

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



MODULACIÓN DE PAR-4 Y WT1 POR CURCUMINA
EN CÉLULAS DE CÁNCER

POR

LILIA TERESA RODRÍGUEZ RANGEL

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

2023

**MODULACIÓN DE PAR-4 Y WT1 POR CURCUMINA
EN CÉLULAS DE CÁNCER**

Comité de Tesis



Dr. Pablo Zapata Benavides

Presidente



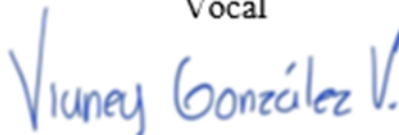
Dr. Moisés Franco Molina

Secretario



Dr. José Manuel Vázquez Guillén

Vocal




Dra. Vianey González Villasana

Vocal



Dr. Santiago Saavedra Alonso

Vocal



Dra. Katiushka Arevalo

Subdirectora de Posgrado

DERECHOS RESERVADOS©

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta Tesis está protegido, el uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material contenido que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde se obtuvo mencionando al autor o autores.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico recibido para poder realizar mis estudios (Número de beca 759491, No. CVU: 617335).

Al Laboratorio de Inmunología y Virología de la Facultad de Ciencias Biológicas (FCB) de la Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL), por proveer el apoyo financiero y de la infraestructura requeridos para llevar a cabo este trabajo.

Al Dr. Pablo Zapata Benavides, por darme la oportunidad de formar parte de su equipo de trabajo, por siempre estar dispuesto a dar tiempo extra en beneficio de la Investigación, por su disposición para resolver mis dudas y por ser un gran ejemplo profesional.

Al Dr. Santiago Saavedra Alonso por el apoyo brindado para la realización de este trabajo, durante mi periodo como estudiante dentro del L5 - Laboratorio de Biología Molecular del Cáncer.

A mis Profesores con vocación de enseñanza y un excelente desempeño docente.

A mis compañeros del laboratorio, Óscar, Norma Cesilia, Juan Manuel y Gerardo por el conocimiento que me han compartido y el apoyo brindado.

DEDICATORIA

Al Gran Arquitecto del Universo.

A mi Padre por ser ejemplo de superación constante y mi fuente de inspiración, le dedico este trabajo especialmente a él, quien falleció debido a cáncer de pulmón.

A mis Padres Hugo Neptalí Rodríguez Correa y Ma. Teresa Rangel Jaramillo por ser mi guía y ejemplo de vida, por su amor incondicional que trasciende los límites de la vida terrenal.

A mi Compañero de vida, Amancio Hernández Domínguez, por su amor, por ser una columna de apoyo y estabilidad, y siempre impulsarme para alcanzar mis metas.

A mis tíos Jorge Martínez Cedillo (+) y Rosa Lilia Rangel Jaramillo por ser parte muy importante de mi vida.

A mi Familia por elección, por su acompañamiento.

A las personas que padecen cáncer y quienes han sido afectados de forma directa o indirecta por esta enfermedad.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	3
ANTECEDENTES	5
<i>wt1</i> (Gen Supresor de Tumor de Wilms 1)	15
WT1 en cáncer pulmonar	18
Par-4	20
Par-4 en cáncer de pulmón	22
JUSTIFICACIÓN	29
HIPÓTESIS	30
OBJETIVO GENERAL	31
OBJETIVOS PARTICULARES	31
MATERIAL Y MÉTODOS	32
Estrategia experimental general	32
Tratamiento de células con Curcumina.....	33
Ensayo colorimétrico MTT	33
Extracción de proteínas	33
Cuantificación de proteínas	34
Electroforesis (en gel de poliacrilamida-SDS)	34
Inmunocitoquímica de líneas celulares.....	35
Cuantificación de la expresión de WT1 y Par-4.....	36
RESULTADOS	40
BIBLIOGRAFÍA	57

