de sangre periférica (PBMC)

Las PBMC provenientes de donadores sanos, se aislaron del resto de las células sanguíneas por centrifugación sobre gradiente de densidad Histopaque 1077 (SIGMA-ALDRICH), con previa separación del plasma. El paquete globular se diluyó con RPMI-1640 suplementado con 100 U/ml de penicilina, 100 μ g/ml streptomycin y 5% de SFB inactivado. Posteriormente, se centrifugó a 2200 rpm a temperatura ambiente por 30 minutos. Una vez recuperado el anillo de PBMC de la interfase las células se lavaron por centrifugación. Las células se sembraron en placas de 96 pozos a razón de 100,000 células/pozo, se adicionó el medio AIM-V (GIBCO-BRL) solo o conteniendo el vehículo de la α -mangostina (DMSO), la α -mangostina (1-8 μ M) y la fitohemaglutinina (PHA, 2.5 μ g/mL) durante 72 horas. Al cabo de este tiempo, la viabilidad celular se evaluó mediante el ensayo colorimétrico basado en XTT siguiendo las indicaciones del fabricante. La sal de tetrazolium, XTT, se usa para determinar la cantidad de células metabólicamente activas, que reflejan la proliferación celular. El ensayo se basa en la escisión del anillo de tetrazolium del XTT (de color amarillo) por la deshidrogenasa mitocondrial y el reactivo acoplador de electrones N-metildibenzopirazina metil sulfato (PMS) para formar la sal de formazán (de color naranja), la cual es soluble en solución acuosa y se cuantifica por absorbancia mediante un espectrofotómetro. Para estos experimentos, la absorbancia se determinó en un lector multimodal de microplacas (Synergy HT, BioTek, VT, EUA) a 492 nm. Los valores de absorbancia se normalizaron con respecto al control, al cual se le dio arbitrariamente el valor de 100.

5.5. Determinación de las concentraciones inhibitorias (CI), del índice de combinación (IC) y de la fracción afectada (FA)

Las CI se calcularon a partir de las curvas de concentración-respuesta de cada compuesto por el análisis de regresión logística no lineal utilizando el

programa Origin (OriginLab Corporation, Northampton, MA, EUA). La CI_{50} hace referencia a la concentración necesaria de cada compuesto para inhibir el 50 % de la proliferación celular con respecto al máximo y mínimo efecto, dentro del intervalo de concentraciones probadas.

El IC es una medida cuantitativa basada en la ley de acción de masas, para determinar el grado de interacción farmacológica entre dos o más fármacos, y determinar si existe sinergismo o antagonismo a partir del efecto medio. El IC entre los fármacos se determinó con la fórmula descrita por Chou-Talalay (fórmula 1) la cual indica que si el valor es < 1 , $= 1$ o > 1 , el efecto al co-incubar dos o más fármacos es de tipo sinérgico, aditivo o antagónico; respectivamente (Chou, 2006).

$$IC = \frac{(D)_1}{(Dm)_1 (fa/1-fa)^{1/m1}} + \frac{(D)_2}{(Dm)_2 (fa/1-fa)^{1/m2}}$$

Fórmula 1. Fórmula para determinar el índice de combinación. Donde, IC = índice de combinación, $(D)_1$ = concentración del fármaco 1, $(D)_2$ = concentración del fármaco 2, $(Dm)_1$ = concentración inhibitoria al 50 % del fármaco 1, $(Dm)_2$ = concentración inhibitoria al 50% del fármaco 2, fa = fracción afectada de la proliferación celular cuando se co-incuban los dos fármacos, m1 = pendiente obtenida con la curva de concentración respuesta del fármaco 1, m2 = pendiente obtenida con la curva de concentración respuesta del fármaco 2. Si el IC es < 1 , $= 1$ o > 1 , el efecto es de tipo sinérgico, aditivo o antagónico; respectivamente(Chou, 2006).

$$fa = 1 - \frac{\% \text{ proliferación}}{100}$$

Fórmula 2. Fórmula para determinar la fracción afectada. Donde fa = fracción afectada. Adaptado de (Chou, 2006).

La fracción afectada (fa) hace referencia a la población celular afectada por los fármacos, es decir que fracción de células entre el 0 y 1 no proliferó. Mientras más cercano sea el valor a 1, mayor será la fa, la cual se calcula a partir del porcentaje de proliferación, como se indica en la fórmula 2.

5.6. Análisis del ciclo celular

Las células se sembraron en cajas de 6 pozos a una razón de 30,000 a 70-000 células/pozo, 24 horas después se adicionó el medio conteniendo el vehículo, las CI₂₀ y CI₅₀ de ambos compuestos determinadas a partir de su efecto en la proliferación celular, así como los esquemas de combinación CI₅₀:CI₂₀ y CI₅₀:CI₅₀ de α -mangostina y 5-fluorouracilo, respectivamente. Después de 72 horas de tratamiento se colectaron las células, se lavaron con PBS, se fijaron en etanol al 70% v/v y se almacenaron a -20°C. Para la lectura en el citómetro, las muestras se lavaron dos veces con PBS (pH 7.2), se incubaron a temperatura ambiente durante 20 min protegidas de la luz en una solución que contenía: 4 μ L de 7-AAD (Biolegend, San Diego, CA, EUA) intercalante de DNA + 196 μ L de tritón (0.25%) por muestra. Finalmente, el contenido de DNA se determinó utilizando un citómetro de flujo FACSCanto II (Becton Dickinson, San José, CA, EUA) y los resultados se analizaron mediante el software FlowJo (LLC, Ashland, OR, EUA).

5.7. Análisis estadístico

La diferencia significativa se determinó mediante ANOVA de una vía seguido del post hoc Holm-Sidak para comparaciones múltiples y para comparaciones entre dos grupos se aplicó la prueba T de Student utilizando el programa SigmaStat versión 3.5 (Jandel Scientific, San José, CA, USA). Se consideró diferencia significativa con una $P < 0.05$.

6. Resultados

En primera instancia evaluamos el efecto *per se* de la α -mangostina en el panel de líneas celulares representativas de los fenotipos de cáncer de mama luminal B (T-47D), HER-2/neu (MBCDF) y triple negativo (MBCDF-D5, HCC-1806 y SUM-229PE).

6.1. La α -mangostina inhibió la proliferación de manera dependiente de la concentración en el panel de líneas celulares de cáncer de mama

Con la finalidad de determinar el efecto de la α -mangostina en la proliferación celular se realizaron curvas de concentración-respuesta del fitofármaco en las células T-47D, MBCDF, MBCDF-D5, HCC-1806 y SUM-229PE. Interesantemente, la α -mangostina inhibió la proliferación celular de manera significativa y dependiente de la concentración en todas las líneas celulares; no obstante, la potencia fue diferente, aunque no muy distante entre líneas celulares (figura 6). Aproximadamente a partir de la concentración de 6 μ M la α -mangostina inhibió el 100% de la proliferación de las líneas celulares MBCDF, MBCDF-D5, HCC-1806 y SUM-229PE; mientras que en las células T-47D lo hizo hasta 8 μ M. Con base en las curvas de concentración-respuesta se calcularon las CI_{20} y CI_{50} de la α -mangostina (tabla 3).

Tabla 3. CI_{20} y CI_{50} de la α -mangostina en el panel de líneas celulares de cáncer de mama

Línea celular	CI_{20} ($\mu\text{M} \pm \text{SEM}$)	CI_{50} ($\mu\text{M} \pm \text{SEM}$)
T-47D	2.70 \pm 0.11	4.36 \pm 0.17
MBCDF	4.67 \pm 0.24	5.23 \pm 0.19
MBCDF-D5	0.16 \pm 0.11	0.77 \pm 0.22
HCC-1806	1.87 \pm 0.20	2.59 \pm 0.17
SUM-229PE	2.39 \pm 0.12	3.13 \pm 0.09

Con base en las curvas de concentración-respuesta se determinaron las concentraciones inhibitorias al 20% (CI_{20}) y 50% (CI_{50}) de α -mangostina. $N \geq 3$ experimentos independientes con seis réplicas cada uno.

Basándonos en los valores de la CI_{50} , podemos concluir que las células con perfil de expresión molecular TN fueron las más sensibles al efecto antiproliferativo de la α -mangostina, seguido de las RE+ y finalmente las HER-2/neu: MBCDF-D5 > HCC-1806 > SUM-229PE > T-47D > MBCDF. Lo anterior pudiera deberse a las diferencias fenotípicas de las células, a los diversos mecanismos de acción de la α -mangostina o bien a los mecanismos que pudieran desarrollar las células como estrategia de escape a un tratamiento.

