



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS**

**FACULTAD DE NUTRICIÓN**

**EL NUTRACÉUTICO  $\alpha$ -MANGOSTINA COMO AGENTE TERAPÉUTICO  
EN CÁNCER CERVICOUTERINO**

**TESIS PROFESIONAL**

Que para obtener el grado de:

**LICENCIADA EN NUTRICIÓN**

PRESENTA

**SAMANTHA VIVIANA BERNADEZ VALLEJO**

**DIRECTORA DE TESIS:**

Dra. Janice García Quiroz

**ASESORA INTERNA:**

Dra. Ollin Celeste Martínez Ramírez

**SINODALES:**

Dra. Azucena Salazar Piña

Dra. Carol Arely Botello Amaro

M. en C. Raúl Dávila Delgado

L. N. Sonia López Cortés

L.N. Alma Margarita Venosa Castañón

**CUERNAVACA MORELOS**

**NOVIEMBRE 2022**

El presente trabajo se realizó en el Departamento de Biología de la Reproducción “Dr. Carlos Gual Castro” del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán bajo dirección de la Dra. Janice García Quiroz. Gracias al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada como Ayudante de Investigador de la Dra. Lorenza Díaz Nieto, con número de CVU 1033415.

## **Dedico esta tesis a**

Mi familia y a mis verdaderos amigos, una de las muestras de amor más grande que me han podido dar es el apoyo incondicional, principalmente en cumplir este sueño.

Mi mamá Blanca Lilia Vallejo Aranda y a mi papá Sergio Bernadez del Valle. Las personas que siempre han estado conmigo, que han creído en mí, que me han apoyado y que con esfuerzo y perseverancia hemos podido salir adelante, a pesar de las circunstancias y de los retos.

A Dios, no había imaginado llegar hasta aquí, y se demuestra que sus planes son más grandes que los míos.

## **Agradecimientos**

Agradezco profundamente a la Doctora Janice García Quiroz, por darme la oportunidad de formar parte de su equipo de trabajo, por su paciencia, perseverancia y comprensión, por enseñarme la magia que hay en la ciencia y apoyarme más de lo que había imaginado, es una excelente profesionalista y la admiro mucho. ¡Le agradezco tanto a usted!

Estoy especial y profundamente agradecida, por todo el amor y cariño de mis padres Sergio Bernadez del Valle y Blanca Lilia Vallejo Aranda, por su apoyo incondicional, sacrificios, que me han permitido crecer como persona.

Al Doctor Fernando Larrea Gallo, jefe del Departamento de Biología de la Reproducción del INCMNSZ, por aceptarme en su grupo de trabajo.

A la Doctora Lorenza Díaz Nieto, por compartir sus conocimientos, consejos y su invaluable apoyo. Gracias por otorgarme su confianza como ayudante de investigador.

Al Doctor Euclides Ávila Chávez por todos los conocimientos transmitidos y por inspirarme para seguir adelante.

A la Facultad de Nutrición y a la Escuela de Técnicos Laboratoristas pertenecientes a la Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

A los buenos profesores, que me brindaron herramientas y las bases de tan maravillosa carrera

A mi asesora interna la Dra. Ollin Celeste Martínez Rodríguez y a mis sinodales la Dra. Azucena Salazar Piña, la Dra. Carol Arely Botello Amaro, M. en C. Raúl Dávila Delgado, L. N. Sonia López Cortés Y L. N. Alma Margarita Venosa Castañón, por su apoyo como docentes y permitir que con mi trabajo de tesis pueda cumplir mis objetivos. Sin duda son una parte fundamental para que como alumnos tengamos la oportunidad de salir adelante.

A mis amigos, compañeros y Doctores del grupo de trabajo del Laboratorio de Biología de la Reproducción “Dr. Carlos Gual Castro” del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ), los cuales siempre mostraron empatía y apoyo, además de ser personas de las cuales se puede aprender mucho.

A mi familia, siempre presentes en cada etapa de mi vida.

A esa persona que siempre estuvo presente para mí, que me mostro su apoyo, comprensión y me inspiró a ser mejor persona, llego en el momento indicado.

A mis amigos que siempre me impulsan a ser mejor y me muestran su apoyo incondicional.

Agradezco a Galia Lara Sotelo, quien siempre me habló de lo interesante y lo mágico que puede ser la nutrición en investigación y sobre todo agradecer su apoyo para que yo formara parte de este gran equipo de trabajo.

¡A todos por todo gracias!

## RESUMEN

**Introducción:** El cáncer cervicouterino es la segunda neoplasia más diagnosticada en nuestro país y presenta una razón mortalidad-incidencia del 45.92%, por lo que resulta evidente la necesidad de desarrollar nuevas estrategias terapéuticas. Previamente nuestro grupo de trabajo determinó *in vitro* que el nutracéutico  $\alpha$ -mangostina, inhibe la proliferación de líneas celulares de cáncer cervicouterino de manera significativa y dependiente de la concentración. Las células más sensibles a la  $\alpha$ -mangostina fueron las células SiHa y CaSki, en donde adicionalmente se observó una inhibición en la expresión génica de los oncogenes del virus del papiloma humano *E6* y *E7* y del canal de potasio oncogénico éter  $\alpha$ -go-go tipo1, *EAG1*. **Objetivo:** Evaluar el efecto de la  $\alpha$ -mangostina en la inhibición del crecimiento tumoral y en la expresión tumoral de *E6*, *E7* y *EAG1* en un modelo murino de cáncer cervicouterino. **Materiales y métodos:** Ratones hembra atímicos se xenoinjertaron con las células SiHa y CaSki para evaluar su tumorigenicidad. Cuando los ratones generaron tumor, se dividieron en dos grupos (grupo I: vehículo al 0.1%; grupo II:  $\alpha$ -mangostina 8mg/kg de peso/día) y se les administró el tratamiento por 1 mes. Cada tercer día se midió el largo y ancho del tumor para determinar el volumen tumoral. Al final del tratamiento se recolectó el tumor, se extrajo el RNA y se evaluó la expresión génica de los *oncogenes del VPH* y *EAG1* por PCR en tiempo real. **Resultados:** Las células CaSki no fueron tumorigénicas, mientras que las SiHa si indujeron la formación de tumores. En los ratones con xenoinjerto de células SiHa, la  $\alpha$ -mangostina inhibió de manera significativa el crecimiento tumoral así como la expresión de los *oncogenes del VPH* y de *EAG1*. **Conclusión:** La  $\alpha$ -mangostina es un agente antitumoral efectivo en cáncer cervical, cuyo mecanismo de acción involucra la inhibición de la expresión de *E6*, *E7* y *EAG1*. Estos resultados proporcionan las bases para evaluar en estudios futuros el efecto de la  $\alpha$ -mangostina *per se* o como agente co-adyuvante de la terapia convencional del cáncer cervicouterino.

## ABSTRACT

**Introduction:** Cervical cancer is the second most diagnosed neoplasm in our country and has a mortality-incidence ratio of 45.92%, consequently is necessary to develop new therapeutic strategies. Previously our investigation group demonstrated *in vitro* that  $\alpha$ -mangostin inhibits significantly the proliferation of different cervical cancer cell lines in a concentration-dependent manner and the most sensitive cells were SiHa and CaSki. Additionally the natural compound inhibited the gene expression of the human papilloma virus (HPV) oncogenes E6 and E7 as well as the expression of the oncogenic ether  $\alpha$ -go-go potassium channel type1, *EAG1*. **Objective:** To evaluate the effect of  $\alpha$ -mangostin in the inhibition of tumor growth and in the tumor expression of *E6*, *E7* and *EAG1* in a murine model of cervical cancer. **Materials and methods:** Nude female mice were xenografted with SiHa and CaSki cells to assess their tumorigenicity. When the mice generated tumor, they were divided into two groups (group I: vehicle at 0.1%; group II:  $\alpha$ -mangostin 8 mg/kg/day) and the treatment was administered for 1 month. To determine the tumor volume, every other day both the length and width of the tumor were measured. At the end of treatment, the tumor was collected, the RNA was extracted, and the gene expression of the HPV oncogenes and *EAG1* was evaluated by qPCR. **Results:** Only SiHa cells induced tumor formation. In the mice xenografted with SiHa cell, the treatment with  $\alpha$ -mangostin significantly inhibited the tumor growth as well as the expression of HPV oncogenes and *EAG1*. **Conclusion:** The  $\alpha$ -mangostin is an effective antitumor agent in cervical cancer, whose mechanism of action involves the decrease of *E6*, *E7* and *EAG1*. These results conclude the bases to evaluate in future studies the effect of  $\alpha$ -mangostin *per se* or as an adjuvant agent of conventional therapy for cervical cancer.

## ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
1.1. Cáncer cervicouterino	2
1.1.1. Lesiones preneoplásicas	3
1.1.2. Clasificación del cáncer cervicouterino	4
1.1.3. Estadificación del cáncer cervicouterino	5
1.2. Incidencia y mortalidad del cáncer cervicouterino	6
1.3. Factores de riesgo, detección y tratamiento del cáncer cervicouterino	8
1.4. Virus del papiloma humano	11
1.4.1. Estructura y genoma del VPH	11
1.4.2. Mecanismo de infección viral	12
1.5. Nutrición y respuesta inmune eficiente contra el VPH	13
1.6. Xantonas como agentes antineoplásicos	14
1.6.1. Efectos antineoplásicos de la $\alpha$ -mangostina en cáncer cervicouterino	15
1.6.1.1. La $\alpha$ -mangostina inhibe la proliferación de células de cáncer cervicouterino con diferente potencia	15
1.6.1.2. La $\alpha$ -mangostina inhibe la progresión del ciclo celular de manera diferencial en células de cáncer cervicouterino	17
1.6.1.3. La $\alpha$ -mangostina inhibe la expresión de los oncogenes <i>E6</i> y <i>E7</i> del VPH16	19
1.6.1.4. La $\alpha$ -mangostina inhibe la expresión génica de <i>EAG1</i>	20
1.7. Efectos antivirales de la $\alpha$ -mangostina	22
<b>2. JUSTIFICACIÓN</b>	<b>23</b>
<b>3. HIPÓTESIS</b>	<b>24</b>
<b>4. OBJETIVOS</b>	<b>25</b>
4.1. Objetivo general	25
4.2. Objetivos específicos	25
<b>5. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>26</b>

5.1. Reactivos	26
5.2. Líneas celulares y cultivo celular	26
5.3. Inducción de tumores, tratamiento y determinación del volumen tumoral	26
5.4. Estudios de expresión génica	29
5.5. Análisis estadístico	30
<b>6. RESULTADOS</b>	<b>31</b>
6.1. Tumorigenicidad de línea celulares de cáncer cervicouterino	31
6.2. Efecto de la $\alpha$ -mangostina en la inhibición del crecimiento tumoral de xenoinjertos de células SiHa	33
6.3. Efecto de la $\alpha$ -mangostina en la inhibición de la expresión génica de <i>E6-VPH16</i> , <i>E7-VPH16</i> y <i>EAG1</i>	35
<b>7. DISCUSIÓN</b>	<b>36</b>
<b>8. CONCLUSIÓN</b>	<b>38</b>
<b>9. PERSPECTIVAS</b>	<b>39</b>
<b>10. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>40</b>
<b>11. APÉNDICES</b>	<b>46</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.-	Incidencia y mortalidad de cáncer cervicouterino	8
Tabla 2.-	Pruebas para la detección del cáncer cervicouterino	9
Tabla 3.-	Tratamiento del cáncer cervicouterino con base en la etapa en la que se encuentra la neoplasia	10
Tabla 4.-	Cl <sub>50</sub> de la $\alpha$ -mangostina en diferentes líneas celulares de cáncer cervicouterino	17
Tabla 5.-	Efecto de la $\alpha$ -mangostina en la inhibición de la expresión de los oncogenes <i>E6</i> y <i>E7</i> del VPH16	19
Tabla 6.-	Efecto de la $\alpha$ -mangostina en la expresión del canal <i>EAG1</i> en líneas celulares de cáncer cervicouterino	21
Tabla 7.-	Grupos de tratamiento	28
Tabla 8.-	Sondas y oligonucleótidos utilizados	30
Tabla 9.-	Días que tardó en aparecer el tumor posterior al xenoinjerto de las células de cáncer cervicouterino y días que tardó en llegar a punto final con base en el crecimiento tumoral	31
Tabla Suplementaria 1.-	Días que tardó en aparecer el tumor posterior al xenoinjerto de células C33a/HeLa y días que tardó en llegar a punto final con base en el crecimiento tumoral	46

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.-	Aparato reproductor femenino	2
Figura 2.-	Progresión de lesiones preneoplásicas a cáncer cervicouterino	4
Figura 3.-	Incidencia y mortalidad de cáncer cervicouterino en la población femenina mayor de 15 años, en México y en el Mundo.	7
Figura 4.-	Mecanismo de infección del VPH	13
Figura 5.-	Efecto de la $\alpha$ -mangostina en la proliferación de células de cáncer cervicouterino	16
Figura 6.-	Efecto de la $\alpha$ -mangostina en la distribución del ciclo celular	18
Figura 7.-	Tumorigenicidad de las líneas celulares de cáncer cervicouterino	32
Figura 8.-	Cinética de inhibición del crecimiento tumoral con $\alpha$ -mangostina	33
Figura 9.-	Efecto de la $\alpha$ -mangostina en la inhibición del crecimiento tumoral al final del tratamiento	34
Figura 10.-	Efecto de la $\alpha$ -mangostina en la expresión de los <i>oncogenes</i> del VPH16 y de <i>EAG1</i> .	35
Figura Suplementaria 1.-	Tumorigenicidad de las líneas celulares de cáncer cervicouterino C33a y HeLa	47

## LISTA DE ABREVIATURAS

A	Abosrbancia
ATCC	De sus siglas en inglés “American Type Culture Collection”
CCAC	Comité Canadiense del Cuidado de los Animales de sus siglas en inglés “Canadian Council on Animal Care”
CI <sub>50</sub>	Concentración Inhibitoria al 50%
D.S.	Desviación estándar
DMEM-HG	De sus siglas en inglés “Dulbecco's Modified Eagle Medium-High in Glucose”
DMSO	Dimetilsulfóxico
E.S.	Error estándar
EAG1	Canal de potasio éter à-go-go tipo 1
FIGO	Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia
ICQ	Inmunocitoquímica
LCR	Región larga de control de sus siglas en inglés “Long Control Región”
LIS	Lesión Intraepitelial Escamosa
NIC	Neoplasia Intraepitelial Cervical
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
ROS	Especies reactivas de oxígeno de sus siglas en inglés “Reactive Oxygen Species”
RPL32	De sus siglas en inglés “Ribosomal Protein L32”
RPMI	De sus siglas en inglés “Roswell Park Memorial Institute”
S.C.	Subcutáneo
SCC	Antígeno de Células Escamosas de sus siglas en inglés “Squamous Cell Carcinoma”
SFB	Suero Fetal de Bovino
VIH	Virus de la Inmunodeficiencia Humana
VPH	Virus del Papiloma Humano
VT	Volumen Tumoral
VTF	Volumen Tumoral Final
VTI	Volumen Tumoral Inicial

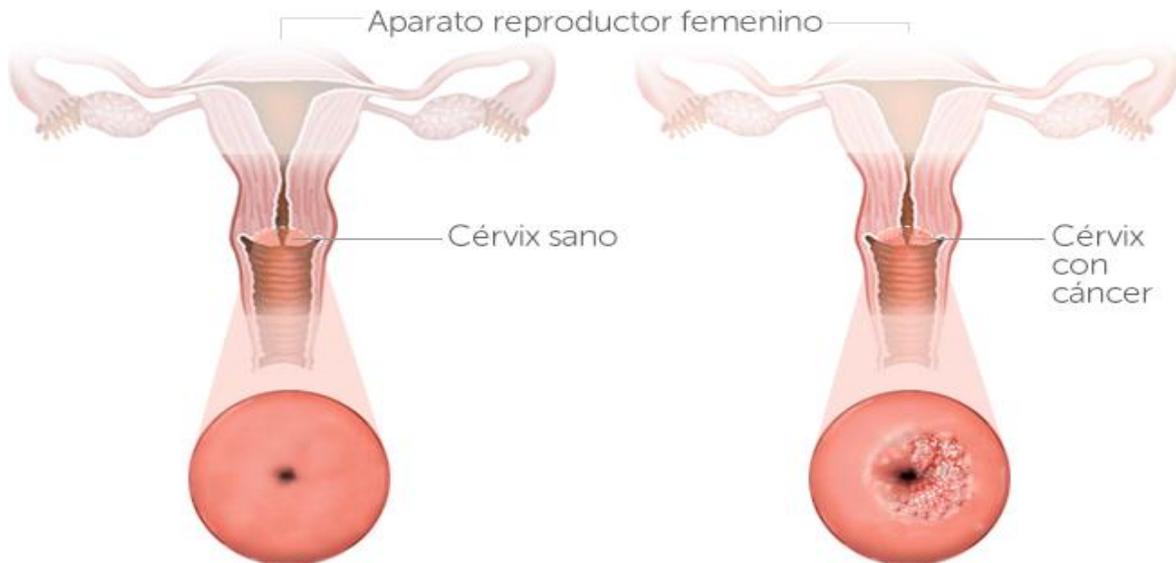
## 1. INTRODUCCIÓN

La historia del cáncer es tan antigua como la historia de la propia humanidad. Uno de los documentos más antiguos en el que se menciona la palabra cáncer es en el papiro de Edwin Smith, quien en 1862 compró un papiro a un anticuario de Luxor, Egipto, escrito en el siglo XVII A.C. y es la transcripción de un manuscrito de alrededor del año 2500 A.C. Hoy en día se estima que el papiro contiene una compilación de las enseñanzas de Imhotep, gran médico egipcio que vivió en torno al año 2625 A.C., en el cual se abordan cuarenta y ocho casos de afecciones médicas, y cada uno de ellos cuenta con título, examen, informe y tratamiento; interesantemente, en el caso número 45 se habla de instrucciones concernientes a tumores en el pecho, para el cual no existe cura (González-Fisher et al., 2005; Mukherjee, 2010). Más adelante, Hipócrates (460-375 A. C.) propuso la teoría de los cuatro humores (sangre, moco, bilis amarilla y bilis negra), de cuyo equilibrio surgía la salud; mientras que, de su desequilibrio, surgía la enfermedad; para Hipócrates, un exceso de bilis negra en varios sitios del cuerpo causaba cáncer (American Cancer Society; <https://www.cancer.org/cancer/cancer-basics/history-of-cancer/modern-knowledge-and-cancer-causes.html>, fecha de consulta 11 de febrero del 2022). Actualmente se sabe que el cáncer es una enfermedad heterogénea caracterizada por la proliferación celular descontrolada de células que presentan mutaciones genéticas, resisten a señales inhibitorias, evaden apoptosis, se adaptan, invaden y migran desde un sitio primario hasta tejidos distantes, tienen la capacidad de generar nuevos vasos sanguíneos, presentan desregulación energética, promueven un ambiente inflamatorio y evaden el sistema inmunológico; la convergencia de estos procesos biológicos conlleva al desarrollo del cáncer (Meza-Junco et al., 2006).