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla N°	Título	Página
1.	Subtipos histológicos de cáncer de mama.	9
2.	Subtipos moleculares de cáncer de mama de acuerdo con estudios inmunohistoquímicos y principales características histopatológicas. Adaptado de (Horvath 2021).	10
3.	Frecuencia de las principales alteraciones moleculares en adenocarcinoma pulmonar y carcinoma de células escamosas (Villalobos, P. y Wistuba I. 2017).	14
4.	Efectos anticancerígenos de la curcumina y sus análogos en melanoma (Nabavi et al. 2018).	28
5.	primers para la amplificación de WT1, GAPDH y Bcl-2.	38
6.	Condiciones de reacción para la amplificación de WT1, GAPDH y Bcl-2.	39

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura N°	Título	Página
1	Distribución de incidencia (izquierda) y mortalidad (derecha) de los principales tipos de cánceres en el mundo. (WHO 2021)	5
2	Distribución de incidencia de los principales tipos de cánceres en México. (WHO 2021)	6
3	Distribución de mortalidad de los principales tipos de cánceres en México. (WHO 2021).	6
4	Factores de riesgo en el melanoma cutáneo (Martínez-Amores Martínez et al. 2017).	12
5	Estructura de wt1 a nivel DNA (exones), mRNA y proteína (Yang et al. 2007).	16
6	Estructura de Par-4.	21
7	Diagrama que muestra la estrategia experimental general del proyecto.	32
8	Viabilidad de células MCF-7, B16F10 y A549 tratadas con diferentes concentraciones de curcumina.	40
9	Expresión de Par-4 en la línea celular B16F10.	41
10	Expresión de Par-4 en las líneas celulares MCF-7 y A549.	42
11	Análisis de la expresión de Par-4 en las líneas celulares B16F10 y A549.	43
12	Análisis de la expresión de WT1 en la línea celular B16F10.	44
13	Análisis de la expresión basal de Bcl-2 en la línea celular MCF-7 y B16F10.	44
14	Análisis de la expresión de Bcl-2 en la línea celular de melanoma murino B16F10 tratadas con 0 20 y 60 μ M/mL de curcumina.	45
15	Análisis de la localización celular de Par-4 y WT1 inducida por el tratamiento de curcumina en 24 h, en células A549.	46
16	Análisis de la localización celular de Par-4 y WT1 inducida por el tratamiento de curcumina en 24 h, en células MCF-7.	47
17	Análisis de la localización celular de Par-4 y WT1 inducida por el tratamiento de curcumina en 24 h, en células B16F10.	48
18	Análisis de la localización celular de Par-4 inducida por el tratamiento de 60 μ M de curcumina en 24 h, en células B16F10.	49
19	Inmunofluorescencia de Par-4 y WT1 inducida por el tratamiento de curcumina en 24 h, en células B16F10.	50

LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

°C	Grados centígrados
μM	Micro molar
aa	aminoácidos
A549	Adenocarcima Pulmonar
ADN / DNA	Ácido desoxirribonucleico
ARN / RNA	Ácido ribonucleico
B160F10	Melanoma murino de la cepa C57BL/6J
Bax	Regulador de apoptosis BAX; Bcl-2-like proteína 4
Bcl-2	Linfoma de células B 2
Bcl-X	Linfoma de células B extragrande
cm ²	Centímetros cuadrados
CO ₂	Dióxido de carbono
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol, marcador fluorescente que se une fuertemente a regiones enriquecidas en adenina y timina en secuencias de ADN.
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
G3PDH / GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
h	h
iNOS	Sintasa de óxido nítrico inducible
MCF	<i>Michigan Cancer Foundation</i>
mg	Microgramos
min	min
mL	Microlitros
mM	milimolar
MMP	Familia de las metaloproteinasas de la matriz
MTT	Bromuro de 3-(4,5dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol
NaCl	cloruro de sodio
NFκB	Factor nuclear kappa B
OMS	Organización Mundial de la Salud
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
PPARc	Receptor gamma activado por proliferador de peroxisoma
ROS	especies reactivas de oxígeno por sus siglas en inglés
rpm	revoluciones por minuto
SDS	Dodecilsulfato sódico por sus siglas en inglés
SFB	Suero fetal bovino

TBS	Solución salina tamponada con tris por sus siglas en inglés
TIMP-1	Inhibidor tisular de la metaloproteinasa-1
V	Volts
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular
WB	Western blot
WT1	Wilms tumor 1
β -actina	Beta actina
β -mercaptoetanol	Beta mercaptoetanol

RESUMEN

En este proyecto se trataron las líneas celulares A549, MCF-7 y B16F10 con curcumina durante 24 h para evaluar la modulación de WT1 y Par-4, así como el efecto en la expresión de Bcl-2 mediante RT-PCR e inmunocitoquímica.