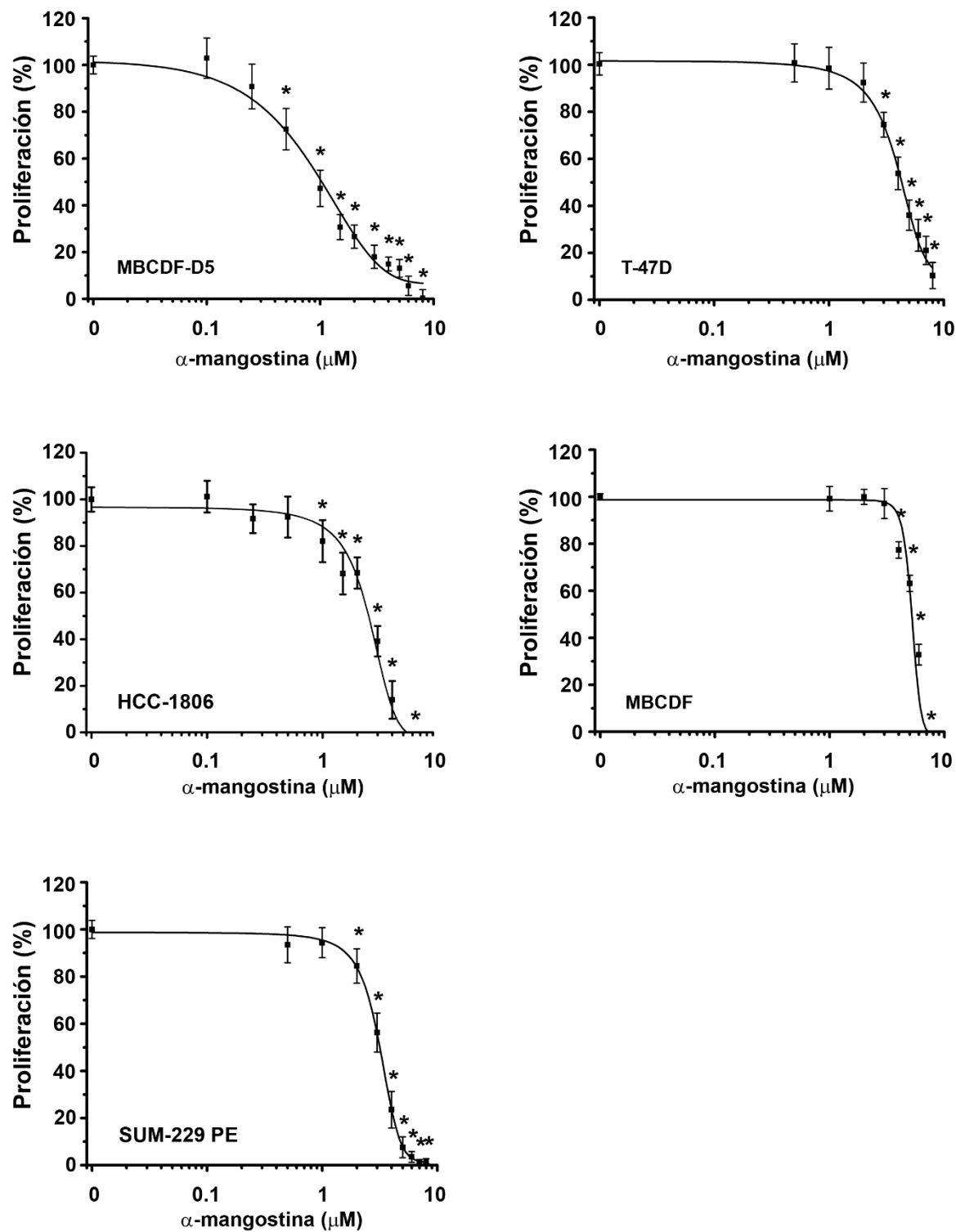


Figura 6. Curvas de concentración-respuesta de la α-mangostina en un panel de líneas celulares de cáncer de mama. La α-mangostina inhibió la proliferación celular de manera dependiente de la concentración en los distintos cultivos de cáncer mama. * $P < 0.05$ vs control. Los resultados se muestran como el promedio \pm SEM. $N \geq 3$ experimentos independientes con seis réplicas cada uno.

Debido al potente efecto antiproliferativo de la α -mangostina en células de cáncer de mama, decidimos evaluar su efecto en células no neoplásicas, con la finalidad de descartar efectos citotóxicos.

6.2. La α -mangostina no ejerce efectos citotóxicos en las PBMC

Con el objetivo de precisar si la α -mangostina exhibe efectos adversos en células no neoplásicas, se decidió evaluar su efecto en la toxicidad de las células PBMC. Dentro del intervalo de concentraciones probadas, la α -mangostina no afectó la viabilidad de las células PBMC, lo cual sugiere la baja toxicidad del compuesto (figura 7). Lo anterior es de suma relevancia, ya que para poder combinar el compuesto natural con el agente citotóxico 5-fluorouracilo, consideramos importante que la α -mangostina no afecte a las células del sistema inmunológico porque se exacerbarían los efectos tóxicos, debido a que este es uno de los principales efectos adversos del agente quimioterapéutico.

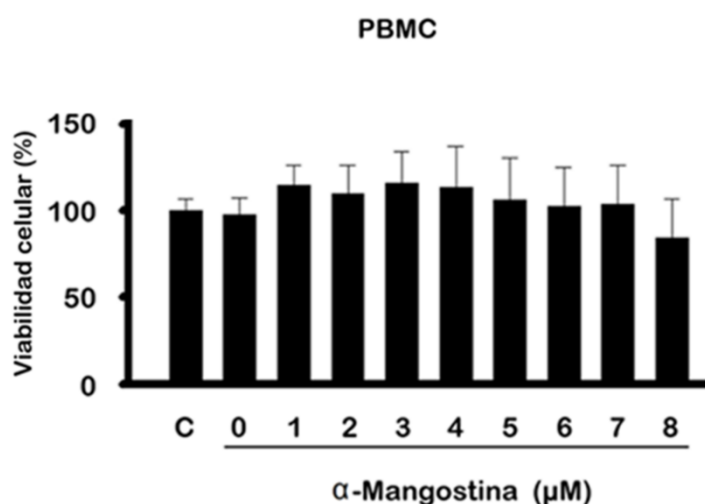


Figura 7. Efecto de la α -mangostina en la viabilidad de células mononucleares de sangre periférica (PBMC). Dentro del intervalo de concentraciones probadas, la α -mangostina (1-8 μ M) no afectó la viabilidad de las PBMC. Donde C=medio y 0=vehículo. Los resultados se muestran como el promedio \pm SEM de 3 experimentos independientes con tres réplicas por tratamiento.

Si bien se sabe que el 5-fluorouracilo exhibe actividad antineoplásica, fue necesario evaluar a manera de control su efecto en la proliferación del panel propuesto de líneas celulares de cáncer de mama.

6.3. El 5-fluorouracilo inhibió la proliferación del panel de líneas celulares de cáncer de mama

Curvas de concentración-respuesta del 5-fluorouracilo se llevaron a cabo en el panel de líneas celulares de cáncer de mama y se determinó que este agente inhibió la proliferación celular de manera significativa y dependiente de la concentración (figura 8). Con base en las curvas de concentración-respuesta se determinaron las CI_{20} y CI_{50} del compuesto (tabla 4).

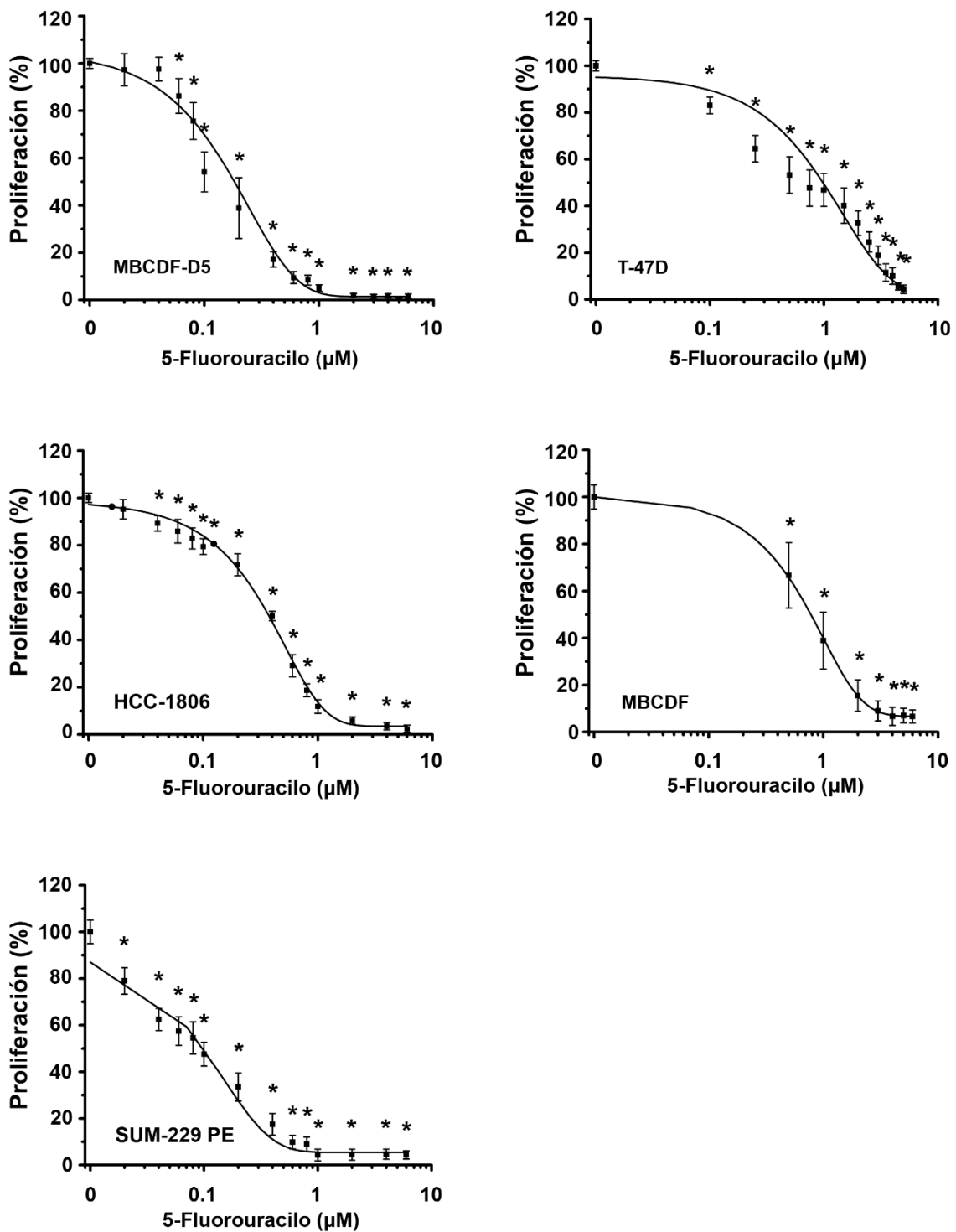


Figura 8. Curvas de concentración-respuesta del 5-fluorouracilo en un panel de líneas celulares de cáncer de mama. El 5-fluorouracilo inhibió la proliferación celular de manera dependiente de la concentración en las distintas líneas celulares de cáncer de mama. * $P < 0.05$ vs control. Los resultados se muestran como el promedio \pm SEM. $N \geq 3$ experimentos independientes con seis réplicas cada uno.

