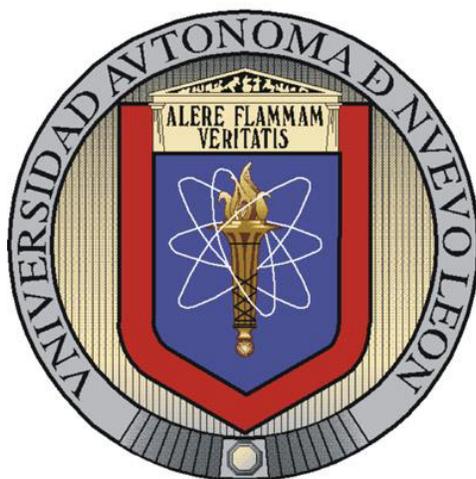


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



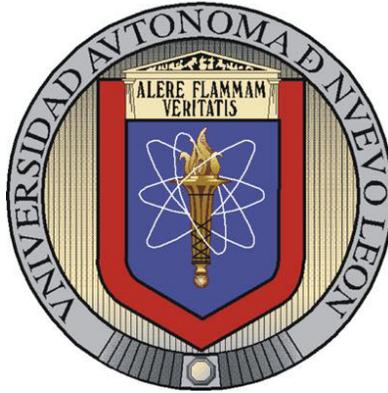
**LA CURCUMINA E IMMUNEPOTENT CRP INDUCEN LA
SECRECIÓN DE PAR-4 EN FIBROBLASTOS Y RATONES, CON
EFECTO CITOTÓXICO EN LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER DE
MAMA**

POR

NORMA CESILIA ARELLANO RODRÍGUEZ

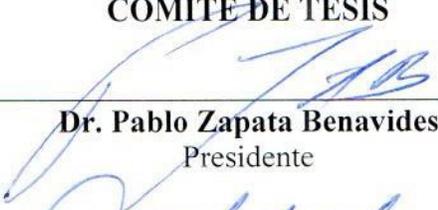
**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN
INMUNOBIOLOGÍA**

JULIO, 2018



LA CURCUMINA E IMMUNEPOTENT CRP INDUCEN LA SECRECIÓN DE PAR-4 EN FIBROBLASTOS Y RATONES, CON EFECTO CITOTÓXICO EN LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER DE MAMA

COMITÉ DE TESIS



Dr. Pablo Zapata Benavides
Presidente



Dr. Edgar Mendoza Gamboa
Secretario



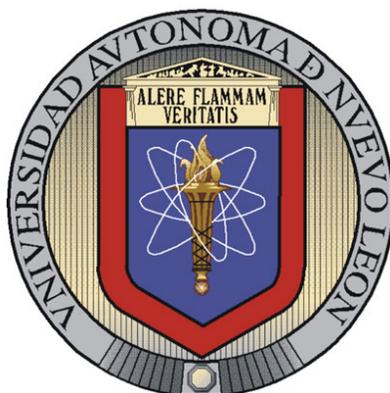
Dr. Moisés A. Franco Molina
Vocal



Dra. Diana Reséndez Pérez
VOOdI



Dr. Laura María Trejo Ávila
Vocal



LA CURCUMINA E IMMUNEPOTENT CRP INDUCEN LA SECRECIÓN DE PAR-4 EN FIBROBLASTOS Y RATONES, CON EFECTO CITOTÓXICO EN LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER DE MAMA

DIERECCIÓN DE TESIS

Dr. Pablo Zapata Benavides

Director de Tesis

Dr. Santiago Saavedra Alonso

Director externo

LUGAR DE TRABAJO

Este trabajo se realizó en la Unidad de Biología Molecular del Cáncer del Laboratorio de Inmunología y Virología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León.



Agradezco a la Universidad Autónoma de Nuevo León en especial al Laboratorio de Inmunología y Virología por brindarme el apoyo económico y la infraestructura para realizar este proyecto.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico para poder realizar mis estudios

Al laboratorio de inmunología y virología de la FCB/UANL, por proveer el apoyo financiero y de infraestructura requeridos para realización de este trabajo

Al Dr. Pablo Zapata Benavides por brindarme la oportunidad de ser parte de su equipo de trabajo, gracias por el apoyo, los consejos y los ánimos brindados durante el desarrollo de este proyecto de investigación, por ser un gran doctor, un gran amigo y un gran ejemplo, Gracias.

A mis padres, hermanos, sobrinos y a Javier por el apoyo incondicional e impulsarme a seguir adelante, son mi motivación.

A la M.C. Mariela Arellano Rodríguez por su apoyo y ayuda durante la realización de este trabajo.

Al Dr. Santiago Saavedra por ayudarme y resolver mis dudas en los aspectos técnicos en la realización de este trabajo.

A mis maestros, gracias por su disponibilidad para aclarar mis dudas y forjar en mí un deseo de superación, así como ser parte de mi comité de tesis.

A mis compañeros del laboratorio y grandes amigos Gustavo, Jorge, Juan Manuel, Felipe por su apoyo en lo profesional, en lo personal y proporcionar un buen ambiente de trabajo, Gracias.

DEDICATORIA

Este trabajo está dedicado:

A mis padres **Gumara Rodríguez Esquivel** y **Rogaciano Arellano Hernández** por darme su apoyo incondicional en todo momento, la fuerza y motivación para dar mi máximo esfuerzo.

A mis hermanos que siempre estarán conmigo y por estar siempre presentes.

A mis sobrinos desde el más grande al más pequeño, son un gran motivo.

A Javier García por su apoyo incondicional, consejos, comprensión y por estar conmigo en momentos difíciles.

A mis maestros, amigos y compañeros por fortalecer mis conocimientos.

INDICE

AGRADECIMIENTOS	i
DEDICATORIA	ii
ÍNDICE DE TABLAS	v
ÍNDICE DE FIGURAS	vi
NOMENCLATURA	vii
RESUMEN	xii
ABSTRACT	xiii
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1-Cáncer de mama	3
2.1.1 Clasificación.....	3
2.1.2 Factores de riesgo.....	5
2.1.3 Tratamiento	6
2.2 Par-4	7
2.2.1 Función y localización de Par-4	8
2.2.2 Regulación de Par-4	11
2.3 Curcumina	15
2.3.1 Mecanismos de muerte por curcumina	16
2.3.2 Curcumina en cáncer	16
2.4 IMMUNEPOTENT CRP	18
2.4.1 IMMUNEPOTENT CRP en cáncer	18
3. JUSTIFICACIÓN	20
4. HIPÓTESIS	21
5. OBJETIVO GENERAL	22
6. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
7. MATERIALES Y MÉTODOS	24
7.1 Cultivo de líneas celulares de cáncer de mama	24
7.2 Tratamiento de células con Curcumina e ICRP <i>in vitro</i>	24
7.3 Ensayo de viabilidad celular mediante MTT.....	24
7.4 Evaluación de la modulación de Par-4 por curcumina.....	25

7.5 Extracción de proteínas y Western blot.....	25
7.6 Cuantificación de proteínas	25
7.7 Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS.....	26
7.8 Inmunodetección y revelado	26
7.9 Ensayo <i>in vivo</i>	27
7.10 Tratamiento de las células con plasma.....	27
7.11 Ensayo de quimio sensibilización.....	27
8. RESULTADOS	29
8.1 Análisis de la viabilidad celular en líneas celulares de cáncer de mama y fibroblastos tratados con Curcumina e IMMUNEPOTENT CRP.....	29
8.2 Efecto de Curcumina e IMMUNEPOTENT CRP en la morfología celular de las líneas celulares MCF-7, MDA-MB 231, SKBR3, HDFn y 3T3-Swiss albino.....	33
8.3 Determinación de la expresión basal de Par-4 en líneas celulares de cáncer de mama y fibroblastos.	36
8.4 Análisis de la modulación de la proteína Par-4 en fibroblastos por Curcumina e IMMUNEPOTENT CRP	37
8.5 Análisis de la expresión de Par-4 soluble en medio condicionado de fibroblastos tratados con Curcumina e IMMUNEPOTENT CRP	38
8.6 Análisis del incremento de la concentración de Par-4 soluble en plasma de ratones tratados con Curcumina e IMMUNEPOTENT CRP	39
8.7 Análisis del efecto del plasma de ratones tratados con Curcumina e IMMUNEPOTENT CRP en la viabilidad de células de cáncer de mama	40
8.8 Quimiosensibilización de células de cáncer de mama vía Par-4	43
9. DISCUSIÓN	44
10. CONCLUSIONES.....	47
11. BIBLIOGRAFÍA.....	48
12. RESUMEN BIOGRÁFICO	53

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Dosis letal 50 de Curcumina e IMMUNEPOTENT CRP en las células de cáncer de mama y fibroblastos	32
---	----

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Representación esquemática de la proteína de Par-4.....	7
Figura 2. Representación esquemática de la fosforilación de la proteína Par-4.	9
Figura 3. Mecanismo para la apoptosis selectiva en células cancerígenas mediada por SAC.....	10
Figura 4. Representación esquemática de las vías mediante las cuales Par-4/NF- κ B induce apoptosis.....	11
Figura 5. Cascadas de señalización que involucran a Par-4.....	14
Figura 6. Estructura de la curcumina.	15
Figura 7. Viabilidad de líneas celulares de cáncer de mama expuesta a Curcumina.....	29
Figura 8. Viabilidad de líneas celulares no cancerígenas expuesta a Curcumina.	30
Figura 9. Viabilidad de líneas celulares de cáncer de mama expuesta a IMMUNEPOTENT CRP.	31
Figura 10. Viabilidad de líneas celulares no cancerígenas expuesta a IMMUNEPOTENT CRP.	32
Figura 11. Efecto citotóxico de la Curcumina en la viabilidad de las líneas celulares de cáncer de mama y fibroblastos.....	34
Figura 12. Efecto citotóxico de IMMUNEPOTENT CRP en la viabilidad de las líneas celulares de cáncer de mama y fibroblastos.....	35
Figura 13. Análisis de la expresión basal de la proteína Par-4.	36
Figura 14. Modulación de la proteína Par-4.....	37
Figura 15. Expresión de la proteína Par-4 en medio condicionado.	38
Figura 16. Modulación de la proteína Par-4 soluble en ratones.....	39
Figura 17. Análisis de la viabilidad de células de cáncer de mama expuestas a plasma de ratones tratados con Curcumina e IMMUNEPOTENT CRP.....	41
Figura 18. Análisis de la viabilidad de células MCF-7 expuestas a plasma de ratones tratados con IMMUNEPOTENT CRP y anti-Par-4.....	42
Figura 19. Análisis de la viabilidad de células MCF-7 expuestas a plasma de ratones tratados con IMMUNEPOTENT CRP y Cisplatino.	43

NOMENCLATURA

%	Por ciento
µg	Microgramos
µL	Microlitros
°C	Grados centígrados
µM	Micro molar
5-FU	5 Fluorouracil
AKT1	Serina/treonina kinasa 1 por sus siglas en inglés
Bcl2	Linfoma de células B 2
bdLE	Extracto dializable de leucocitos bovinos
BRCA1	cáncer de mama 1 por sus siglas en inglés
BRCA2	cáncer de mama 2 por sus siglas en inglés
CLIS	carcinoma lobulillar <i>in situ</i>
Cm ²	Centímetros cuadrados
CO ₂	Dióxido de carbono
COX2	ciclooxigenasa 2
CQ	cloroquina
CRT	Calreticulina
D131	Dominio 131
DCIS	carcinoma ductal <i>in situ</i>
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium

DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DTH	Hipersensibilidad de tipo retardada por sus siglas en inglés
GATA-3	proteína vinculante GATA 3
GRP78	proteína reguladora para la glucosa 78 por sus siglas en inglés
h	horas
HBEC	Células Epiteliales Bronquiales Humanas por sus siglas en inglés
HDFn	Fibroblasto dérmico primario normal, humano neonatal por sus siglas en inglés
HEL	fibroblasto de pulmón humano normal
h-TERT	Transcriptasa reversa de telomerasa humana
ICRP	IMMUNEPOTENT CRP
IL-1	Interleucina 1
IL-6	Interleucina 6
MAP3K1	Proteína kinasa activada por mitógeno1por sus siglas en inglés
MCF-7	Michigan Cancer Foundation
MDA-MB-231	MD Anderson-Melanoma Breast-231
MEF	fibroblasto embrionario de ratón por sus siglas en inglés
min	minutos
miR-17	Micro RNA de interferencia 17
mM	milimolar

MTT	Bromuro de 3-(4,5dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol
NaCl	cloruro de sodio
NFκB	factor nuclear kappa B
NLS1	secuencias de localización nuclear 1
NLS2	secuencias de localización nuclear 2
NSCLC	Cáncer pulmonar de células no pequeñas
OMS	organización mundial de la salud
OXP	Oxaliplatino
Par-4	Respuesta a la apoptosis de próstata 4 por sus siglas en inglés
PBS	Buffer salino de fosfatos por sus siglas en inglés
pH	Potencial de hidrógeno
PI	Yoduro de propidio
PIK3CA	fosfatidilinositol-4,5-bifosfato3
PKA	proteína quinasa A por sus siglas en inglés
PR	receptor de progesterona
PrECs	células epiteliales
PrSCs	células del estroma de próstata humana normales
PTEN	fosfatasa y homólogo de tensina
ATP	Adenosina tri fosfato
RB1	retinoblastoma 1

RE	receptor de estrógeno
RE	retículo endoplásmico
ROS	especies reactivas de oxígeno por sus siglas en inglés
rpm	revoluciones por minuto
SAC	Selectivo para Apoptosis de Células Cancerígenas
SDS	Dodecilsulfato sódico por sus siglas en inglés
Ser249	Serina 249
SFB	suero fetal bovino
TBS	Solución salina tamponada con tris por sus siglas en inglés
Thr16	Del inglés threonine 163
TNBC	triple negativo
TNF	factor de necrosis tumoral
TP53	proteína tumoral p53
U	Unidades
U/mL	Unidades por mililitro
UACA	Autoantígeno uveal con dominio super enrollado y repeticiones de anquirinas
V	Volts
VEGF	factor de crecimiento celular endotelial vascular
Wb	Western blot
β -actina	Beta actina

β -mercaptoethanol Beta mercaptoethanol

RESUMEN

La respuesta a la apoptosis de próstata 4 (Par-4) es una proteína que induce apoptosis por dos vías en células cancerígenas y no en células normales: la vía intrínseca se lleva a cabo mediante la acumulación de Par-4 en el núcleo y un estímulo apoptótico como son la quimioterapia y radioterapia, y por vía extrínseca mediante la secreción de Par-4 [por secretagogos como la cloroquina (CQ)] y su interacción con el receptor GRP78 que se encuentra sobreexpresado en células cancerígenas.

En este trabajo pretendemos probar si la curcumina e IMMUNEPOTENT CRP estimulan la expresión y secreción de Par-4 *in vitro* e *in vivo* y su efecto en cáncer de mama.

Las líneas celulares HDFn y 3T3-swiss albino y ratones BALB/c, se trataron con Curcumina e IMMUNEPOTENT CRP, la expresión de Par-4 en el pellet celular, en el sobrenadante del medio de cultivo y en el plasma de los ratones se evaluó mediante Western blot, el análisis de proliferación de las células de cáncer de mama tratadas con el plasma de ratones se realizó mediante MTT.

La Curcumina induce mayor expresión y secreción de Par-4 en comparación al IMMUNEPOTENT CRP en cultivo de fibroblastos, sin embargo, *in vivo* el IMMUNEPOTENT CRP indujo una mayor secreción sistémica de Par-4 y un mayor efecto inhibitorio en la proliferación de células de cáncer de mama comparado con la Curcumina. La línea celular MCF-7 resulto ser más sensible al tratamiento con plasma de ratones tratados con IMMUNEPOTENT CRP que las líneas celulares MDA-MB-231 y SKBR3.

El IMMUNEPOTENT CRP induce la secreción de Par-4 en el plasma con un efecto inhibitorio en las líneas celulares de cáncer de mama, lo que sugiere que el IMMUNEPOTENT CRP puede ser utilizado como quimiosensibilizador con las diferentes drogas anticancerígenas.

ABSTRACT

The response to prostate apoptosis 4 (Par-4) is a protein that induces apoptosis by two routes in cancer cells and not in normal cells: the intrinsic pathway is carried out by the accumulation of Par-4 in the nucleus and an apoptotic stimulus such as chemotherapy and radiotherapy, and extrinsically through the secretion of Par-4 [by secretagogues such as chloroquine (CQ)] and its interaction with the GRP78 receptor that is overexpressed in cancer cells.

In this work we intend to test whether curcumin and IMMUNEPOTENT CRP stimulate the expression and secretion of Par-4 *in vitro* and *in vivo* and its effect on breast cancer.

The HDFn and 3T3-swiss albino cell lines and BALB/c mice were treated with Curcumin and IMMUNEPOTENT CRP, the expression of Par-4 in the cell pellet, in the supernatant of the culture medium and the plasma of the mice was evaluated by Western blot, proliferation analysis of breast cancer cells treated with the plasma of mice was performed by MTT.

Curcumin induces higher expression and secretion of Par-4 compared to IMMUNEPOTENT CRP in fibroblast culture, however, *in vivo* the IMMUNEPOTENT CRP induced a higher systemic secretion of Par-4 and greater inhibitory effect on the proliferation of cancer cells breast compared to Curcumin. The MCF-7 cell line was found to be the most sensitive to the plasma treatment with IMMUNEPOTENT CRP than the MDA-MB-231 and SKBR3 cell lines.

The IMMUNEPOTENT CRP induces the secretion of Par-4 in plasma with an inhibitory effect in cancer cell lines, suggesting that IMMUNEPOTENT CRP can be used as a chemosensitizer with different anticancer drugs.