Los resultados obtenidos por RT-PCR, indicaron que WT1, Par-4 y BCL-2 fueron modulados por el tratamiento de curcumina, lo que se corroboró por el aumento de su expresión proteica, a una concentración de 20 μ M de curcumina; y una disminución en su expresión al incrementar la dosis a 60 μ M de curcumina. Asimismo, se visualizó mediante MTT una respuesta en la viabilidad celular dependiente de la dosis y el tiempo. Lo anterior, se puede correlacionar con un incremento en la apoptosis mediado por BCL-2; así como una disminución de WT1, Par-4 y Bcl-2 a 60 μ M de curcumina cuando la viabilidad celular ya se encuentra muy baja.

ABSTRACT

In this project, A549, MCF-7, and B16F10 cells were evaluated by RT-PCR and immunocytochemistry, to determine the modulation of WT1 and Par-4 and the effect on the expression of the Bcl-2 gen by curcumin, the cells received treatment for 24 hours.

RT-PCR results shown that WT1, Par-4, and BCL-2 were modulated by curcumin treatment. At a concentration of 20 μM of this treatment, it was observed a raise of WT1, Par-4 and Bcl-2 expression, and a decrease in its expression when increasing the dose to 60 μM of curcumin. Likewise, the cell viability by MTT was visualized with a time and dose dependent response. This can be correlated with an increase in apoptosis mediated by BCL-2; as well as a decrease in WT1, Par-4 and Bcl-2 at 60 μM of curcumin when cell viability is already very low.

INTRODUCCIÓN

El cáncer, también conocido como neoplasia o tumor maligno, es un gran *conjunto de enfermedades génicas*, en su mayoría no hereditarias, que pueden comenzar en cualquier sitio cuando las células atípicas crecen sin control, invaden tejidos adyacentes o se diseminan a órganos distintos. El proceso final se llama metástasis y es una causa relevante de muerte (Iwasa y Marshall 2019; WHO 2020). El cáncer es monoclonal, es decir, debe a la proliferación incontrolada de una célula extraña; sin embargo, para que una célula normal modifique su fenotipo, son necesarias múltiples mutaciones en diferentes genes para que esta célula se convierta en una célula neoplásica (Iwasa y Marshall 2019).

En diversos estudios se ha demostrado que el gen Par-4 es supresor tumoral, ya que es da lugar a la apoptosis de forma selectiva en células carcinogénicas, por lo que se ha considerado como un blanco terapéutico. Asimismo, se ha confirmado que Par-4 interacciona con WT1 por lo que puede modular sus actividades transcripcionales a través de interacciones físicas (Johnstone *et al.* 1996); y debido a esta interacción puede inducir apoptosis, a través de la regulación WT1, el cual inhibe la función de p53 para inducir apoptosis (Maheswaran *et al.* 1995). Además, Par-4 regula Bcl-2 a través de un sitio de unión a WT1 localizado en el promotor bcl-2 (Cheema *et al.* 2003).