Tabla 4. CI_{20} y CI_{50} del 5-fluorouracilo en el panel de líneas celulares de cáncer de mama

Línea celular	CI_{20} ($\mu\text{M} \pm \text{D.E}$)	CI_{50} ($\mu\text{M} \pm \text{D.E}$)
T-47D	0.18 \pm 0.07	0.54 \pm 0.13
MBCDF	0.36 \pm 0.03	0.70 \pm 0.03
MBCDF-D5	0.07 \pm 0.01	0.15 \pm 0.01
HCC-1806	0.23 \pm 0.02	0.43 \pm 0.02
SUM-229PE	0.016 \pm 0.01	0.061 \pm 0.01

Con base en las curvas de concentración-respuesta se determinaron las concentraciones inhibitorias al 20% (CI_{20}) y (CI_{50}) del 5-fluorouracilo. $N \geq 3$ experimentos independientes con seis réplicas cada uno.

En referencia a la CI_{50} , se determinó que la sensibilidad de las células al 5-fluorouracilo fue la siguiente: SUM-229PE > MBCDF-D5 > HCC-1806 > T-47D > MBCDF. Al igual que con la α -mangostina, la sensibilidad celular al 5-fluorouracilo fue mayor en las células TN (lo cual es lo esperado), seguida de RE+, y finalmente las HER-2/neu.

6.4. El efecto antiproliferativo al combinar la α -mangostina con el 5-fluorouracilo fue mayor que la monoterapia

Para los estudios de combinación se establecieron los siguientes esquemas: $CI_{20}:CI_{20}$, $CI_{50}:CI_{20}$, $CI_{20}:CI_{50}$ y $CI_{50}:CI_{50}$ de α -mangostina y 5-fluorouracilo, respectivamente. La combinación de α -mangostina con 5-fluorouracilo mostró mayor efecto antiproliferativo y significativamente diferente con respecto a la monoterapia en todas las líneas celulares de cáncer de mama (figura 9).

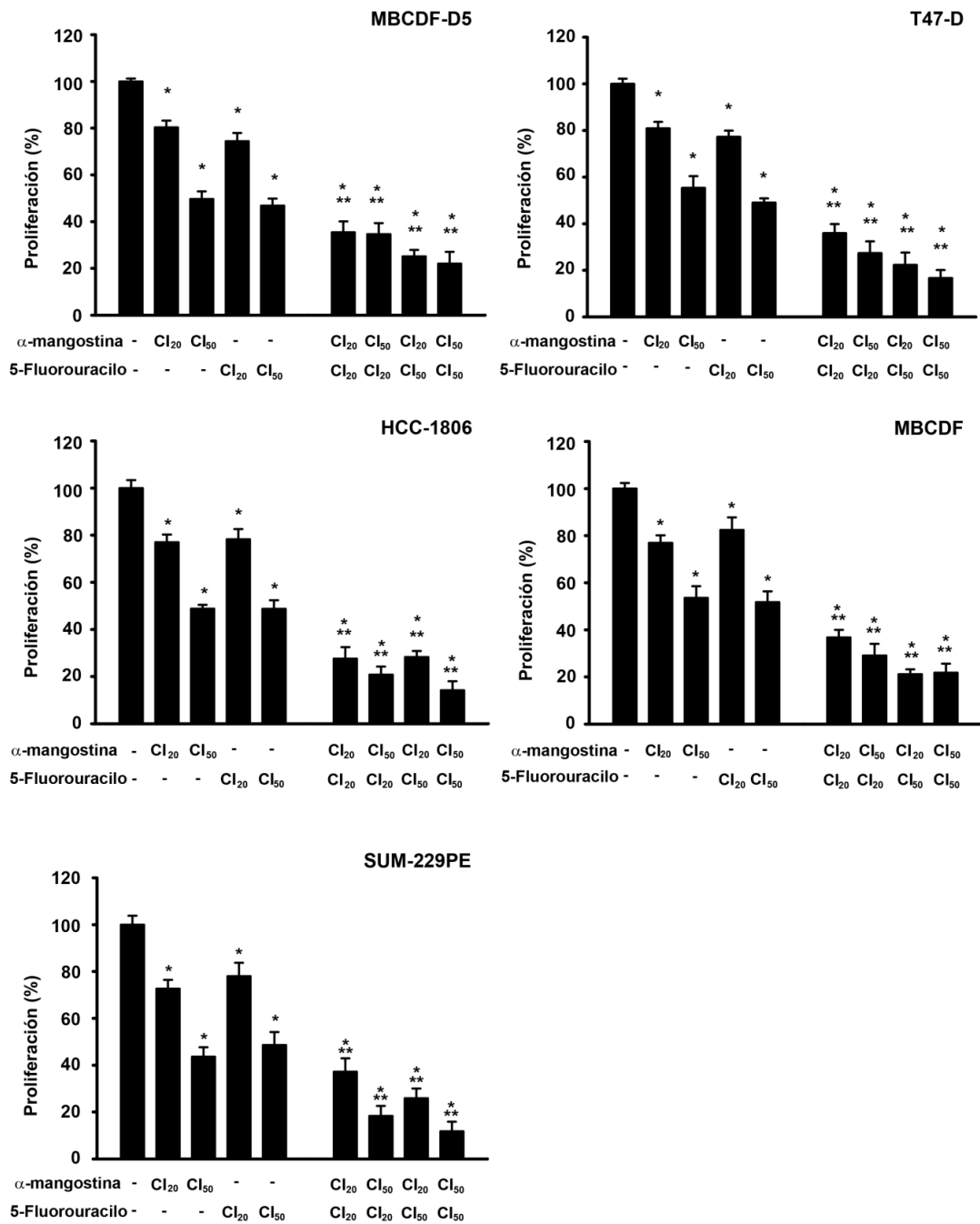


Figura 9. Efecto de la combinación de α -mangostina y 5-fluorouracilo en la proliferación de las líneas celulares de cáncer de mama. Se evaluó el efecto de las concentraciones inhibitorias al 20% (CI₂₀) y 50% (CI₅₀) de la α -mangostina y/o el 5-fluorouracilo en la proliferación de las líneas celulares de cáncer de mama, los resultados se muestran como el promedio \pm SEM., N \geq 3 experimentos independientes con seis réplicas cada uno. * P<0.05 vs vehículo (-), ** P<0.05 vs monoterapia.

La conclusión gráfica del efecto de la combinación entre α -mangostina y 5-fluorouracilo en términos de la naturaleza del efecto se visualiza en la figura 10, donde valores por debajo de la línea horizontal (IC <1) indican efecto sinérgico, sobre la línea efecto aditivo (IC=1) y por encima (IC>1) efecto antagónico (Chou, 2006). Entre más cercano sea el valor del IC a 0 mayor es el sinergismo y entre más cercano sea el valor de la FA a 1, mejor será el efecto de la combinación. En términos de IC, el mayor efecto sinérgico se observó en la línea celular MBCDF-D5 (figura 10, símbolos de color verde), seguido de T-47D (figura 10, símbolos de color azul), SUM-229PE (figura 10, símbolos de color rojo) y HCC1806 (figura 10, símbolos de color rosa).