1. INTRODUCCIÓN

El cáncer de mama es una enfermedad multifactorial que se caracteriza por el crecimiento descontrolado de las células debido a cambios genéticos, este cáncer es el más común entre las mujeres y el segundo después del cáncer de pulmón en términos de muerte. Cada año se detectan 1.30 millones de casos nuevos y ocurren 458 mil muertes por esta enfermedad a nivel mundial. En México, 63 de cada 100 mil mujeres mayores de 80 años, fallecieron por esta causa. La curcumina es un compuesto polifenólico derivado de la planta cúrcuma (*Cúrcuma longa*), sus efectos incluyen actividad antiviral, antiartríticos, antioxidantes además de anticancerígenas. Se le relaciona con la modulación de varias enzimas que están relacionadas con patologías como el cáncer y la inflamación. Por ejemplo, COX-2, que se ha observado que esta sobreexpresado en una gran cantidad de cánceres en el humano como: de colon, hígado, páncreas, mama, pulmón, vejiga, piel, estómago, cánceres de cabeza y cuello. La curcumina es capaz de inducir muerte celular programada a través de la expresión de la proteína de respuesta a la apoptosis de próstata -4 (Par-4). Induce ROS dependiente de la activación de Par-4 y la generación de ceramida, lo que lleva a la muerte celular por autofagia en las células de glioma maligno humano.

Par-4 es una proteína nuclear con una secuencia de zipper de leucina de aproximadamente 39 kDa, en su extremo carboxilo terminal presenta un dominio de zipper de leucina, que le permite la unión con proteínas chaperonas como AKT1, dos secuencias de localización nuclear (NLS1 y NLS2), una secuencia de exportación nuclear y un único dominio SAC (Selectivo para Apoptosis de Células Cancerígenas), es codificado por el gen pro-apoptótico *Par-4*, el cual está localizado en el cromosoma humano 12q21 el cromosoma 7q21 de rata y el cromosoma 10D1 de ratón. Par4 puede ser funcionalmente requerida pero no suficiente para inducir apoptosis y no es restringida a un órgano específico. Par-4 tiene la capacidad de inducir selectivamente apoptosis en células cancerosas, pero no en normales, mediante la unión al receptor GRP78.

El propósito de este trabajo es determinar el efecto de la curcumina e IMMUNEPOTENT CRP sobre el patrón de expresión de la proteína Par-4 y la quimiosensibilización en células de cáncer de mama.

2. ANTECEDENTES

2.1-Cáncer de mama

El cáncer es una enfermedad que se caracteriza por el crecimiento descontrolado de las células debido a cambios genéticos. El cáncer de mama es el más común entre las mujeres, y la segunda causa de muerte después del cáncer de pulmón a nivel mundial; en 2015 se registraron 8.8 millones de muertes (OMS). Sin embargo, cada año se detectan 1.30 millones de casos nuevos y ocurren 458 mil muertes por esta enfermedad (<http://www.inegi.org.mx/saladeprensa/aproposito/2015/mama0.pdf>).

El cáncer de mama no hace distinción entre las poblaciones de países desarrollados y en desarrollo debido a que cerca del 70 % de las muertes registradas en 2015 se presentaron en países de ingresos medios y bajos. En Estados Unidos el 12.5% de la población femenina se le ha diagnosticado cáncer de mama y el 3.5% muere debido a esta causa, las tasas de mortalidad por este cáncer se incrementan conforme aumenta la edad. Se estima que en 2018 en los Estados Unidos habrá 266,120 nuevos casos de cáncer de mama invasivo diagnosticado en mujeres y 2,550 diagnosticados en hombres debido a que el cáncer de mama se presenta solo en un 2% (sociedad americana del cáncer. 2018) En México, 63 de cada 100 mil mujeres mayores de 80 años, fallecieron por esta causa en el 2015(Sifuentes-Alvares et al., 2015).

2.1.1 Clasificación

La clasificación histopatológica de los carcinomas mamarios según la organización mundial de la salud (OMS) se basa en invasores y no invasores (*in situ*) (NOM-041-SSA2-2002, Diario Oficial, 17 septiembre 2003.). El carcinoma ductal *in situ* (DCIS) representa del 15% al 20% de todos los cánceres de mama diagnosticado por lo general en etapas tempranas, mediante rastreo por mamografía y se caracteriza por la proliferación intraductal de células epiteliales malignas sin invasión a través de la membrana basal en el estroma circundante (Kuo Lo et al., 2016). El carcinoma lobulillar

in situ (CLIS) se origina del lobulillo terminal ductal y se puede distribuir de forma difusa por la mama, las pacientes diagnosticadas con CLIS suelen tener más de un lobulillo afectado y el riesgo incrementa hasta un 30% de desarrollar cáncer de mama invasor. El diagnóstico de CLIS generalmente se da antes de la menopausia, entre los 40 y 50 años de edad. Menos del 10% de las mujeres diagnosticadas con CLIS ya han atravesado la menopausia, además de que se presenta con menos frecuencia en hombres (Castellanos et al., 2009, Breastcancer.org, 2018). En contraste con el carcinoma invasor de mama que es capaz de invadir a través de la membrana basal en el estroma circundante (Kuo Lo et al., 2016).

Para la clasificación del cáncer de mama invasivo se basa en la presencia de marcadores tumorales, esto permite definir cinco subtipos: Luminal A, luminal B, enriquecido con HER2, normal y basal (Irigoyen et al., 2011). El subtipo luminal A es el más frecuente, corresponde aproximadamente al 67% de los tumores, tiene alta expresión de genes relacionados con el receptor de estrógeno (RE) y baja expresión de genes relacionados con proliferación en comparación con el luminal B, además de que puede ser tratado solo con hormonoterapia. El subtipo luminal B tiende a ser de más alto grado y tiene peor pronóstico que el A, este subtipo requiere de terapia hormonal en combinación con quimioterapia ya que cuenta con más genes relacionados a proliferación (Zepeda et al., 2008). El cáncer de mama categorizado como basal es altamente agresivo, con frecuencia los pacientes que presentan este tipo de cáncer tienen mal pronóstico y son difíciles de tratar. La mayoría (70%-80%) de los cánceres de mama diagnosticados de tipo basal son triple negativo (TNBC), esto porque carecen de expresión de RE, receptor de progesterona (PR) y expresión de HER2. La nula presencia de estos marcadores tumorales son el principal obstáculo en la terapia de cáncer de mama, debido a que estos tumores tienden a ser altamente resistentes a la quimioterapia y terapias dirigidas con alta propensión a la recurrencia (Kuo Lo et al., 2016; Hebbar et al., 2013; Góngora-Moo et al., 2016).

La mayoría de las muertes por cáncer de mama están relacionadas con la metástasis y la recaída de la enfermedad después del tratamiento del tumor primario. Esto se debe a que las células cancerosas residuales son capaces de sobrevivir a cirugía, radiaciones y

terapias adyuvantes, sirviendo como un reservorio para la recurrencia del cáncer de mama. Sin embargo, se sabe poco sobre las vías que contribuyen a la supervivencia y recurrencia de las células residuales de cáncer de mama. Estudios han identificado a la proteína proapoptótica supresora de tumor Par-4 como un regulador crítico de la recurrencia del tumor mamario (Alvarez et al., 2013).

2.1.2 Factores de riesgo

El cáncer de mama es una enfermedad multifactorial y, entre los factores de riesgo se incluyen la edad, historia familiar, consumo de alcohol, obesidad, sedentarismo, exposición a radiaciones ionizantes, factores endocrinos y reproductivos como: menarca temprana, edad avanzada al primer parto, nulidad, menopausia tardía, así como el uso de terapia de remplazo hormonal por más de cinco años (Sant'Ana et al., 2016; Hebbbar et al., 2013; Sifuentes-Alvares et al., 2015).

Una alimentación saludable reduce el riesgo a padecer cáncer de mama, así como ejercicio regular, no fumar y mantener un peso adecuado, ya que existe una correlación positiva entre el incremento del riesgo de cáncer de mama y el creciente consumo de alimentos ricos en grasa, etanol y tabaco por las mujeres actuales (Sant 'Ana et al., 2016; Pérez et al., 2016).

Hay una alta probabilidad de desarrollar cáncer a partir de mutaciones en genes que codifican proteínas que están involucradas en procesos de reparación del DNA y regulación del ciclo celular, que son funciones que mantienen la fidelidad e integridad del genoma (Pérez et al., 2016). En el caso de cáncer de mama, se ha observado que las mutaciones de penetrancia más altas se presentan en genes que codifican a: BRCA1 y BRCA2 (gen cáncer de mama 1 y 2) (Ortiz et al., 2016), proteína tumoral p53 (TP53) (Walerych et al., 2012), fosfatidilinositol-4,5-bifosfato3 (PIK3CA) (Cancer Genome Atlas Network 2013), retinoblastoma 1 (RB1) (Lesueur et al., 2006), fosfatasa y tenina homólogo (PTEN) (Depowski et al., 2001), proteína vinculante GATA 3 (GATA-3) (Usary J. et al., 2004) y proteína kinasa activada por mitógeno 1 (MAP3K1) (Kan Z et al., 2010).

2.1.3 Tratamiento

La terapia para este tipo de cáncer depende de la etapa y el estado clínico del paciente, además de las características anatómicas y patológicas de la enfermedad. El tratamiento local consiste en cirugía y radioterapia y el tratamiento sistémico consiste en terapia hormonal, quimioterapia y terapia biológica (Leal et al., 2016). El estatus hormonal de las células de cáncer de mama determina las opciones de tratamiento. Durante varios años la cirugía y la quimioterapia neoadyuvante ha sido la base para el tratamiento del cáncer de mama. Sin embargo, han surgido otras opciones como las terapias dirigidas en combinación con la quimioterapia, la cual ha presentado una mejor respuesta a la enfermedad. Actualmente las terapias dirigidas son: el trastuzumab y (anticuerpo monoclonal dirigido contra HER2/neu), pertuzumab (anticuerpo monoclonal dirigido contra el dímero de HER2/neu) o tamoxifeno (fármaco antagonista del RE) que están diseñados para atacar los tumores que son HER2/neu y receptores hormonales positivos (Hebbar et al., 2013; IMSS, 2017).

2.2 Par-4

La proteína de respuesta a la apoptosis de próstata -4 (Par-4) es una proteína nuclear con una secuencia de zipper de leucina de aproximadamente 342 aa en humanos, 332 aa en ratas y 333 aa en ratones, con un peso molecular de 39 kDa. Es una proteína multi dominio, la cual presenta dos secuencias de localización nuclear (NLS1 y NLS2), las cuales son esenciales para la translocación de Par-4 del citoplasma al núcleo, y necesarias para inducir apoptosis (El-Guendy y Rangnekar, 2003), además contiene un único dominio SAC (Selectivo para Apoptosis de Células Cancerígenas) de 59 aminoácidos, el cual es exclusivo para Par-4 y es 100% conservado en humanos, ratas y ratones. En su extremo carboxilo terminal contiene un dominio de zipper de leucina, que le permite la unión al DNA y algunas proteínas chaperonas como AKT1, contiene aproximadamente 40 aminoácidos encontrados en forma de repeticiones heptad, donde la cuarta posición de cada repetición está ocupada por una leucina y la cual se une al surco mayor del DNA (figura 1), (QiNan et al., 2016; Brasseur et al., 2016; Sarkar et al., 2015). La proteína Par-4 es codificada por el gen pro-apoptótico *Par-4*, el cual está localizado en el cromosoma 12q21 en humanos, en el cromosoma 7q21 en ratas y el cromosoma 10D1 en ratones. El gen fue identificado mediante un screening diferencial para encontrar genes pro-apoptóticos que fueron inducidos en respuesta a la elevación de Ca^{2+} en las células. También se descubrió que la ablación de andrógenos era igualmente eficaz para inducir la expresión de Par-4 en células de próstata dependientes de andrógenos (Sells et al., 1994). Par-4 puede ser funcionalmente requerida pero no suficiente para inducir apoptosis y no es restringida a un órgano específico.

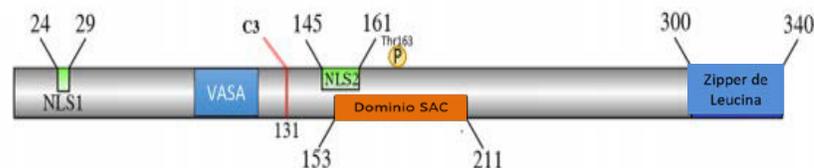


Figura 1. Representación esquemática de la proteína de Par-4. La proteína de Par-4 cuenta con secuencias de localización nuclear (NLS1 y 2), un dominio VASA, un dominio selectivo para apoptosis en células cancerígenas (SAC) y un dominio de zipper de leucina. Imagen tomada y modificada de Brasseur k et al., 2016.

2.2.1 Función y localización de Par-4

Par-4 desarrolla su capacidad apoptótica a través de dos mecanismos distintos como son la activación de la maquinaria de muerte y la inhibición de los factores de sobrevivencia, Par-4 presenta actividad intrínseca y extrínseca

La actividad intrínseca se realiza por la sobre expresión de Par-4 endógeno cuya expresión es estimulada por una gran variedad de estímulos apoptóticos como radiación, fármacos.

La capacidad de Par-4 para causar apoptosis directamente se asocia con su translocación al núcleo mediante la fosforilación en la posición aminoacídica Thr155 por PKA (PKA se encuentra elevada en diversas células cancerosas) en el dominio NLS2 (figura 2), permitiendo inhibir los mecanismos de sobrevivencia asociados al factor nuclear kappa B (NF- κ B) superando los mecanismos protectores de las células, tales como la presencia de Bcl-xL, Bcl-2 o la ausencia de la función p53 o PTEN , Al/Bfl1; y genes anti apoptóticos como el inhibidor de apoptosis ligado a X (XIAP) que protegen de la apoptosis generada por TNF- α (Barkett and Gilmore, 1999).

Par- 4 interacciona directamente con la proteína del tumor de Wilm's (WT-1), la cual funciona como un transactivador de la proteína anti-apoptótica Bcl2. Uniéndose específicamente a los dedos de zinc de WT1 y desregulando su actividad promotora del gen BCL-2 conduciendo apoptosis.

La sobreexpresión de Par-4 es suficiente para inducir directamente la apoptosis en la mayoría de las células cancerosas en ausencia de un segundo estímulo. Interesantemente Par-4 es incapaz de inducir directamente la apoptosis en células normales o en células cancerosas hormonas dependientes como LNCaP de cáncer de próstata y en células de cáncer de mama MCF-7, en las cuales Par-4 se localiza principalmente en el citoplasma. Se ha observado que AKT1 se une al zipper de leucinas e induce la fosforilación de Par-4 en la Ser249 (figura 2) para mantener a la proteína en el citoplasma e inhibir su

actividad apoptótica, lo que conduce a la supervivencia de la célula cancerosa (Brasseur et al., 2016).

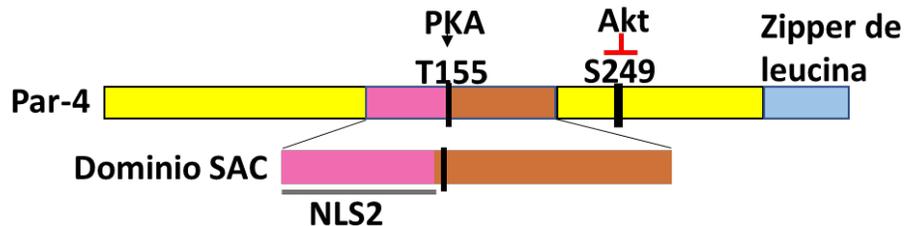


Figura 2. Representación esquemática de la fosforilación de la proteína Par-4. La proteína Par-4 tiene 2 sitios de fosforilación, uno para PKA y otro para AKT que determinan su traslado al núcleo y actividad apoptótica. Imagen tomada y modificada de Zhao et al., 2007.

Las células resistentes a Par-4 están sensibilizadas por la sobreexpresión de Par-4 a una amplia gama de estímulos apoptóticos, tales como aumento de Ca^{2+} intracelular, extracción del factor de crecimiento, $TNF-\alpha$ o rayos X y radiación gamma (Chakraborty et al., 2001; El-Guendy et al., 2003; Nalca et al., 1999).

Vía extrínseca

La secreción de par-4 ocurre por la vía clásica y es asociado al estrés del retículo endoplásmico (RE). Par-4 extracelular, tiene la capacidad de inducir selectivamente apoptosis en células cancerosas, pero no en células normales, mediante la unión al receptor GRP78 (proteína reguladora para la glucosa 78) que se encuentra en la superficie de células cancerosas en niveles elevados y es asociado con la severidad y quimioresistencia del tumor (Lee et al., 2007) en contraste con las células normales que presentan baja expresión, por la activación de la vía dependiente de FADD- caspasa 8/caspasa 3. También se requiere la fosforilación mediada por PKA de Par-4 en Thr155 tanto para el tráfico de Fas / FasL a la membrana como para la inhibición de $NF-\kappa B$ (figura3). Par-4 inicia el estrés del retículo endoplásmico que aumenta la secreción de

Par-4 y se convierte en un círculo vicioso. Se cree que esta es la principal casusa de disfunción en la diabetes de tipo 2 (QiNan et al., 2016; Zhao et al., 2008).