A pesar de los esfuerzos en la prevención y detección temprana, el cáncer cervicouterino se encuentra dentro de las 5 principales neoplasias con mayor incidencia y mortalidad en la mujer a nivel mundial, lo que representa un problema en materia de salud pública que requiere ser abordado.

## 1.1. Cáncer cervicouterino

El cáncer cervicouterino es una neoplasia que se caracteriza por el crecimiento anormal de células en la locación del cérvix, el cual se compone de dos partes: 1) Endocérvix, conformado por células glandulares y se encuentra en la parte interna que conecta al útero y 2) Exocérvix o ectocérvix, conformado por células escamosas, localizado en la parte externa que conecta con la vagina. El endocérvix y el ectocérvix se unen en la zona de transformación, donde comienzan la mayoría de las lesiones preneoplásicas (Figura 1) (Bhatla et al., 2018).



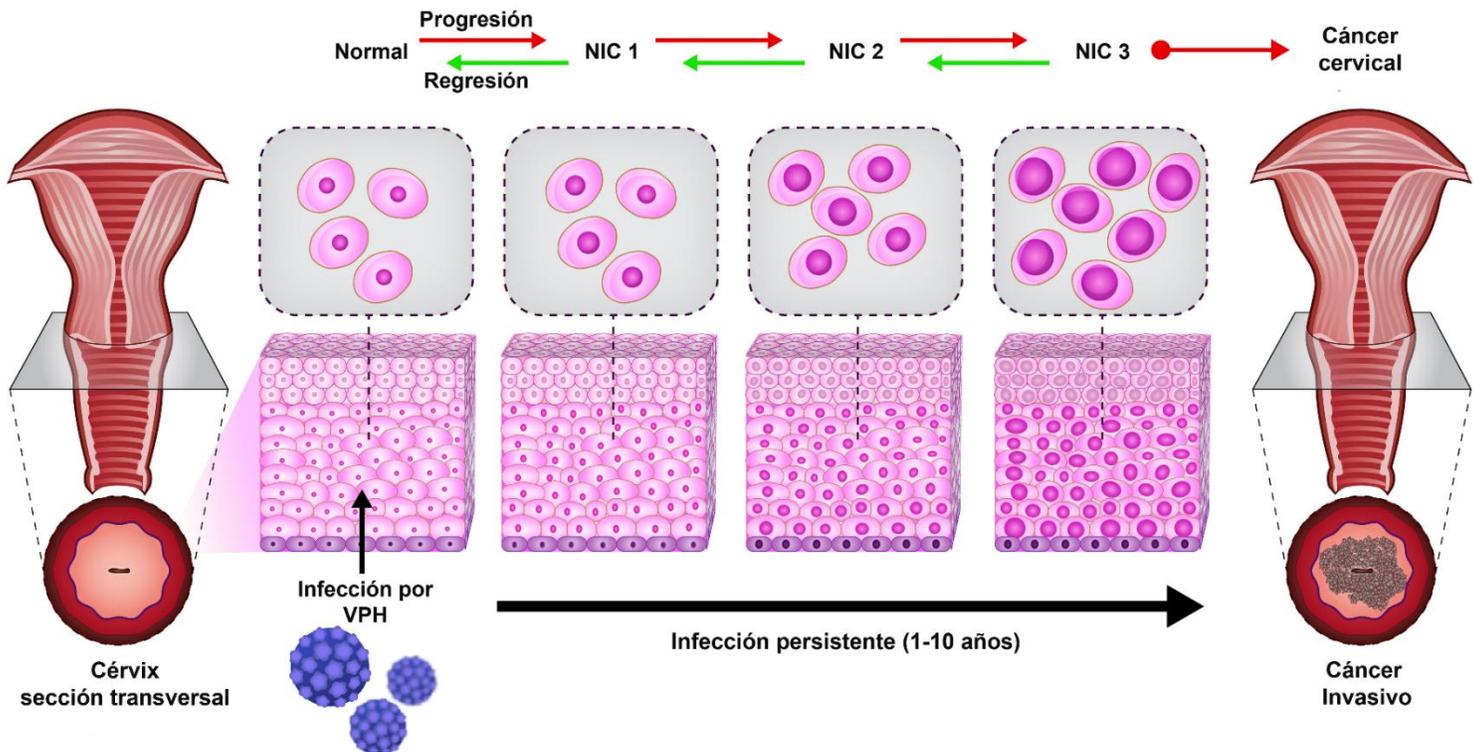
**Figura 1. Aparato reproductor femenino.** El aparato reproductor femenino abarca los ovarios, las trompas de Falopio, el útero, el cérvix y la vagina. El útero tiene una capa muscular externa denominada miometrio y un revestimiento interno denominado endometrio. El cérvix (también denominado cuello del útero o cuello uterino) constituye la porción final, inferior y estrecha que forma un canal con la vagina (NIH Instituto Nacional del Cáncer; <https://www.cancer.gov/espanol/buscar/resultados?swKeyword=cervix>, fecha de consulta 03 de marzo del 2022). El cérvix normal está compuesto por la unión de dos epitelios: el endocérvix y el exocérvix, a la unión de ambos epitelios se le denomina zona de transformación, en donde se observan la mayoría de las lesiones pre-neoplásicas. En la imagen izquierda se muestra el aparato reproductor femenino con cervix sano y en la representación de la derecha se ilustra el cervix con cáncer (Médica sur; [https://www.medicasur.com.mx/en\\_mx/ms/ms\\_sal\\_em\\_coi\\_cacu\\_01\\_cancer\\_cervicouterino](https://www.medicasur.com.mx/en_mx/ms/ms_sal_em_coi_cacu_01_cancer_cervicouterino), fecha de consulta 03 de marzo del 2022).

### 1.1.1. Lesiones preneoplásicas

Las células normales del cuello uterino presentan cambios anormales que pueden conducir a la formación de lesiones preneoplásicas, descritas comúnmente como Lesión Intraepitelial Escamosa (LIS), también conocidas como displasia que puede ser leve, moderada o severa; sin embargo, uno de los términos más utilizados es el de neoplasia intraepitelial cervical (NIC) (Lau et al., 2005). Las lesiones preneoplásicas pueden ser detectadas mediante el examen de Papanicolau y una vez analizadas son clasificadas con base en los lineamientos Bethesda en NIC grado I, II y III (Instituto Nacional de Salud Pública, <http://www.insp.mx/salud/index.html>, fecha de consulta 10 junio del 2022).

- **NIC I:** Es la lesión pre-neoplásica menos grave, tiene poca probabilidad de avanzar y desarrollar cáncer.
- **NIC II:** Se considera una displasia moderada y tiene alto riesgo de progresar a cáncer invasor.
- **NIC III:** La mayor parte del tejido se ve anormal, se considera una displasia severa y es la pre-neoplasia más grave.

La mayor parte de las lesiones preneoplásicas de bajo grado desaparecen por sí solas sin necesidad de tratamiento alguno; sin embargo, cierto porcentaje evoluciona a lesiones preneoplásicas de alto grado y tiene mayor probabilidad de convertirse en cáncer cervicouterino (Figura 2).



**Figura 2. Progresión de lesiones preneoplásicas a cáncer cervicouterino.** Las lesiones preneoplásicas se describen comúnmente con el término de neoplasia intraepitelial cervical (NIC) que, dependiendo de las características morfológicas, microscópicas y del grado de severidad son clasificadas en: NIC grado I, donde se observan los primeros cambios anormales que están confinados al tercio inferior del epitelio; NIC grado II, los cambios anormales se extienden al tercio medio (lesiones intraepiteliales escamosas de bajo grado) y NIC grado III, los cambios son uniformes y en todo el epitelio (lesión intraepitelial escamosa de alto grado), su identificación requiere de una tinción estándar de hematoxilina-eosina lo que permite coadyuvar a un tratamiento y reducir su progresión a carcinoma (Adaptado de (Yousefi et al., 2021).

### 1.1.2. Clasificación del cáncer cervicouterino

La organización mundial de la salud clasifica al cáncer cervicouterino en tres categorías: 1) carcinoma de células escamosas, el cual se desarrolla a partir de las células escamosas que conforman el exocérvix y comienza principalmente en la zona de transformación, 2) adenocarcinoma, que se desarrolla a partir de las células glandulares productoras de moco del endocérvix y 3) carcinoma adenoescamoso o mixto que exhibe características de ambos tipos de carcinoma. Dentro de estos tipos de cánceres, el más frecuente es el carcinoma de células escamosas (9 de cada 10 casos registrados); mientras que, el resto corresponde a los carcinomas adenoescamosos o mixtos (American Cancer Society, <https://www.cancer.org/es/cancer/cancer-de-cuello-uterino/deteccion-diagnostico->

[clasificacion-por-etapas/clasificacion-de-la-etapa.html](#), fecha de consulta 01 de diciembre del 2020).

Dependiendo de las características particulares del tumor y el grado de avance de la enfermedad, el cáncer cervicouterino se estadifica en diversas etapas.

### **1.1.3. Estadificación del cáncer cervicouterino**

El cáncer cervicouterino se estadifica en cuatro etapas, cuyas características han sido establecidas por la Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia (FIGO) (American Cancer Society; <https://www.cancer.org/es.html>, fecha de consulta 31 de enero 2021; (Bhatla et al., 2020).

**Etapas I.** El carcinoma está estrictamente confinado al cuello uterino.

- **Etapas IA.** El cáncer ha crecido en el tejido del cuello uterino y en los tejidos cercanos; sin embargo, no se ha propagado a otras zonas. Se puede observar con un microscopio a una profundidad máxima de invasión entre 3 mm y 5 mm.

**Etapas IA1.** El cáncer se observa solo con microscopio y mide menos de 3 mm, no se ha propagado del lugar inicial.

**Etapas IA2.** El cáncer se observa en microscopio y mide de 3 a 5 mm, no se ha propagado a otras zonas.

- **Etapas IB:** El cáncer es mayor a 5 mm y no se ha propagado a otras zonas.

**Etapas IB1.** El cáncer mide entre 5 mm y 2 cm, no obstante, no se ha propagado a otra zona.

**Etapas IB2.** El cáncer mide de 2-4 cm y aún no se propaga a otras zonas.

**Etapas IB3.** El cáncer mide 4 cm, no se ha propagado a otra zona.

**Etapas II.** El cáncer ha crecido fuera del cuello uterino; sin embargo, no se ha propagado fuera de la cavidad, ya que no ha invadido las paredes de la pelvis o la parte inferior de la vagina.

- **Etapas IIA.** El cáncer ha crecido fuera del cuello uterino, pero no más allá del parametrio.

**Etapas IIA1.** El cáncer no es mayor a 4 cm y no se ha propagado a otra área.

**Etapa IIA2.** El cáncer es mayor a 4 cm; sin embargo, no se ha propagado fuera del área.

- **Etapa IIB.** El cáncer ha crecido y se ha propagado a los tejidos más cercanos, mas no a ganglios ni a lugares distantes.

**Etapa III.** El cáncer se ha propagado a la parte inferior de la vagina o a las paredes pélvicas, puede bloquear los uréteres y hay posibilidad de que se haya propagado a los ganglios.

- **Etapa IIIA.** El cáncer se ha propagado a la parte inferior de la vagina, mas no a las paredes pélvicas ni a los ganglios.
- **Etapa IIIB.** El cáncer ha invadido las paredes de la pelvis y/o está bloqueando uno o ambos uréteres causando problemas con los riñones.
- **Etapa IIIC.** El cáncer puede ser de cualquier tamaño y se ha extendido a ganglios.

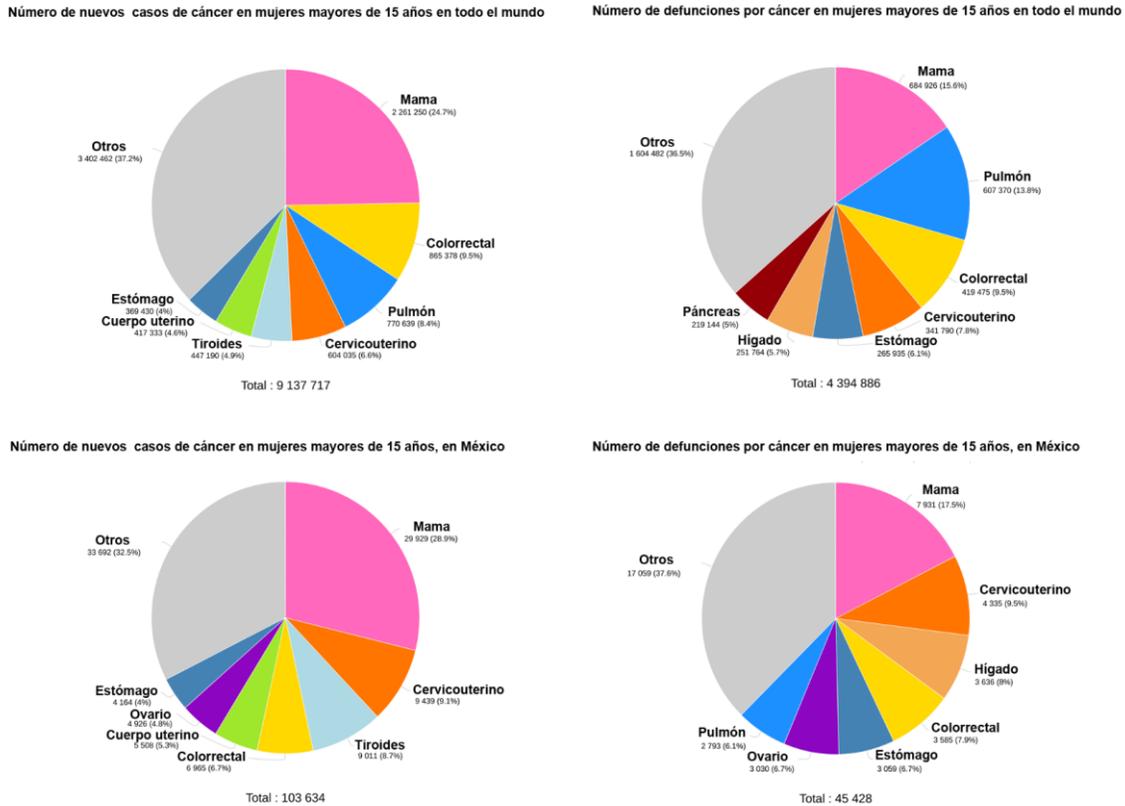
**Etapa IV.** El cáncer ha crecido en la vejiga y se ha expandido a otros órganos lejanos.

- **Etapa IVA.** El cáncer está creciendo fuera de la pelvis, se ha propagado a la vejiga o al recto.
- **Etapa IVB.** El cáncer se ha diseminado a ganglios y a otros órganos fuera del área pélvica como pulmones o huesos.

## **1.2. Incidencia y mortalidad del cáncer cervicouterino**

El cáncer cervicouterino aún persiste como un problema de salud pública. Hasta el año 2020 a nivel mundial se registraron 604,035 nuevos casos (Figura 3, panel superior izquierdo) y 341,790 defunciones (Figura 3, panel superior derecho), lo que corresponde a un 6.6 % y 7.8% de incidencia y mortalidad; respectivamente, en referencia al número total de neoplasias. En nuestro país, el cáncer cervicouterino es la segunda neoplasia con mayor incidencia y mortalidad (Figura 3 panel inferior), en el 2020 se registraron 9,439 nuevos casos en mujeres mayores de 15 años, lo cual corresponde al 9.1% de incidencia con respecto al total de neoplasias y el número estimado de defunciones fue 4,335 (9.5% del total

de muertes por neoplasia) (Globocan 2020; <https://gco.iarc.fr/today/home>, fecha de consulta 10 de febrero del 2022).



**Figura 3.- Incidencia y mortalidad de cáncer cervicouterino en la población femenina mayor de 15 años, en México y en el Mundo.** El panel superior muestra el número de nuevos casos y el número de muertes por cáncer en la población femenina a nivel mundial; mientras que el panel inferior muestra el número de nuevos casos y el número de muertes por cáncer en la población femenina en México. Cada neoplasia se denota de un color, se muestra el número de casos y entre paréntesis se indica el porcentaje de incidencia o muertes de esta neoplasia. El cáncer cervicouterino se identifica en color naranja, y ocupa el 4º lugar en incidencia y mortalidad a nivel mundial; mientras que, en nuestro país se posiciona en 2º lugar, tanto en incidencia como en mortalidad (Globocan 2020; <https://gco.iarc.fr/today/home>, fecha de consulta 23 de noviembre del 2022).