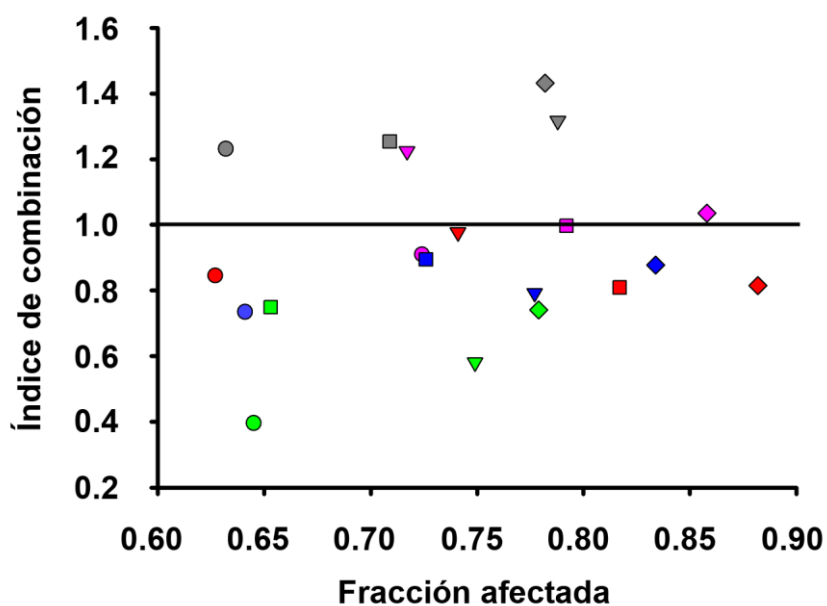


Figura 10. Índice de combinación versus fracción afectada en líneas celulares de cáncer de mama expuestas a distintos esquemas de combinación entre α -mangostina y 5-fluorouracilo. En las líneas celulares T-47D (azul), MBCDF (gris), MBCDF-D5 (verde), HCC-1806 (rosa) y SUM-229PE (rojo), se determinó el índice de combinación y la fracción afectada al co-incubar las concentraciones inhibitorias al 20% (CI₂₀) y/o al 50% (CI₅₀) de α -mangostina y 5-fluorouracilo. Los esquemas de combinación evaluados fueron los siguientes: CI₂₀:CI₂₀ (●), CI₅₀:CI₂₀ (■), CI₂₀:CI₅₀ (▼) y CI₅₀:CI₅₀ (◆) entre α -mangostina y 5-fluorouracilo; respectivamente. Los puntos por debajo de la línea horizontal indican efecto sinérgico, en la línea efecto aditivo y por arriba de ésta efecto antagónico. Valores de fracción afectada más cercanos al 1 indican mayor efecto de la combinación. N \geq 3 experimentos independientes con seis réplicas cada uno

Si bien la naturaleza del efecto al combinar α -mangostina con el 5-fluorouracilo en la línea celular MBCDF fue de tipo antagónico, el efecto antiproliferativo fue mayor que el observado con la monoterapia.

De manera general, el sinergismo fue más intenso cuando se utilizó una menor concentración de 5-fluorouracilo; es decir, cuando se combinó la CI_{20} del 5-fluorouracilo ya sea con la CI_{20} o CI_{50} del fitofármaco. Para llevar a cabo los estudios de ciclo celular tomamos en cuenta que lo que buscamos es disminuir las concentraciones del fármaco quimioterapéutico debido a sus fuertes efectos secundarios por lo que evaluamos únicamente esquemas de combinación con alta concentración del fitofármaco.

6.5. Efecto de los tratamientos solos o en combinación en la distribución del ciclo celular

Para dilucidar parte del mecanismo antineoplásico de la α -mangostina sola o en combinación con el 5-fluorouracilo nos planteamos determinar el efecto de los tratamientos en la distribución del ciclo celular, para lo cual probamos los esquemas de combinación de $CI_{50}:CI_{20}$ y $CI_{50}:CI_{50}$ de α -mangostina y 5-fluorouracilo, respectivamente, cuyos resultados se muestran en la figura 11. La α -mangostina a las CI_{20} y CI_{50} promovió de manera dependiente de la concentración la muerte celular, lo cual se evidenció con el aumento en el porcentaje de células en la fase Sub G1, aunque solo hubo diferencia significativa en la línea celular T-47D a la respectiva CI_{50} . Por otra parte, el 5-fluorouracilo (CI_{50}) solo incrementó el porcentaje de células en fase SubG1 en las células SUM-229PE, lo cual concuerda con los estudios de proliferación celular, ya que esta línea celular es la más sensible al agente citotóxico. En la figura 12 se muestran los histogramas representativos del efecto de los tratamientos en la distribución del ciclo celular en las células características de los fenotipos luminal (T-47D), Her-2/neu (MBCDF) y triple negativo (MBCDF-D5). Al combinar α -mangostina y 5-fluorouracilo, el porcentaje de células en la fase SubG1 fue

significativamente mayor *versus* el control y la monoterapia en las células SUM-229PE y MBCDF. El incremento en la concentración del 5-fluorouracilo en los esquemas de combinación no promovió mayor muerte en las líneas celulares previamente mencionadas. El efecto de las combinaciones en las células MBCDF-D5, HCC-1806 y T-47D no fue significativamente diferente de la monoterapia, prácticamente el efecto fue similar al de la α -mangostina. En general no se observaron cambios en las distintas fases del ciclo celular en las líneas celulares, a excepción de MBCDF, donde la incubación con el agente quimioterapéutico mostro una tendencia a aumentar el porcentaje de células en la fase S. y en la tabla 5 se muestra el porcentaje de muerte celular (células en SubG1) con α -mangostina, 5-fluorouracilo y sus combinaciones.

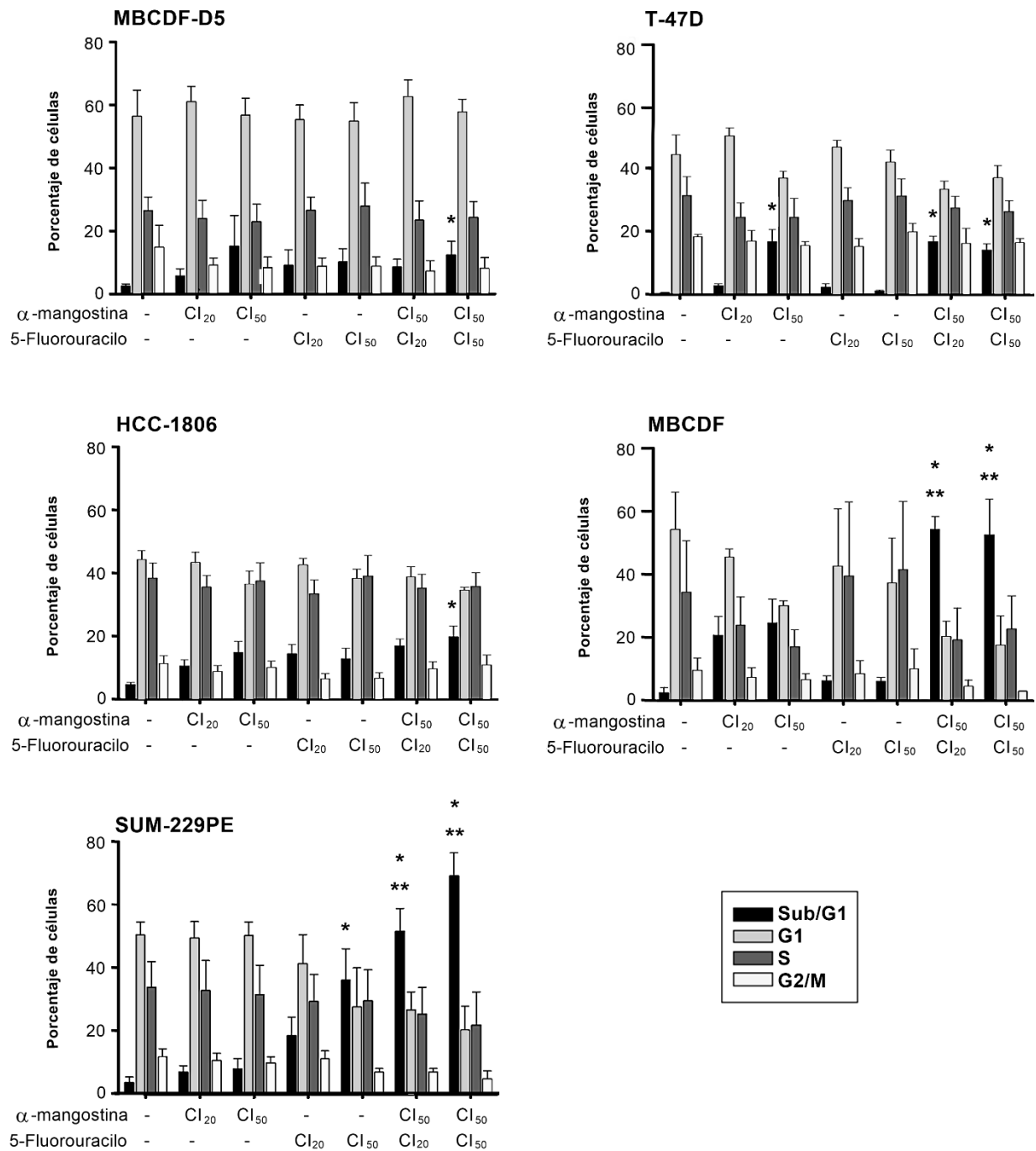


Figura 11. Efecto de la α -mangostina y/o 5-fluorouracilo en la distribución del ciclo celular en un panel representativo de diversos fenotipos de cáncer de mama. Se evaluó el efecto de las concentraciones inhibitorias al 20% (Cl₂₀) y 50% (Cl₅₀) de la α -mangostina y/o el 5-fluorouracilo en la distribución del ciclo celular. Los resultados se muestran como el promedio \pm SEM, N \geq 4 experimentos. * $P < 0.05$ vs control (-), ** $P < 0.05$ vs monoterapia.