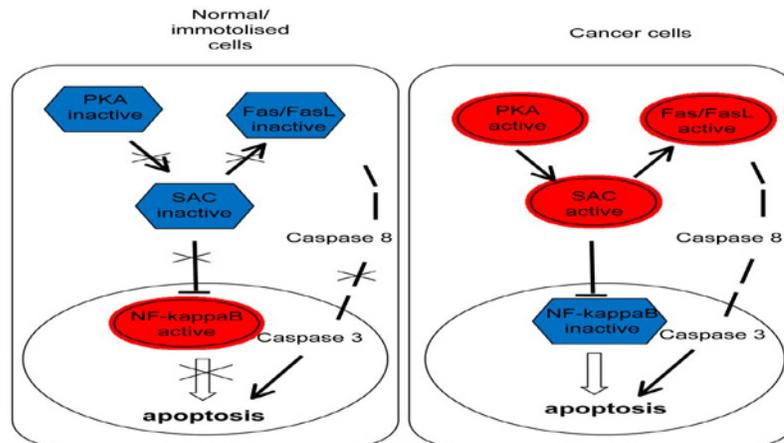


Figura 3. Mecanismo para la apoptosis selectiva en células cancerígenas mediada por SAC. SAC es activado mediante PKA que se encuentra elevado en células cancerosas. El SAC induce apoptosis mediante la activación del receptor de muerte Fas / FasL y la inhibición de la vía de supervivencia de células NF-κB. Imagen tomada de Zhao et al., 2008.

La secreción de Par-4 ocurre por un mecanismo independiente a la acción de la apoptosis por Par-4 o su dominio SAC Par-4 y dicha proteína era capaz de inducir apoptosis al entrar en contacto con células cancerígenas. Sin embargo, este incremento en la secreción de Par-4 no se observó cuando células de cáncer de pulmón (H460 y A549) y células de cáncer de próstata (LNCaP, C4-2B, DU145 y PC-3) fueron tratadas con CQ (Burikhanov et al., 2017; Sviripa et al., 2016).

Recientemente se ha observado que Par-4 endógeno juega un papel importante como agente apoptótico en enfermedades neurodegenerativas, y en diabetes de tipo 2. Se ha observado en las células β de los islotes del páncreas induce apoptosis mediada por Par-4/NF-κB, donde su expresión es aumentada por el estrés de retículo endoplasmático producido por trastornos metabólicos crónicos severos donde la apoptosis se lleva a cabo a través de la membrana del retículo endoplasmático y las vías mitocondriales (figura 4).

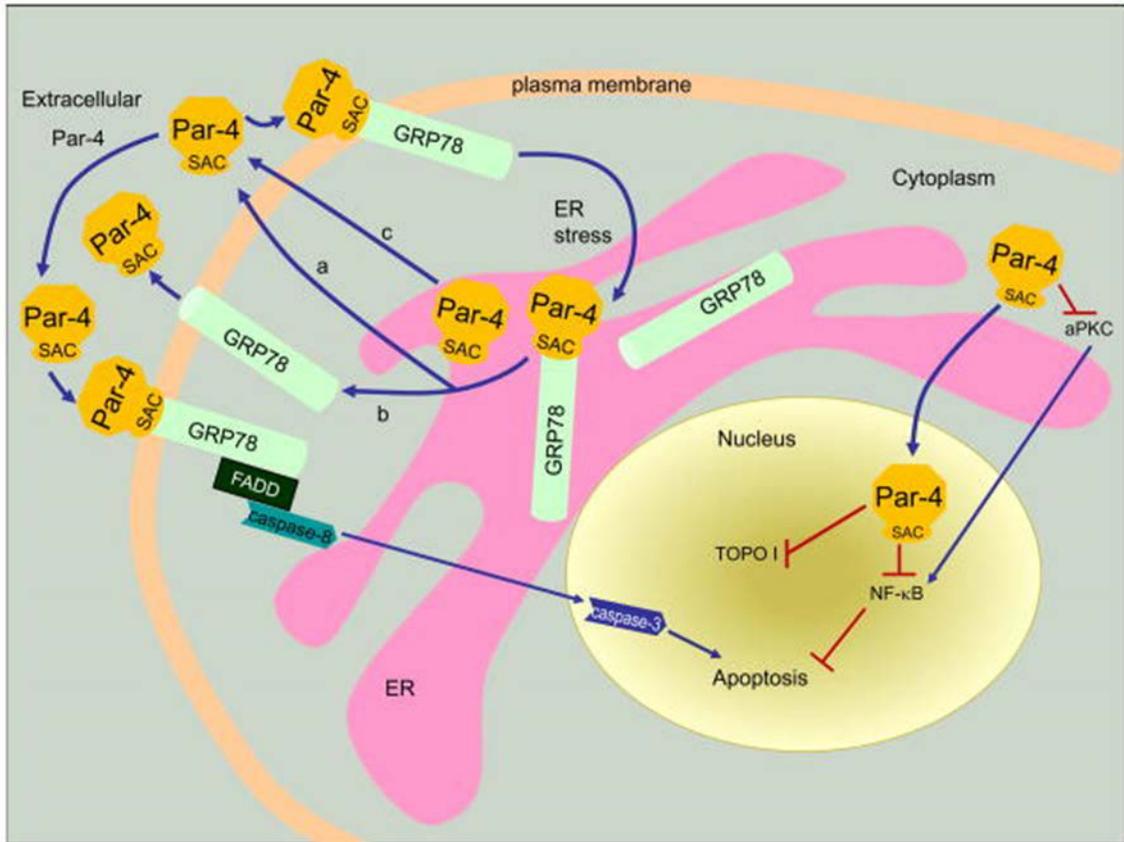


Figura 4. Representación esquemática de las vías mediante las cuales Par-4/NF-κB inducen apoptosis. Estrés ER y disfunción mitocondrial inducen la expresión en el núcleo de Par-4/NF-κB. Imagen modificada de QiNan Wu et al., 2016.

2.2.2 Regulación de Par-4

Recientemente se ha demostrado que Par-4 es regulado por mecanismos postraduccionales no solo por fosforilación, sino también por ubiquitinación, secuestro y clivaje proteolítico. La ubiquitinación se lleva a cabo por la proteína Fbxo45 en su dominio VASA, este mecanismo es usado para bajar los niveles de la proteína. Tanto las células cancerosas como las células normales secuestran a Par-4, e inhiben los efectos de dicha proteína endógena autogenerada, en las células cancerígenas se lleva a cabo mediante la sobreexpresión de la proteína de filamento intermedio, vimentina. En el caso de las células normales el secuestro también lo lleva a cabo la proteína vimentina, y solo lo exporta a niveles bajos, con excepción de cuanto se encuentra en situaciones de estrés,

donde su liberación se incrementa (Sviripa et al., 2016), además se ha observado que Par-4 interactúa con la transcriptasa reversa de telomerasa humana (h-TERT) y se sugiere que bloquea la apoptosis inducida por Par-4 bloqueando su translocación al núcleo ya que al bloquear h-TERT aumenta la expresión nuclear de Par-4 (Sheng J et al., 2010; Zhou et al., 2013). Recientemente se observó que en diferentes células de cáncer que Par-4 es escindido por caspasa-3 en la posición D131 durante el proceso de apoptosis, generando un fragmento clivado de la proteína (cl-Par-4) de 25 kDa que contiene la NLS2, la inducción selectiva en la apoptosis en el dominio de las células cancerosas (SAC) y el dominio de zipper de leucina. Además, la acumulación de cl-Par-4 bajo estímulos apoptóticos se relaciona con la quimiosensibilidad de células cancerosas y el nivel de apoptosis observado (Brasseur et al., 2016). Las células cancerosas poseen mecanismos para inhibir el efecto de Par-4, en estos también está incluido el secuestro de la proteína. Se ha observado que el autoantígeno uveal con un dominio super enrollado y repeticiones de anquirinas (UACA) compite con Par-4 por la unión con el receptor GRP78 previniendo su traslocación del citoplasma al núcleo, regulando positivamente la expresión de NF- κ B y bloqueando la apoptosis mediada por Par-4 (Qinan et al., 2014). El aumento en la expresión de Par-4 regula positivamente WNT1, se ha observado que, en cáncer de mama invasivos, la expresión de WNT1 promueve la diferenciación y la apoptosis e inhibe la proliferación, además de asociarse con un mejor pronóstico en un subgrupo de pacientes de cáncer de mama invasivo en estadio II (Yoysungnoen et al., 2006.). La sobreexpresión de Par-4 disminuye la expresión de FZD8. Los Frizzled (FZD) son receptores de superficie celular transmembrana activados por la familia de lipoglicoproteínas WNT para activar la señalización WNT canónica y/o no canónica (Walerych et al., 2012).

Par-4 es una proteína que juega un papel importante en la homeostasis celular en la regulación del ciclo menstrual y durante la embriogénesis. En cáncer se ha observado que puede jugar un papel pronóstico y terapéutico debido a que los niveles más altos de expresión de Par-4 se correlacionaron con un mejor pronóstico en términos de supervivencia (Ahmed et al., 2008), además se ha observado que Par-4 está disminuido en más del 70% de los cánceres renales (Cook et al., 1999). neuroblastoma (Kogel et al.,

2001), formas agudas y crónicas de leucemia (Boehrer et al., 2001). Y en aproximadamente el 32% de los carcinomas endometriales, por el silenciamiento mediante la hipermetilación del promotor, mutación de una base en el exón 3 del gen Par-4, que convierte un residuo de arginina (CGA) en un codón de terminación (TGA) en cáncer de endometrio (Moreno-Bueno et al., 2007). O inestabilidad en una región 12q21 del cromosoma humano se encuentra el gen Par-4 en cáncer que a menudo se elimina en el cáncer gástrico y pancreático (Johnstone et al., 1998), las mutaciones K-Ras son las mutaciones más frecuentes en el cáncer de páncreas (Almoguera et al., 1988), y regulan negativamente Par-4 en cánceres pancreáticos que albergan mutaciones puntuales de K-Ras (Ahmed et al., 2008). En el caso del cáncer de próstata, Par-4 no está regulado negativamente, silenciado o mutado, pero si esta inactivado debido a la fosforilación por Akt1, que impide la translocación nuclear de Par-4, reteniéndolo en el citoplasma y haciéndolo incapaz de causar apoptosis (Goswami et al., 2005). En la figura 5 se muestran las cascadas de señalización que involucran a Par-4.

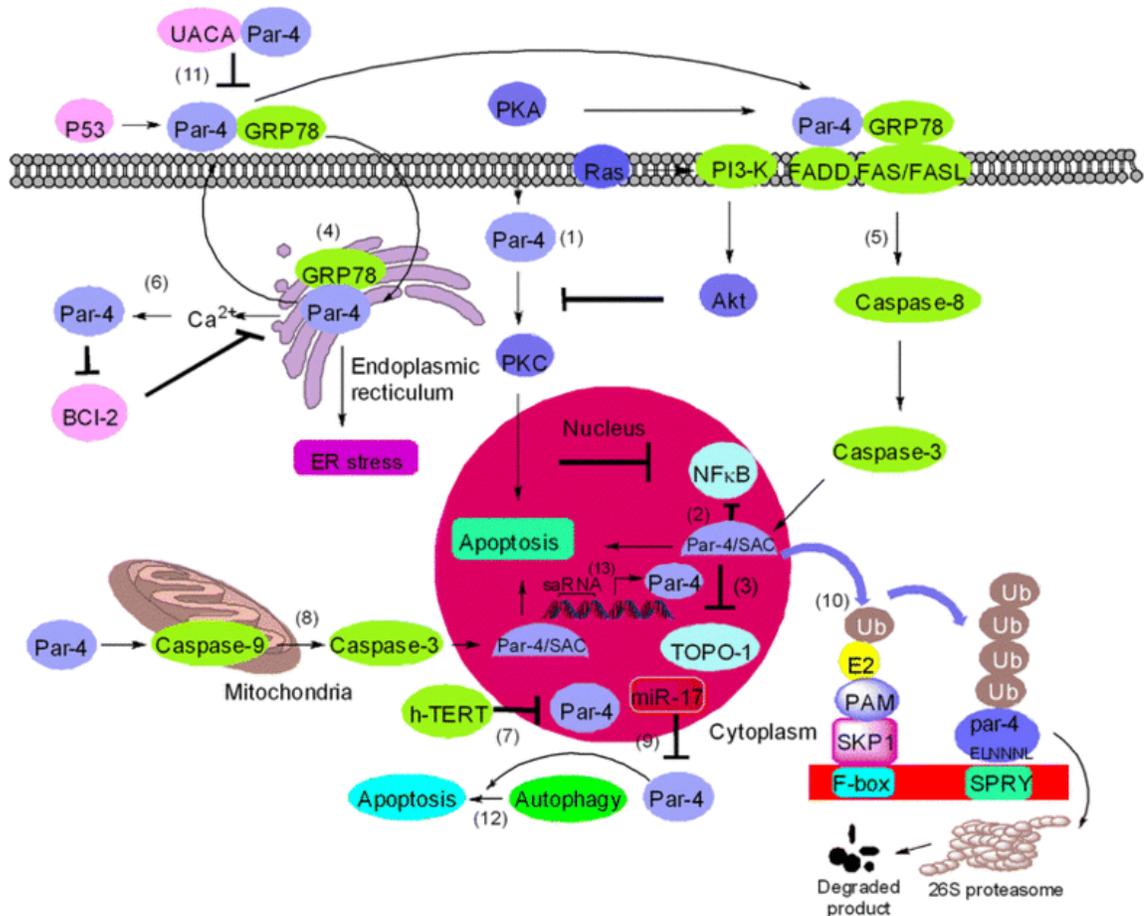


Figura 5. Cascadas de señalización que involucran a Par-4. 1) PKA activa Par-4, que luego se une a una PKC, lo que lleva a la apoptosis. 2) Par-4 se transloca al núcleo e inhibe NF-κB. 3) Par-4 se transloca al núcleo e inhibe la actividad de TOPO1, lo que lleva a la apoptosis. 4) el estrés de RE puede conducir a la secreción de Par-4, seguido de la unión de Par-4 a GRP78; esta unión también induce estrés de RE. 5) Par-4 se une a GRP78, haciendo que FADD interactúe con Fas y FasL en la membrana celular, activando caspasa-8 y caspasa-3 llevando a la apoptosis. Este proceso inhibe NF-κB y puede ser activado por PKA. 6) Par-4 bloquea BCL2 y promueve la apoptosis. 7) h-TERT se une a Par-4 e inhibe la translocación de Par-4 al núcleo. 8) Par-4 activa la caspasa-9 a través de las mitocondrias y conduce a la apoptosis y la escisión de Par-4. 9) la expresión de miR-17 inhibe la acción apoptótica de Par-4. 10) ubiquitinación mediada por el complejo E2/PAM/SKP1 de Par-4. 11) UACA puede competir con Par-4 por la unión de GRP78, y P53 puede inducir la secreción de Par-4 e inhibir la expresión de UACA. 12) Par-4 cambia la autofagia a la apoptosis. 13) saRNAs activan la expresión de Par-4. Imagen tomada de Rasool et al., 2016.

Compuestos como los secretagogos (Arylquins) y la cloroquina (CQ) se utilizan en la estimulación la secreción de Par-4. Burikhanov et al., en 2017 observaron que al tratar líneas celulares normales de humano y de ratón (MEF, PrSCs, PrECs, HEL y HBEC), con una serie de fármacos que contenían el farmacóforo de quinolina o quinolona, incremento la expresión y secreción de Par-4, además de que Par-4 secretado está

involucrado en la apoptosis específica de células cancerosas *in vitro*, Burikhanov et al., (2009) demostraron que Par-4 también se secreta *in vivo* y se puede detectar en el suero. La actividad de Par-4 en el suero fue capaz de inducir apoptosis específicamente en células cancerosas.

2.3 Curcumina

La curcumina (1,7-bis(4-hidroxi-3-metoxifenil)-1,6-heptadieno-3,5-diona fig. 6) es un compuesto polifenólico natural de pigmento amarillo derivado de la planta cúrcuma (*Cúrcuma longa*) fue aislado por primera vez en 1815 como un extracto crudo por Vogel y Pelletier (Milobedeska J, et al., 1910), además de ser ampliamente utilizado como un agente colorante de alimentos, y debido a su actividad biológica activa se usa en diversos tratamientos de algunas enfermedades. Dentro de sus actividades se incluyen: antioxidante, anti-inflamatorio, anti-proliferativo, anti-angiogénico, anti-microbiano, anti-parasitario además de inmunomodulador. La curcumina también es capaz de suprimir la trombosis y protege contra el infarto del miocardio, así como de disminuir los niveles de azúcar en sangre en humanos (Aggarwal BB, Sung B. 2009; Waghela et al., 2015).

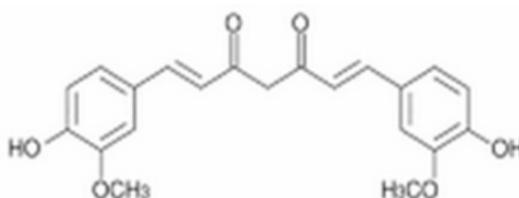


Figura 6. Estructura de la curcumina.

Durante los últimos años se han realizado estudios *in vivo* e *in vitro*, donde sugieren que la curcumina tiene efectos antivirales, antiartríticos además de anticancerígenas. Esto implica la regulación de varios blancos moleculares como NF-κB, factor de crecimiento celular endotelial vascular (VEGF), factor de necrosis tumoral (TNF), interleucina 1 (IL-1), interleucina 6 (IL-6), proteínas kinasas y ciclooxigenasa 2 (COX2) entre otras. Por lo mencionado anteriormente, la curcumina es considerado un agente terapéutico potencial para la prevención y/o tratamiento de algunas enfermedades (Kiuchi F, et al., 1993).

2.3.1 Mecanismos de muerte por curcumina

La curcumina está involucrada en la modulación de varios blancos moleculares en los cuales se incluyen factores de transcripción, factores de crecimiento y sus receptores, citoquinas, enzimas y los genes que regulan la proliferación celular y la apoptosis (Aggarwal BB, et al., 2007). Se sugiere que la curcumina induce muerte celular mediante la activación de las vías de muerte celular y la inhibición del crecimiento de las vías de proliferación (Ravindran J., et al., 2009).