Si bien la incidencia de cáncer cervicouterino ha ido a la baja en los últimos 15 años, la mortalidad por este tipo de cáncer es verdaderamente alarmante con una razón mortalidad-incidencia a nivel mundial de más del 50% y en nuestro país corre el riesgo de superar este porcentaje (Tabla 1) (Globocan, 2020, <https://gco.iarc.fr/today/home>, fecha de consulta 23 de noviembre del 2022).

---

**Tabla 1. Incidencia y mortalidad de cáncer cervicouterino**

---

<b>Población</b>	<b>Nuevos casos</b>	<b>Defunciones</b>	<b>Razón mortalidad-incidencia</b>
Mundial	604,035	341,790	56.58%
México	9,439	4,335	45.92%

---

Se muestran el número estimado de nuevos casos y defunciones por cáncer cervicouterino a nivel mundial y en México, así como la razón mortalidad-incidencia de esta neoplasia en mujeres mayores de 15 años (Globocan, 2020, <https://gco.iarc.fr/today/home>, fecha de consulta 23 de noviembre del 2022).

Con base en lo anterior, existe la necesidad de ahondar en los procesos implicados en la génesis, promoción, detección, progresión y tratamiento de esta neoplasia.

### **1.3. Factores de riesgo, detección y tratamiento del cáncer cervicouterino**

La organización mundial de la salud habla de cinco principales factores de riesgo para el desarrollo de enfermedades no transmisibles como son, las enfermedades cardíacas, diabetes y cáncer, los cuales son: tabaquismo, consumo nocivo de alcohol, alimentación no saludable, inactividad física y el control de las enfermedades no transmisibles. En referencia al cáncer cervicouterino, los factores de riesgo directamente relacionados con esta neoplasia son: inicio de la vida sexual a temprana edad, múltiples parejas sexuales, infecciones vaginales, consumo de tabaco, uso de anticonceptivos orales u hormonas, no realizar estudios para una detección temprana e infección por el virus del papiloma humano (VPH). La infección por el VPH, constituye el mayor factor de riesgo para el desarrollo del cáncer cervicouterino, ya que es el principal agente causal de la enfermedad (Moore et al., 2001; Tirado-Gómez et al., 2005; Gariglio et al., 2009; Melo et al., 2016). Ha este respecto se han implementado estrategias de prevención primaria como las vacunas profilácticas y prevención secundaria que incluye pruebas para el diagnóstico oportuno como la citología y el papanicolaou. Si se detecta alguna anomalía en las pruebas mencionadas anteriormente, se

indican pruebas complementarias como la colposcopia, toma de biopsia de cérvix y genotipificación del VPH. En la tabla 2 se resumen las pruebas para la detección del cáncer cervicouterino.

**Tabla 2. Pruebas para la detección del cáncer cervicouterino**

<b>Pruebas</b>	<b>Descripción</b>	<b>Recomendación</b>
<b>Citología cervical / Papanicolaou</b>	Se pueden realizar en mujeres de 21 a 64 años. Si el resultado es “adecuado” no se necesita realizar otros estudios; en cambio, sí se observan anormalidades es necesario un seguimiento clínico.	Negativo: Cada 3 años. Positivo: se refiere a la paciente a exámenes complementarios.
<b>Colposcopia</b>	Es un examen de confirmación, se evalúa el cérvix y se describe el grado de lesión, este estudio se realiza a cualquier mujer que acude por primera vez a revisión ginecológica y esencialmente en aquellas mujeres en las que la citología cervical muestra alteraciones del cérvix.	De acuerdo a los resultados se decide la frecuencia del estudio y el tratamiento.
<b>Biopsia</b>	La biopsia permite estudiar el tejido, diagnosticar el cáncer u otras anormalidades, se puede realizar acompañado de una colposcopia y un PCR.	
<b>PCR</b>	Detecta la genotipificación del VPH y la amplificación de los oncogenes <i>E6</i> y <i>E7</i> . Se sugiere realizar este estudio cuando los resultados de citología cervical o Papanicolaou sean anormales.	

Los estudios se deben realizar en mujeres de 21 a 65 años de edad y en situaciones que impliquen factores de riesgo que permitan una detección oportuna, se sugiere realizar una citología en primer lugar, si los resultados son anormales se requiere de una colposcopia y biopsia además de un examen de genotipificación, la frecuencia de los estudios depende de los resultados y puede variar de 5, 3 y 1 año respectivamente (McNamara et al., 2016; Hurtado-Salgado et al., 2018) (Secretaría de Salud, <http://www.dof.gob.mx/normasOficiales/2383/SALUD/SALUD.htm>, fecha de consulta: 01 de abril 2022).

La frecuencia de los estudios, así como el tratamiento depende del estado de salud de las pacientes, la edad, las conveniencias personales y la estadificación del cáncer, en la tabla 3 se observa algunos de los tratamientos sugeridos de acuerdo a la etapa en la que se encuentra la neoplasia (American Cancer Society; <https://www.cancer.org/es.html>, fecha de consulta 1 de noviembre 2020; Modificación a la norma oficial Mexicana NOM-014-SSA2-1994, para la prevención, detección, diagnóstico, tratamiento, control y vigilancia epidemiológica del cáncer cervicouterino; <http://www.dof.gob.mx/normasOficiales/2383/SALUD/SALUD.htm> fecha de consulta 10 de abril 2022).

**Tabla 3. Tratamiento del cáncer cervicouterino con base en la etapa en la que se encuentra la neoplasia**

<b>Procedimiento</b>	<b>Tratamiento</b>	<b>Estadificación</b>
<b>Cirugía</b>	Histerectomía simple o radical	IA1, IA2, IB1, IIA1
<b>Radioterapia</b>	Radioterapia con rayo externo o braquiterapia	IA2, IB1, IIA1
<b>Quimioterapia</b>	Cisplatino, carboplatino, 5-fluorouracilo, paclitaxel o topotecán	IIB2, IIA2, IIB, IIIA, IIIB, IVA
<b>Terapia dirigida</b>	Bevacizumab o tisotumab vedotin	IVA, IVB
<b>Inmunoterapia</b>	Pembrolizumab	IVA, IVB

Dependiendo de la etapa y la edad en el momento del diagnóstico, se puede requerir más de un tipo de tratamiento. En los estadios I y II, se considera la opción de tratamientos que conserven la fertilidad (American Cancer Society; <https://www.cancer.org/es.html>, fecha de consulta 1 de noviembre 2020; Modificación a la norma oficial Mexicana NOM-014-SSA2-1994, para la prevención, detección, diagnóstico, tratamiento, control y vigilancia epidemiológica del cáncer cervicouterino; <http://www.dof.gob.mx/normasOficiales/2383/SALUD/SALUD.htm> fecha de consulta 10 de abril 2022) .

Es conveniente considerar los efectos adversos de los tratamientos como; anemia, alopecia, diarrea, dolor, edema, fatiga, náuseas, vomito, estreñimiento, pérdida de apetito, pérdida de peso, por mencionar solo algunos, por eso mismo, se requiere de estrategias terapéuticas que puedan coadyuvar o potencializar el tratamiento y al mismo tiempo disminuir efectos secundarios.

## **1.4. Virus del papiloma humano**

Actualmente se conocen 200 tipos virales del VPH clasificados como alto y bajo riesgo, dependiendo del tipo de lesión ocasionada (McQuillan et al., 2017). La infección con VPH de bajo riesgo se relaciona con la generación de condilomas y el 90% de estos son causados por los VPH de tipo 6 y 11; en cambio, los VPH tipo 16, 18, 31, 45, 56, son considerados de alto riesgo, por su capacidad oncogénica. Los VPH de tipo 16 y 18 están presentes en aproximadamente en el 70% de los cánceres cervicales. Particularmente el VPH tipo 16 es el más frecuente y se relaciona más con el desarrollo de cáncer cervical de tipo escamoso; mientras que el VPH tipo 18 se asocia más con la generación de adenocarcinomas (Hellner et al., 2011).

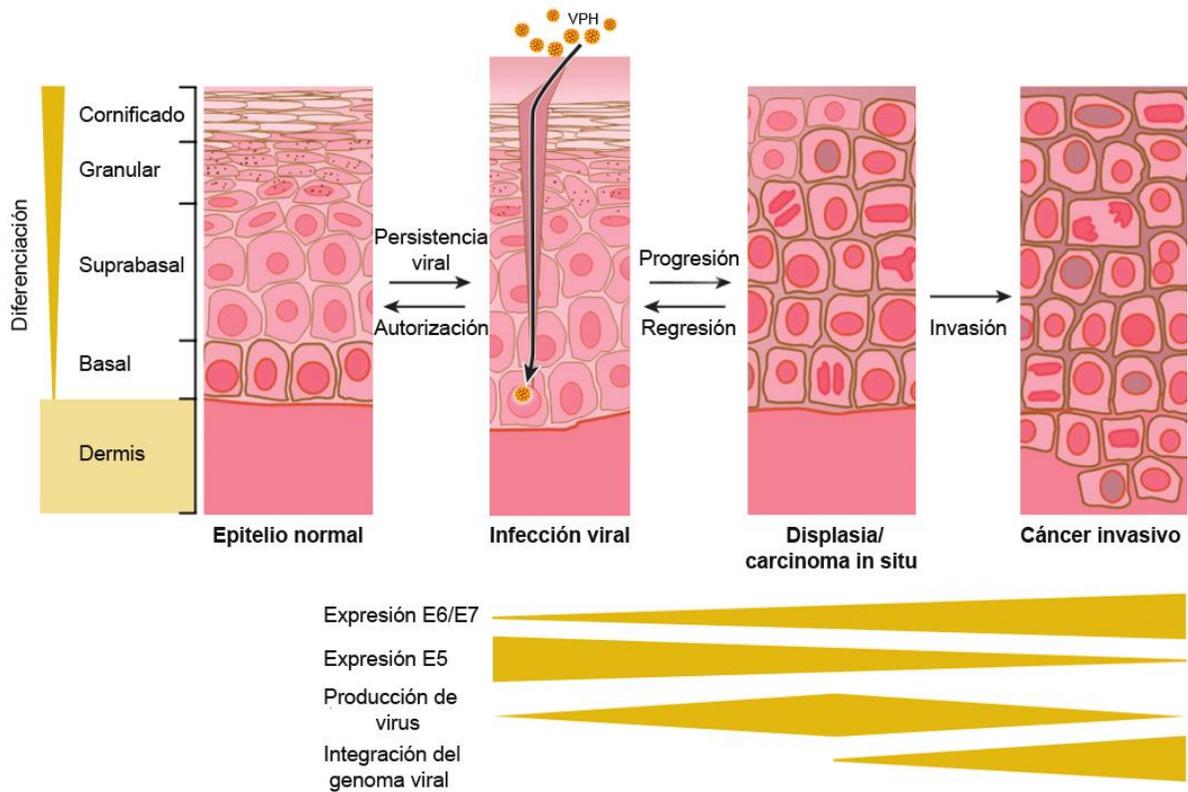
### **1.4.1. Estructura y genoma del VPH**

El VPH es un tipo de virus de ADN de doble cadena circular, de aproximadamente 55 nm de diámetro, cuenta con 8000 pares de bases, no presenta envoltura, sino una cápside icosaédrica constituida por 72 capsómeros pentaméricos. El genoma del VPH, está formado por tres regiones de codificación funcional: 1) Región para codificar genes de expresión temprana (E, early), 2) Región para codificar genes de expresión tardía (L, late), y 3) Región reguladora no codificante, la región larga de control (LCR, de sus siglas en inglés “long control región”) (Muñoz et al., 2006). Los genes de expresión temprana, codifican para las proteínas no estructurales denominadas E1, E2, E3, E4, E5, E6, E7 y E8. La proteína E1 tiene funciones de helicasa, E2 es esencial para la replicación y la transcripción del genoma viral, participa en la segregación genómica y en la encapsulación del virus, E4 regula la expresión de genes tardíos, controla el ensamblaje y la liberación de los viriones, E5 estimula la actividad transformante de E6 y E7, promueve la fusión celular generando aneuploidía e inestabilidad cromosómica; mientras que las proteínas E6 y E7, también conocidas como los oncogenes del VPH, participan en la disrupción del ciclo celular. Concretamente E6 se une e induce la degradación de la proteína supresora de tumores p53 inhibiendo la apoptosis, mientras que E7 se une e induce la degradación de la proteína supresora de tumores pRb, incrementa la actividad de las cinasas

dependientes de ciclinas y afecta la expresión de los genes de la fase de síntesis (fase S) por interacción directa con factores de transcripción E2F, promoviendo con ello proliferación celular descontrolada (McMurray et al., 2001; Hellner et al., 2011). Algunos VPH tienen marcos de lectura para las proteínas E3 y E8, aunque se desconocen sus funciones. Los genes de expresión tardía codifican para las proteínas estructurales L1 y L2, las cuales participan en el ensamblaje de la cápside viral. L1 es la proteína principal de la cápside, reconoce receptores sobre la célula hospedera, es altamente inmunogénica e induce anticuerpos neutralizantes. L2 participa en la unión del virión a la célula, en su entrada a la célula y su transporte al núcleo, la liberación del genoma y el ensamble de los viriones. La LCR contiene elementos de respuesta para factores de transcripción celulares tales como AP1, SP1, Oct1, entre otros; así como para las proteínas virales E1 y E2 que controlan la replicación y expresión del genoma viral (Hellner et al., 2011; Hareza et al., 2022).

#### **1.4.2. Mecanismo de infección viral**

Durante la actividad sexual, los VPH pueden acceder a las células epiteliales en la zona de transformación del epitelio cervical; o bien, ante una lesión, las células de tipo basal son vulnerables a la infección (Figura 4) (De la Fuente-Villarreal, 2010; Hellner et al., 2011; Doorbar et al., 2015). El ciclo infeccioso del VPH comienza con su unión a la superficie celular mediante la interacción de la proteína L1 de la cápside con proteoglicanos de heparán sulfato de la célula basal, posteriormente se lleva a cabo la internalización del virión al citoplasma mediante endocitosis y por un proceso de reducción química se degrada la cápside viral, se rompen los puentes disulfuro que estabilizan la cápside, originando capsómeros y monómeros, los cuales son transportados al núcleo junto con pequeños fragmentos del ADN viral. Así, el genoma viral y las proteínas de la cápside participan en los procesos de transcripción génica, replicación del ADN y maduración de viriones (Giroglou et al., 2001; Nelson et al., 2002; Rivera et al., 2006).



**Figura 4. Mecanismo de infección del VPH.** El VPH infecta las células basales del epitelio escamoso, lo cual puede conducir a displasia y si la infección es por VPH de alto riesgo puede evolucionar a carcinoma. La progresión desde la infección viral hasta el desarrollo de displasia es un proceso lento y muchas lesiones regresan espontáneamente. La displasia se caracteriza por incremento de la actividad mitótica de las células de la capa basal y suprabasal del epitelio escamoso, lo cual puede ocurrir como una consecuencia de la expresión de los oncogenes E6 y E7, lo que contribuye a la inestabilidad genómica. La progresión maligna es frecuentemente acompañada por la integración de porciones del genoma del VPH dentro del cromosoma de la célula hospedera. Esto conduce a un incremento en la expresión de las oncoproteínas E6 y E7, pérdida de la expresión de E5 y falla para producir la progenie viral (Adaptado de (Hellner et al., 2011)).

### 1.5. Nutrición y respuesta inmune eficiente contra el VPH

El sistema inmunológico es el sistema de defensa del cuerpo, cuya función primaria es proteger el cuerpo de agentes patógenos como virus, bacterias, hongos, toxinas o cualquier agente reconocido como extraño y que pueda originar alguna enfermedad. Respecto al último punto, el sistema inmunológico también participa activamente en la prevención del cáncer, ya que reconoce a las células neoplásicas como extrañas y genera mecanismos de defensa contra éstas. Para que el sistema inmunológico, funcione de manera óptima, intervienen varios

factores, uno de los más importantes es la nutrición adecuada, la cual permite iniciar una respuesta inmune eficaz contra las infecciones. Por lo tanto, una mala nutrición tiene repercusiones importantes ya que se disminuye la actividad de los fagocitos y la actividad del sistema de secreción de anticuerpos, así como la producción de citosinas (Childs et al., 2019; Barrea et al., 2021). En referencia al desarrollo del cáncer cervical, la respuesta del sistema inmunológico juega un papel importante en la eliminación del VPH. Resultados de una investigación prospectiva en cáncer y nutrición, mostraron que hay una asociación inversa entre el consumo de frutas, vegetales y nutrientes (vitaminas A, C y E, antioxidantes, folatos y minerales) con la disminución del riesgo de infección del VPH, desarrollo de NIC y cáncer cervical (Medina et al., 2020). Adicionalmente se observó que el consumo de alimentos de origen vegetal tiene el potencial de suprimir los oncogenes *E6* y *E7* del VPH, evitar la transformación celular y reducir el riesgo de cáncer (Chih et al., 2013).