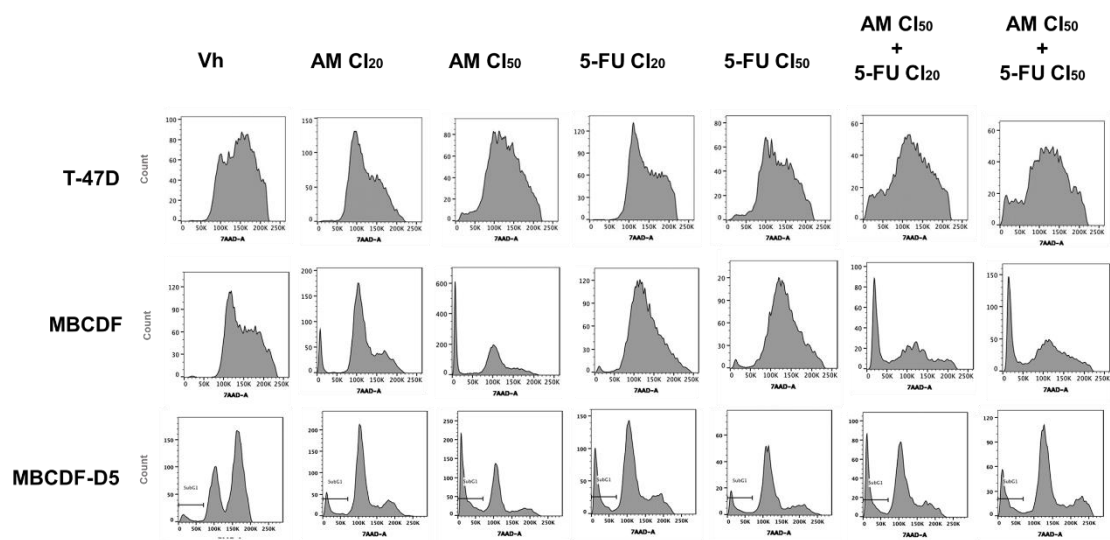


Figura 12. Efecto de la α -mangostina y/o 5-fluorouracilo en la distribución del ciclo celular de las líneas celulares T-47D (RE+), MBCDF (HER-2/neu+) y MBCDF-D5 (TN). Se evaluó el efecto de las concentraciones inhibitorias al 20% (Cl₂₀) y 50% (Cl₅₀) de la α -mangostina y/o el 5-fluorouracilo en la distribución del ciclo celular.

Tabla 5. Porcentaje de muerte celular al co-incubar α -mangostina y 5-fluorouracilo

TRATAMIENTO	Línea celular (% de muerte celular)				
	T-47D	MBCDF	MBCDF-D5	HCC-1806	SUM-229PE
VH	0.74 ± 0.17	2.60 ± 1.63	2.52 ± 0.69	4.81 ± 0.62	3.66 ± 1.72
AM Cl ₂₀	3.14 ± 0.58	20.80 ± 5.94	5.76 ± 2.26	10.7 ± 1.89	6.98 ± 1.98
AM Cl ₅₀	17.62 ± 3.88	24.71 ± 7.44	15.19 ± 9.73	15.07 ± 3.45	7.91 ± 3.22
5FU Cl ₂₀	2.65 ± 1.13	6.37 ± 1.54	9.10 ± 4.82	14.63 ± 2.10	18.50 ± 5.75
5FU Cl ₅₀	1.34 ± 0.39	6.16 ± 1.20	10.18 ± 4.22	13.04 ± 3.30	35.93 ± 9.50 *
AM Cl ₅₀ + 5FU Cl ₂₀	17.63 ± 1.66 *	54.15 ± 4.17^{*,**}	8.59 ± 2.39	17.12 ± 2.17	51.43 ± 7.11^{*,**}
AM Cl ₅₀ + 5FU Cl ₅₀	14.87 ± 2.00*	52.48 ± 11.17^{*,**}	12.37 ± 4.35 *	20.05 ± 3.38*	68.83 ± 7.26^{*,**}

Porcentaje de células en la fase sub G1 con las concentraciones inhibitorias al 20% (Cl₂₀) y/o 50% (Cl₅₀) de la α -mangostina (AM) y del 5-fluorouracilo (5-FU). Vh=vehículo, N≥4 experimentos. En negritas se resaltan los esquemas de tratamiento donde hubo diferencia significativa, * $P < 0.05$ vs Vh, ** * $P < 0.05$ vs monoterapia.

7. Discusión

Dada la heterogeneidad del cáncer de mama y con la finalidad de apegarnos a lo observado en la clínica, decidimos utilizar para este estudio líneas celulares con diferentes perfiles de expresión molecular, con características representativas de los fenotipos moleculares del cáncer de mama, luminal B (T-47D), HER-2/neu (MBCDF) y TN (MBCDF-D5, HCC-1806 y SUM-229PE). Se hizo énfasis en las líneas celulares TN, ya que los tumores mamarios con esta firma molecular son los más agresivos, cursan con peor pronóstico y su única opción de tratamiento es la quimioterapia, aunado a que la población mexicana presenta alta incidencia de este tipo de cáncer en comparación al resto del mundo (Chavarri-Guerra et al., 2012).

En primera instancia evaluamos el efecto de la α -mangostina en la proliferación celular del panel de líneas celulares mencionadas. Si bien existen diversos estudios que describen el efecto antineoplásico de la α -mangostina en cáncer de mama, hay discrepancia con respecto a la potencia de la xantona en los fenotipos RE+ y RE-. Al respecto, Won y colaboradores mostraron que la α -mangostina inhibe la proliferación de las células MCF-7 (RE+); mientras que las MDA-MB-231 (RE-) solo fueron ligeramente sensibles a concentraciones elevadas del fitofármaco (10 μ M), por lo que se concluyó que el RE es requerido para que la xantona inhiba el crecimiento celular (Won et al., 2014). Por el contrario Li y colaboradores describieron que no hay diferencia en la potencia de α -mangostina para inhibir la proliferación de MCF-7 y MDA-MB-231, cuyos valores de CI_{50} fueron muy similares 2.71 y 2.6 μ M, respectivamente (Li et al., 2014). Lo anterior también lo tomamos como base para ampliar el panel de líneas celulares y así determinar si el efecto es independientemente del perfil de expresión de receptores hormonales o receptores a factores de crecimiento. Particularmente, en este estudio observamos que la α -mangostina inhibió el crecimiento celular en todos los fenotipos, de manera significativa y dependiente de la concentración. La sensibilidad al compuesto fue la siguiente: MBCDF-D5 > HCC-1806 > SUM-229PE

> T-47D > MBCDF. Interesantemente, en el fenotipo TN se observó el mayor efecto del fitofármaco, lo cual puede deberse, además de otros mecanismos, a que estas células tienen mayor sensibilidad al estrés oxidativo debido a los defectos en las vías de respuesta al daño en el DNA que resulta en inestabilidad del genoma y que si bien en un principio esto conduce a carcinogénesis, también puede llevar a catástrofe mitótica (Alli et al., 2009). En concordancia con lo anterior, la α -mangostina es capaz de aumentar la presencia de especies reactivas de oxígeno (ROS) y de especies reactivas de nitrógeno (RNS) lo que conduce a la muerte de células transformadas (Akao et al., 2008).

Lo ideal es que el tratamiento antineoplásico solo interfiera con los procesos de las células malignas y no afecte a las células normales. Dado el fuerte efecto inhibitorio de la proliferación por parte de la α -mangostina en células neoplásicas, decidimos evaluar su efecto en PBMC, con la finalidad de determinar su toxicidad en células no neoplásicas. Con base en los estudios de toxicidad se determinó que dentro del rango de concentraciones probadas, el fitofármaco no afectó la proliferación de las células PBMC. Lo anterior coincide con lo descrito por Matsumoto y colaboradores en el 2003, quienes describieron que la α -mangostina exhibe fuerte actividad inhibitoria del crecimiento en células de leucemia sin afectar a los linfocitos de sangre periférica (Matsumoto et al., 2003). De manera similar, Kasemwattanaoj y colaboradores también describieron que la α -mangostina no inhibió la proliferación de las células PBMC (Kasemwattanaoj et al., 2013). Interesantemente, la xantona no solo no afecta a las células de sangre periférica sino que funge como inmunomodulador (Tang et al., 2009), e incrementa la actividad de las células natural killer (panaxantona: mezcla de α -mangostina y γ -mangostina, 150mg/día/7 días), las cuales son las principales células de defensa de la inmunidad innata y participan de manera importante en la erradicación de las células tumorales (Shibata et al., 2011). Si bien se ha descrito, como posible mecanismo de acción, que la α -mangostina promueve la acumulación de ROS y RNS en células neoplásicas, diversos estudios han demostrado que depende del

tejido, es decir, se ha encontrado que esta xantona puede ejercer también un efecto antioxidante; por ejemplo se demostró que tiene efectos cardioprotectores (Sampath and Kannan, 2009) y neuroprotectores (Weecharangsan et al., 2006). Considerando lo anterior, la xantona podría contrarrestar los efectos adversos de hemotoxicidad, cardiotoxicidad y neurotoxicidad del 5-fluorouracilo lo cual impactaría directamente en la calidad de vida de la paciente.

En referencia a la farmacocinética de la α -mangostina en humanos, únicamente encontramos un estudio; Chitchumroonchokchai y colaboradores, analizaron la biodisponibilidad de las xantonas presentes en el mangostán, después de la ingesta de 60 ml del jugo de la fruta y observaron que la única xantona detectable en suero fue la α -mangostina, con una concentración máxima (Cmax) de 0.45 $\mu\text{mol/L}$, y el tiempo en el que se alcanzó (Tmax) fue de 2–4 h (Chitchumroonchokchai et al., 2012). Haciendo un análisis de comparación entre la Cmax alcanzada en suero y el rango de las CI_{50} de la α -mangostina (0.77-5.22 $\mu\text{mol/L}$) obtenido en este estudio, podemos decir que la CI_{50} es mayor a lo alcanzado en la circulación; no obstante, Chitchumroonchokchai y colaboradores no determinaron la dosis exacta de α -mangostina administrada, ya que se ingirió el jugo de la fruta; por lo tanto, para alcanzar las concentraciones séricas necesarias para ejercer el efecto antineoplásico podría administrarse la xantona a mayor dosis, mediante alguna formulación o alguna otra vía. Una característica importante de la xantona es que por vía oral la biodisponibilidad es baja, pero puede incrementarse al ingerirse a la par con alimentos altos en grasa (Chitchumroonchokchai et al., 2012).