2.3.2 Curcumina en cáncer

La curcumina está relacionada con la modulación de varias enzimas involucradas con patologías como el cáncer y la inflamación. Un ejemplo de ellas es la COX-2, que por estímulos mitogénicos e inflamatorios resulta en una mayor síntesis de prostaglandinas en tejido inflamado y neoplásico (Seibert K, Masferrer JL., 1994). Se ha observado que COX-2 está sobreexpresado en una gran cantidad de cánceres en el humano como: colon, hígado, páncreas, mama, pulmón, vejiga, piel, estómago, cánceres de cabeza y cuello (Subbaramaiah K, Dannenberg AJ., 2003).

Yoosungnoen P, et al., 2006 observaron que en ratones desnudos que habían sido implantados con células de carcinoma hepatocelular, y recibieron tratamiento con curcumina, la sobreexpresión de COX-2 y VEGF inducida por el tumor disminuyó, lo

que sugiere que la curcumina inhibe la angiogénesis tumoral. Por otra parte se ha observado que la curcumina tiene efecto en P53 un gen supresor de tumores que regula vías celulares y moleculares previniendo la formación del cáncer. Han SS et al., en 1999 mostraron que la curcumina modula a la baja la expresión de P53, así como de los genes de supervivencia egr-1, c-myc y bcl-XL en células B, dando como resultado la detención del crecimiento y la apoptosis del linfoma de células B (Ramachandran et al., 1999), en cáncer de mama Lv D et al., en 2014 observaron en ratones desnudos tratados con curcumina una disminución o inhibición del crecimiento del tumor, así como la inducción de apoptosis.

2.4 IMMUNEPOTENT CRP

El IMMUNEPOTENT CRP es un compuesto dializado de leucocitos de bazo de bovino, que contiene una mezcla heterogénea de sustancias de bajo peso molecular (10-12 kDa) que son capaces de modificar la respuesta inmune, este compuesto también llamado extracto dializable de leucocitos de bovino (bDLE) está libre de patógenos y carece de citotoxicidad para el paciente (Franco-Molina et al., 2008).

2.4.1 IMMUNEPOTENT CRP en cáncer

Estudios previos han demostrado que el IMMUNEPOTENT CRP presenta efectos citotóxicos en las líneas celulares de cáncer, tal como lo muestra Franco Molina et al en 2006, donde observaron una disminución en la viabilidad de las líneas celulares de cáncer MCF-7, BT-474, MDA-MB-453, A-427, Calu-1, U937 Y L5178Y, además de que en las células de cáncer de mama MCF-7 fue suprimida la expresión del RNAm de p53, bag-1, c-myc, bcl-2 y bad que influyen en la apoptosis. En la línea celular HeLa se observó que se disminuye la viabilidad a través de la ruta de muerte celular programada (RCD) e induce arresto celular en la fase G2/M, además de inducir alteraciones del DNA, pérdida del potencial de membrana mitocondrial y producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Martínez-Torres et al., 2018).

Sierra-Rivera et al en 2016 observaron que al poner en contacto la línea celular K562 con bDLE, se disminuía la viabilidad y se incrementaban los niveles de las interleucinas IL-6, IL-8 y TNF- α , así como de las quimiocinas CCL2/MCP-1, CXCL8/IL-8 de manera dependiente de dosis.

Ratones C57BL/6 inoculados con células B16F10 y tratados con IMMUNEPOTENT CRP presentaron retraso en el crecimiento tumoral, disminución del peso tumoral y previno la metástasis. *In vitro* se observó un incremento de la apoptosis y la producción de VEGF, además se indujo la exposición a calreticulina (CRT), liberación de adenosina trifosfato (ATP), HSP70, HSP90, y HMGB1 en dichas células al entrar en contacto con el IMMUNEPOTENT CRP (Franco-Molina et al., 2010, Rodríguez-Salazar et al., 2017). En 2017 Rodríguez-Salazar et al., en esta misma cepa inoculó lisados de células B16F10

ricos en DAMS tratadas con IMMUNEPOTENT CRP y la combinación IMMUNEPOTENT CRP+OXP (Oxaliplatino), 7 días después retaron con células vivas y observaron que se inhibía el crecimiento tumoral.

Además de presentar citotoxicidad en células cancerígenas, IMMUNEPOTENT CRP tiene efecto quimio protector sobre las células de medula ósea, ya que incrementa las poblaciones de leucocitos, granulocitos y eritroides, además de reducir la producción de ROS/superóxido y activación de Nrf2, mejoró los niveles hematológicos y aumento de peso en ratones tratados con 5-Fluorouracil (5-FU), un agente quimioterapéutico utilizado para tratar el cáncer gastrointestinal, de mama, pancreático de cabeza y cuello entre otros (Coronado-Cerda et al., 2016). En pacientes diagnosticados con cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC) y pacientes con cáncer de mama, el tratamiento como adyuvante de IMMUNEPOTENT CRP, aumento el total de leucocitos y subpoblaciones de linfocitos T (CD4, CD8, CD16 y CD56 y manteniendo hipersensibilidad de tipo retardada, DTH) aumentando la calidad de vida de los pacientes (Franco-Molina et al., 2008; Lara-H et al., 2010).

3. JUSTIFICACIÓN

El cáncer de mama es un problema de salud pública que se presenta principalmente en mujeres y constituye una de las causas principales de muerte en México.

Por lo que es importante buscar mejores alternativas de tratamiento y sensibilidad a drogas que mejore la eficiencia de quimio y radioterapia. Por lo que en este trabajo pretendemos evaluar compuestos que inducen estrés en el retículo endoplasmático con potencial secretagogo de Par-4 como la Curcumina y el IMMUNEPOTENT CRP quimiosensibilizan a través de la inducción de la expresión de Par-4, una proteína proapoptótica que induce muerte celular después de un estímulo.

4. HIPÓTESIS

La curcumina e IMMUNEPOTENT CRP incrementan la expresión y secreción de la proteína Par-4 en fibroblastos y ratones con capacidad anti-proliferativa en líneas celulares de cáncer de mama con diferente estatus hormonal.

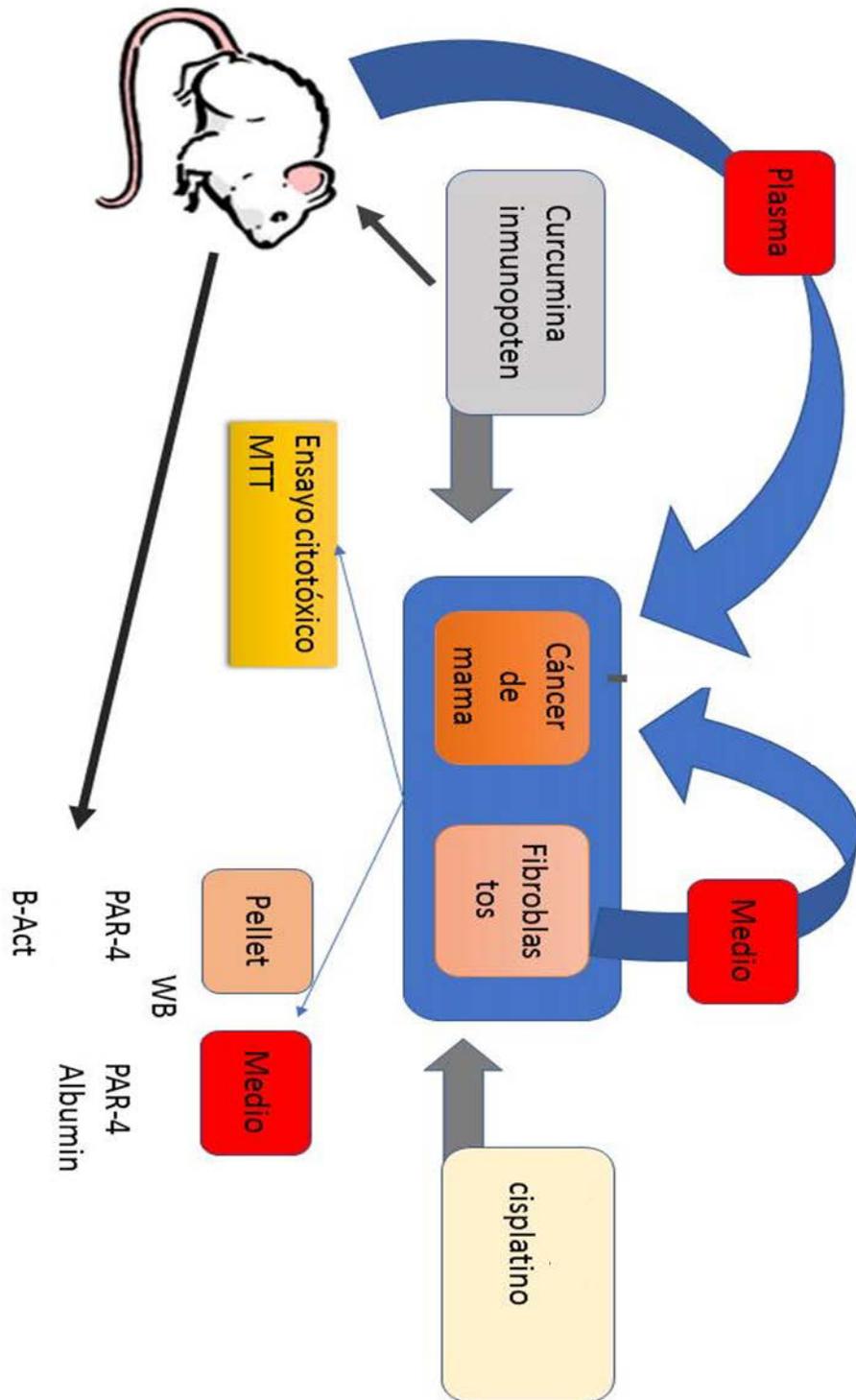
5. OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto de curcumina e IMMUNEPOTENT CRP en la modulación y secreción de la proteína Par-4 en fibroblastos y ratones.

6. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1.-Determinar la expresión basal de la proteína Par-4 en líneas celulares de cáncer de mama y fibroblastos de humano y de ratón.
- 2.-Evaluar el efecto citotóxico de Curcumina e IMMUNEPOTENT CRP en líneas celulares de cáncer de mama y en fibroblastos humanos y de ratón.
- 3.-Evaluar la modulación en la expresión basal de la proteína Par-4 después del tratamiento con Curcumina e IMMUNEPOTENT CRP en fibroblastos.
- 4.-Evaluar la capacidad de la Curcumina e IMMUNEPOTENT CRP para inducir la secreción de la proteína Par-4 soluble en fibroblastos y ratones
- 5.- Evaluar la capacidad del plasma de ratones tratados con Curcumina e IMMUNEPOTENT CRP en la inhibición de la proliferación celular mediante par-4 soluble
- 6.- Observar si la inducción de la proteína Par-4 por Curcumina e IMMUNEPOTENT CRP se asocia con la quimiosensibilización en líneas celulares de cáncer de mama.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Cultivo de líneas celulares de cáncer de mama

Se utilizaron las líneas celulares de cáncer de mama receptor de estrógeno positivo (MCF-7), triple negativo (SKBR3) y receptor HER2 positivo (MDA-MB-231) y líneas celulares no tumorales (Primary Dermal Fibroblast Normal; Human, Neonatal, HDFn y 3T3- Swiss-albino) cultivadas en medio DMEM/F12 suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) más antibiótico, a 37°C en una atmósfera de 5% CO₂, en una humedad relativa al 70%.

7.2 Tratamiento de células con Curcumina e ICRP *in vitro*

Para determinar el efecto citotóxico de la Curcumina en las líneas celulares de cáncer de mama y no tumorales se cultivaron en una caja de 96 pozos con 3,000 células. Se le añadió medio DMEM/F12 que contenía diferentes concentraciones (0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40 y 50 µM) de Curcumina (Sigma-Aldrich, c1386) por triplicado, preparado a partir de un stock de 20 mM de Curcumina en DMSO. Para el IMMUNEPOTENT CRP (producido por el Laboratorio de Inmunología y Virología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México) las células se incubaron en medio DMEM/F12 que contenía diferentes concentraciones (0, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.25 y 1.5 U/mL) por 24, 48 y 72 h. Posteriormente se evaluó la viabilidad celular por el ensayo de MTT.

7.3 Ensayo de viabilidad celular mediante MTT

Para la determinación de la viabilidad celular se empleó la técnica de MTT, se preparó la solución con 5mg/mL de MTT en buffer PBS estéril, posteriormente se agregaron 20µL

de esta solución a cada pozo y la placa se incubó de 45 a 90 min a 37°C; pasado el tiempo de incubación se procedió a decantar el sobrenadante y agregar después 100 µL de DMSO para solubilizar las sales precipitadas. Para descartar el color de la curcumina, se metieron por triplicado cada una de las concentraciones sin células y se trataron de la misma manera. Finalmente, la placa se llevó al lector de ELISA a una longitud de onda 570nm.

7.4 Evaluación de la modulación de Par-4 por curcumina

Se cultivaron 1,000,000 de células en cajas de cultivo de 12.5 cm² y se aplicó el tratamiento con curcumina usando las concentraciones de 0, 10 y 60 µM e IMMUNEPOTENT CRP en concentraciones de 0, 0.5 y 1 U/mL, después de 4 y 24 h se procedió a colectar las células y el medio de cultivo, a las células se les agregó 100 µL de buffer PBS y se centrifugaron por 10 min a 1600 rpm. Las pastillas celulares se analizaron mediante Western blot. Del sobrenadante se concentró la proteína con tubos para centrifuga con filtro Amicon 30k (Millipore) y se analizó Par-4 soluble mediante Wb.

7.5 Extracción de proteínas y Western blot

Las pastillas que se obtuvieron del punto anterior se lavaron con PBS para después tener un paquete celular, el cual se resuspendió en 100 µL de buffer de lisis (Triton 1%, NaCl 150mM, Tris 25mM, pH 7.6) y se incubó en hielo por 1 h. Posteriormente las células se centrifugaron a 10,000 rpm por 5 min y el sobrenadante se transfirió a un tubo estéril y se almacenó a -80°C para su uso posterior.

7.6 Cuantificación de proteínas

La concentración de proteínas se determinó usando el Kit Bio-Rad Protein Assay siguiendo las instrucciones del fabricante. Para la cuantificación de los extractos

proteínicos se prepararon diluciones de 1:5 utilizando como diluyente el buffer de lisis; después se prepararon las diluciones en relación a 1 mL de A con 20 μ L de S; posteriormente se agregaron 200 μ L de reactivo B para después incubar por 15 min a temperatura ambiente. Después se leyó la placa en el lector de ELISA a una longitud de onda de 595 nm.

7.7 Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS

Se tomaron 50 μ g de proteína total y se desnaturalizaron en buffer de carga que contiene SDS y β -mercaptoetanol, se calentaron a 95°C por 5 min y después se cargaron en geles de poliacrilamida-SDS al 12%, se corrieron a 40 volts por 20 min y posteriormente se incrementó el voltaje a 100 volts por 90 min, después se procedió a transferir las proteínas del gel a una membrana de nitrocelulosa usando un casete de transferencia de proteínas en condiciones de 25 volts a 4°C toda la noche, finalizada la transferencia de proteínas se continuó con el bloqueo de la membrana con una solución de TBS con leche al 5 % y Tween al 0.5 % por una hora.

7.8 Inmunodetección y revelado

Para la inmunodetección se emplearon anticuerpos primarios: anti-Par-4 monoclonal, (Santa Cruz Biotechnology) y β -actina monoclonal (Sigma-Aldrich); y como segundo anticuerpo se empleó anti-ratón proveído por BIORAD; para su detección se empleó el Kit de quimioluminiscencia. Una vez que se expuso al reactivo para la quimioluminiscencia, se procedió al revelado con películas especiales en condiciones sin luz.

7.9 Ensayo *in vivo*

A ratones BALB/c de aproximadamente 5 semanas se les administró curcumina e IMMUNEPOTENT CRP en una concentración de 100 mg/kg y 5 U en 200 μ L respectivamente vía intraperitoneal, 24 h después se recolectó el plasma con EDTA y se inactivó durante 30 min a 56°C a baño maría.

7.10 Tratamiento de las células con plasma

Para determinar el efecto citotóxico del plasma extraído de ratones tratados con Curcumina e IMMUNEPOTENT CRP en las líneas celulares de cáncer de mama, se cultivaron en una caja de 96 pozos 3,000 células por pozo, seguido de esto, se incubaron 24 h con 10 % y 20 % de plasma solo y en combinación con anti-Par-4 por triplicado. Posteriormente se evaluó la viabilidad celular por el ensayo de MTT.

7.11 Ensayo de quimio sensibilización

Se sembraron 3000 células por pozo en una caja de 96 pozos, se incubaron con 10 % del plasma que se extrajo de los ratones en combinación con 5 μ g/ μ L y 10 μ g/ μ L de Cisplatino, 24 h después se determinó la viabilidad celular mediante el ensayo de MTT.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis de resultados se llevó a cabo mediante un análisis de varianza (ANOVA) y Tukey, para observar las diferencias entre los grupos considerándose significativo con $p < 0.05$.

8. RESULTADOS

8.1 Análisis de la viabilidad celular en líneas celulares de cáncer de mama y fibroblastos tratados con Curcumina e IMMUNEPOTENT CRP.

Para determinar la viabilidad de las líneas celulares de cáncer de mama (MCF-7, MDA-MB-231 y SKBR3) y fibroblastos (HDFn y 3T3-Swiss albino), tratados con diferentes concentraciones de Curcumina e IMMUNEPOTENT CRP se evaluó mediante el ensayo de MTT.

En las células tratadas con Curcumina se observó una reducción de la viabilidad celular que dependiente de dosis y del tiempo. La línea celular de cáncer de mama MCF-7 mostro mayor sensibilidad (CI_{50} de 12.11 $\mu\text{M}/\text{mL}$) al tratamiento con Curcumina en comparación con la línea MDA-MB-231 y SKBR-3, ya que se observó una CI_{50} de 12.11 $\mu\text{M}/\text{mL}$ 15.2 $\mu\text{M}/\text{mL}$ y 18.4 $\mu\text{M}/\text{mL}$ a las 24 h respectivamente como se observa en la figura 7.