#### **1.6. Xantonas como agentes antineoplásicos**

Muchas plantas y frutas tienen actividades biológicas interesantes con aplicaciones terapéuticas potenciales que coadyuvan en la prevención y tratamiento de enfermedades, cuyos beneficios se atribuyen a una parte del alimento que contiene sustancias naturales bioactivas con propiedades farmacológicas; denominadas nutraceuticos (Zeisel, 1999; Das et al., 2012; Varzakas et al., 2016; Subedi et al., 2021). Las xantonas son nutraceuticos presentes en el mangostán (*Garcinia Mangostana Linn*), 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 y exhiben gran variedad de propiedades farmacológicas como efectos antioxidantes, cardioprotectores, antialérgicos, antivirales, antifúngicos, antibacteriales, antiinflamatorios y antineoplásicos (Pinto et al., 2005; Cassileth, 2011; Yang et al., 2017; Pinto et al., 2021). Con respecto a este último punto, la actividad antineoplásica de las xantonas se ha observado en células o modelos *in vivo* de leucemia (Matsumoto et al., 2004; Chen et al., 2014), feocromocitoma (Sato et al., 2004), cáncer de colon (Watanapokasin et al., 2011), carcinoma hepatocelular

(Hsieh et al., 2013), carcinoma epidermoide de boca (Fukuda et al., 2017), adenocarcinoma gástrico (Shan et al., 2014), cáncer de pulmón (Phan et al., 2018), melanoma (Beninati et al., 2014; Zhou et al., 2021), cáncer de próstata (Li et al., 2014), cáncer de mama (Zhu et al., 2021), cáncer de ovario (Ittiudomrak et al., 2019; Yu et al., 2020), y cáncer de cérvix (Pérez-Rojas et al., 2016; Chien and Hsieh, 2020; Nguyen et al., 2020). Más de 68 xantonas se han aislado del mangostán; no obstante, la más abundante y la más estudiada es la  $\alpha$ -mangostina, la cual exhibe potentes efectos antineoplásicos entre los que se incluyen inhibición de la proliferación celular, promoción de la apoptosis, promoción de la diferenciación celular e inhibición de la metástasis y angiogénesis cuyos mecanismos han sido ampliamente estudiados (Zhang et al., 2017).

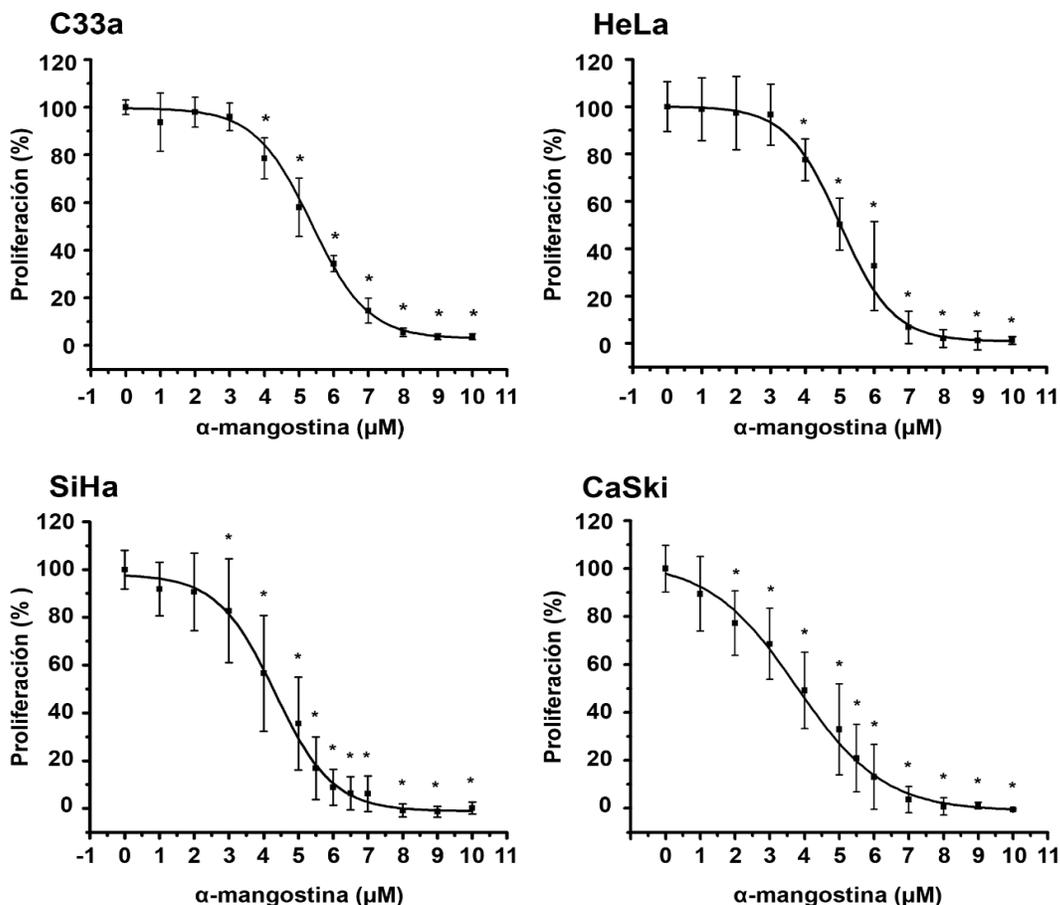
#### **1.6.1. Efectos antineoplásicos de la $\alpha$ -mangostina en cáncer cervicouterino**

En lo referente a cáncer cervicouterino, pocos son los estudios con los que se cuenta; a este respecto, se sabe que la  $\alpha$ -mangostina induce apoptosis a través de la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), activación de la vía de señalización ASK1/p38 y arresto del ciclo celular en modelos de cáncer cervicouterino (Pérez-Rojas et al., 2016; Lee et al., 2017). Adicionalmente se ha observado que la  $\alpha$ -mangostina detiene el ciclo celular en la fase G2-M en las células SiHa, promueve apoptosis por la vía intrínseca a través de la generación de ROS y disminuye la viabilidad y proliferación celular (El Habbash et al., 2017; Janardhanan et al., 2020).

##### **1.6.1.1. La $\alpha$ -mangostina inhibe la proliferación de células de cáncer cervicouterino con diferente potencia**

Previamente se evaluó el efecto de la  $\alpha$ -mangostina en la proliferación de las líneas celulares de cáncer cervical C33a (no expresa VPH), HeLa (expresa de 10-50 secuencias de VPH18), SiHa (expresa de 1-2 copias de VPH16) y CaSki (expresa ~600 copias de VPH16 y secuencias de VPH18) que además de expresar diferencialmente al VPH expresan al canal de potasio oncogénico éter a-go-go tipo 1 (EAG1) (Pater et al., 1985; Adler et al., 1997; Díaz L. et al., 2009). La

$\alpha$ -mangostina inhibió la proliferación del panel de líneas celulares de cáncer cervical de manera significativa y dependiente de la concentración (Figura 5).



**Figura 5.- Efecto de la  $\alpha$ -mangostina en la proliferación de células de cáncer cervicouterino.** La  $\alpha$ -mangostina inhibió la proliferación del panel completo de líneas celulares de cáncer cervical de manera significativa y dependiente de la concentración. Los resultados se muestran como el promedio  $\pm$  D.E de 6 réplicas en al menos 3 experimentos independientes. Los datos de las células tratadas con vehículo se normalizaron al 100%. \* P<0.001% vs vehículo (0  $\mu$ M) (manuscrito en preparación).

Con base en las curvas de concentración-respuesta se determinó la concentración inhibitoria al 50% ( $CI_{50}$ ), la cual hace referencia a la concentración necesaria de la  $\alpha$ -mangostina para inhibir el 50% de la proliferación celular (Tabla 4).

**Tabla 4.  $CI_{50}$  de la  $\alpha$ -mangostina en diferentes líneas celulares de cáncer cervicouterino**

Línea celular	$CI_{50}$ ( $\mu M \pm E.S.$ )
C33a	$5.35 \pm 0.07$
HeLa	$5.00 \pm 0.07$
SiHa	$4.32 \pm 0.16$
CaSki	$3.77 \pm 0.23$

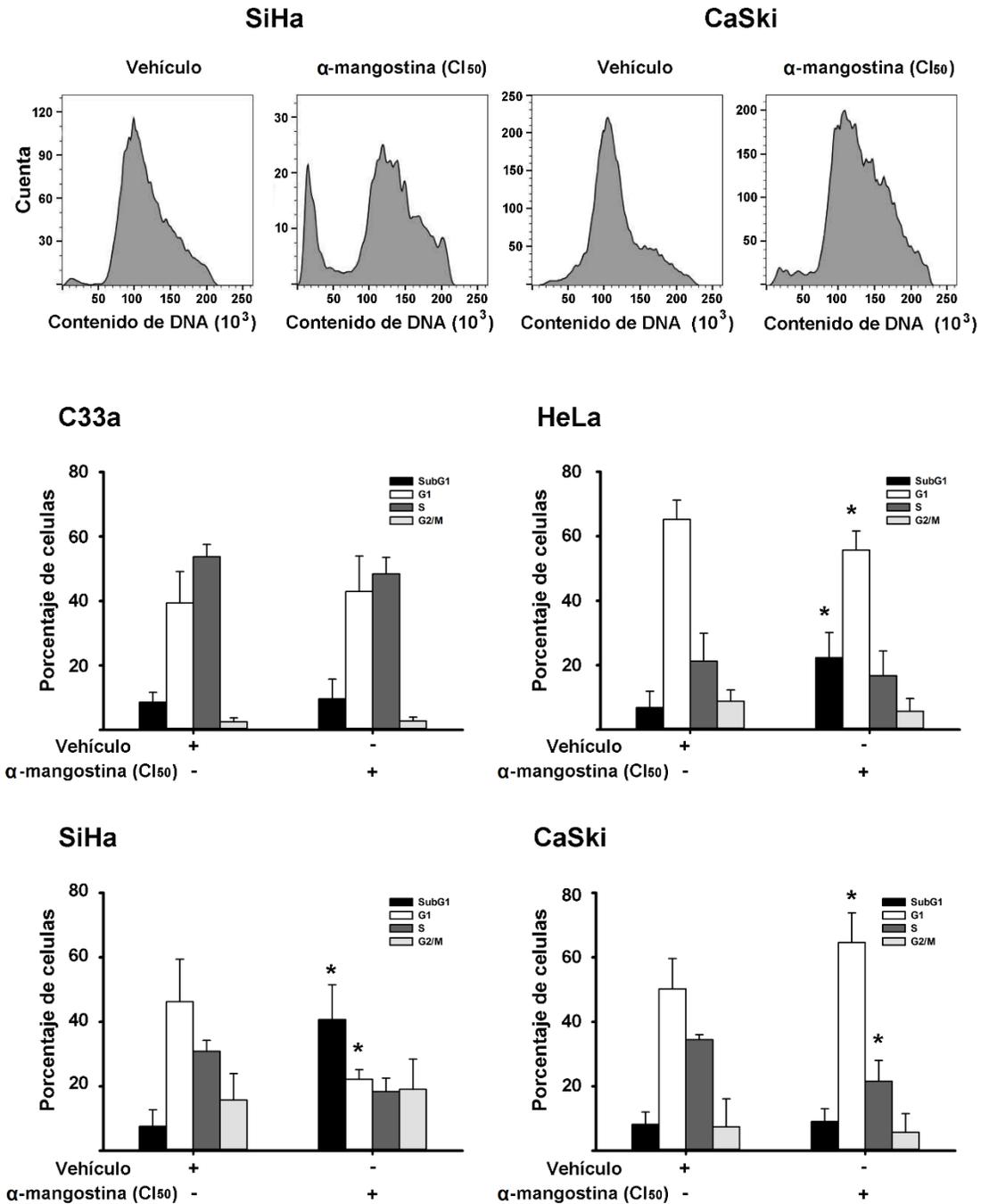
Concentración inhibitoria al 50 % ( $CI_{50}$ ) de la  $\alpha$ -mangostina en las células C33a, HeLa, SiHa y CaSki. Los resultados se representan como la media  $\pm$  E.S. (manuscrito en preparación).

Considerando los valores de la  $CI_{50}$  de la  $\alpha$ -mangostina, la sensibilidad de las líneas celulares al nutracéutico fue la siguiente: CaSki > SiHa > HeLa > C33a. Los resultados sugieren que la  $\alpha$ -mangostina inhibe con mayor potencia la proliferación de las líneas celulares que presentan mayor carga viral, como es el caso de las líneas celulares CaSki y SiHa.

Con el objetivo de dilucidar parte del mecanismo antineoplásico de la  $\alpha$ -mangostina en cáncer cervicouterino, se determinó el efecto su efecto en la distribución del ciclo celular de C33a, HeLa, SiHa y CaSki.

#### **1.6.1.2. La $\alpha$ -mangostina inhibe la progresión del ciclo celular de manera diferencial en células de cáncer cervicouterino**

La  $\alpha$ -mangostina a la respectiva  $CI_{50}$  promovió el incremento del número de células HeLa y SiHa en la fase SubG1, indicativo de muerte celular, acompañado de la disminución del número de células en la fase G1. En las células CaSki, la xantona promovió arresto del ciclo celular en la fase G1, acompañado de la disminución de las células en la fase S, mientras que en las células C33a no se observó efecto en la distribución del ciclo celular (Figura 6).



**Figura 6. Efecto de la  $\alpha$ -mangostina en la distribución del ciclo celular.** Se evaluó el efecto de la  $\alpha$ -mangostina a la respectiva concentración inhibitoria al 50% (CI<sub>50</sub>) de cada línea celular en la distribución del ciclo celular a las 48 horas de tratamiento. En las líneas celulares SiHa y HeLa el nutracéutico promovió muerte celular (fase SubG1) acompañada de la disminución de las células en la fase G1 del ciclo celular. En las células CaSki, la  $\alpha$ -mangostina promovió un arresto en la fase G1 del ciclo celular acompañado de la disminución de las células en la fase S. Los resultados se muestran como el promedio  $\pm$  D.S. de al menos 3 experimentos independientes. \* P<0.001% vs vehículo (manuscrito en preparación).

Adicionalmente se evaluó el efecto de la  $\alpha$ -mangostina en la expresión de los oncogenes del VPH, dado que también se ha demostrado que este compuesto natural exhibe efectos antivirales (ver sección 1.7).

### 1.6.1.3. La $\alpha$ -mangostina inhibe la expresión de los oncogenes *E6* y *E7* del VPH16

Para evaluar el efecto de la  $\alpha$ -mangostina en la expresión de los oncogenes del VPH, se utilizaron las líneas celulares de cáncer cervicouterino que expresan mayor número de copias del VPH tipo 16: SiHa (1-2 copias del VPH16) y CaSki (600 copias del VPH16). Las células se incubaron en presencia de la  $\alpha$ -mangostina (2-10  $\mu$ M) y su respectivo vehículo durante 24 horas, al cabo de este tiempo, se extrajo el RNA, se sintetizó el DNA complementario y se evaluó el efecto del nutraceutico en la expresión de los oncogenes mediante PCR en tiempo real. La  $\alpha$ -mangostina a 10  $\mu$ M inhibió la expresión de los oncogenes *E6* y *E7* del VPH16 en ambas líneas celulares. No obstante, el efecto fue mayor y de manera significativa en las células CaSki, en la cual la  $\alpha$ -mangostina inhibió en un 66% y 78% la expresión de *E6* y *E7* respectivamente (Tabla 5).

**Tabla 5. Efecto de la  $\alpha$ -mangostina en la inhibición de la expresión de los oncogenes *E6* y *E7* del VPH16**

Línea celular	<i>E6</i> (% de inhibición)	<i>E7</i> (% de inhibición)
SiHa	32 $\pm$ 29	26 $\pm$ 29
<b>CaSki</b>	<b>66 <math>\pm</math> 22*</b>	<b>78 <math>\pm</math> 11*</b>

La  $\alpha$ -mangostina (10  $\mu$ M) inhibió la expresión de los oncogenes *E6* y *E7* del virus del papiloma humano tipo 16 (HPV16). Los valores se muestran como el promedio  $\pm$  D.E. del porcentaje de inhibición del oncogén. N $\geq$ 3 experimentos independientes, cada experimento con 3 réplicas. \*P<0.05 vs vehículo. Se resalta en negritas los valores significativamente diferentes (manuscrito en preparación).

Díaz y colaboradores reportaron en el 2009 que la transfección de los oncogenes del VPH a queratinocitos, promueve el incremento en la expresión del canal *EAG1* (Díaz et al., 2009), por lo que también se evaluó el efecto de la  $\alpha$ -mangostina en la expresión del canal.

#### **1.6.1.4. La $\alpha$ -mangostina inhibe la expresión génica de *EAG1***

La expresión de *EAG1* se encuentra prácticamente confinada al sistema nervioso central; sin embargo, su expresión exacerbada fuera de dicho sitio se asocia con la progresión del cáncer (Hemmerlein et al., 2006; Han et al., 2017). El canal *EAG1* presenta alto potencial oncogénico de acuerdo a lo demostrado por Pardo y colaboradores en 1999, en cuyos experimentos *in vitro* se evidenció que la transfección del canal a células de mamífero confiere un fenotipo canceroso; es decir, pierden la inhibición por contacto formando cúmulos, así como la dependencia a factores de crecimiento presentando alta síntesis de DNA y actividad metabólica (Pardo et al., 1999). La expresión de *EAG1* ha sido detectada en varias líneas celulares tumorales; así como en cultivos primarios y en diversos tejidos neoplásicos, por lo que ha sido identificado como nuevo blanco oncológico presente en diferentes tipos de tumores, ya que la inhibición de su expresión y/o actividad disminuye la proliferación celular (Pardo et al., 1999; Farías et al., 2004; Hemmerlein et al., 2006; García-Becerra et al., 2010)

La relación entre el canal de potasio *EAG1* y el cáncer cervical ha sido estudiado con anterioridad, en donde se demostró que la expresión de *EAG1* se observa incluso en muestras de pacientes con Papanicolaou negativo; una de estas muestras provenía de una paciente con infección por VPH de alto riesgo, otra presentó cistadenoma paratubárico y la tercer paciente tenía hiperplasia endometrial; adicionalmente, la expresión de *EAG1* se observa en muestras de cáncer cervicouterino y el nivel de expresión incrementa conforme avanza la malignidad de la neoplasia; es decir, los niveles de expresión de *EAG1* incrementan de lesiones de bajo grado a lesiones de alto grado (Farías et al., 2004; Ortiz et al., 2011). Adicionalmente, los oncogenes *E6* y *E7* del VPH incrementan la expresión de *EAG1* (Díaz et al., 2009; Chávez-López et al., 2020). Debido a la elevada presencia de *EAG1* en tumores de cáncer de cérvix, a su relación con la infección del VPH y al ser un indicador de proliferación celular que puede conducir a tumores malignos podemos considerar a este canal como un marcador temprano y un blanco terapéutico en las primeras etapas del cáncer de cérvix (Ortiz et al., 2011). En los últimos 10 años la investigación para encontrar

nuevas formas de tratamiento en diferentes tipos de cáncer se ha enfocado en la búsqueda de compuestos que bloqueen la expresión y/o actividad del canal EAG1; a este respecto, el astemizol, un antihistamínico H<sub>1</sub>, bloquea la actividad del canal EAG1 y disminuye la proliferación de células neoplásicas *in vitro* e *in vivo*; no obstante, dicho fármaco presenta ciertas desventajas como antineoplásico a nivel sociológico y comercial por sus efectos secundarios a nivel cardiaco (García-Quiroz et al., 2011; García-Quiroz et al., 2019). Por lo tanto, compuestos capaces de inhibir la expresión o actividad del canal sin efectos secundarios graves, pudieran fungir como buenos agentes antineoplásicos. Interesantemente, la  $\alpha$ -mangostina inhibe la expresión génica de *EAG1* de manera significativa y dependiente de la concentración en las células CaSki (Tabla 6), mientras que en las células SiHa si bien hay una disminución de la expresión no se observó diferencia significativa.