En referencia al efecto antiproliferativo del 5-fluorouracilo, éste inhibió el crecimiento celular de manera significativa y dependiente de la concentración en todo el panel de células propuestas; al igual que con la α -mangostina, el fenotipo TN fue el más sensible. Nuestros resultados concuerdan con lo descrito por Ring y colaboradores en el 2004, donde describen que el 5-fluorouracilo es altamente efectivo para el tratamiento de tumores con fenotipo triple negativo (Ring et al.,

2004; Rouzier et al., 2005). Después de la administración por infusión continua de 300-500 mg/m²/día de 5-fluorouracilo, que se encuentra dentro del rango de dosis administrada para el tratamiento de cáncer de mama, se alcanzan concentraciones séricas de 11.2 µM (Diasio and Harris, 1989), con base en lo anterior, los rangos de CI₅₀ de 5-fluorouracilo obtenidas en este estudio (0.061 µM - 0.70 µM) son fácilmente alcanzables en la circulación sanguínea.

Una de las preguntas del presente estudio fue si la α-mangostina puede fungir como agente adyuvante del efecto antineoplásico del 5-fluorouracilo. Mediante el análisis del IC se determinó que el efecto al combinar el fitofármaco con el agente quimioterapéutico fue de tipo sinérgico en casi todas las líneas celulares probadas y con todos los esquemas de combinación evaluados, lo cual es benéfico ya que de esta manera se puede reducir la dosis de la quimioterapia y mantener el efecto antineoplásico.

De acuerdo con lo observado con la monoterapia, donde las células TN fueron las más sensibles, en las combinaciones, las células MBCDF-D5 (TN) exhibieron los IC más bajos, lo cual se tradujo en sinergismo. A manera de especulación, lo anterior puede deberse a que quizá en estas células los mecanismos mediante los cuales los compuestos están ejerciendo sus efectos antineoplásicos son totalmente excluyentes, es decir, son diferentes y no convergen en ninguna vía, lo que incrementa el sinergismo, con base a lo descrito por Chou y Talalay (Chou, 2006). Li y colaboradores en el 2014 observaron que la α-mangostina inhibe la actividad de la ácido graso sintasa, enzima necesaria para la proliferación celular, independientemente del fenotipo celular (Li et al., 2014), por lo tanto existe la posibilidad que en las células MBCDF-D5 la α-mangostina está actuando mediante este mecanismo para disminuir la proliferación celular, mientras que el 5-fluorouracilo está inhibiendo la síntesis de ácidos nucleicos (Grem, 1997); por lo tanto los mecanismos son excluyentes, no se anteponen entre si y por ende observamos mayor sinergismo. Por el contrario, en las células MBCDF el IC de todos los esquemas de combinación denotó antagonismo,

probablemente en estas células la α -mangostina y el 5-fluorouracilo actúan de manera similar para inhibir la proliferación y por ello se están anteponiendo en sus efectos y mostrando un efecto antagónico, lo cual no indica precisamente que la combinación de los compuestos en lugar de inhibir la proliferación la promueva, sino más bien que el efecto en conjunto no es mejor que el efecto de cada compuesto por separado y tal vez se verían mejores efectos en la proliferación solo si se aumentara la concentración de la monoterapia, en particular del agente no tóxico. Por otra parte, las células MBCDF son un cultivo primario y presentan mayor heterogeneidad celular, la cual es un sello distintivo del cáncer, probablemente el tratamiento solo afectó cierta población, mientras que la no afectada desarrolló mecanismos de escape al tratamiento, y si bien la combinación de ambos fármacos no fue beneficiosa, ambos compuestos por separado mostraron ser efectivos para la inhibición de la proliferación, por lo que se podrían administrar en monoterapia.

Este es el primer estudio de combinación que determina la naturaleza del efecto de la combinación entre α -mangostina y 5-fluorouracilo en cáncer de mama. La estrategia terapéutica aquí planteada establece una excelente opción para aquellas pacientes que tienen como única opción de tratamiento la quimioterapia.

Se ha reportado que las xantonas inhiben la actividad de los CYP2C8, CYP2C9 y CYP2C19 (Foti et al., 2009), quizás la α -mangostina es capaz de inhibir la actividad de otras enzimas del complejo enzimático del CYP450, involucradas en la eliminación del 5-fluorouracilo permanece más tiempo en el organismo y posiblemente esta sería una de las razones para explicar que al combinar ambos compuestos observamos sinergismo. Dado lo anterior, si la α -mangostina aumenta el tiempo de vida del 5-fluorouracilo, su combinación permitiría utilizar menores dosis en la clínica, con la consecuente disminución de los efectos secundarios no deseados.

En lo que respecta al efecto de los tratamientos en el ciclo celular, en las células SUM-229PE y MBCDF la combinación de α -mangostina con el 5-fluorouracilo promovió de manera significativa mayor muerte celular con respecto al control y a la monoterapia. Lo cual pudiera ser parte del mecanismo en estas líneas celulares. Si bien con los ensayos de combinación encontramos que en las células SUM-229PE de acuerdo a la fórmula propuesta por Chou y Talalay tenían un efecto sinérgico moderado, mientras que en los ensayos de ciclo celular hubo un mayor porcentaje de células muertas cuando se combinaban ambos compuestos; es importante no perder de vista que si bien el índice de combinación fue cercano a 1, en estos mismos estudios, el porcentaje de células viables al combinar ambos tratamientos fue bajo, sumado a esto, en esta línea celular el fármaco quimioterapéutico fue más potente. En el caso de las células MBCDF, estas células fueron las menos sensibles a ambos compuestos probados, y además el efecto de la combinación resultó de tipo antagónico, sin embargo, el porcentaje de células viables también fue bajo al realizar combinaciones. Ya se ha reportado que el fitofármaco promueve apoptosis por diversos mecanismos en distintos tipos de cáncer, y además el agente quimioterapéutico es citotóxico, por lo que al combinar ambos tratamientos obtuvimos en todas las líneas celulares probadas un aumento en el porcentaje de células muertas.

8. Conclusión

La α -mangostina podría ser un excelente candidato como tratamiento adyuvante de la quimioterapia convencional, debido a la carencia de efectos secundarios considerables y a la promoción de sinergismo en la inhibición de la proliferación y a la promoción de la muerte celular, lo que conllevaría en un futuro a disminuir las dosis administradas a las pacientes. Lo anterior ofrece una alternativa terapéutica plausible y aplicable para el manejo del cáncer de mama.

9. Perspectivas

- Llevar a cabo ensayos de combinación en un modelo *in vivo* de cáncer de mama
- Evaluar los posibles mecanismos moleculares por los cuales la combinación de α -mangostina y 5-fluorouracilo inhiben la proliferación celular.
- Evaluar los posibles mecanismos mediante los cuales se promueve antagonismo al combinar α -mangostina y 5-fluorouracilo en las células MBCDF.
- Determinar el efecto de la α -mangostina en combinación con un inhibidor de los receptores tirosina cinasa, debido a que el menor efecto inhibitorio del fitofármaco fue en las células HER-2/neu+.

10. Literatura citada

- Akao Y, Nakagawa Y, Iinuma M, Nozawa Y. 2008. Anti-cancer effects of xanthenes from pericarps of mangosteen. *International journal of molecular sciences* 9:355-370.
- Alli E, Sharma VB, Sunderesakumar P, Ford JM. 2009. Defective repair of oxidative dna damage in triple-negative breast cancer confers sensitivity to inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase. *Cancer Res* 69:3589-3596.
- Anderson WF, Rosenberg PS, Prat A, Perou CM, Sherman ME. 2014. How many etiological subtypes of breast cancer: two, three, four, or more? *J Natl Cancer Inst* 106.
- Balunas MJ, Su B, Brueggemeier RW, Kinghorn AD. 2008. Xanthenes from the botanical dietary supplement mangosteen (*Garcinia mangostana*) with aromatase inhibitory activity. *J Nat Prod* 71:1161-1166.
- Berdasco M, Esteller M. 2010. Aberrant epigenetic landscape in cancer: how cellular identity goes awry. *Developmental cell* 19:698-711.
- Bharat A, Gao F, Margenthaler JA. 2009. Tumor characteristics and patient outcomes are similar between invasive lobular and mixed invasive ductal/lobular breast cancers but differ from pure invasive ductal breast cancers. *Am J Surg* 198:516-519.
- Brandan ME, Villaseñor-Navarro Y. 2006. Detección del cáncer de mama: estado de la mamografía en México. *Cancerología* 1:147-162.
- Brunton LL, Lazo JS, Parker KL. 2006. Goodman & Gilman. Las bases farmacológicas de la terapéutica, 11° ed.
- Bumrungpert A, Kalpravidh RW, Chuang CC, Overman A, Martinez K, Kennedy A, McIntosh M. 2010. Xanthenes from mangosteen inhibit inflammation in human macrophages and in human adipocytes exposed to macrophage-conditioned media. *J Nutr* 140:842-847.
- Chairungsrilerd N, Furukawa K, Ohta T, Nozoe S, Ohizumi Y. 1996. Pharmacological properties of alpha-mangostin, a novel histamine H1 receptor antagonist. *Eur J Pharmacol* 314:351-356.
- Chao AC, Hsu YL, Liu CK, Kuo PL. 2011. alpha-Mangostin, a dietary xanthone, induces autophagic cell death by activating the AMP-activated protein kinase pathway in glioblastoma cells. *J Agric Food Chem* 59:2086-2096.
- Chavarri-Guerra Y, Villarreal-Garza C, Liedke PE, Knaul F, Mohar A, Finkelstein DM, Goss PE. 2012. Breast cancer in Mexico: a growing challenge to health and the health system. *The Lancet Oncology* 13:e335-343.
- Cheang MC, Voduc D, Bajdik C, Leung S, McKinney S, Chia SK, Perou CM, Nielsen TO. 2008. Basal-like breast cancer defined by five biomarkers has superior prognostic value than triple-negative phenotype. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 14:1368-1376.
- Chitchumroonchokchai C, Riedl KM, Suksumrarn S, Clinton SK, Kinghorn AD, Failla ML. 2012. Xanthenes in mangosteen juice are absorbed and partially conjugated by healthy adults. *The Journal of nutrition* 142:675-680.