Adicionalmente, se ha considerado que la curcumina podría ser un posible fármaco anticanceroso eficaz, que podría ser indicado solo o en conjunto con otros medicamentos, ya que afecta a diferentes vías de señalización y dianas moleculares implicadas en el desarrollo de varios cánceres, por ejemplo, factores de transcripción y de crecimiento, citocinas proinflamatorias, receptores, proteínas quinasas, apoptóticas y aquellas que intervienen en la supervivencia y proliferación celular. Aunado a lo anterior, se ha reportado el mecanismo inhibitorio de la curcumina en la expresión de WT1 en líneas celulares leucémicas (Anuchapreeda *et al.* 2006). Así como su efecto activador de Par-4 dependiente de ROS, lo cual conduce a la autofagia en líneas celulares humanas de glioma maligno. En células de carcinoma hipofaríngeo, Par-4 tiene la capacidad de inducir de forma simultánea apoptosis y autofagia (Thayyullathil *et al.* 2014; L. J. Wang *et al.* 2014).

Por lo que en este proyecto se estudiara la modulación de WT1 y Par-4 en las células de cáncer A549, MCF-7 y B16F10, las cuales corresponden a adenocarcinoma pulmonar humano, cáncer de mama humano y melanoma murino respectivamente. Asimismo, se analizar el gen Bcl-2 que se encuentra río abajo de WT1 y Par-4 en la vía de señalización de la apoptosis.

ANTECEDENTES

De forma global, el cáncer ocupa el segundo lugar en causar mortalidad, siendo el cáncer de pulmón, el tipo de cáncer con mayor mortalidad (18%), por otro lado, el cáncer que presenta mayor incidencia es el cáncer de mama (11.7%) (Figura 1).

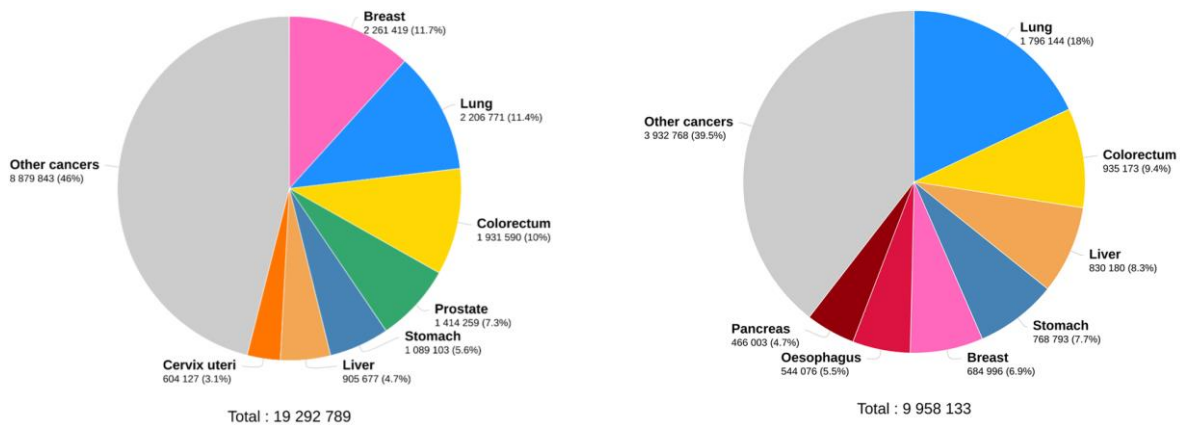


Figura 1. Distribución de los tipos de cáncer en el mundo con respecto a su incidencia y mortalidad (respectivamente) (WHO 2021).

En México, el primer lugar en incidencia y mortalidad es ocupado por el cáncer de mama con un 15.3% y 8.8% respectivamente (Figura 2), mientras que el cáncer de pulmón se encuentra en el cuarto lugar de cánceres con mayor mortalidad (7.9%). Otro tipo de cáncer común es el cáncer de piel, que se encuentra dentro de las primeras 20 tipologías con mayor incidencia mundial y en México ocupa el lugar número 21 (Figura 3) (WHO 2021). Sin embargo, duplica su incidencia cada 10 años (México 2021). El mal pronóstico se debe a la falta de tratamientos efectivos y al diagnóstico tardío.