**Tabla 6. Efecto de la  $\alpha$ -mangostina en la expresión del canal *EAG1* en líneas celulares de cáncer cervicouterino**

$\alpha$ -mangostina ( $\mu$ M)	<i>EAG1</i> (% de inhibición)	
	SiHa	CaSki
0	0 $\pm$ 12	0 $\pm$ 8
4	16 $\pm$ 26	13 $\pm$ 18
6	16 $\pm$ 19	<b>30 <math>\pm</math> 19*</b>
8	17 $\pm$ 30	<b>33 <math>\pm</math> 22*</b>
10	18 $\pm$ 19	<b>53 <math>\pm</math> 19*</b>

La  $\alpha$ -mangostina (4-10  $\mu$ M) inhibió la expresión del canal oncogénico éter à-go-go tipo 1 (*EAG1*) en las células CaSki de manera dependiente de la concentración. Los valores se muestran como el promedio  $\pm$  D.S. del porcentaje (%) de inhibición del canal. N $\geq$ 3 experimentos independientes, cada experimento con 3 réplicas. \*P<0.05 vs vehículo (0  $\mu$ M de  $\alpha$ -mangostina). Se resalta en negritas los valores significativamente diferentes (manuscrito en preparación).

### 1.7. Efectos antivirales de la $\alpha$ -mangostina

Muchos compuestos de origen natural han sido identificados como agentes antivirales, dentro de los cuales resalta la  $\alpha$ -mangostina (Navarro et al., 2017). A este respecto, se sabe que la  $\alpha$ -mangostina ( $CI_{50}= 5.12 \mu M$ ) interfiere con el ciclo de replicación del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), al inhibir la actividad de la proteasa VIH-1 (Chen et al., 1996), la cual participa en el ensamble y maduración de los viriones infecciosos (Brik and Wong, 2003) Además, la  $\alpha$ -mangostina (5 y 10  $\mu g/ml$ ) disminuye la capacidad de infección del rotavirus, al mejorar la respuesta inmune innata ante la infección viral (Shaneyfelt et al., 2006). Adicionalmente, esta xantona ( $CI_{50}= 6.3 \mu M$ ) suprime la replicación del virus de la hepatitis C (VHC) al restaurar los niveles de ROS (Choi et al., 2014) ya que existe una asociación directa entre el estrés oxidativo y la infección por el VHC (Ivanov et al., 2013). La infección severa por el virus del dengue se asocia con alta carga viral y producción masiva de citosinas pro-inflamatorias, evento conocido como tormenta de citosinas; interesantemente, el tratamiento con  $\alpha$ -mangostina (15 y 20  $\mu M$ ) inhibe la replicación del virus del dengue y la expresión de citosinas y quimosinas en células de carcinoma hepatocelular (Tarasuk et al., 2017), células monoculares de sangre periférica (Sugiyanto et al., 2019) y células dendríticas (Yongpitakwattana et al., 2021), incluso de manera más potente que el antiviral ribavirin y el antiinflamatorio dexametasona, respectivamente (Tarasuk et al., 2017). Posteriormente mediante la técnica de docking molecular se determinó que la  $\alpha$ -mangostina (8  $\mu M$ ) suprime la producción del virus del dengue al interactuar con proteínas que participan en los diferentes estados del ciclo de replicación viral, tal como la metiltransferasa NS5, la proteasa NS2B-NS3 y la glicoproteína (Panda et al., 2021). Por otra parte, la  $\alpha$ -mangostina (8  $\mu M$ ) también inhibe la infección y replicación del virus chikungunya a través de la posible interacción con múltiples proteínas blanco del virus (Patil et al., 2021). Recientemente también se determinó que la  $\alpha$ -mangostina (36.45  $\mu M$ ) y derivados de esta interactúan con las principales proteasas del SARS-COV2 (Hidayat et al., 2021).

## 2. JUSTIFICACIÓN

Si bien la incidencia del cáncer cervicouterino ha ido a la baja en los últimos 15 años, la mortalidad por este tipo de cáncer es verdaderamente alarmante con una razón mortalidad-incidencia a nivel mundial de más del 50% y en nuestro país corre el riesgo de superar este porcentaje (44.9%), por lo que resulta evidente la necesidad de desarrollar nuevas estrategias terapéuticas que reflejen mayor éxito. Con base en las características antineoplásicas y antivirales de la  $\alpha$ -mangostina, este compuesto constituye un excelente candidato para prevenir el desarrollo tumoral o bien coadyuvar en el tratamiento del cáncer cervicouterino sin efectos secundarios considerables en comparación a los que presentan los agentes quimioterapéuticos convencionales, con el objetivo de extrapolarlo en un futuro a la clínica. Con base en lo anterior y en los estudios previos de este grupo de trabajo, es necesario ampliar la investigación referente a las propiedades antineoplásicas y mecanismos moleculares de acción de la xantona en modelos *in vivo* de cáncer cervicouterino

### **3. HIPÓTESIS**

La  $\alpha$ -mangostina inhibirá el crecimiento tumoral y la expresión génica de *E6*, *E7* y *EAG1* en un modelo murino de cáncer cervicouterino.

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1. Objetivo General**

Evaluar el efecto de la  $\alpha$ -mangostina en la inhibición del crecimiento tumoral y en la expresión génica de *E6*, *E7* y *EAG1* en un modelo murino de cáncer cervicouterino.

### **4.2. Objetivos Específicos**

- Evaluar la tumorigenicidad de las líneas celulares de cáncer cervicouterino SiHa y CaSki.
- Determinar el tiempo de aparición tumoral y el tiempo de crecimiento tumoral antes de detectar en el ratón la aparición de los signos determinados como puntos finales (criterios que se establecen en experimentos que involucran animales para la investigación).
- Evaluar el efecto de la  $\alpha$ -mangostina en la inhibición del crecimiento tumoral.
- Evaluar el efecto de la  $\alpha$ -mangostina en la inhibición de la expresión génica de los oncogenes del VPH y *EAG1* en el tejido tumoral.

## **5. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **5.1. Reactivos**

Los medios de cultivo y suero fetal de bovino (SFB) fueron adquiridos de AccesoLab. La  $\alpha$ -mangostina se adquirió de Sigma-Aldrich (número de catálogo: M3824-50MG, pureza  $\geq 98\%$ )

### **5.2. Líneas celulares y cultivo celular**

Se evaluó la tumorigenicidad de las líneas celulares de cáncer cervical positivas a EAG1 y VPH16: SiHa (presenta 1-2 copias de VPH16 por célula) y CaSki (presenta ~600 copias de VPH16 por célula y secuencias relacionadas a VPH18). Las células SiHa se cultivaron en medio DMEM-HG (de sus siglas en inglés “Dulbecco's Modified Eagle Medium-High in Glucose”) y las células CaSki en medio RPMI (de sus siglas en inglés “Roswell Park Memorial Institute”), ambos medios se suplementaron con 100 U/ml de penicilina, 100  $\mu\text{g/ml}$  de streptomina y 10% de SFB inactivado. El mantenimiento celular se llevó a cabo en cajas de 75  $\text{cm}^2$  a 37°C bajo atmósfera húmeda, 5% de  $\text{CO}_2$  y 95% de aire. El levantamiento de las células para su amplificación se llevó a cabo mediante rondas de tripsinización (a 37° C durante 2 minutos).

### **5.3. Inducción de tumores, tratamiento y determinación del volumen tumoral**

Este estudio fue aprobado por el comité interno para el cuidado y uso de animales de laboratorio (CICUAL: BRE-1920) del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, los estudios en ratones se llevaron a cabo de acuerdo a las normas nacionales e internacionales, incluyendo la norma oficial mexicana 062-ZOO-1999 y los lineamientos del Comité Canadiense del Cuidado de los Animales (CCAC, de sus siglas en inglés “Canadian Council on Animal Care”). Se utilizaron ratones hembra atímicos (nu/nu, fondo genético BALB/c de ~ 6 semanas de edad), los cuales se mantuvieron en cajas estériles ventiladas bajo las siguientes condiciones: humedad y temperatura constantes (25° C  $\pm$  1° C), ciclos de luz-oscuridad de 12/12 horas, alimento (5053 irradiado) y aguas estériles *ad libitum*.

Con la finalidad de respetar los criterios que se establecen en experimentos que involucran animales para la investigación establecidos por el CCAC, observaremos los siguientes elementos para la determinación de los puntos finales:

- El crecimiento de la masa tumoral no deberá rebasar el punto donde el animal se vea afectado significativamente en sus funciones corporales normales (alimentación, desplazamiento, etc.).
- La carga tumoral en animales involucrados en experimentos terapéuticos no deberá exceder del 10% de su peso (17 mm en ratones de 25 g).
- La masa tumoral no deberá provocar dolor, estrés o dificultad de movimiento debido a su localización en el cuerpo del animal.
- La pérdida de peso del animal no debe exceder del 20 % (considerando la masa tumoral).
- Ulceración o infección en el sitio del tumor.
- Invasión del tejido adyacente a la masa tumoral.
- Incontinencia o diarrea prolongada.
- Distensión abdominal significativa o donde la carga de ascitis exceda del 10% del peso corporal básico.
- Trauma auto inducido persistente.
- Respiración laboriosa, descargas sanguinolentas o muco-purulentas por cualquier orificio.
- Moribundo, letárgico o fallo en la respuesta a estímulos suaves.
- Señales de dolor y angustia tales como: aislamiento, mordeduras, piloerección, lomo arqueado, ojos y abdomen hundidos, deshidratación.
- Patrones alterados de la alimentación, de las conductas de aseo, automutilación y/o agresión.
- Hipotermia.

Cuando aparecieron algunas de las señales anteriores, se solicitó la evaluación por parte del veterinario asignado para el cuidado de los animales y se procedió según el caso y la severidad del mismo, a proporcionar analgésicos

(ketoprofeno 2-5 mg/kg de peso por vía S.C. cada 24 horas o meloxicam 1-2 mg/kg de peso *per os* cada 12 horas) o a la eliminación inmediata de forma humanitaria de los animales en cuestión.

Para evaluar la tumorigenicidad de las líneas celulares propuestas, se inocularon por vía S.C. las células SiHa y CaSki a una razón de  $5 \times 10^6$  células en 100  $\mu$ l de medio sin suplementar en el flanco inferior lateral de los ratones y se determinó el tiempo de aparición tumoral (días que tarda en aparecer el tumor). Cuando las células xenoinjertadas generaron tumor y éste alcanzó un volumen palpable de aproximadamente 30 mm<sup>3</sup>, los ratones se dividieron en dos grupos de tratamiento (Tabla 7), el cual se administró durante 1 mes.

**Tabla 7. Grupos de tratamiento**

Grupo	Tratamiento	Dosis
I	Vehículo (DMSO)	0.1%
II	$\alpha$ -mangostina	8mg/kg de peso/día

El dimetilsulfóxido (DMSO) y la  $\alpha$ -mangostina se diluyeron en el agua de beber de los ratones. El consumo promedio de agua por ratón es de aproximadamente 5 ml; sin embargo, cada semana se promedió el consumo de agua por ratón y en caso de ser necesario se reajustaron los cálculos de tal manera que los animales consuman la dosis indicada diariamente. Para preparar el tratamiento, primero se preparó una solución stock de  $\alpha$ -mangostina a una concentración de 200 mM, para lo cual se disolvieron 50 mg de  $\alpha$ -mangostina (P.M.=410.46 g/mol) en 609  $\mu$ l de DMSO. Dado que un ratón consume aproximadamente 5 ml de agua/día, se agregarán 2.436  $\mu$ l de la solución stock de  $\alpha$ -mangostina (lo que equivale a 0.20 mg de  $\alpha$ -mangostina) por cada 5 ml de agua, por lo que estarían consumiendo 0.20 mg de  $\alpha$ -mangostina por ratón de 25 g, lo que equivale a 8 mg/kg de peso/día.

Cada tercer día se monitorizó a los ratones para evaluar la posible aparición de los signos determinados como puntos finales y con un calibrador vernier se midió el largo (L) y ancho (A) del tumor para calcular el volumen tumoral (Fórmula 1).

$$VT = LA^2/2$$

**Fórmula 1. Volumen tumoral (VT).** Donde L y A corresponden al eje mayor y menor del tumor, respectivamente.

Al término de los experimentos, se anestesiaron a los animales con pentobarbital sódico (50-70 mg/kg) y se colectó la sangre por punción cardíaca para evaluar en futuros experimentos los niveles en suero del antígeno de células escamosas (SCC, de sus siglas en inglés “squamous cell carcinoma”), marcador de cáncer de cérvix que correlaciona con el estadio del tumor y el tamaño del mismo, finalmente se sacrificó al animal por dislocación cervical y se recolectó el tumor, el cual se dividió en tres partes: una se almacenó en trizol® y se congeló inmediatamente a -70°C para la extracción de RNA y estudios de expresión génica, la segunda se fijó en formaldehído al 10% para futuros estudios de inmunohistoquímica (IHQ) y la tercera se almacenó en buffer de lisis RIPA para la futura determinación de expresión proteica mediante la técnica de Western Blot.

#### **5.4. Estudios de expresión génica**

Se extrajo el RNA del tumor y éste se cuantificó utilizando la placa para micro-volúmenes Take 3™ compatible con el lector de microplacas Synergy HT (BioTek, VT, EUA), a través del cual se leyó la absorbancia de la muestra a 260 nm y 280 nm; dado que, a estas longitudes de onda los ácidos nucleicos y proteínas tienen su máximo pico de absorción, respectivamente. Por unidad de absorbancia la concentración de RNA es de 40 µg/ml, por lo que el equipo aplica este factor para determinar la concentración total de RNA en la muestra. Adicionalmente se determinó la pureza del RNA mediante la relación del valor de absorbancia a 260 nm dividido entre el valor de absorbancia a 280 nm ( $A_{260}/A_{280}$ ) y se consideró aceptable cuando los valores fueron mayores a 1.8. La reacción de retrotranscripción se llevó a cabo con 2 µg de RNA utilizando el kit Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit de Thermo Fisher Scientific (siguiendo las indicaciones del fabricante) en el equipo Veriti 96 well Thermal Cycle (Thermo Fisher Scientific) bajo el siguiente protocolo: 25 °C x 10 min, 50 °C x 30 min y 85 °C x 5 min. El ADN complementario se almacenó a -20 °C hasta su uso. Mediante la técnica de PCR en tiempo real se evaluó el efecto del tratamiento en la expresión génica de *E6-VPH16*, *E7-VPH16* y *EAG1*. La expresión relativa del RNAm de cada gen estudiado se normalizó *versus* la expresión del gen de la proteína ribosomal 60S

L32 (RPL32 de sus siglas en inglés “Ribosomal Protein L32”). El nombre del gen, número de acceso, secuencia de oligos, amplicón resultante y sonda utilizada se especifican en la Tabla 8. La reacción de PCR se llevó a cabo en el termociclador LightCycler® 480 de Roche (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania) de acuerdo con el siguiente protocolo: activación de la Taq DNA polimerasa a 95 °C x 10 minutos, seguido de 55 ciclos de amplificación que incluyen la desnaturalización a 95 °C x 10 segundos, hibridación a 60 °C x 30 segundos y elongación a 72°C x 1 segundo, por último la etapa de enfriamiento a 40 °C por 30 segundos.

**Tabla 8. Sondas y oligonucleótidos utilizados**

<b>Gen</b>	<b>No.de acceso</b>	<b>Secuencias sentido</b>	<b>Secuencia antisentido</b>	<b>Amplicón resultante</b>	<b>No. de sonda *</b>
<b><i>E6-VPH16</i></b>	04693493001	tgtttcaggaccacagga	ttgtttgcagctctgtgcat	63	115
<b><i>E7-VPH16</i></b>	04688627001	caactgatctctactgttatgagcaa	ccagctggaccatctatttca	73	63
<b><i>EAG1</i></b>	AF078741.1	cctggaggtgatccaagatg	ccaaacacgtctcctttcc	60	49
<b><i>RPL32</i></b>	NM_000994.3	gaagttcctggtccacaacg	gagcgatctcggcacagta	77	17

\* De la biblioteca Universal Roche. Secuencias proporcionadas por UNIPARTS, S.A. Genes analizados: Oncogenes del virus del papiloma humano (VPH) tipo 16 (*E6* y *E7*), canal de potasio éter à-go-go tipo 1 (*EAG1*) y el gen que codifica para la proteína ribosomal 60S L32 (*RPL32*).