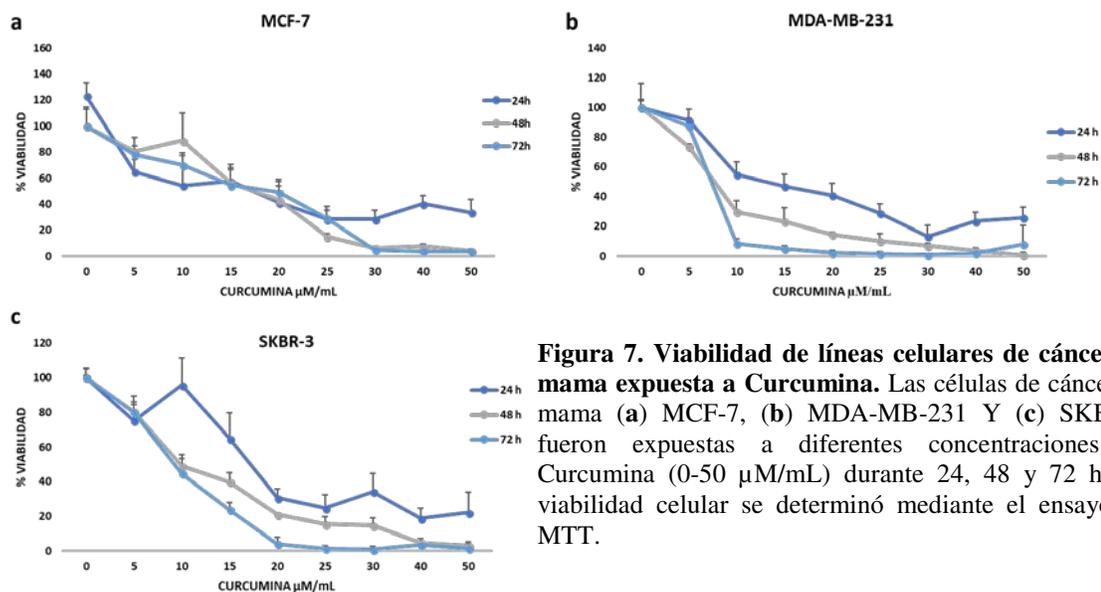


Figura 7. Viabilidad de líneas celulares de cáncer de mama expuesta a Curcumina. Las células de cáncer de mama (a) MCF-7, (b) MDA-MB-231 Y (c) SKBR-3 fueron expuestas a diferentes concentraciones de Curcumina (0-50 $\mu\text{M}/\text{mL}$) durante 24, 48 y 72 h. La viabilidad celular se determinó mediante el ensayo de MTT.

En las líneas celulares de fibroblastos HDFn y 3T3 Swiss albino también se observó un efecto dependiente de dosis-tiempo, encontrándose que los fibroblastos de humano fueron más sensible a la curcumina en comparación con los fibroblastos de ratón con una CI_{50} de 15.52 $\mu\text{M}/\text{mL}$ y 24 $\mu\text{M}/\text{mL}$ respectivamente como se observa en la figura 8.

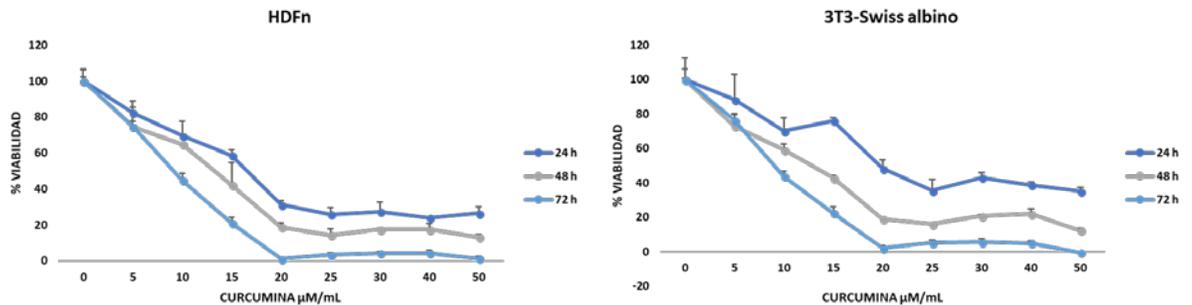


Figura 8. Viabilidad de líneas celulares no cancerígenas expuestas a Curcumina. Las líneas celulares no cancerígenas (a) FDHn y (b) 3T3-Swiss albino fueron expuestas a diferentes concentraciones de Curcumina (0-50 $\mu\text{M}/\text{mL}$ durante 24, 48 y 72 h. La viabilidad celular se determinó mediante el ensayo de MTT. Los ensayos se realizaron por triplicado y se graficó la desviación estándar.

La viabilidad de las líneas celulares tratadas con IMMUNEPOTENT CRP mostró un efecto dependiente de dosis-tiempo en la línea MCF-7, sin embargo, en las líneas MDA-MB-231 y SKBR-3 se observó un efecto que dependió solo de la dosis y no de tiempo como se muestra en la figura 9. La línea MCF-7 mostró una mayor resistencia al tratamiento con IMMUNEPOTENT CRP en comparación con MDA-MB-231 y SKBR-3 debido a que en el tratamiento después de las 24 h no mostró una CI_{50} como se observa en la figura 9.

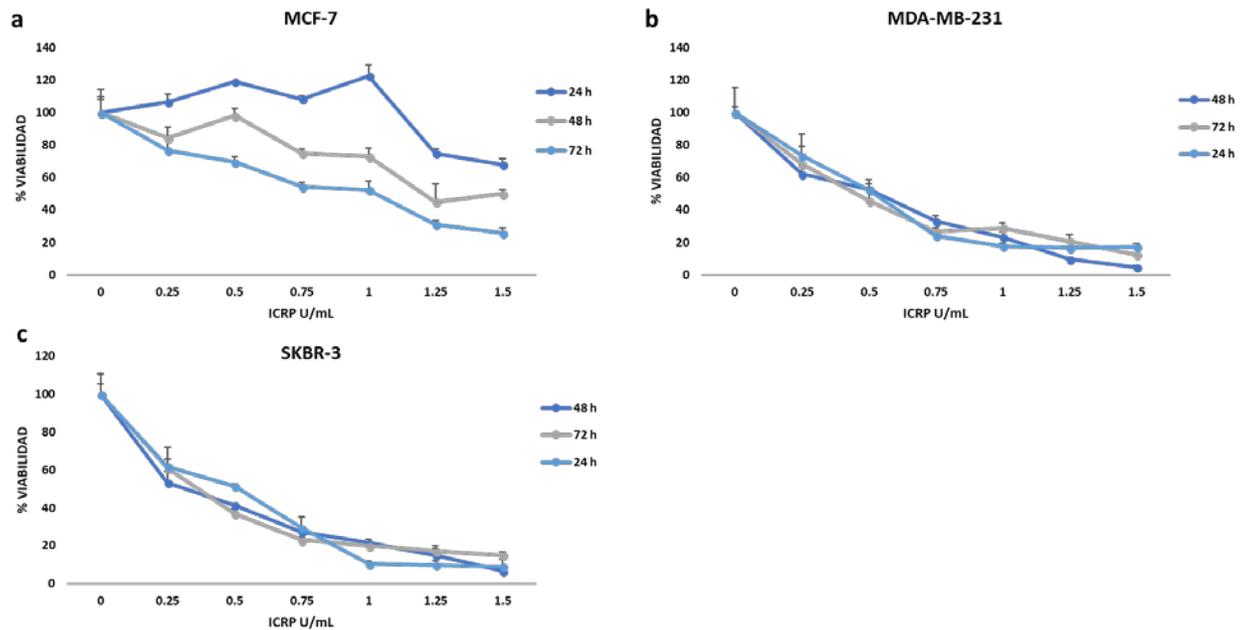


Figura 9. Viabilidad de líneas celulares de cáncer de mama expuestas a IMMUNEPOTENT CRP. Las células de cáncer de mama (a) MCF-7, (b) MDA-MB-231 y (c) SKBR3 fueron expuestas a diferentes concentraciones de IMMUNEPOTENT CRP (0-1.5 U/mL durante 24, 48 y 72 h. La viabilidad celular se determinó mediante el ensayo de MTT. Los ensayos se realizaron por triplicado y se graficó la desviación estándar.

En el tratamiento de los fibroblastos (HDFn y 3T3 Swiss albino se observó un efecto dependiente solo de la dosis al igual que las dos líneas de cáncer de mama (MDA-MB-231 y SKBR-3) sin embargo la línea HDFn mostró mayor sensibilidad ya que la viabilidad cayó por debajo del 30 % con la mínima concentración usada como se observa en la figura 10.

Las Concentraciones Inhibitorias al 50 de las líneas celulares tratadas con Curcumina e IMMUNEPOTENT CRP se muestran en la tabla 1.

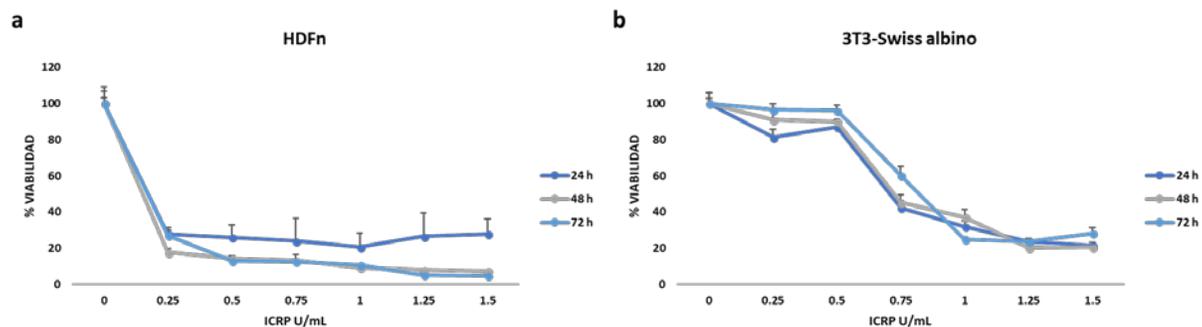


Figura 10. Viabilidad de líneas celulares no cancerígenas expuestas a IMMUNEPOTENT CRP. Las células no cancerígenas (a) HDFn y (b) 3T3-Swiss albino fueron expuestas a diferentes concentraciones de IMMUNEPOTENT CRP (0-1.5 U/mL) durante 24, 48 y 72 h. La viabilidad celular se determinó mediante el ensayo de MTT. Los ensayos se realizaron por triplicado y se graficó la desviación estándar.

Tabla 1. Concentración Inhibitoria 50 de Curcumina e IMMUNEPOTENT CRP en las células de cáncer de mama y fibroblastos.

Línea celular	CI ₅₀ Curcumina	CI ₅₀ ICRP
MCF-7	12.11 $\mu\text{M}/\mu\text{L}$	1.42 U/mL
MDA-MB-231	15.2 $\mu\text{M}/\mu\text{L}$	0.45 U/mL
SKBR-3	18.4 $\mu\text{M}/\mu\text{L}$	0.38 U/mL
HDFn	15.52 $\mu\text{M}/\mu\text{L}$	0.0026 U/mL
3T3-Swiss albino	24 $\mu\text{M}/\mu\text{L}$	0.72 U/mL

8.2 Efecto de Curcumina e IMMUNEPOTENT CRP en la morfología celular de las líneas celulares MCF-7, MDA-MB 231, SKBR3, HDFn y 3T3-Swiss albino

El tratamiento de las líneas celulares con las concentraciones mencionadas anteriormente de Curcumina e IMMUNEPOTENT CRP afectan la morfología celular, el efecto más notorio en las células tratadas con Curcumina se puede observar desde la concentración de 15 $\mu\text{M}/\text{mL}$, siendo más evidente a la concentración de 30 $\mu\text{M}/\text{mL}$, donde las células adaptan una morfología redondeada, pignóticas y con una gran cantidad de vacuolas. Este efecto es similar en todas las líneas celulares como se observa en la figura 11.

En lo que respecta a la morfología de las líneas cancerígenas y no cancerígenas tratadas con IMMUNEPOTENT CRP, la alteración de la morfología celular se observó desde la concentración de 0.75 U/mL y a una concentración de 1.5 U/mL el 100% de las células presentaron una pérdida de la morfología como se muestra en la figura 12.

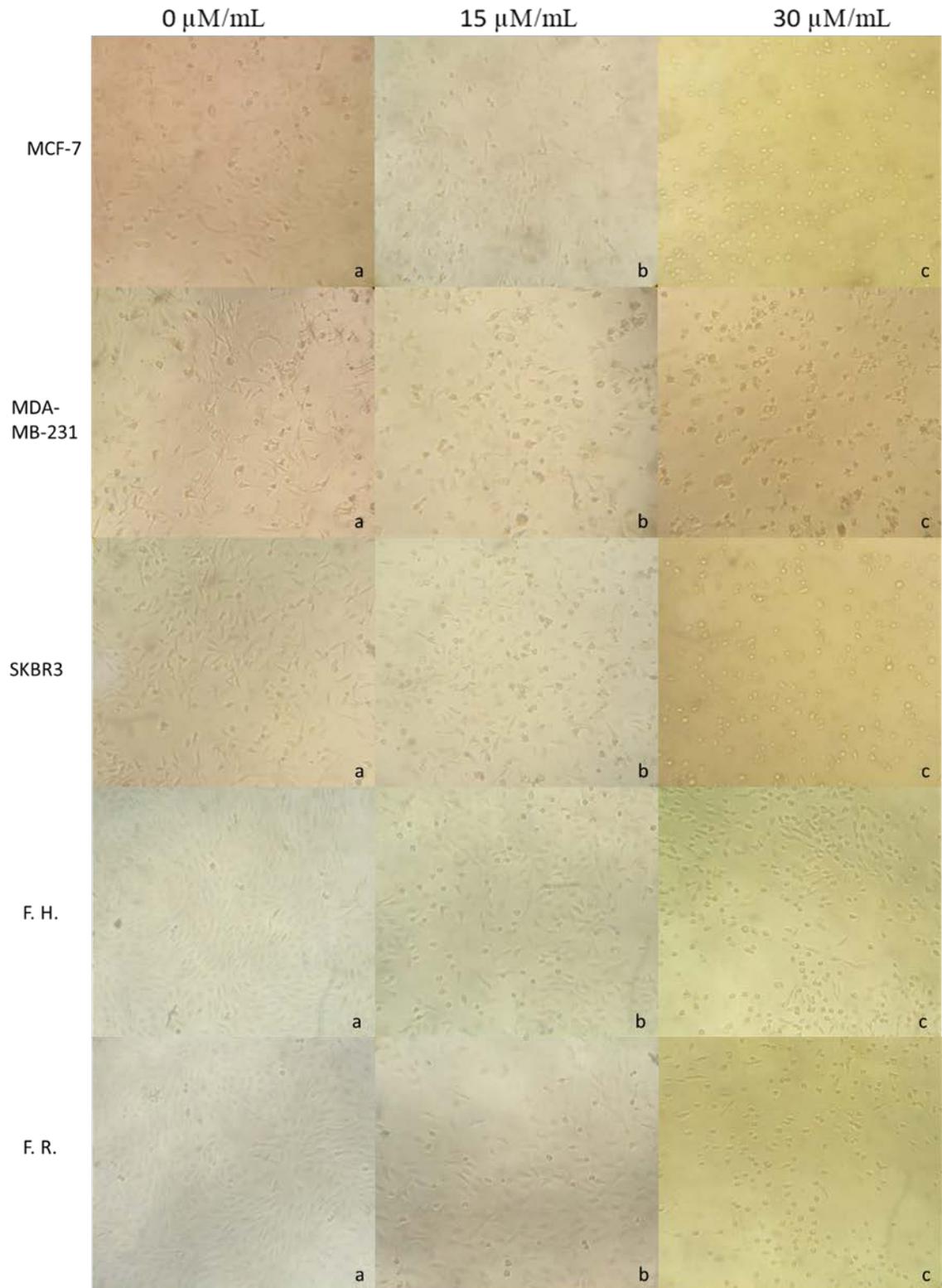


Figura 11. Efecto de la Curcumina en la morfología de las líneas celulares de cáncer de mama y fibroblastos. En la primera columna (a) se muestra el control (0 $\mu\text{M}/\text{mL}$) de cada una de las líneas celulares, la columna 2 (b) y 3 (c) fueron expuestas a 15 y 30 $\mu\text{M}/\text{mL}$ de Curcumina respectivamente.