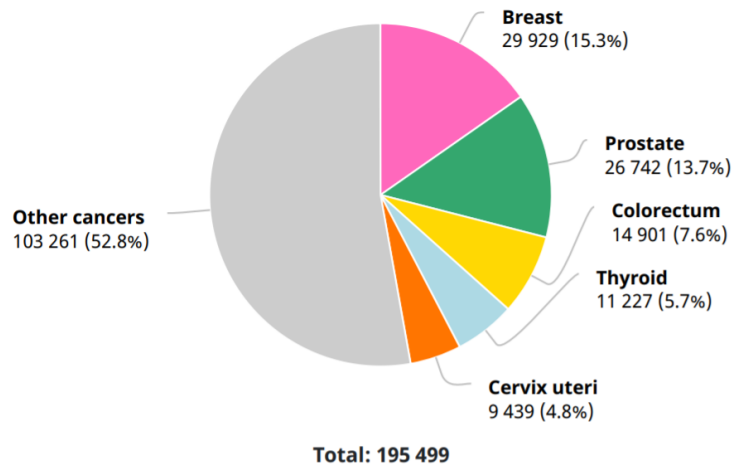


Figura 2. Distribución de incidencia de los principales tipos de cánceres en México. (WHO 2021)

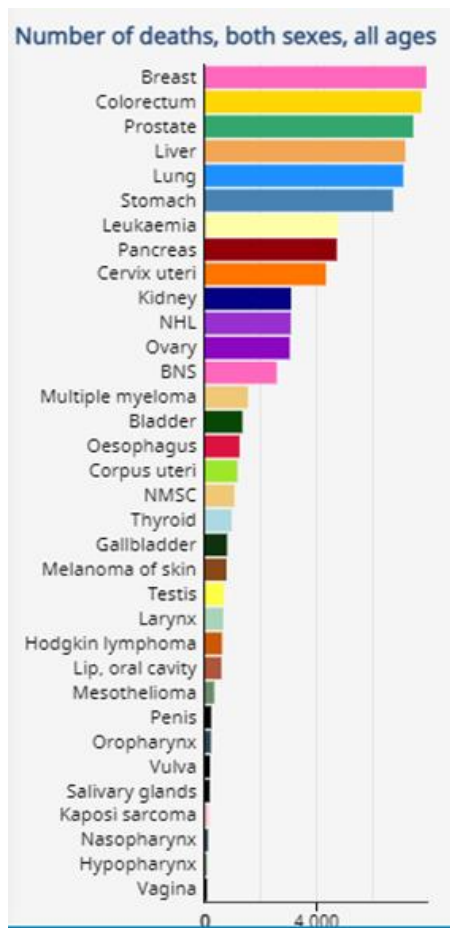


Figura 3. Distribución de mortalidad de los principales tipos de cánceres en México. (WHO 2021)

Cáncer de pulmón

En la práctica clínica, se clasifica principalmente en SCLC, carcinoma pulmonar microcítico (*Small-Cell Lung Cancer*) y NSCLC, carcinoma pulmonar de células no pequeñas (*Non-small-cell lung cancer*). Aproximadamente, del 80% al 85% son NSCLC (American Cancer Society 2020; Li, X., et al 2019 citado por (Abbas et al. 2020)) y estos se subclasifican adenocarcinoma, cáncer de células escamosas y de células grandes (American Cancer Society 2020). Del 15% al 20% restante de los cánceres de pulmón son SNLC, el cual es más agresivo que los tipos de cáncer mencionados anteriormente, este tiene una supervivencia a 5 años menor al 6% (National Cancer Institute 2014), y para el cual en los últimos 30 años no se ha desarrollado ningún tratamiento (Cardnell et al 2017).

Adicionalmente, la supervivencia a 5 años que se estima en personas con cáncer pulmonar y bronquios es del 18.1 % (National Cancer Institute 2014).

De acuerdo con la OMS, los cánceres de pulmón se clasifican en más de 50 subtipos histológicos y se agrupan en los siguientes cinco tipos histológicos: epiteliales, mesenquimales, linfocitocíticos, de origen ectópico y metastásico. Dentro de los tumores epiteliales se incluyen los adenocarcinomas, carcinomas de células escamosas, neuroendocrinos (carcinomas de células grandes, células pequeñas), entre otros (Travis et al. 2015).