- Choi M, Kim YM, Lee S, Chin YW, Lee C. 2014. Mangosteen xanthenes suppress hepatitis C virus genome replication. *Virus Genes* 49:208-222.
- Chou TC. 2006. Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies. *Pharmacol Rev* 58:621-681.
- de la Vara-Salazar E, Suarez-Lopez L, Angeles-Llerenas A, Torres-Mejia G, Lazcano-Ponce E. 2011. [Breast cancer mortality trends in Mexico, 1980-2009]. *Salud publica de Mexico* 53:385-393.
- Diasio RB, Harris BE. 1989. Clinical pharmacology of 5-fluorouracil. *Clin Pharmacokinet* 16:215-237.
- Doi H, Shibata MA, Shibata E, Morimoto J, Akao Y, Inuma M, Tanigawa N, Otsuki Y. 2009. Panaxanthone isolated from pericarp of *Garcinia mangostana* L. suppresses tumor growth and metastasis of a mouse model of mammary cancer. *Anticancer research* 29:2485-2495.
- Edge SB, Compton CC. 2010. The American Joint Committee on Cancer: the 7th edition of the AJCC cancer staging manual and the future of TNM. *Annals of surgical oncology* 17:1471-1474.
- El Habbash AI, Mohd Hashim N, Ibrahim MY, Yahayu M, Omer FAE, Abd Rahman M, Nordin N, Lian GEC. 2017. In vitro assessment of anti-proliferative effect induced by alpha-mangostin from *Cratoxylum arborescens* on HeLa cells. *PeerJ* 5:e3460.
- Esparza-Lopez J, Escobar-Arriaga E, Soto-Germes S, Ibarra-Sanchez MJ. 2017. Breast Cancer Intra-Tumor Heterogeneity: One Tumor, Different Entities. *Rev Invest Clin* 69:66-76.
- Esparza-López J, Medina-Franco H, Escobar-Arriaga E, León-Rodríguez E, Zentella-Dehesa A, Ibarra-Sánchez M. 2013. Doxorubicin induces atypical NF-κB activation through c-Abl kinase activity in breast cancer cells. *J Cancer Res Clin Oncol* 139(10):: 1625–1635.
- Focaccetti C, Bruno A, Magnani E, Bartolini D, Principi E, Dallaglio K, Bucci EO, Finzi G, Sessa F, Noonan DM, Albin A. 2015. Effects of 5-fluorouracil on morphology, cell cycle, proliferation, apoptosis, autophagy and ROS production in endothelial cells and cardiomyocytes. *PLoS One* 10:e0115686.
- Foti RS, Pearson JT, Rock DA, Wahlstrom JL, Wienkers LC. 2009. In vitro inhibition of multiple cytochrome P450 isoforms by xanthone derivatives from mangosteen extract. *Drug Metab Dispos* 37:1848-1855.
- Fukuda M, Sakashita H, Hayashi H, Shiono J, Miyake G, Komine Y, Taira F, Sakashita H. 2017. Synergism between alpha-mangostin and TRAIL induces apoptosis in squamous cell carcinoma of the oral cavity through the mitochondrial pathway. *Oncol Rep* 38:3439-3446.
- Grem JL. 1997. Mechanisms of Action and Modulation of Fluorouracil. *Semin Radiat Oncol* 7:249-259.
- Gutierrez-Orozco F, Chitchumroonchokchai C, Lesinski GB, Suksamrarn S, Failla ML. 2013. alpha-Mangostin: anti-inflammatory activity and metabolism by human cells. *J Agric Food Chem* 61:3891-3900.

- Gutierrez-Orozco F, Failla ML. 2013. Biological activities and bioavailability of mangosteen xanthenes: a critical review of the current evidence. *Nutrients* 5:3163-3183.
- Hanahan D, Weinberg RA. 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144:646-674.
- Ho CK, Huang YL, Chen CC. 2002. Garcinone E, a xanthone derivative, has potent cytotoxic effect against hepatocellular carcinoma cell lines. *Planta Med* 68:975-979.
- Hong YK, McMasters KM, Egger ME, Ajkay N. 2018. Ductal carcinoma in situ current trends, controversies, and review of literature. *Am J Surg* 216:998-1003.
- Iinuma M, Tosa H, Tanaka T, Asai F, Kobayashi Y, Shimano R, Miyauchi K. 1996. Antibacterial activity of xanthenes from guttiferaceous plants against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Pharm Pharmacol* 48:861-865.
- Imigo F, Mansilla E, Delama I, Poblete MT, Fonfach C. 2011. Clasificación molecular del cáncer de mama. *Cuadernos de cirugía* 25:67-74.
- Ittiudomrak T, Puthong S, Roytrakul S, Chanchao C. 2019. alpha-Mangostin and Apigenin Induced Cell Cycle Arrest and Programmed Cell Death in SKOV-3 Ovarian Cancer Cells. *Toxicol Res* 35:167-179.
- Johnson JJ, Petiwala SM, Syed DN, Rasmussen JT, Adhami VM, Siddiqui IA, Kohl AM, Mukhtar H. 2012. alpha-Mangostin, a xanthone from mangosteen fruit, promotes cell cycle arrest in prostate cancer and decreases xenograft tumor growth. *Carcinogenesis* 33:413-419.
- Jung HA, Su BN, Keller WJ, Mehta RG, Kinghorn AD. 2006. Antioxidant xanthenes from the pericarp of *Garcinia mangostana* (Mangosteen). *J Agric Food Chem* 54:2077-2082.
- Kaomongkolgit R, Jamdee K, Chaisomboon N. 2009. Antifungal activity of alpha-mangostin against *Candida albicans*. *J Oral Sci* 51:401-406.
- Kasemwattanoj P, Moongkarndi P, Pattanapanyasat K, Mangmool S, Rodpai E, Samer J, Konlata J, Sukapirom K. 2013. Immunomodulatory activities of alpha-mangostin on peripheral blood mononuclear cells. *Nat Prod Commun* 8:1257-1260.
- Kim M, Chin YW, Lee EJ. 2017. alpha, gamma-Mangostins Induce Autophagy and Show Synergistic Effect with Gemcitabine in Pancreatic Cancer Cell Lines. *Biomolecules & therapeutics* 25:609-617.
- Knaul FM, Nigenda G, Lozano R, Arreola-Ornelas H, Langer A, Frenk J. 2009. [Breast cancer in Mexico: an urgent priority]. *Salud Publica Mex* 51 Suppl 2:s335-344.
- Kohler BA, Sherman RL, Howlader N, Jemal A, Ryerson AB, Henry KA, Boscoe FP, Cronin KA, Lake A, Noone AM, Henley SJ, Ehemann CR, Anderson RN, Penberthy L. 2015. Annual Report to the Nation on the Status of Cancer, 1975-2011, Featuring Incidence of Breast Cancer Subtypes by Race/Ethnicity, Poverty, and State. *Journal of the National Cancer Institute* 107:djv048.