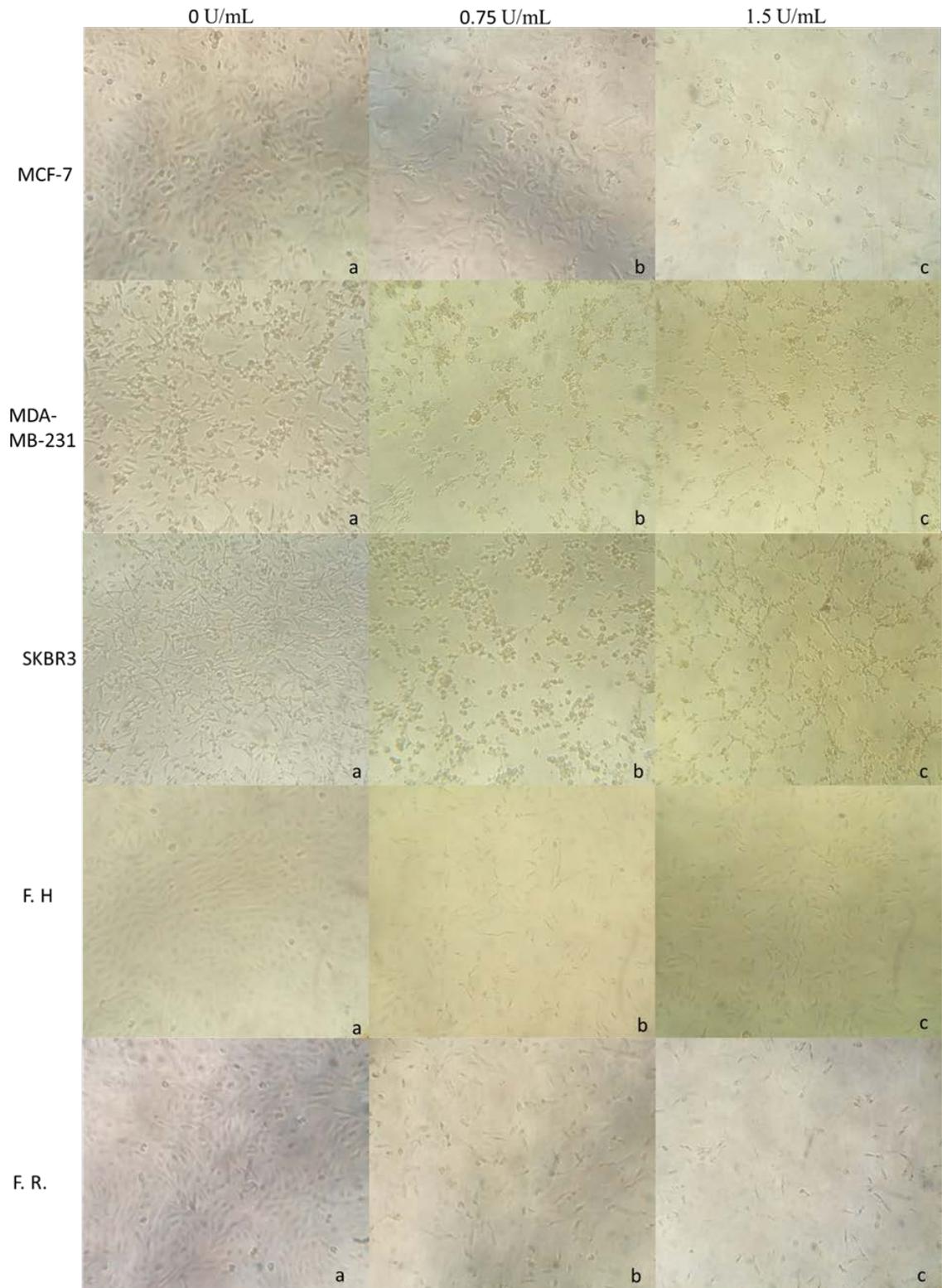


Figura 12. Efecto del IMMUNEPOTENT CRP en la morfología de las líneas celulares de cáncer de mama y fibroblastos. En la primera columna (a) se muestra el control (0 U/mL) de cada una de las líneas celulares, la columna 2 (b) y 3 (c) fueron expuestas a 0.75 y 1.5 U/mL de ICRP respectivamente.

8.3 Determinación de la expresión basal de Par-4 en líneas celulares de cáncer de mama y fibroblastos.

La determinación de la expresión basal de la proteína Par-4 se realizó mediante Western blot. Los niveles de la expresión basal de la proteína Par-4 varía en todas las líneas celulares. La línea MCF-7 mostro una expresión más baja comparado con las otras dos líneas celulares de cáncer de mama mientras que los fibroblastos de humano (HDFn) presentan una señal más fuerte en comparación con la línea de fibroblastos de ratón y el resto de las líneas celulares. En la figura 13 se observa la expresión basal de la proteína Par-4 y β -actina como gen endógeno en cada una de las líneas celulares para normalizar la expresión de la proteína Par-4.

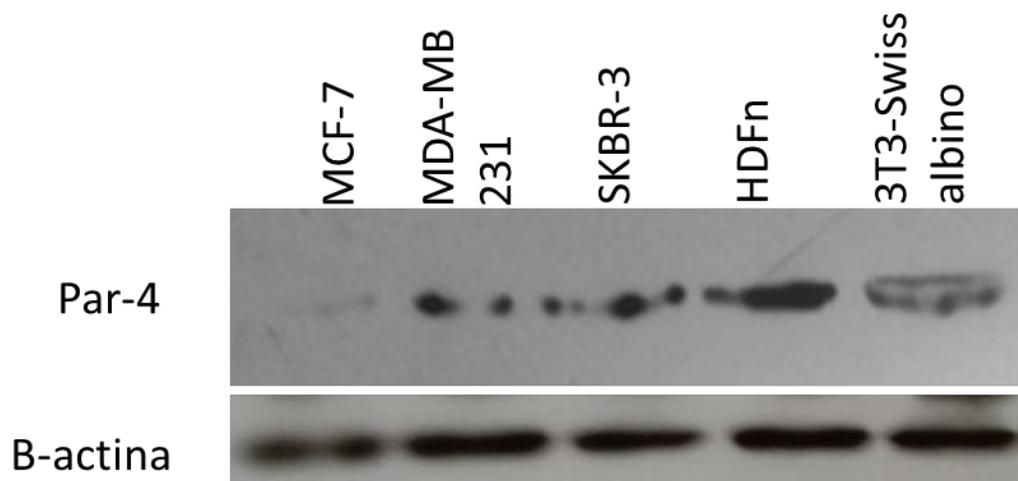


Figura 13. Análisis de la expresión basal de la proteína Par-4. Cada una de las líneas celulares mostraron una expresión basal variada. El fibroblasto humano (*HDFn*) mostró una expresión mayor en comparación con el resto de las líneas celulares.

8.4 Análisis de la modulación de la proteína Par-4 en fibroblastos por Curcumina e IMMUNEPOTENT CRP

Para determinar si la Curcumina e ICRP tenían la capacidad de incrementar la expresión de Par-4 en fibroblastos. Las líneas celulares HDFn y 3T3-Swiss albino fueron tratadas con Curcumina e IMMUNEPOTENT CRP y se analizó mediante Western blot. Los resultados mostraron un incremento en la expresión de la proteína en la línea HDFn con Curcumina a las 4 h y 24 h después del tratamiento en una concentración de 10 $\mu\text{M}/\mu\text{L}$ y 60 $\mu\text{M}/\mu\text{L}$, respectivamente. Mientras que el tratamiento con IMMUNEPOTENT CRP mostro un incrementó a las 24 h después del tratamiento con 0.5 U/mL como se observa en la figura 14 a. En la línea 3T3-Swiss albino (figura 14 b) se observó un incremento en la expresión de la proteína con 60 $\mu\text{M}/\mu\text{l}$ de Curcumina 4 horas después del tratamiento y 1 U/mL de IMMUNEPOTENT CRP a las 24 h después del tratamiento.

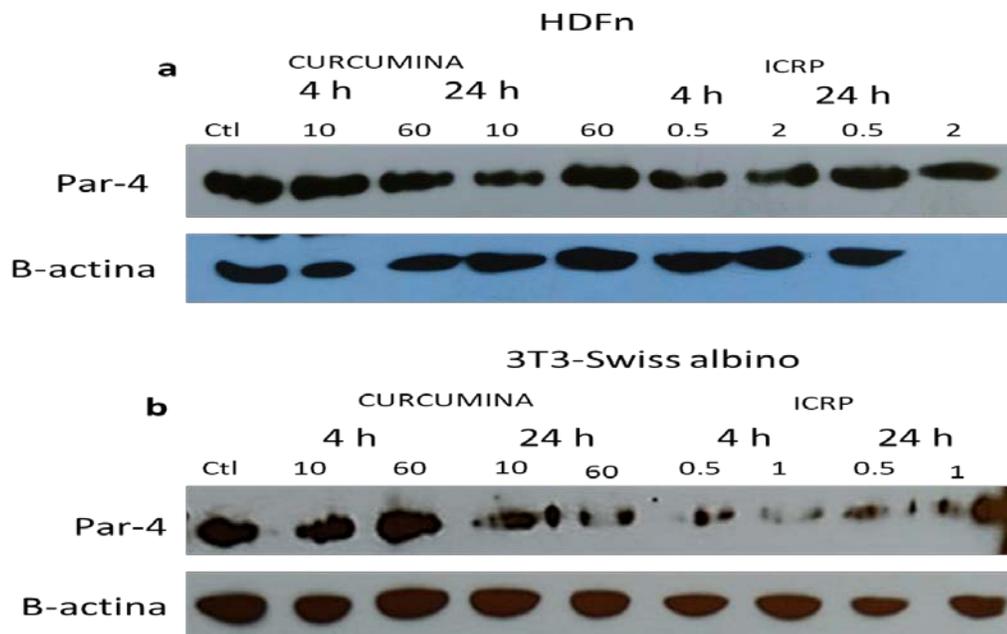


Figura 14. Modulación de la proteína Par-4. Las líneas celulares (a) HDFn y (b) 3T3-Swiss albino se sometieron a tratamiento con curcumina e IMMUNEPOTENT CRP en dos concentraciones por 4h y 24h. El análisis de la modulación de la proteína se realizó mediante Western blot.

8.5 Análisis de la expresión de Par-4 soluble en medio condicionado de fibroblastos tratados con Curcumina e IMMUNEPOTENT CRP

Para determinar si la curcumina e IMMUNEPOTENT CRP tenían la capacidad de inducir la secreción de la proteína Par-4, se evaluó la expresión de par-4 en medio condicionado de fibroblastos después del tratamiento con diferentes dosis y tiempos de Curcumina e IMMUNEPOTENT CRP. Los resultados mostraron la presencia de Par-4 soluble en medios de cultivo y un incremento en la expresión de Par-4 después de las 4 h de tratamiento con Curcumina, así como con IMMUNEPOTENT CRP en comparación con el control, y a las 24 h después del tratamiento, la curcumina al parecer es un mejor inductor de la secreción de Par-4, como se observa en la figura 15 a. La expresión se puede apreciar mejor en el análisis densitométrico del Western blot como se muestra en la figura 15 b.

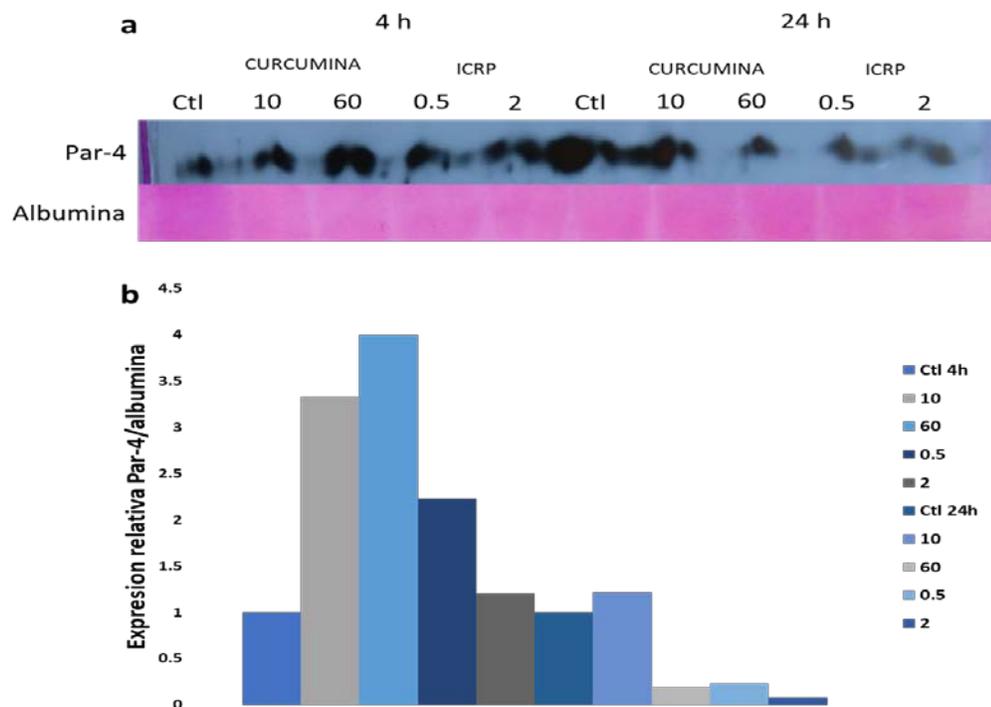


Figura 15. Expresión de la proteína Par-4 en medio condicionado. La línea celular HDFn se sometió a tratamiento con curcumina e IMMUNEPOTENT CRP en dos concentraciones por 4h y 24h, después se recolecto el medio condicionado. El análisis de la expresión de la proteína se realizó mediante Western blot. **a)** Análisis de Western blot de medio condicionado. **b)** Análisis desitométrico de las bandas del Wb.

8.6 Análisis del incremento de la concentración de Par-4 soluble en plasma de ratones tratados con Curcumina e IMMUNEPOTENT CRP

Para determinar si la Curcumina e IMMUNEPOTENT CRP tienen la capacidad de incrementar la expresión de la proteína Par-4 soluble sistémica en ratones y analizar si dicha proteína tenía la capacidad de inducir muerte en células cancerígenas, se administró Curcumina (100 mg/kg) e IMMUNEPOTENT CRP (5 U en 200 μ L) vía intraperitoneal a ratones BALB/c de 5 semanas de edad, 24 h después se recolectó el plasma y se inactivo el complemento a 56°C por 30 minutos, la expresión de la proteína Par-4 se analizó mediante western blot (figura 16 a) donde se observó un incremento en la expresión de la proteína después del tratamiento en comparación con el control, sin embargo, se observó un mayor incremento en el plasma de ratones tratados con IMMUNEPOTENT CRP en comparación al plasma de ratones tratados con Curcumina, esto se puede observar mejor en el análisis densitométrico del Western blot, donde se muestra un mayor incremento de la proteína en plasma de ratones tratados con IMMUNEPOTENT CRP (figura 16 b).

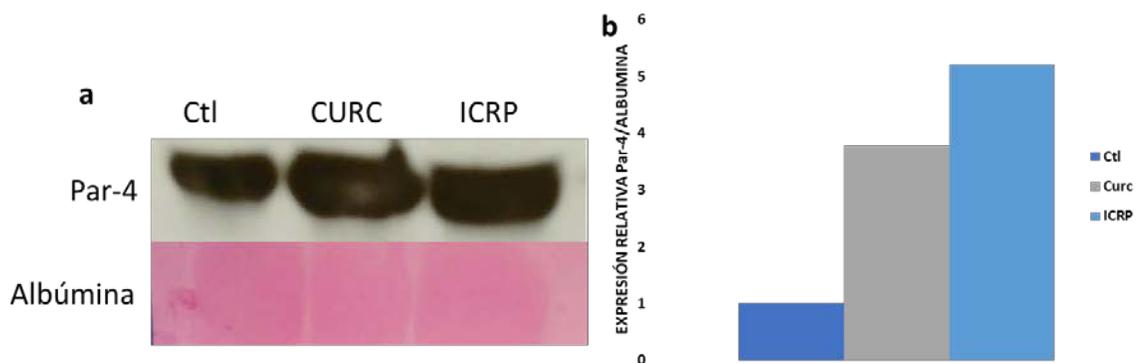


Figura 16. Modulación de la proteína Par-4 soluble en ratones. Ratones BALB/c se inocularon con Curcumina e IMMUNEPOTENT CRP en una concentración de 100 mg/kg y 5 U en 200 μ L de agua inyectable respectivamente vía intraperitoneal. Después de 24 h se recolectó el plasma. El análisis se llevó a cabo mediante la técnica de western blot. (a) Western blot de la modulación de Par-4, (b) análisis densitométrico del Western blot.

8.7 Análisis del efecto del plasma de ratones tratados con Curcumina e IMMUNEPOTENT CRP en la viabilidad de células de cáncer de mama

Para evaluar el efecto del plasma de ratones tratados con Curcumina e IMMUNEPOTENT CRP sobre la viabilidad de células de cáncer de mama (MCF-7, MDA-MB-231 y SKBR3), las células de cáncer de mama se incubaron en medio que contenía 10% y 20% de plasma y se evaluó mediante MTT. En la línea MCF-7 se observó que la viabilidad de las células incubadas con el plasma de ratones tratados con IMMUNEPOTENT CRP en una concentración de 20% disminuye significativamente ($p=0.003$) en comparación con control. Por otro lado, el plasma de ratones tratados con Curcumina estimulo la proliferación celular, incrementando su viabilidad. En el grupo de células tratadas con 10% de plasma, no se observó una disminución significativa en la viabilidad con respecto al control como se observa en la figura 17 a. Este fenómeno se repitió en las líneas MDA-MB-231 y SKBR3, donde se observó que solo las células tratadas con plasma de ratones tratados con IMMUNEPOTENT CRP disminuyó su viabilidad significativamente ($p=0.0001$ y $p=0.0001$ respectivamente) mientras que en los grupos tratados con 10% de plasma no se observó diferencia significativa en comparación con el control (figura 17 b y 17 c). EL grupo con DMSO se metió como control debido a que se usó para disolver la Curcumina. La viabilidad se analizó mediante el ensayo de MTT.