### 5.5. Análisis estadístico

La diferencia significativa se determinó con los datos del promedio  $\pm$  E.S. mediante ANOVA de una vía seguido del post hoc de Holm-Sidak para comparaciones múltiples y para comparaciones entre dos grupos se aplicó la prueba T-test utilizando el programa SigmaStat versión 3.5 (Jandel Scientific). Se consideró diferencia significativa con una ( $P < 0.05$ ).

## 6. RESULTADOS

El primer paso de este estudio *in vivo* fue evaluar la tumorigenicidad de las líneas celulares de cáncer cervicouterino SiHa y CaSki.

### 6.1. Tumorigenicidad de líneas celulares de cáncer cervicouterino

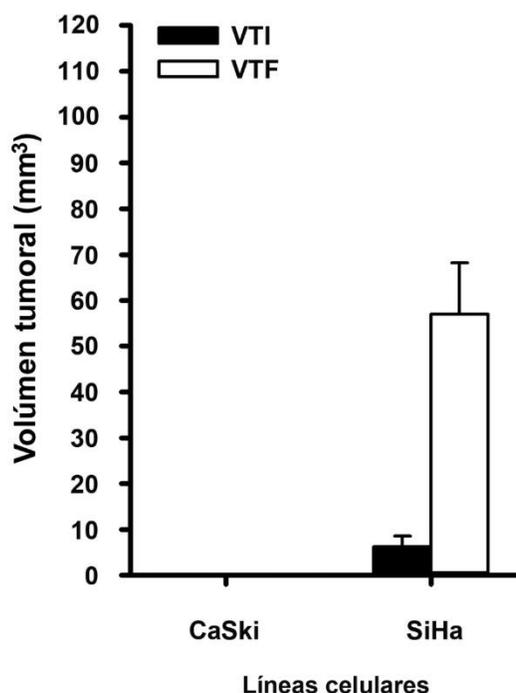
Para determinar la tumorigenicidad, se xenoinjertaron de manera S.C. en las patas traseras del ratón las células SiHa o CaSki a una densidad de  $5 \times 10^6$  células en 100  $\mu$ l de medio sin suplementar. Cada tercer día se observó detalladamente el área del xenoinjerto en los ratones para determinar el tiempo que tardó en aparecer la masa tumoral (Tabla 9, tiempo inicial) con cada línea celular; así como la cinética de tiempo antes de detectar en el ratón la aparición de los signos determinados como puntos finales (Tabla 9, tiempo final).

**Tabla 9. Días que tardó en aparecer el tumor posterior al xenoinjerto de las células de cáncer cervicouterino y días que tardó en llegar a punto final con base en el crecimiento tumoral**

Línea celular xenoinjertada	Tiempo inicial (días $\pm$ D.S.)	Tiempo final (días $\pm$ D.S.)
CaSki	-	-
SiHa	42 $\pm$ 7.31	37 $\pm$ 18.41

Los resultados se muestran como el promedio  $\pm$  D.S. del número de días que tardó en aparecer el tumor (tiempo inicial) posterior al xenoinjerto subcutáneo de las células CaSki y SiHa ( $5 \times 10^6$  células). Adicionalmente se determinó el promedio de días en el que tarda en llegar a punto final (tiempo final) el ratón con base en el tamaño tumoral.  $N \geq 6$  en SiHa,  $N \geq 11$  en CaSki. El xenoinjerto de células CaSki no generó tumor (-) durante el tiempo de seguimiento (4 meses).

Los ratones a los que se les xenoinjertaron las células SiHa, generaron tumor a los 42 $\pm$ 7.31 días y el tiempo de seguimiento de los tumores generados fue de 37 días (Tabla 9), alcanzando un volumen tumoral final (VTF) de 57 mm<sup>3</sup> (Figura 7). Con este modelo tumoral los ratones xenoinjertados con las células CaSki ( $N \geq 11$  ratones) no desarrollaron tumor durante el tiempo de seguimiento, el cual fue de 4 meses para esta línea celular.



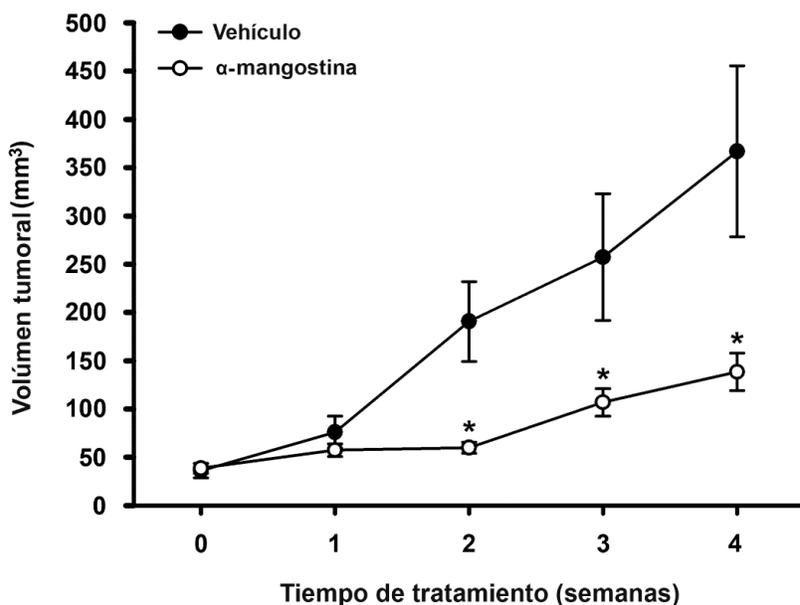
**Figura 7.- Tumorigenicidad de las líneas celulares de cáncer cervicouterino.** Se xenoinjertaron de manera S.C. las células de cáncer cervicouterino CaSki, y SiHa en las patas traseras de ratones inmunodeprimidos BALBc nu/nu. Las barras de color negro indican el volumen tumoral inicial (VTI, primer volumen tumoral observado) y las barras de color blanco indican el volumen tumoral final (VTF, volumen al final del experimento). Los resultados se muestran como el promedio  $\pm$  E.S. del volumen tumoral desde el inicio hasta el punto final.  $N \geq 6$  en SiHa y  $N \geq 11$  en CaSki. Las células CaSki no generaron tumor.

Adicionalmente se evaluó la tumorigenicidad y el tiempo de aparición tumoral en las células de cáncer cervicouterino C33a y Hela para estudios posteriores (Figura suplementaria 1 y Tabla 1).

El siguiente objetivo fue determinar el efecto de la  $\alpha$ -mangostina en la inhibición del crecimiento tumoral. Si bien una de las líneas celulares clave para el desarrollo de los tumores y evaluación del efecto antitumoral de la xantona eran las células CaSki, estas no generaron tumor mediante el método aplicado. En consecuencia, decidimos realizar los experimentos *in vivo* con xenoinjertos de células SiHa, ya que son células tumorigénicas y expresan al VPH16, encontrado en alto porcentaje de muestras con cáncer cervicouterino.

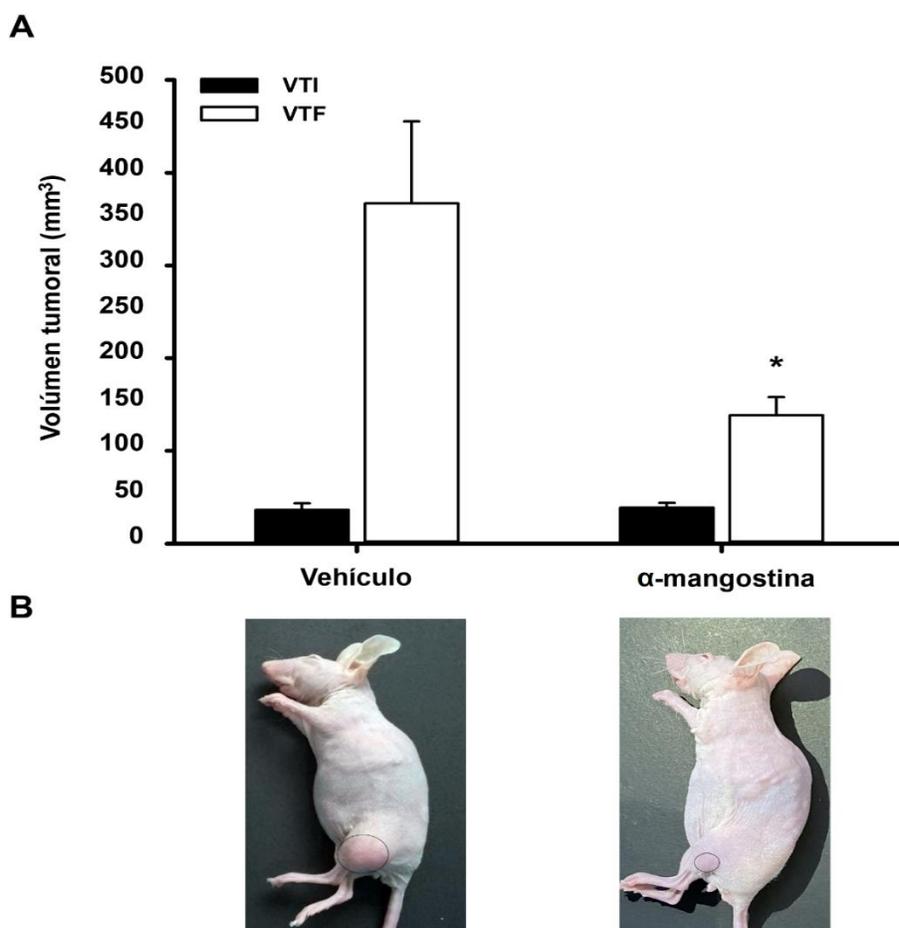
## 6.2. Efecto de la $\alpha$ -mangostina en la inhibición del crecimiento tumoral de xenoinjertos de células SiHa

Una vez que se detectó la masa tumoral en los ratones y que esta no disminuyó de tamaño, procedimos a clasificar a los ratones en los grupos de tratamiento, el grupo tratado con vehículo (0.1 % de DMSO) y el tratado con  $\alpha$ -mangostina (8mg/kg de peso/día). Cada tercer día se midió con el vernier el largo y ancho del tumor, cuyas medidas se tomaron en cuenta para calcular el volumen tumoral y seguir la cinética de crecimiento a lo largo del experimento (Figura 8). Los resultados indican que, la  $\alpha$ -mangostina retrasó el crecimiento tumoral en comparación al vehículo.



**Figura 8.-Cinética de inhibición del crecimiento tumoral con  $\alpha$ -mangostina.** Se xenoinjertaron células SiHa de manera S.C. en las patas traseras de ratones inmunodeprimidos BALBc nu/nu. El tratamiento con  $\alpha$ -mangostina (8 mg/kg) inició una vez que los ratones presentaron un volumen tumoral inicial aproximado de 30 mm<sup>3</sup> y continuó durante 4 semanas. Los resultados se muestran como el promedio  $\pm$  E.S. del volumen tumoral desde el inicio (semana 0) hasta el final del tratamiento (semana 4). N $\geq$ 9 ratones por grupo. \*P<0.05 vs Vehículo.

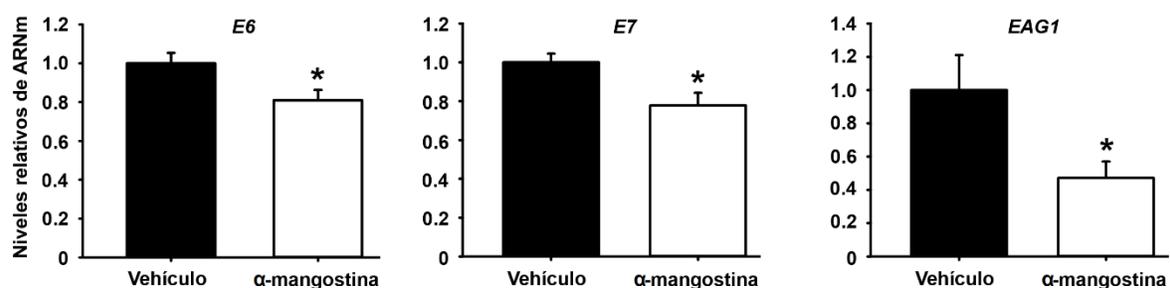
Con la finalidad de que no haya sesgo al final del tratamiento, no debe de haber diferencia significativa entre el VTI (Volumen Tumoral Inicial) promedio de los grupos de tratamiento (Figura 9, barras negras). Con base en el VTF se determinó que la  $\alpha$ -mangostina inhibió el crecimiento tumoral de manera significativa en comparación al vehículo (Figura 9, barras blancas y fotografías representativas).



**Figura 9. Efecto de la  $\alpha$ -mangostina en la inhibición del crecimiento tumoral al final del tratamiento.** Los ratones xenoinjertados se dividieron en grupo tratado con vehículo (0.1% de DMSO) o  $\alpha$ -mangostina (8 mg/kg). Se calculó el volumen tumoral inicial (VTI, barras negras) y el volumen tumoral final (VTF, barras blancas). Los resultados se muestran como el promedio  $\pm$  E.S. del volumen tumoral al inicio del tratamiento y al final del mismo.  $N \geq 9$  ratones por grupo. \* $P < 0.05$  vs vehículo. Se muestran fotografías representativas del tumor generado (cuya periferie se resalta con un círculo de color negro) en ratones tratados con vehículo o  $\alpha$ -mangostina.

### 6.3. Efecto de la $\alpha$ -mangostina en la inhibición de la expresión génica de *E6-VPH16*, *E7-VPH16* y *EAG1*.

Con base a lo observado *in vitro*, en referencia al efecto de la  $\alpha$ -mangostina en la expresión de los oncogenes del VPH y de *EAG1*, decidimos indagar si en el modelo *in vivo* ocurre lo mismo. Como puede observarse en la Figura 10, el tratamiento de los ratones con  $\alpha$ -mangostina inhibió la expresión de *E6-VPH16*, *E7-VPH16* y *EAG1* en el tejido tumoral.



**Figura 10. Efecto de la  $\alpha$ -mangostina en la expresión de los oncogenes del VPH16 y de *EAG1*.** Al final del tratamiento se recolectó el tejido tumoral y se extrajo el RNA usando Trizol®, Se procesaron 2 $\mu$ g de RNA por RT-qPCR y se evaluó el efecto de la  $\alpha$ -mangostina y su respectivo vehículo en la expresión de los oncogenes *E6* y *E7* del virus del papiloma humano tipo 16 (*E6-VPH16* y *E7-VPH16*), así como del canal de potasio oncogénico ether  $\alpha$ -go-go tipo 1 (*EAG1*). Los resultados se muestran como el promedio  $\pm$  D.S. de los niveles de expresión génica de *E6*, *E7* y *EAG1* en relación a la expresión del gen constitutivo RPL32.  $N \geq 9$  muestras por grupo. \* $P < 0.05$  vs vehículo.

## 7. DISCUSIÓN

El cáncer cervicouterino es una neoplasia que afecta a mujeres en todo el mundo, con base en los últimos datos registrados por el Globocan, la razón mortalidad-incidencia es del 55.7% a nivel mundial, y 44.9% en nuestro país, datos verdaderamente alarmantes tomando en cuenta que hoy en día existen vacunas profilácticas y exámenes de detección oportuna. Con respecto a estas cifras, es necesario fortalecer la investigación orientada en comprender los procesos implicados en la génesis de dicha patología con la finalidad de desarrollar nuevas estrategias preventivas y terapéuticas. Actualmente se cuentan con investigaciones enfocadas en evaluar el uso de sustancias derivadas de plantas y alimentos con múltiples propiedades para la salud, tal es el caso de la  $\alpha$ -mangostina, un nutracéutico que se encuentra en la fruta del mangostán, y a la cual se le han atribuido múltiples beneficios terapéuticos, entre los que destacan sus efectos antivirales (Brik and Wong, 2003; Shaneyfelt et al., 2006; Ivanov et al., 2013; Chen et al., 2014; Choi et al., 2014) y antineoplásicos (Pinto et al., 2005; Yeung, 2006; Cassileth, 2011; Pinto et al., 2021). En referencia a este último punto y en lo que respecta a cáncer cervicouterino se ha reportado que la  $\alpha$ -mangostina inhibe la progresión del ciclo celular, induce apoptosis y disminuye significativamente la viabilidad celular de SiHa y Hela (El Habbash et al., 2017; Lee et al., 2017; Chien et al., 2020; Janardhanan et al., 2020). Adicionalmente, nuestro grupo de trabajo determinó que la  $\alpha$ -mangostina inhibe la proliferación de diferentes líneas celulares de cáncer cervicouterino cuyos efectos son más potentes en las células con mayor expresión del VPH, como SiHa y CaSki; además, la xantona inhibe la expresión de los oncogenes del VPH, del canal oncogénico EAG1 y detiene la progresión del ciclo celular.