Existen diversas circunstancias de riesgo que aumentan la posibilidad de sufrir cáncer de pulmón, entre los cuales el factor de riesgo más sobresaliente es fumar, incluyendo a los fumadores pasivos. Aproximadamente el 90% se puede atribuir al tabaquismo y el 30% de las defunciones de personas no fumadores es atribuible a la exposición residencial al radón (Alavanja 2002; de Groot et al. 018). Otras causas de riesgo son la exposición al asbesto (O'Reilly et al. 2007), y a agentes carcinogénicos, como minerales radiactivos (por ejemplo,

el uranio), sustancias derivadas de la combustión del diésel e inhalación de sustancias químicas (compuestos de níquel, cadmio, arsénico, berilio, sílice, cloruro de vinilo, gas mostaza, derivados del cromo y del carbón, y éteres de clorometilo) (American Cancer Society 2020).

El mal pronóstico se debe a la falta de tratamientos efectivos y al diagnóstico tardío, ya que únicamente 1 de cada 5 pacientes con cáncer pulmonar son diagnosticados en la etapa I, para los cuales la supervivencia a 5 años es de 57% (National Cancer Institute 2019). Además, al momento del diagnóstico dos tercios de los pacientes con NSLC, generalmente presentan un estado avanzado (es decir, estadios IIIB y IV irresecables) (Li, X., et al 2019 citado por (Abbas et al. 2020).

Actualmente, los tratamientos principales son la cirugía, radioterapia, quimioterapia, inmunoterapia y terapia dirigida. Además, el descubrimiento de distintos biomarcadores ha permitido revolucionar las estrategias terapéuticas (Travis et al. 2015; Villalobos y Wistuba 2017).

Cáncer de mama

Clínicamente se clasifica en cinco subtipos sobre la base de características moleculares e histológicas (Figura 4). Los tumores con una expresión del receptor de estrógenos (ER), del receptor de progesterona (PR) o ambos, son denominados cánceres de mama con receptores hormonales positivos, por otro lado, los aquellos sin la expresión de los receptores ER, PR y HER2 se conocen como triple negativo (TNBC) (Harbeck *et al.* 2019).

Todos los cánceres de mama surgen en las unidades lobulillares del conducto terminal del conducto colector. Las características histológicas y moleculares tienen alta importancia para la terapia, y se han desarrollado diversas clasificaciones sobre la base de estas características. Los subtipos histológicos con mayor frecuencia son las lesiones invasivas, como el *carcinoma ductal invasor* (también denominado "tipo no especial" (NST)) y el carcinoma lobulillar; y sus homólogos preinvasores, el carcinoma ductal *in situ* y lobulillar *in situ* (o neoplasia lobulillar) (Tabla 1) (Harbeck et al. 2019).

Subtipos histológicos	
<p>Preinvasivo</p> <ul style="list-style-type: none"> • Carcinoma ductal <i>in situ</i> - DCIS. • Carcinoma lobular <i>in situ</i> - LCIS. 	<p>Invasivo</p> <ul style="list-style-type: none"> • Ductal invasor (no especial, NST) • Lobular o lobulillar.

Tabla 1. Subclasificación histológica de cáncer de mama.

En la siguiente Tabla 2 se observa la subclasificación molecular, de acuerdo con estudios inmunohistoquímicos y principales características histopatológicas. En donde se observa que el subtipo con mayor frecuencia es el subtipo luminal A, el cual tiene una frecuencia del 50% (Horvath 2021). La incidencia de luminal A ha sido predominante en diversos estudios internacionales, seguida de luminal B, HER2 y basal-like (Pandit et al. 2020).

	Luminal		Her 2		Triple negativo	
Tipo molecular	Luminal A	Luminal B	Luminal	Enriquecido	“non basal-like”	“basal-like”
Frecuencia	50%	15%	20%		15%	
Pronóstico	Bueno		Intermedio		Malo	

Tabla 2. Subclasificación molecular del cáncer de mama, de acuerdo con estudios inmunohistoquímicos y principales características histopatológicas. Adaptado de (Horvath 2021)

Los subtipos intrínsecos de Perou y Sorlie se basan en una firma de expresión de 50 genes (PAM50) (Harbeck et al. 2019).