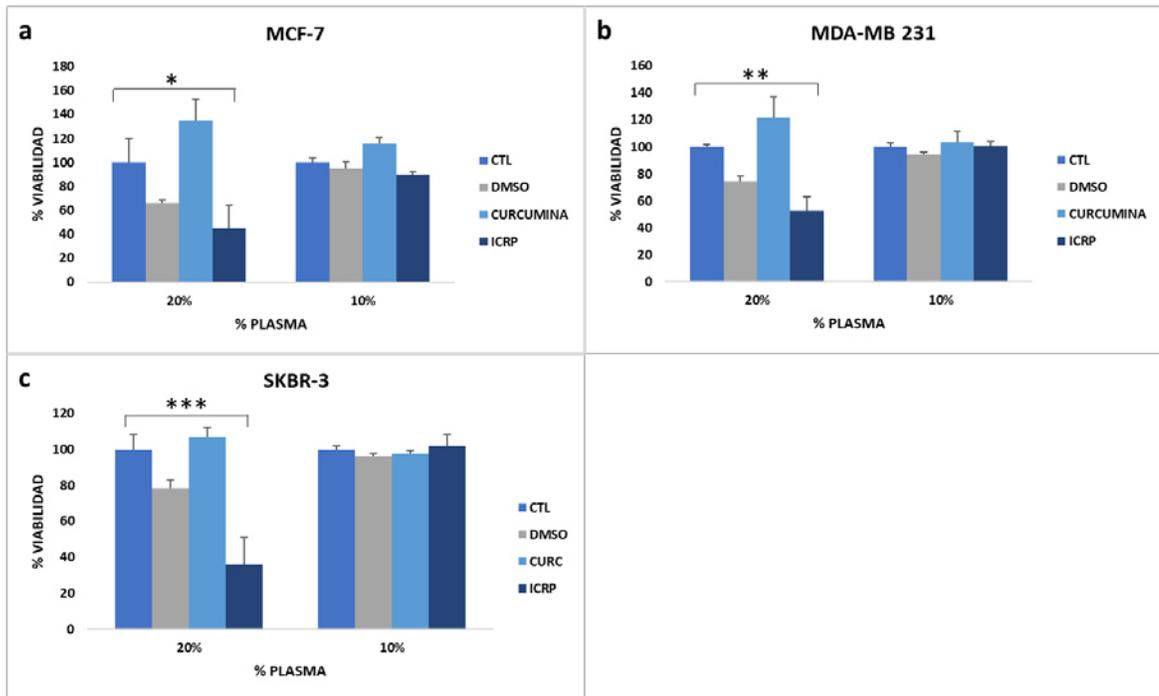


Figura 17. Análisis de la viabilidad de células de cáncer de mama expuestas a plasma de ratones tratados con Curcumina e IMMUNEPOTENT CRP. El plasma de ratones tratados con Curcumina e IMMUNEPOTENT CRP, se expuso a células de cáncer de mama en una concentración de 10% y 20% durante 24 h. Se observó una disminución significativa en el grupo tratado con plasma con IMMUNEPOTENT CRP en todas las líneas celulares en comparación con el control. Los grupos de ratones sin tratar y tratados con DMSO se usaron como control. La viabilidad se determinó mediante el ensayo de MTT. *** = $p \leq 0.001$, ** = $p \leq 0.01$, * = $p \leq 0.05$

Posterior a esto, para determinar que el efecto en la disminución de la viabilidad observado anteriormente era por la proteína Par-4, la línea MCF-7 se incubó en medio que contenía 20% de plasma de ratones tratados con IMMUNEPOTENT CRP solo y en combinación con el anticuerpo anti-Par-4, cabe resaltar que la mezcla del plasma con el anticuerpo se hizo media hora antes de incubar con las células para dar tiempo a que se llevara a cabo la neutralización de la proteína. La viabilidad celular se evaluó mediante el ensayo de MTT. En los resultados se observó un incremento en la viabilidad de las células que fueron incubadas con la mezcla de plasma-anti-Par-4 en comparación con las células que se expusieron solo al plasma como se observa en la figura 18 a. EL efecto también se observó en la morfología de las células, donde en el tratamiento con el plasma-anti-Par-4 se observó una disminución en la pérdida de la morfología celular en comparación con las células expuestas solo a plasma como lo muestra la figura 18 b.

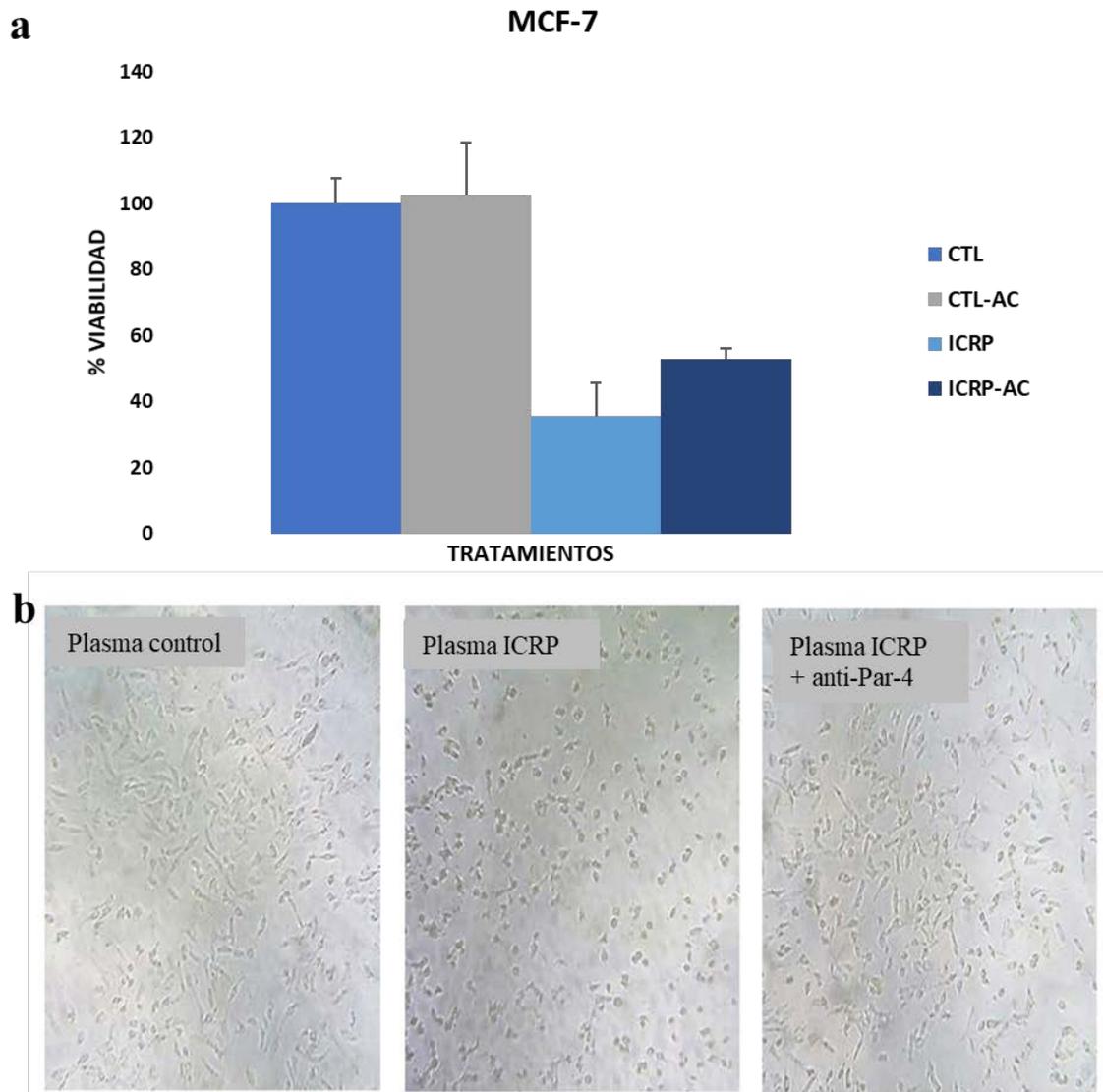


Figura 18. Análisis de la viabilidad de células MCF-7 expuestas a plasma de ratones tratados con IMMUNEPOTENT CRP y anti-Par-4. (a) El plasma de ratones tratados con IMMUNEPOTENT CRP, se expuso a células MCF-7 en una concentración de 20% solo y en combinación con anti-Par-4 durante 24 h y. **(b)** Efecto en la morfología de células expuestas a 20% de plasma y plasma/ac. La viabilidad se determinó mediante el ensayo de MTT.

8.8 Quimiosensibilización de células de cáncer de mama vía Par-4

Para determinar si la proteína Par-4 secretada por IMMUNEPOTENT CRP era capaz de quimiosensibilizar a las células de cáncer de mama (MCF-7), las células se expusieron a plasma de ratones tratados con IMMUNEPOTENT CRP solo y en combinación con cisplatino y se analizó mediante MTT. La figura 19 a muestra la viabilidad de las células expuestas a 5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ y 10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de cisplatino. Los resultados mostraron que hay una disminución en la viabilidad celular en los grupos que se expusieron a la combinación de plasma-cisplatino, siendo más evidente la disminución en el grupo que contenía 10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de cisplatino en comparación con el control como se observa en la figura 19 b.

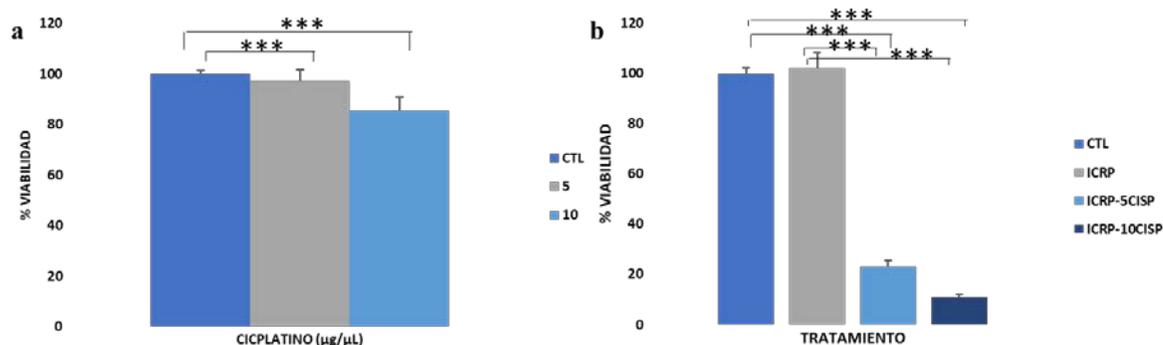


Figura 19. Análisis de la viabilidad de células MCF-7 expuestas a plasma de ratones tratados con IMMUNEPOTENT CRP y Cisplatino. (a) Las células MCF-7 se expusieron a 5 y 10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ por 24 h y se analizó la viabilidad. (b) El plasma de ratones tratados con IMMUNEPOTENT CRP, se expuso a células de cáncer de mama en una concentración de 10% solo y en combinación con Cisplatino durante 24 h. Se observó una reducción significativa en los tratamientos con IMMUNEPOTENT CRP-cisplatino en comparación con el control. Los grupos de ratones sin tratar y tratados con DMSO se usaron como control. La viabilidad se determinó mediante el ensayo de MTT. ***= $P \leq 0.0001$

9. DISCUSIÓN

El cáncer de mama es la causa más frecuente de muerte en mujeres a nivel mundial debido a que presenta alta propensión a la recurrencia. El gen Par-4 ha sido propuesto como un regulador negativo de la recurrencia del cáncer de mama (Álvarez et al., 2008), la disminución en la expresión de la proteína Par-4 es asociada a un pobre pronóstico de los pacientes y a un a pobre respuesta a la quimioterapia neoadyuvante, así como a un alto riesgo de recaída de los pacientes, por lo que es importante buscar estrategias que permitan inducir la expresión de Par-4 en pacientes con pobre pronóstico. Burikhanov et al., 2017 han propuesto a la CQ como un excelente inductor de Par-4 soluble en células de fibroblastos normales con acción específica en células cancerígenas. En este trabajo nosotros analizamos a la Curcumina y el IMMUNEPOTENT CRP como inductores de la expresión y secreción de Par-4 y su acción sobre células de cáncer de mama con diferente estatus hormonal. Se ha observado que células de próstata y cáncer de mama con un estatus hormonal positivo responden mejor al estímulo apoptótico inducido por Par-4. En este trabajo analizamos la expresión basal de las líneas celulares MCF-7, MDA-MB-231 y SKBR3 encontrándose una mayor expresión en las líneas celular MDA-MB-231 (triple negativo) y SKBRE (RE negativo, Her2/neu positivo) y una menor expresión en las células MCF-7 (RE positivo). Por otra parte, De Bessa García et al., 2010 reportaron una mayor expresión de Par-4 en células MCF-7 en comparación con las células MDA-MB-231, mientras que Cahalin et al., 2012 reportó una mayor expresión de Par-4 en MCF-7 comparado con las células SKBR3. Estos resultados difieren con nuestros resultados, ya que nosotros encontramos una expresión basal de Par-4 en MCF-7 significativamente menor en comparación con las células MDA-MB-231 y SKBR3, posiblemente debido a que las condiciones de cultivo no son las mismas ya que ellos usaron medio RPMI y nosotros DMEM /F12.

La expresión exógena de Par-4 reduce la proliferación de la línea celular MCF-7 mientras que el knockout de Par-4 con un RNAi induce un aumento en la proliferación celular, así como en la expresión de BCL-2 y reduce la expresión de BID sin alterar el ciclo celular (Pereira MC et al., 2013).

En el análisis de viabilidad de las líneas celulares de cáncer de mama tratadas con Curcumina se observó una mayor sensibilidad en las MCF-7 en comparación a las MDA-MB-231 y SKBR3, esto concuerda con lo reportado por Shao et al., 2002, donde observaron una mayor sensibilidad en las MCF-7 y lo relacionaron con la sensibilidad a estrógenos, ya que sugieren que la curcumina actúa a través del RE. Sin embargo, este mecanismo no es el mismo para las otras dos líneas celulares que son RE negativo. Se ha reportado que la Curcumina afecta preferentemente células cancerígenas y no células normales (Syng-Ai C et al., 2004), sin embargo en este trabajo los cultivos de fibroblastos se observó una mayor sensibilidad de la Curcumina en células HDFn, que en las células cancerígenas, sin embargo algunos estudios han reportado que la Curcumina induce apoptosis en las células HDF en altas concentraciones y esta puede ser reducida con una coadministración de antioxidantes (Scharstuhl A. et al., 2009; Mangalathillam S et al., 2012), además Kuttan R et al., 1985 observó citotoxicidad de Curcumina frente a una línea celular de macrófagos murinos y células renales humanas .

Estudios previos han demostrado que el IMMUNEPOTENT CRP induce muerte celular en una variedad de células cancerígenas como MCF-7, (Mendoza-Gamboa E et al., 2008) K562, (Sierra-Rivera CA et al., 2016) y HeLa (Martínez-Torres et al., 2018) mediada por ROS e independiente de caspasas (Martínez-Torres). En nuestros resultados observamos una disminución en la viabilidad celular de una manera dependiente de la dosis y el tiempo en la línea celular MCF-7 como ha sido reportado por el Dr. Franco Molina, en su trabajo observaron una CI_{50} de 0.06 U/mL en células MCF-7 tratadas con IMMUNEPOTENT CRP en un periodo de incubación de 72 h, mientras que nuestros resultados fue 1.42 U/mL en 24 h. Martínez-Torres et al., 2018 también reporta un efecto dependiente de dosis y tiempo en células Hela incubadas con IMMUNEPOTENT CRP, sin embargo, en nuestros resultados con el resto de las líneas celulares (MDA-MB-231, SKBR3, HDFn y 3T3-Swiss albino) observamos un efecto dependiente de dosis, pero no dependiente del tiempo.

La Curcumina y el IMMUNEPOTENT CRP incrementaron la expresión de la proteína Par-4 las líneas celulares HDFn y 3T3-Swiss albino comparado con las células no

tratadas, Thayyullathil et al., 2014 observaron que la Curcumina induce una activación de Par-4 dependiente ROS conduciendo a autofagia en células de glioma maligno humano, U87MG y U118MG (Thayyullathil F et al., 2014),

La exposición breve a agentes inductores de estrés del retículo endoplásmico aumentó aún más la secreción celular de Par-4 por una vía sensible a brefeldin-A. La secreción se produjo independientemente de la activación de la caspasa y la apoptosis (Burikhanov R et al., 2009). La secreción normal de la proteína Par-4 soluble es muy baja para causar una apoptosis masiva, sin embargo compuestos de la familia heterocíclicas inducen secreción de la proteína dentro de los principales compuestos secretagogos se encuentra el Arylquins 1 (Burikhanov R et al., 2014), en el 2017 Burikhanov et al., observaron que líneas celulares normales de humano y de ratón (MEF, PrSCs, PrECs, HEL y HBEC), se incrementó la expresión de Par-4 con una serie de fármacos que contenían el farmacóforo de quinolina o quinolona. En este trabajo se observó Curcumina e IMMUNEPOTENT CRP también indujeron la secreción de la proteína Par-4 en la línea celular HDFn, es posible que compuestos que induzcan un estrés del retículo endoplásmico tiene la capacidad de inducir secreción de Par-4 como lo son la Curcumina y el IMMUNEPOTENT CRP.

En base a los estudios de Burikhanov et al., 2017 donde demuestra que algunos secretagogos son capaces de inducir la secreción de par-4 en células normales en cultivo celular y en ratones en forma sistémica nosotros tratamos ratones BALB/c tratados con Curcumina e IMMUNEPOTENT CRP y observamos un incremento en la expresión de la proteína Par-4 en plasma comparado con los ratones control, y observamos que el plasma de ratones tratados con IMMUNEPOTENT CRP indujo una disminución en la viabilidad en las líneas celulares de cáncer de mama MCF-7, MDA-MB-231 Y SKBR3, comparados con los controles, y el plasma de los ratones tratados con el IMMUNEPOTENT CRP bloqueado previamente con 50 µg/mL de anticuerpo anti-PAR-4, indicando que el IMMUNEPOTENT CRP puede funcionar como secretagogo de Par-4 y funcionar como un excelente quimiosensibilizante en pacientes con cáncer.