Para evaluar el efecto de la  $\alpha$ -mangostina *in vivo*, primero evaluamos la tumorigenicidad de las líneas celulares de cáncer cervicouterino SiHa y CaSki ya que con base a los resultados observados *in vitro*, eran las líneas celulares que mejor se adecuaban a los objetivos de este trabajo; no obstante, también se evaluó la tumorigenicidad y tiempo de aparición tumoral de las células C33a y

HeLa para estudios posteriores (Figura suplementaria 1 y Tabla suplementaria 1). Con base en los resultados de tumorigenicidad (Figura 7), determinamos que la línea celular SiHa representó la mejor opción para la aplicación de este modelo de cáncer cervicouterino, ya que es altamente tumorigénica y expresa al VPH16, uno de los virus más frecuentemente encontrados en muestras de pacientes con lesiones pre-neoplásicas o cáncer cervicouterino. En el presente trabajo demostramos que, desde la segunda semana de tratamiento, la  $\alpha$ -mangostina inhibió el crecimiento tumoral de manera significativa en comparación al volumen promedio de los tumores generados en el grupo de ratones tratados con vehículo (Figura 8). Al momento de iniciar el tratamiento, el volumen tumoral promedio entre el grupo de ratones tratados con vehículo o  $\alpha$ -mangostina, no fue significativamente diferente (Figura 9A, barras negras). Interesantemente al final del tratamiento se visualiza claramente que la  $\alpha$ -mangostina inhibió el crecimiento tumoral de manera considerable y significativa en comparación al vehículo (Figura 9, barras blancas), lo cual se visualiza de mejor manera en las fotografías representativas mostradas en la figura 9B. Estos resultados concuerdan con lo observado previamente por Pérez-Rojas y colaboradores en el 2016, en un modelo murino de cáncer cervicouterino que involucró la generación de tumores subcutáneos con células HeLa (Pérez-Rojas et al., 2016). Al igual que lo observado *in vitro*, la  $\alpha$ -mangostina inhibió la expresión génica de *E6*, *E7* y *EAG1* en el tejido tumoral. Previamente Díaz y colaboradores demostraron que los oncogenes del VPH incrementan la expresión de *EAG1* (Díaz et al., 2009), por lo que el efecto de la  $\alpha$ -mangostina en la expresión de los oncogenes del VPH pudiera conllevar a la inhibición en la expresión de *EAG1*. De esta manera se determinó parte del mecanismo de acción mediante el cual la  $\alpha$ -mangostina promueve sus efectos antineoplásicos y a la par mediante el cual ejerce un efecto antiviral contra el VPH.

Es preciso mencionar que con base en los antecedentes de nuestro grupo de trabajo, en referencia a los efectos *in vitro* de la  $\alpha$ -mangostina en las líneas de celulares de cáncer cervicouterino, donde se demostró que el efecto antineoplásico es mayor en las células SiHa y CaSki, nuestro objetivo era evaluar

el efecto antitumoral de la xantona *in vivo*, tanto en tumores generados por células CaSki como en tumores generados por células SiHa; sin embargo, con este modelo las células CaSki no fueron tumorigénicas. Se tiene registro que las líneas celulares SiHa, C33a, y Hela son tumorigénicas, con base a lo reportado en la American Type Culture Collection (ATCC; <https://www.atcc.org/products/htb-35>; fecha de acceso 15 de junio del 2022). En algunos otros trabajos también se ha reportado que las células HeLa generan tumores (Lin et al., 2020). Sin embargo, en lo referente a la tumorigenicidad de células CaSki en la mayoría de los casos se ha utilizado matriz extracelular de Matrigel (Munagala et al., 2011), un sustrato que contiene las características necesarias para el crecimiento tumoral. Con base en lo anterior, nos propusimos generar tumores con células CaSki utilizando Matrigel; no obstante, por complicaciones de importación del reactivo durante la contingencia sanitaria no fue posible implementar esta estrategia, la cual es una perspectiva del presente trabajo.

## **8. CONCLUSIÓN**

El nutraceutico  $\alpha$ -mangostina es capaz de inhibir el crecimiento tumoral, por lo que representa una alternativa terapéutica plausible y aplicable en el tratamiento del cáncer cervicouterino. Parte del mecanismo mediante el cual la  $\alpha$ -mangostina ejerce sus efectos antineoplásicos es al incidir en la expresión de los oncogenes del VPH y del canal de potasio oncogénico *EAG1*.

## 9. PERSPECTIVAS

- Evaluar el efecto de la  $\alpha$ -mangostina en la expresión proteica de EAG1 y del VPH en los tumores generados con las células SiHa y recolectados de este experimento in vivo.
- Evaluar el efecto de la  $\alpha$ -mangostina en los niveles séricos del marcador tumoral de cáncer cervicouterino SCC.
- Generar tumores con las células CaSki.
- Evaluar el efecto antineoplásico de la  $\alpha$ -mangostina en tumores generados con las células CaSki.
- Evaluar el efecto de la  $\alpha$ -mangostina como agente adyuvante del tratamiento convencional de cáncer cervicouterino.

## 10. BIBLIOGRAFÍA

- Adler K, Erickson T, Bobrow M. 1997. High sensitivity detection of HPV-16 in SiHa and CaSki cells utilizing FISH enhanced by TSA. *Histochem Cell Biol* 108:321-324.
- Barrea L, Muscogiuri G, Frias-Toral E, Laudisio D, Pugliese G, Castellucci B, García-Velasquez E, Savastano S, Colao A. 2021. Nutrition and immune system: from the Mediterranean diet to dietary supplementary through the microbiota. *Crit Rev Food Sci Nutr* 61:3066-3090.
- Beninati S, Oliverio S, Cordella M, Rossi S, Senatore C, Liguori I, Lentini A, Piredda L, Tabolacci C. 2014. Inhibition of cell proliferation, migration and invasion of B16-F10 melanoma cells by alpha-mangostin. *Biochem Biophys Res Commun* 450:1512-1517.
- Bhatla N, Aoki A, Nand D, Sankaranarayanan R. 2018. Cáncer de cuello uterino. *Int J Gynecol Obstet* 143:22 - 36.
- Bhatla N, Singhal S, S. 2020. Primary HPV screening for cervical cancer. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 65:98-108.
- Brik A, Wong CH. 2003. HIV-1 protease: mechanism and drug discovery. *Org Biomol Chem* 1:5-14.
- Cassileth B. 2011. Mangosteen (*Garcinia mangostana*). *Oncology (Williston Park)* 25:844.
- Chávez-López MG, Zúñiga-García V, Castro-Magdonel BE, Vera E, Garrido E, Sánchez-Ramos J, Ponce-Castañeda MV, Cabrera-Muñoz ML, Escobar Y, Ortiz CS, Hernández-Gallegos E, Ávalos-Fuentes A, Camacho J. 2020. E2f1 Gene and Protein Expression in Human Retinoblastoma Tumors and its Regulation by pRb in HeLa Cells. *Genes (Basel)* 11.
- Chen JJ, Long ZJ, Xu DF, Xiao RZ, Liu LL, Xu ZF, Qiu SX, Lin DJ, Liu Q. 2014. Inhibition of autophagy augments the anticancer activity of alpha-mangostin in chronic myeloid leukemia cells. *Leuk Lymphoma* 55:628-638.
- Chen SX, Wan M, Loh BN. 1996. Active constituents against HIV-1 protease from *Garcinia mangostana*. *Planta Med* 62:381-382.
- Chien HJ, Ying TH, Hsieh SC, Lin CL, Yu YL, Kao SH, Hsieh YH. 2020. alpha-Mangostin attenuates stemness and enhances cisplatin-induced cell death in cervical cancer stem-like cells through induction of mitochondrial-mediated apoptosis. *Journal of cellular physiology* 235:5590-5601.
- Chih HJ, Lee AH, Colville L, Binns CW, Xu D. 2013. A review of dietary prevention of human papillomavirus-related infection of the cervix and cervical intraepithelial neoplasia. *Nutr Cancer* 65:317-328.
- Childs CE, Calder PC, Miles EA. 2019. Diet and Immune Function. *Nutrients* 11.
- Choi M, Kim YM, Lee S, Chin YW, Lee C. 2014. Mangosteen xanthones suppress hepatitis C virus genome replication. *Virus Genes* 49:208-222.
- Das L, Bhaumik E, Raychaudhuri U, Chakraborty R. 2012. Role of nutraceuticals in human health. *J Food Sci Technol* 49:173-183.
- De la Fuente-Villarreal D. 2010. Biología del Virus del Papiloma Humano y técnicas de diagnóstico. *ELSERVIER* 12:231 - 238.

- Díaz L, Ceja-Ochoa I, Restrepo-Angulo I, Larrea F, Avila-Chávez E, García-Becerra R, Borja-Cacho E, Barrera D, Ahumada E, Gariglio P, Álvarez-Rios E, Ocadiz-Delgado R, García-Villa E, Hernández-Gallegos E, Camacho-Arroyo I, Morales A, Ordaz-Rosado D, García-Latorre E, Escamilla J, Sánchez-Pena LC, Saqui-Salces M, Gamboa-Domínguez A, Vera E, Uribe-Ramírez M, Murbartian J, Ortiz CS, Rivera-Guevara C, De Vizcaya-Ruiz A, Camacho J. 2009. Estrogens and human papilloma virus oncogenes regulate human ether-a-go-go-1 potassium channel expression. *Cancer Res* 69:3300-3307.
- Doorbar J, Egawa N, Griffin H, Kranjec C, Murakami I. 2015. Human papillomavirus molecular biology and disease association. *Rev Med Virol* 25 Suppl 1:2-23.
- 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.
- Farías LM, Ocana DB, Díaz L, Larrea F, Avila-Chávez E, Cadena A, Hinojosa LM, Lara G, Villanueva LA, Vargas C, Hernández-Gallegos E, Camacho-Arroyo I, Dueñas-González A, Pérez-Cardenas E, Pardo LA, Morales A, Taja-Chayeb L, Escamilla J, Sánchez-Pena C, Camacho J. 2004. Ether a go-go potassium channels as human cervical cancer markers. *Cancer Res* 64:6996-7001.
- 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.
- García-Quiroz J, Camacho J. 2011. Astemizole: an old anti-histamine as a new promising anti-cancer drug. *Anticancer Agents Med Chem* 11:307-314.
- García-Quiroz J, González-González ME, Díaz L, Ordaz-Rosado D, Segovia-Mendoza M, Prado-García H, Larrea F, García-Becerra R. 2019. Astemizole, an Inhibitor of Ether-a-Go-Go-1 Potassium Channel, Increases the Activity of the Tyrosine Kinase Inhibitor Gefitinib in Breast Cancer Cells. *Rev Invest Clin* 71:186-194.
- García-Becerra R, Díaz L, Camacho J, Barrera D, Ordaz-Rosado D, Morales A, Ortiz CS, Avila E, Bargallo E, Arrecillas M, Halhali A, Larrea F. 2010. Calcitriol inhibits Ether-a go-go potassium channel expression and cell proliferation in human breast cancer cells. *Exp Cell Res* 316:433-442.
- Gariglio P, Gutierrez J, Cortes E, Vázquez J. 2009. The role of retinoid deficiency and estrogens as cofactors in cervical cancer. *Arch Med Res* 40:449-465.
- Giroglou T, Florin L, Schafer F, Streeck RE, Sapp M. 2001. Human papillomavirus infection requires cell surface heparan sulfate. *J Virol* 75:1565-1570.
- González-Fisher RF, Flores Shaw LP. 2005. El Papiro quirúrgico de Edwin Smith. *An Med (Mex)* 50.
- Han B, Tokay T, Zhang G, Sun P, Hou S. 2017. Eag1 K(+) Channel: Endogenous Regulation and Functions in Nervous System. *Oxid Med Cell Longev* 2017:7371010.

- Hareza DA, Wilczynski JR, Paradowska E. 2022. Human Papillomaviruses as Infectious Agents in Gynecological Cancers. Oncogenic Properties of Viral Proteins. *Int J Mol Sci* 23.
- Hellner K, Munger K, K. 2011. Human papillomaviruses as therapeutic targets in human cancer. *J Clin Oncol* 29:1785-1794.
- Hemmerlein B, Weseloh RM, Mello de Queiroz F, Knotgen H, Sanchez A, Rubio ME, Martin S, Schliephacke T, Jenke M, Heinz Joachim R, Stuhmer W, Pardo LA. 2006. Overexpression of Eag1 potassium channels in clinical tumours. *Mol Cancer* 5:41.
- Hidayat S, Ibrahim FM, Pratama KF, Muchtaridi M. 2021. The interaction of alpha-mangostin and its derivatives against main protease enzyme in COVID-19 using in silico methods. *J Adv Pharm Technol Res* 12:285-290.
- Hsieh SC, Huang MH, Cheng CW, Hung JH, Yang SF, Hsieh YH. 2013. alpha-Mangostin induces mitochondrial dependent apoptosis in human hepatoma SK-Hep-1 cells through inhibition of p38 MAPK pathway. *Apoptosis* 18:1548-1560.
- Hurtado-Salgado E, Ortiz-Panozo E, Salmeron J, Saavedra-Lara N, Kuri-Morales P, Pesqueira-Villegas E, Luna-Gordillo R, Franco EL, Lazcano-Ponce E. 2018. Use of HPV testing in cervical cancer screening services in Mexico, 2008-2018: a nationwide database study. *Salud Publica Mex* 60:722-733.
- 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.
- Ivanov AV, Bartosch B, Smirnova OA, Isaguliants MG, Kochetkov SN. 2013. HCV and oxidative stress in the liver. *Viruses* 5:439-469.
- Janardhanan S, Mahendra J, Mahendra L, Devarajan N. 2020. Cytotoxic Effects of Mangosteen Pericarp Extracts on Oral Cancer and Cervical Cancer Cells. *Asian Pac J Cancer Prev* 21:2577-2583.
- Lau S, Franco EL, Franco EL. 2005. Management of low-grade cervical lesions in young women. *CMAJ* 173:771-774.
- 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.
- Li G, Petiwala SM, Nonn L, Johnson JJ. 2014. Inhibition of CHOP accentuates the apoptotic effect of alpha-mangostin from the mangosteen fruit (*Garcinia mangostana*) in 22Rv1 prostate cancer cells. *Biochemical and biophysical research communications* 453:75-80.
- Lin Z, Lin Y, Shen J, Jiang M, Hou Y. 2020. Flavonoids in *Ageratum conyzoides* L. Exert Potent Antitumor Effects on Human Cervical Adenocarcinoma HeLa Cells In Vitro and In Vivo. *Biomed Res Int* 2020:2696350.
- Matsumoto K, Akao Y, Yi H, Ohguchi K, Ito T, Tanaka T, Kobayashi E, Iinuma M, Nozawa Y. 2004. Preferential target is mitochondria in alpha-mangostin-induced apoptosis in human leukemia HL60 cells. *Bioorg Med Chem* 12:5799-5806.
- McMurray HR, Nguyen D, Westbrook TF, McAnce DJ. 2001. Biology of human papillomaviruses. *Int J Exp Pathol* 82:15-33.

- McNamara M, Batur P, Walsh JME, Johnson KM. 2016. HPV Update: Vaccination, Screening, and Associated Disease. *J Gen Intern Med* 31:1360-1366.
- McQuillan G, Kruszon-Moran D, Markowitz LE, Unger ER, Paulose-Ram R. 2017. Prevalence of HPV in Adults Aged 18-69: United States, 2011-2014. *NCHS Data Brief*:1-8.
- Medina O, Luvian-Morales J, Valdez-Palomares F, Flores-Cisneros L, Sánchez-López MS, Soto-Lugo JH, Castro-Eguiluz D. 2020. Immunonutrition in Cervical Cancer: Immune Response Modulation by Diet. *Rev Invest Clin* 72:219-230.
- Melo A LN, Orellana J, Vásquez A, Moreno S, Liempi S, Guzman P. 2016. Virus papiloma humano y Chlamydia trachomatis según número de parejas sexuales y tiempo de actividad sexual en estudiantes universitarias en la Región de La Araucanía, Chile. *Rev Chilena Infectol* 33:287 - 292.
- Meza-Junco J, Montano-Loza A, Aguayo-González A. 2006. [Molecular basis of cancer]. *Rev Invest Clin* 58:56-70.
- Moore TO, Moore AY, Carrasco D, Vander Straten M, Arany I, Au W, Tying SK. 2001. Human papillomavirus, smoking, and cancer. *J Cutan Med Surg* 5:323-328.
- Mukherjee S. 2010. *The Emperor of all maladies*. Barcelona.
- Munagala R, Kausar H, Munjal C, Gupta RC. 2011. Withaferin A induces p53-dependent apoptosis by repression of HPV oncogenes and upregulation of tumor suppressor proteins in human cervical cancer cells. *Carcinogenesis* 32:1697-1705.
- Muñoz N, Castellsague X, Berrington de González A, Gissmann L. 2006. Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer. *Vaccine* 24 Suppl 3:S3/1-10.
- Navarro I, Codina D, Periago M. 2017. Propiedades beneficiosas para la salud del Mangostán. *Rev Esp Nutr Comunitaria* 2015 21:29 - 31.
- Nelson LM, Rose RC, Moroianu J. 2002. Nuclear import strategies of high risk HPV16 L1 major capsid protein. *J Biol Chem* 277:23958-23964.
- Nguyen MH, Nguyen DT, Nguyen PTM. 2020. Apoptosis induction by alpha-mangostin-loaded nanoparticles in human cervical carcinoma cells. *Z Naturforsch C J Biosci* 75:145-151.
- Ortiz CS, Montante-Montes D, Saqui-Salces M, Hinojosa LM, Gamboa-Domínguez A, Hernandez-Gallegos E, Martinez-Benitez B, Del Rosario Solis-Pancoatl M, García-Villa E, Ramirez A, Aguilar-Guadarrama R, Gariglio P, Pardo LA, Stuhmer W, Camacho J. 2011. Eag1 potassium channels as markers of cervical dysplasia. *Oncol Rep* 26:1377-1383.
- Panda K, Alagarasu K, Patil P, Agrawal M, More A, Kumar NV, Mainkar PS, Parashar D, Cherian S. 2021. In Vitro Antiviral Activity of alpha-Mangostin against Dengue Virus Serotype-2 (DENV-2). *Molecules* 26.
- Pardo LA, del Camino D, Sanchez A, Alves F, Bruggemann A, Beckh S, Stuhmer W. 1999. Oncogenic potential of EAG K(+) channels. *EMBO J* 18:5540-5547.
- Pater A, 1985. Human papillomavirus types 16 and 18 sequences in carcinoma cell lines of the cervix. *Virology* 145:313-318.
- Patil P, Agrawal M, Almelkar S, Jeengar MK, More A, Alagarasu K, Kumar NV, Mainkar PS, Parashar D, Cherian S. 2021. In vitro and in vivo studies reveal