- Krajarng A, Nilwarankoon S, Suksamrarn S, Watanapokasin R. 2012. Antiproliferative effect of alpha-mangostin on canine osteosarcoma cells. *Res Vet Sci* 93:788-794.
- Kritsanawong S, Innajak S, Imoto M, Watanapokasin R. 2016. Antiproliferative and apoptosis induction of alpha-mangostin in T47D breast cancer cells. *Int J Oncol* 48:2155-2165.
- Kurose H, Shibata MA, Iinuma M, Otsuki Y. 2012. Alterations in cell cycle and induction of apoptotic cell death in breast cancer cells treated with alpha-mangostin extracted from mangosteen pericarp. *J Biomed Biotechnol* 2012:672428.
- Laksmiani NPL. 2019. Ethanolic extract of mangosteen (*Garcinia mangostana*) pericarp as sensitivity enhancer of doxorubicin on MCF-7 cells by inhibiting P-glycoprotein. *Nusantara Biosci* 11.
- Lee CH, Ying TH, Chiou HL, Hsieh SC, Wen SH, Chou RH, Hsieh YH. 2017. Alpha-mangostin induces apoptosis through activation of reactive oxygen species and ASK1/p38 signaling pathway in cervical cancer cells. *Oncotarget* 8:47425-47439.
- Lee S, Stewart S, Nagtegaal I, Luo J, Wu Y, Colditz G, Medina D, Allred DC. 2012. Differentially expressed genes regulating the progression of ductal carcinoma in situ to invasive breast cancer. *Cancer research* 72:4574-4586.
- Lei J, Huo X, Duan W, Xu Q, Li R, Ma J, Li X, Han L, Li W, Sun H, Wu E, Ma Q. 2014. alpha-Mangostin inhibits hypoxia-driven ROS-induced PSC activation and pancreatic cancer cell invasion. *Cancer Lett* 347:129-138.
- Li P, Tian W, Ma X. 2014. Alpha-mangostin inhibits intracellular fatty acid synthase and induces apoptosis in breast cancer cells. *Mol Cancer* 13:138.
- Marquez-Valadez B, Lugo-Huitron R, Valdivia-Cerda V, Miranda-Ramirez LR, Perez-De La Cruz V, Gonzalez-Cuahutencos O, Rivero-Cruz I, Mata R, Santamaria A, Pedraza-Chaverri J. 2009. The natural xanthone alpha-mangostin reduces oxidative damage in rat brain tissue. *Nutr Neurosci* 12:35-42.
- Matsumoto K, Akao Y, Kobayashi E, Ohguchi K, Ito T, Tanaka T, Iinuma M, Nozawa Y. 2003. Induction of apoptosis by xanthenes from mangosteen in human leukemia cell lines. *J Nat Prod* 66:1124-1127.
- Medina-Franco H. 2012. *Oncología Clínica: Manual para médicos no oncólogos*. México, D.F.
- Moo TA, Sanford R, Dang C, Morrow M. 2018. Overview of Breast Cancer Therapy. *PET Clin* 13:339-354.
- Moongkarndi P, Kosem N, Kaslungka S, Luanratana O, Pongpan N, Neungton N. 2004. Antiproliferation, antioxidation and induction of apoptosis by *Garcinia mangostana* (mangosteen) on SKBR3 human breast cancer cell line. *J Ethnopharmacol* 90:161-166.
- Nabandith V, Suzui M, Morioka T, Kaneshiro T, Kinjo T, Matsumoto K, Akao Y, Iinuma M, Yoshimi N. 2004. Inhibitory effects of crude alpha-mangostin, a xanthone derivative, on two different categories of colon preneoplastic

- lesions induced by 1, 2-dimethylhydrazine in the rat. *Asian Pac J Cancer Prev* 5:433-438.
- Parker WB. 2009. Enzymology of purine and pyrimidine antimetabolites used in the treatment of cancer. *Chem Rev* 109:2880-2893.
- Pedraza-Chaverri J, Cardenas-Rodriguez N, Orozco-Ibarra M, Perez-Rojas JM. 2008. Medicinal properties of mangosteen (*Garcinia mangostana*). *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association* 46:3227-3239.
- Pedraza-Chaverri J, Reyes-Fermin LM, Nolasco-Amaya EG, Orozco-Ibarra M, Medina-Campos ON, Gonzalez-Cuahutencos O, Rivero-Cruz I, Mata R. 2009. ROS scavenging capacity and neuroprotective effect of alpha-mangostin against 3-nitropropionic acid in cerebellar granule neurons. *Exp Toxicol Pathol* 61:491-501.
- Perez-Rojas JM, Gonzalez-Macias R, Gonzalez-Cortes J, Jurado R, Pedraza-Chaverri J, Garcia-Lopez P. 2016. Synergic Effect of alpha-Mangostin on the Cytotoxicity of Cisplatin in a Cervical Cancer Model. *Oxid Med Cell Longev* 2016:7981397.
- Phan TKT, Shahbazzadeh F, Pham TTH, Kihara T. 2018. Alpha-mangostin inhibits the migration and invasion of A549 lung cancer cells. *PeerJ* 6:e5027.
- Ring AE, Smith IE, Ashley S, Fulford LG, Lakhani SR. 2004. Oestrogen receptor status, pathological complete response and prognosis in patients receiving neoadjuvant chemotherapy for early breast cancer. *Br J Cancer* 91:2012-2017.
- Rodriguez-Cuevas S, Macias CG, Franceschi D, Labastida S. 2001. Breast carcinoma presents a decade earlier in Mexican women than in women in the United States or European countries. *Cancer* 91:863-868.
- Rouzier R, Rajan R, Wagner P, Hess KR, Gold DL, Stec J, Ayers M, Ross JS, Zhang P, Buchholz TA, Kuerer H, Green M, Arun B, Hortobagyi GN, Symmans WF, Pusztai L. 2005. Microtubule-associated protein tau: a marker of paclitaxel sensitivity in breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:8315-8320.
- Sampath PD, Kannan V. 2009. Mitigation of mitochondrial dysfunction and regulation of eNOS expression during experimental myocardial necrosis by alpha-mangostin, a xanthonic derivative from *Garcinia mangostana*. *Drug Chem Toxicol* 32:344-352.
- Sato A, Fujiwara H, Oku H, Ishiguro K, Ohizumi Y. 2004. Alpha-mangostin induces Ca²⁺-ATPase-dependent apoptosis via mitochondrial pathway in PC12 cells. *J Pharmacol Sci* 95:33-40.
- Scolamiero G, Pazzini C, Bonafe F, Guarnieri C, Muscari C. 2018. Effects of alpha-Mangostin on Viability, Growth and Cohesion of Multicellular Spheroids Derived from Human Breast Cancer Cell Lines. *Int J Med Sci* 15:23-30.
- Schnitt SJ. 2010. Classification and prognosis of invasive breast cancer: from morphology to molecular taxonomy. *Mod Pathol* 23 Suppl 2:S60-64.

- Shan T, Cui XJ, Li W, Lin WR, Lu HW, Li YM, Chen X, Wu T. 2014. alpha-Mangostin suppresses human gastric adenocarcinoma cells in vitro via blockade of Stat3 signaling pathway. *Acta Pharmacol Sin* 35:1065-1073.
- 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. *Curr Mol Med* 11:666-677.
- Shibata MA, Iinuma M, Morimoto J, Kurose H, Akamatsu K, Okuno Y, Akao Y, Otsuki Y. 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.
- Sivaranjani M, Prakash M, Gowrishankar S, Rathna J, Pandian SK, Ravi AV. 2017. In vitro activity of alpha-mangostin in killing and eradicating *Staphylococcus epidermidis* RP62A biofilms. *Appl Microbiol Biotechnol* 101:3349-3359.
- Skehan P, Storeng R, Scudiero D, Monks A, McMahon J, Vistica D, Warren JT, Bokesch H, Kenney S, Boyd MR. 1990. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J Natl Cancer Inst* 82:1107-1112.
- Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, Hastie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Thorsen T, Quist H, Matese JC, Brown PO, Botstein D, Lonning PE, Borresen-Dale AL. 2001. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:10869-10874.
- Stein BN, Petrelli NJ, Douglass HO, Driscoll DL, Arcangeli G, Meropol NJ. 1995. Age and sex are independent predictors of 5-fluorouracil toxicity. Analysis of a large scale phase III trial. *Cancer* 75:11-17.
- Suksamrarn S, Komutiban O, Ratananukul P, Chimnoi N, Lartpornmatulee N, Suksamrarn A. 2006. Cytotoxic prenylated xanthones from the young fruit of *Garcinia mangostana*. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 54:301-305.
- Tang YP, Li PG, Kondo M, Ji HP, Kou Y, Ou B. 2009. Effect of a mangosteen dietary supplement on human immune function: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *J Med Food* 12:755-763.
- Tarasuk M, Songprakhon P, Chamma P, Sratongno P, Na-Bangchang K, Yenchitsomanus PT. 2017. Alpha-mangostin inhibits both dengue virus production and cytokine/chemokine expression. *Virus Res* 240:180-189.
- Trujillo-Zamudio FE, Marquez J, Villasenor Y, Brandan ME. 2006. Textural assessment in digital mammograms. Conference proceedings : Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society IEEE Engineering in Medicine and Biology Society Annual Conference 1:3456-3459.
- Verma RK, Yu W, Shrivastava A, Shankar S, Srivastava RK. 2016. alpha-Mangostin-encapsulated PLGA nanoparticles inhibit pancreatic carcinogenesis by targeting cancer stem cells in human, and transgenic (Kras(G12D), and Kras(G12D)/tp53R270H) mice. *Sci Rep* 6:32743.
- Vichai V, Kirtikara K. 2006. Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. *Nat Protoc* 1:1112-1116.

- 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.). *Med Princ Pract* 15:281-287.
- Won YS, Lee JH, Kwon SJ, Kim JY, Park KH, Lee MK, Seo KI. 2014. alpha-Mangostin-induced apoptosis is mediated by estrogen receptor alpha in human breast cancer cells. *Food Chem Toxicol* 66:158-165.
- Xia Y, Li Y, Westover KD, Sun J, Chen H, Zhang J, Fisher DE. 2016. Inhibition of Cell Proliferation in an NRAS Mutant Melanoma Cell Line by Combining Sorafenib and alpha-Mangostin. *PLoS One* 11:e0155217.
- Zepeda-Castilla EJ, Recinos-Money E, Cuellar-Hubbe M, Robles-Vidal CD, Maafs-Molina E. 2008. [Molecular classification of breast cancer]. *Cir Cir* 76:87-93.