10.CONCLUSIONES

- 1.-** Las células de cáncer de mama (MCF-7, MDA-MB-231 y SKBR3) y fibroblastos (HDFn y 3T3-Swiss albino) presentaron diferente expresión basal de la proteína Par-4.
- 2.-** El IMMUNEPOTENT CRP presenta efectos dependientes de concentración y no de tiempo en las líneas celulares de cáncer de mama y fibroblastos, excepto en células MCF-7.
- 3.-** Curcumina e ICRP incrementan la expresión y secreción de la proteína Par-4 en HDFn y 3T3-Swiss albino.
- 4.-** Curcumina e ICRP inducen la secreción sistémica de la proteína Par-4 en ratones
- 5.-** La proteína Par-4 secretada por ICRP tiene la capacidad de inducir muerte celular en líneas celulares de cáncer de mama.
- 6.-** La proteína Par-4 presente en el plasma de ratones tratados con ICRP es capaz de quimiosensibilizar a las células de cáncer de mama MCF-7.

11.BIBLIOGRAFÍA

Aggarwal, B. B., Gupta, S. C., & Sung, B. (2013). Curcumin: an orally bioavailable blocker of TNF and other inflammatory biomarkers. *British journal of pharmacology*, 169(8), 1672-1692.

American Cancer Society: Cancer Facts and Figures 2018. Atlanta, Ga: American Cancer Society, 2018. Available online. Notificación de salida. Last accessed January 5, 2018.

Barkett, M., & Gilmore, T. D. (1999). Control of apoptosis by Rel/NF- κ B transcription factors. *Oncogene*, 18(49), 6910.

Bovine dialyzable leukocyte extract modulates AP-1 DNA-binding activity and nuclear transcription factor expression in MCF-7 breast cancer cells. *Cytotherapy*

Brasseur, K., Fabi, F., Adam, P., Parent, S., Lessard, L., & Asselin, E. (2016). Post-translational regulation of the cleaved fragment of Par-4 in ovarian and endometrial cancer cells. *Oncotarget*, 7(24), 36971.

Breastcancer.org. (2012). Tipos de cáncer de mama. CLIS. Recuperado el 3 de septiembre de 2015, de: <http://www.breastcancer.org/es/sintomas/tipos/clis>

Burikhanov, R., Hebbar, N., Noothi, S. K., Shukla, N., Sledziona, J., Araujo, N., ... & Maranchie, J. (2017). Chloroquine-Inducible Par-4 Secretion Is Essential for Tumor Cell Apoptosis and Inhibition of Metastasis. *Cell Reports*, 18(2), 508-519.

Burikhanov, R., Sviripa, V. M., Hebbar, N., Zhang, W., Layton, W. J., Hamza, A., ... & Rangnekar, V. M. (2014). Arylquins target vimentin to trigger Par-4 secretion for tumor cell apoptosis. *Nature chemical biology*, 10(11), 924.

Burikhanov, R., Zhao, Y., Goswami, A., Qiu, S., Schwarze, S. R., & Rangnekar, V. M. (2009). The tumor suppressor Par-4 activates an extrinsic pathway for apoptosis. *Cell*, 138(2), 377-388.

Cahalin, A., Bolger, J. C., Walsh, C. A., McCartan, D., McIlroy, M., Hill, A. D. K., & Young, L. S. (2012, September). PAR-4: A Novel Marker of Luminal A Breast Cancer is Down-Regulated by SRC-1 and HOXC11. In *IRISH JOURNAL OF MEDICAL SCIENCE* (Vol. 181, pp. S162-S162). 236 GRAYS INN RD, 6TH FLOOR, LONDON WC1X 8HL, ENGLAND: SPRINGER LONDON LTD.

Cancer Genome Atlas Network. (2012). Comprehensive molecular portraits of human breast tumors. *Nature*, 490(7418), 61.

Castellanos, S. H., Balboa, P. G., Calderón, I. L. T., Casas, M. Á. O., & Lamadrid, J. V. (2009, January). Cáncer de mama. In *Anales de Radiología México* (Vol. 1, pp. 117-126).

Coronado-Cerda, E. E., Franco-Molina, M. A., Mendoza-Gamboa, E., Prado-García, H., Rivera-Morales, L. G., Zapata-Benavides, P., ... & Rodríguez-Padilla, C. (2016). In Vivo

Chemoprotective activity of bovine dialyzable leukocyte extract in mouse bone marrow cells against damage induced by 5-fluorouracil. *Journal of immunology research*, 2016.

de Bessa Garcia, S. A., Pereira, M. C., & Nagai, M. A. (2011). Expression pattern of the pro-apoptotic gene PAR-4 during the morphogenesis of MCF-10A human mammary epithelial cells. *Cancer Microenvironment*, 4(1), 33-38.

Depowski, P. L., Rosenthal, S. I., & Ross, J. S. (2001). Loss of expression of the PTEN gene protein product is associated with poor outcome in breast cancer. *Modern Pathology*, 14(7), 672-676.

Franco-Molina, M. A., Mendoza-Gamboa, E., Miranda-Hernández, D., Zapata-Benavides, P., Castillo-León, L., Isaza-Brando, C., ... & Rodríguez-Padilla, C. (2006). In vitro effects of bovine dialyzable leukocyte extract (bDLE) in cancer cells. *Cytotherapy*, 8(4), 408-414.

Franco-Molina, M. A., Mendoza-Gamboa, E., Zapata-Benavides, P., Castillo-Tello, P., Isaza-Brando, C. E., Zamora-Avila, D., ... & Tamez-Guerra, R. S. (2010). Antiangiogenic and antitumor effects of IMMUNEPOTENT CRP in murine melanoma. *Immunopharmacology and immunotoxicology*, 32(4), 637-646.

Franco-Molina, M. A., Mendoza-Gamboa, E., Zapata-Benavides, P., Vera-García, M. E., Castillo-Tello, P., de la Fuente, A. G., ... & Rodríguez-Padilla, C. (2008). IMMUNEPOTENT CRP (bovine dialyzable leukocyte extract) adjuvant immunotherapy: a phase I study in non-small cell lung cancer patients. *Cytotherapy*, 10(5), 490-496.

Han, S. S., Chung, S. T., Robertson, D. A., Ranjan, D., & Bondada, S. (1999). Curcumin causes the growth arrest and apoptosis of B cell lymphoma by downregulation of egr-1, c-myc, bcl-X L, NF- κ B, and p53. *Clinical immunology*, 93(2), 152-161.

Hebbar, N., Shrestha-Bhattarai, T., & Rangnekar, V. M. (2013). Par-4 prevents breast cancer recurrence. *Breast Cancer Research*, 15(5), 314.

<http://www.inegi.org.mx/saladeprensa/aproposito/2015/mama0.pdf>

IMSS.gob.mx. Tratamiento del cáncer de mama.
<http://www.imss.gob.mx/sites/all/statics/guiasclinicas/232GER.pdf>

Irigoyen, A., Vicente García, F., Córdoba Iturriagaitia, A., Ibáñez Beroiz, B., Santamaría Martínez, M., & Guillén Grima, F. (2011, August). Subtipos moleculares del cáncer de mama: implicaciones pronósticas y características clínicas e inmunohistoquímicas. In *Anales del Sistema Sanitario de Navarra* (Vol. 34, No. 2, pp. 219-233). Gobierno de Navarra. Departamento de Salud.

Kan, Z., Jaiswal, B. S., Stinson, J., Janakiraman, V., Bhatt, D., Stern, H. M., ... & Moorhead, M. (2010). Diverse somatic mutation patterns and pathway alterations in human cancers. *Nature*, 466(7308), 869-873.

Kiuchi F, Goto Y, Sugimoto N. 1993. Nematocidal activity of turmeric: synergistic action of curcuminoids. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*; 41:1640–3.

Kuttan, R., Bhanumathy, P., Nirmala, K., & George, M. C. (1985). Potential anticancer activity of turmeric (*Curcuma longa*). *Cancer letters*, 29(2), 197-202.

Lara, H. H., Ixtepan-Turrent, L., Garza-Treviño, E. N., Tamez-Guerra, R., & Rodriguez-Padilla, C. (2010). Clinical and immunological assessment in breast cancer patients receiving anticancer therapy and bovine dialyzable leukocyte extract as an adjuvant. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 1(3), 425-431.

Leal, N. F. B. D. S., Oliveira, H. F. D., & Carrara, H. H. A. (2016). Supervised physical therapy in women treated with radiotherapy for breast cancer. *Revista Latino-Americana de Enfermagem*, 24.

Lee, A. S. (2007). GRP78 induction in cancer: therapeutic and prognostic implications. *Cancer research*, 67(8), 3496-3499.

Lesueur, F., Song, H., Ahmed, S., Luccarini, C., Jordan, C., Luben, R., ... & Ponder, B. A. J. (2006). Single-nucleotide polymorphisms in the RB1 gene and association with breast cancer in the British population. *British journal of cancer*, 94(12), 1921-1926.

Lo, P. K., Wolfson, B., & Zhou, Q. (2016). Cancer stem cells and early stage basal-like breast cancer. *World J Obstet Gynecol*, 5(2), 150-161.

Lv, Z. D., Liu, X. P., Zhao, W. J., Dong, Q., Li, F. N., Wang, H. B., & Kong, B. (2014). Curcumin induces apoptosis in breast cancer cells and inhibits tumor growth in vitro and in vivo. *Int J Clin Exp Pathol*, 7(6), 2818-2824.

Mangalathillam, S., Rejinold, N. S., Nair, A., Lakshmanan, V. K., Nair, S. V., & Jayakumar, R. (2012). Curcumin loaded chitin nanogels for skin cancer treatment via the transdermal route. *Nanoscale*, 4(1), 239-250.

Martínez-Torres, A. C., Reyes-Ruiz, A., Benítez-Londoño, M., Franco-Molina, M. A., & Rodríguez-Padilla, C. (2018). IMMUNEPOTENT CRP induces cell cycle arrest and caspase-independent regulated cell death in HeLa cells through reactive oxygen species production. *BMC cancer*, 18(1), 13.

Milobedeska J, Kostanecki V, Lampe V. 1910. Structure of curcumin. *Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft*; 43:2163–2170. 11

Ortiz, M., Lafuente-Sanchis, A., Cuevas, J. M., & Zúñiga, Á. (2016). Prevalencia mutacional de los genes BRCA1 y BRCA2 en pacientes con cáncer de mama y ovario atendidos en el Área de Salud de La Ribera (Comunidad Valenciana, España). *Revista Española de Patología*, 49(4), 214-218.

Pereira, M. C., de Bessa-Garcia, S. A., Burikhanov, R., Pavanelli, A. C., Antunes, L., Rangnekar, V. M., & Nagai, M. A. (2013). Prostate apoptosis response-4 is involved in the apoptosis response to docetaxel in MCF-7 breast cancer cells. *International journal of oncology*, 43(2), 531-538.

Pérez-Solis, M. A., Maya-Nuñez, G., Casas-González, P., Olivares, A., & Aguilar-Rojas, A. (2016). Effects of the lifestyle habits in breast cancer transcriptional regulation. *Cancer cell international*, 16(1), 7.

Qinan, W., Ling, Z., & Bing, C. (2014). PAR-4: a possible new target for age-related disease. *Expert opinion on therapeutic targets*, 18(8), 917-927.

QiNan, W., XiaGuang, G., XiaoTian, L., WuQuan, D., Ling, Z., & Bing, C. (2016). Par-4/NF- κ B mediates the apoptosis of islet β cells induced by glucolipotoxicity. *Journal of Diabetes Research*, 2016.

Ramachandran, C., & You, W. (1999). Differential sensitivity of human mammary epithelial and breast carcinoma cell lines to curcumin. *Breast cancer research and treatment*, 54(3), 269-278.

Ravindran, J., Prasad, S., & Aggarwal, B. B. 2009. Curcumin and Cancer Cells: How Many Ways Can Curry Kill Tumor Cells Selectively? *The AAPS Journal*, 11(3), 495–510.

Rodríguez-Salazar, M. D. C., Franco-Molina, M. A., Mendoza-Gamboa, E., Martínez-Torres, A. C., Zapata-Benavides, P., López-González, J. S., ... & Rodríguez-Padilla, C. (2017). The novel immunomodulator IMMUNEPOTENT CRP combined with chemotherapy agent increased the rate of immunogenic cell death and prevented melanoma growth. *Oncology letters*, 14(1), 844-852.

Sant'Ana, R. S. D., Mattos, J. S. D. C., Silva, A. S. D., Mello, L. M. D., & Nunes, A. A. (2016). Associated factors with mammographic changes in women undergoing breast cancer screening. *Einstein (São Paulo)*, 14(3), 324-329.

Sarkar, S., Jain, S., Rai, V., Sahoo, D. K., Raha, S., Suklabaidya, S., ... & Dey, N. (2015). Plant-derived SAC domain of PAR-4 (Prostate Apoptosis Response 4) exhibits growth inhibitory effects in prostate cancer cells. *Frontiers in plant science*, 6.

Scharstuhl, A., Mutsaers, H. A. M., Pennings, S. W. C., Szarek, W. A., Russel, F. G. M., & Wagener, F. A. D. T. G. (2009). Curcumin-induced fibroblast apoptosis and in vitro wound contraction are regulated by antioxidants and heme oxygenase: implications for scar formation. *Journal of cellular and molecular medicine*, 13(4), 712-725.

Seibert K, Masferrer JL. 1994. Role of inducible cyclooxygenase (COX-2) in inflammation. *Receptor*; 4:17–23.

Sells, S. F., Wood, D. P., Joshi-Barve, S. S., Muthukumar, S., Jacob, R. J., Crist, S. A., ... & Rangnekar, V. M. (1994). Commonality of the gene programs induced by effectors of apoptosis in androgen-dependent and-independent prostate cells. *Cell Growth and Differentiation*, 5, 457-457.

Sheng, J. F., Chen, W., Yu, Y., Liu, J., & Tao, Z. Z. (2010). PAR-4 and hTERT expression are negatively correlated after RNA interference targeting hTERT in laryngocarcinoma cells. *Tissue and Cell*, 42(6), 365-369.

Shrestha-Bhattarai, T., & Rangnekar, V. M. (2010). Cancer-selective apoptotic effects of extracellular and intracellular Par-4. *Oncogene*, 29(27), 3873.

Sierra-Rivera, C. A., Franco-Molina, M. A., Mendoza-Gamboa, E., Zapata-Benavides, P., Santaolalla-Tapia, J., Coronado-Cerda, E. E., ... & Rodríguez-Padilla, C. (2016). Effect of bovine dialyzable leukocyte extract on induction of cell differentiation and death in K562 human chronic myelogenous leukemia cells. *Oncology letters*, 12(6), 4449-4460.

Sifuentes-Alvarez, A., Castaneda-Martinez, L. Y., Lugo-Nevares, M., & Reyes-Romero, M. A. (2015). Risk factors associated with breast cancer women's in Durango, Mexico. *Ginecología y obstetricia de México*, 83(11), 662.

Subbaramaiah K, Dannenberg AJ. 2003. Cyclooxygenase 2: a molecular target for cancer prevention and treatment. *Trends Pharmacol Sci*; 24:96–102.

Sviripa, V. M., Burikhanov, R., Obiero, J. M., Yuan, Y., Nickell, J. R., Dwoskin, L. P., ... & Watt, D. S. (2016). Par-4 secretion: stoichiometry of 3-arylquinoline binding to vimentin. *Organic & biomolecular chemistry*, 14(1), 74-84.

Syng-ai, C., Kumari, A. L., & Khar, A. (2004). Effect of curcumin on normal and tumor cells: role of glutathione and bcl-2. *Molecular Cancer Therapeutics*, 3(9), 1101-1108.

Thayyullathil F, Rahman A, Pallichankandy S, Patel M, Galadari S. ROS-dependent prostate apoptosis response-4 (Par-4) up-regulation and ceramide generation are the prime signaling events associated with curcumin-induced autophagic cell death in human malignant glioma. *FEBS Open Bio*. 2014 Aug 30; 4:763-76.

Usary, J., Llaca, V., Karaca, G., Presswala, S., Karaca, M., He, X., ... & Lønning, P. E. (2004). Mutation of GATA3 in human breast tumors. *Oncogene*, 23(46), 7669-7678.

Walerych, D., Napoli, M., Collavin, L., & Del Sal, G. (2012). The rebel angel: mutant p53 as the driving oncogene in breast cancer. *Carcinogenesis*, 33(11), 2007-2017.

Yoysungnoen P, Wirachwong P, Bhattarakosol P. 2006. Effects of curcumin on tumor angiogenesis and biomarkers, COX-2 and VEGF, in hepatocellular carcinoma cell-implanted nude mice. *Clin Hemorheol Microcirc*; 34:109–15.

Zepeda-Castilla, E. J., Recinos-Money, E., Cuéllar-Hubbe, M., Robles-Vidal, C. D., & Maafs-Molina, E. (2008). Clasificación molecular del cáncer de mama. *Cirugía y Cirujanos*, 76(1).

Zhao, Y., & Rangnekar, V. M. (2008). Apoptosis and tumor resistance conferred by Par-4. *Cancer biology & therapy*, 7(12), 1867-1874.

Zhou, L., Chen, B., Hua, X., Zhou, P., Guo, L., Peng, Y., & Qiu, K. (2013). Effect of newly identified hTERT-interacting proteins on telomerase activity. *Acta Biochim Biophys Sin*, 45(8), 674-682.

12.RESUMEN BIOGRÁFICO

Norma Cesilia Arellano Rodríguez

Candidata para obtener el grado de:

Maestro en Ciencias con orientación en Inmunobiología.

Tesis: LA CURCUMINA E IMMUNEPOTENT CRP INDUCEN LA SECRECIÓN DE PAR-4 EN FIBROBLASTOS Y RATONES, CON EFECTO CITOTÓXICO EN LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER DE MAMA

Área de estudio: ciencias de la salud

Datos personales: Nacida en Fresnillo Zacatecas en abril de 1991, hija de la Sra. Gumara Rodríguez Esquivel y el Sr. Rogaciano Arellano Hernández.

Educación: Egresada de la Universidad Autónoma de Zacatecas, grado obtenido Químico Farmacéutico Biólogo en 2017.