- alpha-Mangostin, a xanthonoid from *Garcinia mangostana*, as a promising natural antiviral compound against chikungunya virus. *Virol J* 18:47.
- Pérez-Rojas JM, González-Macias R, González-Cortes J, Jurado R, Pedraza-Chaverri J, García-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.
- Pinto MM, Sousa ME, Nascimento MS. 2005. Xanthone derivatives: new insights in biological activities. *Curr Med Chem* 12:2517-2538.
- Pinto MM, Palmeira A, Fernandes C, Resende D, Sousa E, Cidade H, Tiritan ME, Correia-da-Silva M, Cravo S. 2021. From Natural Products to New Synthetic Small Molecules: A Journey through the World of Xanthones. *Molecules* 26.
- Rivera Z, Delgado J, Painel V. 2006. Mecanismo de infección y transformación de neoplasia producido por virus del papiloma humano en el epitelio cervical. *Rev Chil Ginecol* 71:15 - 140.
- Sato A, Fujiwara H, Oku H, Ishiguro K, Ohizumi Y. 2004. Alpha-mangostin induces Ca<sup>2+</sup>-ATPase-dependent apoptosis via mitochondrial pathway in PC12 cells. *J Pharmacol Sci* 95:33-40.
- 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.
- Shaneyfelt ME, Burke AD, Graff JW, Jutila MA, Hardy ME. 2006. Natural products that reduce rotavirus infectivity identified by a cell-based moderate-throughput screening assay. *Virol J* 3:68.
- Subedi L, Tchen S, Gaire BP, Hu B, Hu K. 2021. Adjunctive Nutraceutical Therapies for COVID-19. *Int J Mol Sci* 22.
- Sugiyanto Z, Yohan B, Hadisaputro S, Dharmana E, Suharti C, Winarto, Djamiatun K, Rahmi FL, Sasmono RT. 2019. Inhibitory Effect of Alpha-Mangostin to Dengue Virus Replication and Cytokines Expression in Human Peripheral Blood Mononuclear Cells. *Nat Prod Bioprospect* 9:345-349.
- Tarasuk M, Songprakhon P, Chimma 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.
- Tirado-Gómez LL, Mohat-Betancourt A, López-Cervantes M, garcía-Carrancá A, Franco-Marina F, Borges G. 2005. Factores de Riesgo de Cáncer cervicouterino invasor en mujeres Mexicanas. *Salud Publica Mex* 47:342 - 350.
- Varzakas T, Zakyntinos G, Verpoort F. 2016. Plant Food Residues as a Source of Nutraceuticals and Functional Foods. *Foods* 5.
- Watanapokasin R, Jarinthan F, Nakamura Y, Sawasjirakij N, Jaratrungtawee A, Suksamrarn S. 2011. Effects of alpha-mangostin on apoptosis induction of human colon cancer. *World J Gastroenterol* 17:2086-2095.
- Yang R, Li P, Li N, Zhang Q, Bai X, Wang L, Xiao Y, Sun L, Yang Q, Yan J. 2017. Xanthones from the Pericarp of *Garcinia mangostana*. *Molecules* 22.
- Yeung S. 2006. Mangosteen for the cancer patient: facts and myths. *J Soc Integr Oncol* 4:130-134.

- Yongpitakwattana P, Morchang A, Panya A, Sawasdee N, Yenchitsomanus PT. 2021. Alpha-mangostin inhibits dengue virus production and pro-inflammatory cytokine/chemokine expression in dendritic cells. *Arch Virol* 166:1623-1632.
- Yousefi Z, Aria H, Ghaedrahmati F, Bakhtiari T, Azizi M, Bastan R, Hosseini R, Eskandari N. 2021. An Update on Human Papilloma Virus Vaccines: History, Types, Protection, and Efficacy. *Front Immunol* 12:805695.
- Yu Y, Fei Z, Qin L. 2020. Anticancer effects of alpha-mangostin in OVACAR-3 human ovarian carcinoma cells are mediated via involvement of reactive oxygen species, mitochondrial -mediated apoptosis, suppression of cell migration and invasion and m-TOR/PI3K/AKT signaling pathway. *J BUON* 25:2293-2300.
- Zeisel SH. 1999. Regulation of "nutraceuticals". *Science* 285:1853-1855.
- Zhang KJ, Gu QL, Yang K, Ming XJ, Wang JX. 2017. Anticarcinogenic Effects of alpha-Mangostin: A Review. *Planta Med* 83:188-202.
- Zhou S, Yotsumoto H, Tian Y, Sakamoto K. 2021. alpha-Mangostin suppressed melanogenesis in B16F10 murine melanoma cells through GSK3beta and ERK signaling pathway. *Biochem Biophys Rep* 26:100949.
- Zhu X LJ, Ning H, Yuan Z, Zhong Y, Wu S y Zhang Zeng J. 2021.  $\alpha$ -mangostin induce la apoptosis e inhibe la metástasis de las células de cáncer de mama mediante la regulación de la vía de señalización RXR $\alpha$ -AKT. *Frontiers en farmacología*.

## 11. APÉNDICES

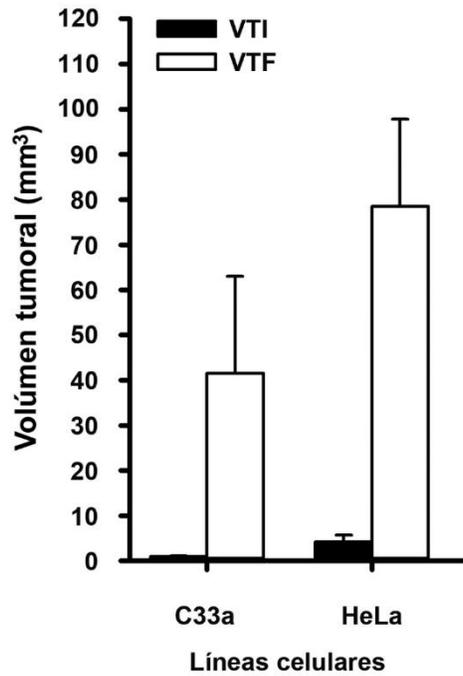
Adicionalmente se determinó la tumorigenicidad, de las líneas celulares C33a y HeLa, las cuales se xenoinjertaron de manera S.C. en las patas traseras del ratón a una densidad de  $5 \times 10^6$  células. Cada tercer día se observó detalladamente el área del xenoinjerto en los ratones para determinar el tiempo que tardó en aparecer la masa tumoral (Tabla Suplementaria 1, tiempo inicial) con cada línea celular; así como la cinética de tiempo antes de detectar en el ratón la aparición de los signos determinados como puntos finales (Tabla Suplementaria 1, tiempo final).

**Tabla Suplementaria 1. Días que tardó en aparecer el tumor posterior al xenoinjerto de células C33a/HeLa y días que tardó en llegar a punto final con base en el crecimiento tumoral**

<b>Línea celular xenoinjertada</b>	<b>Tiempo inicial (días <math>\pm</math> S.D.)</b>	<b>Tiempo final (días <math>\pm</math> S.D.)</b>
<b>C33a</b>	17 $\pm$ 1.41	57 $\pm$ 1.41
<b>HeLa</b>	20 $\pm$ 1.41	34 $\pm$ 2.12

Los resultados se muestran como el promedio  $\pm$  S.D del número de días que tardó en aparecer el tumor (tiempo inicial) posterior al xenoinjerto subcutáneo de las células C33a y HeLa ( $5 \times 10^6$  células). Adicionalmente se determinó el promedio de días en el que tarda en llegar a punto final (tiempo final) el ratón con base en el tamaño tumoral. C33a Y HeLa  $N \geq 6$ .

Los ratones a los que se les xenoinjertaron las células C33a, generaron tumor a los  $17 \pm 1.41$  días y el tiempo de seguimiento de los tumores generados fue de 57 días, alcanzando un VTF de  $41.5 \text{ mm}^3$  (Figura Suplementaria 1). En referencia a los ratones xenoinjertados con las células HeLa, generaron tumor a los  $20 \pm 1.41$  días y el tiempo de seguimiento de los tumores generados fue de 34 días, alcanzando un VTF de  $78.52 \text{ mm}^3$ . Si bien las células C33a generan tumor en menor número días con respecto a las células HeLa, su crecimiento es muy lento. Estos datos sirven de base para otros experimentos in vivo.



---

**Figura Suplementaria 1.- Tumorigenicidad de las líneas celulares de cáncer cervicouterino C33a y HeLa.** Se xenoinjertaron de manera S.C. las células de cáncer cervicouterino C33a y HeLa en las patas traseras de ratones inmunodeprimidos BALBc nu/nu. Las barras de color negro indican el volumen tumoral inicial (VTI, primer volumen tumoral observado) y las barras de color blanco indican el volumen tumoral final (VTF, volumen al final del experimento). Los resultados se muestran como el promedio  $\pm$  SEM del volumen tumoral desde el inicio hasta el punto final. C33a y HeLa  $N \geq 6$

---



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

FACULTAD DE NUTRICIÓN



Cuernavaca, Morelos, a 04 de octubre 2022  
Asunto: Voto aprobatorio.

**MCS. JÉSICA LÓPEZ BUCIO FABIÁN**  
**DIRECTORA INTERINA DE LA FACULTAD DE NUTRICIÓN, UAEM**  
**P R E S E N T E**

Por este conducto me permito comunicarle que, en mi calidad de jurado para examen de grado de la estudiante de Licenciatura en Nutrición Samantha Viviana Bernadez Vallejo, he leído y revisado la tesis titulada EL NUTRACÉUTICO  $\alpha$ -MANGOSTINA COMO AGENTE TERAPÉUTICO EN CÁNCER CERVICOUTERINO, y considero que ésta cubre los requisitos señalados en los lineamientos de Titulación de la Universidad para tesis profesional. Por lo tanto, el estudiante puede continuar con los trámites correspondientes para solicitar fecha de examen.

Sin más por el momento, reciba un cordial saludo.

ATENTAMENTE

M. en C. Raúl Dávila Delgado



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

### Sello electrónico

**RAUL DAVILA DELGADO | Fecha:2022-10-04 14:35:11 | Firmante**

XRZ0db2rezHkh9clUR00SjIksVu/JU0813jwUR1RWs+w0ogkmeDg0XmbMq2XQ5dLug0Y9Wpb71R/DO0w/baqHA3WK0ItDMe1QHlxK+YLVmUPd8A9rgrzXRR9jUmzyVNqxYDa5MGBs1CKxpGe5kFGAaIx3yNT99VrwqykCuNp9ns4t5w23bkFh1UX98T5K+sYiHWIGYB/6JCoB3vbwQ7IyELiYLuN2FOj/jCtP7JZ+D8PJLCKyuZglw8pYWmiFz4kBiUG5f+Dpb1Hua hzkcZSi43y/tsuZVnZwpju6k2yWjCkjqRvi5LVncqfzNZA8sojQWhrkHwc2JYfMaAb7eA==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[nywlcLXeS](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/4Hxq5tq7MIHhSpJCEYqx0RTyBSkVNmLX>





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

FACULTAD DE NUTRICIÓN



Cuernavaca, Morelos, a 20 de octubre de 2022.  
Asunto: Voto aprobatorio.

**DRA. JESICA LÓPEZ BUCIO FABIÁN**  
**DIRECTORA INTERINA DE LA FACULTAD DE NUTRICIÓN, UAEM**  
**P R E S E N T E**

Por este conducto me permito comunicarle que en mi calidad de jurado para examen de grado del (a) estudiante de Licenciatura en Samantha Viviana Bernadez Vallejo, he leído y revisado la tesis titulada **El Nutracéutico  $\alpha$ -mangostina como agente terapéutico en cáncer cervicouterino** y considero que ésta cubre los requisitos señalados en los lineamientos de Titulación de la Universidad para tesis profesional. Por lo tanto, el estudiante puede continuar con los trámites correspondientes para solicitar fecha de examen.

Sin más por el momento, reciba un cordial saludo.

ATENTAMENTE

DRA. CAROL ARELY BOTELLO AMARO.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

### Sello electrónico

CAROL ARELY BOTELLO AMARO | Fecha:2022-10-20 20:33:06 | Firmante

ylayU0ig3GyA66cUM6j3/0+VXgooSmviVXKE+OifT41Wu3avvgfanZdeaXgg1eUbsb3rMs8IDbutID4obX7ujnSUWCRLEwwL15ri1nAv0TTq98/RAs/Ybz1LsmbZTMFTtV4vHGujl7nt  
x02WrxKS0B4rKBcj0c7s5DevvggBlJqEbRg3Bi9fyFfh8kUDFNDk1N0JjDPut9B5eDOeYAWeh8Liaq0a5cS7kS/vFmLkS3A1NP3dSA7NgxNyy+4M4Uh2fEV/9XOZFHloipHN52L+G  
LH65ae62qJeiALwlu/+fnAeJiQ4TTys00IUxosLLCB+g3uK8NGwxuH7YkfBaAd5Q==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o  
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[JEtdAibzS](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/7UO5KrlLeZo8p95hvn46Jy4eAzaNMLtDK>





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS



Cuernavaca, Morelos, a 24 de octubre 2022  
Asunto: Voto aprobatorio.

**MCS. JÉSICA LÓPEZ BUCIO FABIÁN**  
**ENCARGADA DEL DESPACHO DE LA**  
**DIRECCIÓN DE LA FACULTAD DE NUTRICIÓN, UAEM**  
**P R E S E N T E**

Por este conducto me permito comunicarle que, en mi calidad de jurado para examen de grado de la estudiante de Licenciatura en Nutrición Samantha Viviana Bernadez Vallejo, he leído y revisado la tesis titulada EL NUTRACÉUTICO  $\alpha$ -MANGOSTINA COMO AGENTE TERAPÉUTICO EN CÁNCER CERVICOUTERINO, y considero que ésta cubre los requisitos señalados en los lineamientos de Titulación de la Universidad para tesis profesional. Por lo tanto, la estudiante puede continuar con los trámites correspondientes para solicitar fecha de examen.

Sin más por el momento, reciba un cordial saludo.

ATENTAMENTE

MTRA. ALMA MARGARITA VENOSA CASTAÑÓN

Cuernavaca, Morelos, a 07 de noviembre del 2022  
Asunto: Voto aprobatorio.

**MCS. JÉSICA LÓPEZ BUCIO FABIÁN**  
**DIRECTORA INTERINA DE LA FACULTAD DE NUTRICIÓN, UAEM**  
**P R E S E N T E**

Por este conducto me permito comunicarle que, en mi calidad de jurado para examen de grado de la estudiante de Licenciatura en Nutrición Samantha Viviana Bernadez Vallejo, he leído y revisado la tesis titulada EL NUTRACÉUTICO  $\alpha$ -MANGOSTINA COMO AGENTE TERAPÉUTICO EN CÁNCER CERVICOUTERINO, y considero que ésta cubre los requisitos señalados en los lineamientos de Titulación de la Universidad para tesis profesional. Por lo tanto, la estudiante puede continuar con los trámites correspondientes para solicitar fecha de examen.

Sin más por el momento, reciba un cordial saludo.

ATENTAMENTE

Dra. Dolores Azucena Salazar Piña  
Profesora de tiempo Completo  
Facultad de Nutrición



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

### Sello electrónico

**DOLORES AZUCENA SALAZAR PIÑA | Fecha:2022-11-07 14:42:51 | Firmante**

ZISTAbFqLhv4IET8unTQPpgcdzsWaacd8B+ijdwQwRt1rtDKWT++EMD0pRPPybFsXYQYyli8FqmPq0a4TDB/dJ1ISikBmj+dEhwa9/FSkrVYcW4AXDYvgKbwrV1kRXG/VP2j2k  
p1IOkqFjuVqQ9H6S9wI00ZmpoOa3dy1t6XDXG07Rq9addVDp3tjJi11jOz8f4Qtzl6wz1TJoE7uzSOx5lvag/dSn4Qb4sxb+qU3EUcoenofNEbqCB+kDrJMUoCZE2uJeGvJF6pjm/JL  
DfJH/GBvrvIBi4rEkHkb9GxySjMytZlpo7JEXNmVP8ZYzmSFAIfOxBMdZxQxZ59qQ==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o  
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[yabx2gQBn](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/bCorQiK1e9NFUFeyIXQTXMF0RyjQaAgK>





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

FACULTAD DE NUTRICIÓN



Cuernavaca, Morelos, a 19 de octubre 2022  
Asunto: Voto aprobatorio.

**MCS. JÉSICA LÓPEZ BUCIO FABIÁN**  
**DIRECTORA INTERINA DE LA FACULTAD DE NUTRICIÓN, UAEM**  
**P R E S E N T E**

Por este conducto me permito comunicarle que, en mi calidad de jurado para examen de grado de la estudiante de Licenciatura en Nutrición Samantha Viviana Bernadez Vallejo, he leído y revisado la tesis titulada EL NUTRACÉUTICO  $\alpha$ -MANGOSTINA COMO AGENTE TERAPÉUTICO EN CÁNCER CERVICOUTERINO, y considero que ésta cubre los requisitos señalados en los lineamientos de Titulación de la Universidad para tesis profesional. Por lo tanto, el estudiante puede continuar con los trámites correspondientes para solicitar fecha de examen.

Sin más por el momento, reciba un cordial saludo.

L.N. SONIA LÓPEZ CORTÉS  
ATENTAMENTE

**UA  
EM**

Una universidad de excelencia

RECTORÍA  
2017-2023