Dentro de la etiología de este tipo de cáncer se encuentran la predisposición génica, la edad, exposición a los estrógenos endógenos, aparición precoz del primer periodo, menopausia tardía, la nuliparidad, terapias hormonales sustitutivas, ausencia de lactancia materna, radiaciones ionizantes y estilo de vida (obesidad, inactividad física, ingesta de alcohol).

Aproximadamente el 10% son asociados con antecedentes familiares (Shiovitz y Korde 2015), lo cual varía con frecuencia según el grupo étnico. Esto se debe principalmente a mutaciones de genes supresores de tumores de alta importancia como BRCA1 (17q21) y BRCA2 (13q13), cuyas proteínas están involucradas en la reparación homóloga del ADN (Huen et al. 2010), muestran un patrón de herencia autosómico dominante (pérdida de función, sin sentido). Existen otros genes que intervienen en el

cáncer de mama heredado, además de BRCA1 y BRCA2, como ATM, CHEK2, PALB2, PTEN, STK11 y TP53 (Taylor et al. 2018).

Además, se ha planteado la posibilidad de que la utilización de anticonceptivos hormonales pueda aumentar el riesgo de este carcinoma (Del Pup et al. 2019). Dos artículos recientes mostraron un aumento estadísticamente significativo del cáncer de mama con el uso de anticonceptivos hormonales (Busund et al. 2018; Mørch et al. 2017).

Por otro lado, se ha estimado que ~20% de los carcinomas de mama en el mundo son atribuibles a al estilo de vida, por ejemplo, la ingesta de alcohol, el sedentarismo. Por lo que fomentar un estilo de vida saludable da lugar un posible decremento de su incidencia (Danaei et al. 2005).

Melanoma

El melanoma se encuentra entre los tipos de cánceres más agresivos y resistentes al tratamiento. Este tipo de cáncer se origina debido a una transformación maligna de los melanocitos, las células que sintetizan melanina, un pigmento fotoprotector (Lo y Fisher 2014). El 95% de los melanomas son identificados en la piel y el 5% en las mucosas (genital u oral), meninges y retina (Martínez-Amores Martínez et al. 2017).

Los melanomas cutáneos se clasifican en cuatro tipos: léntigo maligno, lentiginoso acral, de extensión superficial y nodular; de los cuales el de extensión superficial se presenta con mayor frecuencia representando el 70% de los melanomas. Por otro lado, el nodular es el melanoma que presenta mayor predisposición a la metástasis, por ende es el más agresivo (Martínez-Amores Martínez et al. 2017).

El factor de riesgo principal de los melanomas es la exposición solar directa, aunque también se debe al fenotipo cutáneo, edad, lesiones precursoras o factores genéticos, Figura 4.

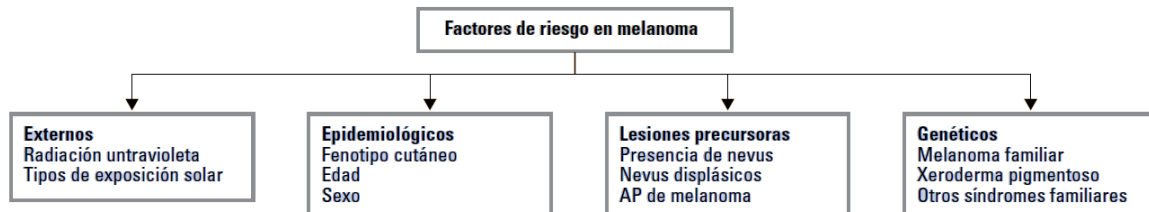


Figura 4. Factores de riesgo en el melanoma cutáneo (Martínez-Amores Martínez et al. 2017).

Biomarcadores

En los últimos años, el reconocimiento de los subtipos histológicos y la identificación de anomalías moleculares en melanomas, cáncer pulmonar y de mama, ha originado terapias dirigidas personalizadas. Los biomarcadores han cambiado la clasificación histológica de los tumores, por lo que son una herramienta indispensable para el diagnóstico patológico (Horvath 2021; Jenkins y Fisher 2021; Villalobos y Wistuba 2017).

El uso de biomarcadores predictivos para identificar tumores que podrían responder a terapias dirigidas ha significado un cambio en el paradigma del diagnóstico de cáncer.

Los biomarcadores se definen como *"una característica que se mide y evalúa objetivamente como un indicador de procesos biológicos normales, procesos patogénicos o respuestas farmacológicas a una intervención terapéutica"* (Srivastava y Kramer 2018).

En el NSCLC se han definido distintos biomarcadores (mutaciones en EGFR, BRAF, MET; fusiones en ALK, ROS1, RET; y niveles de expresión de la proteína PD-L1). Por otro lado, en el SCLC se han identificado los biomarcadores TTF-1 y cMyc, como herramientas para tomar una decisión terapéutica (Cardnell *et al.* 2017). En seguida, se muestra la frecuencia de las alteraciones moleculares distinguibles en adenocarcinoma pulmonar y carcinoma de células escamosas (Tabla 3).

Gene	Alteration	Adenocarcinoma	Squamous Cell Carcinoma
		Frequency	
<i>EGFR</i>	Mutation	10%	3%
<i>ALK</i>	Rearrangement	4-7%	None
<i>ROS</i>	Rearrangement	1-2%	None
<i>KRAS</i>	Mutation	25-35%	5%
<i>MET</i>	Mutation	8%	3%
<i>MET</i>	Amplification	4%	1%
<i>NTRK1</i>	Rearrangement	3%	None
<i>FGFR</i>	Amplification	3%	20%
<i>HER2</i>	Mutation	1.6-4%	None
<i>BRAF</i>	Mutation	1-3%	0.3%
<i>PIK3CA</i>	Mutation	2%	7%
<i>RET</i>	Rearrangement	1-2%	None
<i>DDR2</i>	Mutation	0.5%	3-4%
<i>PTEN</i>	Deletion	-	16%

Tabla 3. Frecuencia de las principales alteraciones moleculares en adenocarcinomas pulmonares y carcinomas de células escamosas (Villalobos, P. y Wistuba I. 2017).

El análisis de biomarcadores es una práctica habitual útil de diagnóstico y tratamiento de cáncer mamario. Originalmente comenzó con las pruebas de expresión del receptor hormonal para guiar la terapia con tamoxifeno. Normalmente, se evalúa el estado del receptor alfa-estrogénico (RE), receptor de progesterona, Ki-67 y HER2, con el fin de ayudar al pronóstico y determinar el tratamiento adecuado entre la terapia hormonal, la terapia anti-HER2, y la quimioterapia. Para llevar a cabo un pronóstico genético en pacientes con ER positivos con ganglios negativos, es posible utilizar una plataforma como MammaPrint, Oncotype DX, Prosigna o EndoPredict y determinar la terapia hormonal como tratamiento adyuvante exclusivo (Colomer et al. 2017).

Por otro lado, el tratamiento del melanoma metastásico se ha transformado a través de la introducción de nuevas terapias inmunitarias y de orientación molecular. El descubrimiento de oncogenes impulsores ha dado lugar a terapias dirigidas, marcando el comienzo de la era de la medicina personalizada. En el melanoma, esto ha sido ejemplificado por el éxito de los agentes dirigidos a las proteínas BRAF y MEK posteriores en pacientes con mutaciones activas de BRAF (Flaherty et al. 2012). Además, bloqueadores

de algún punto de control inmunológico, incluidos anti CTLA-4 (antígeno 4 asociado a los linfocitos T anti-citotóxicos) y anti PD-1 (inhibidores de muerte programada 1), han demostrado un beneficio sustancial como opciones terapéuticas en pacientes con melanoma, independientemente de su estado de mutación oncogénica (Tarhini y Kudchadkar 2018).

wt1 (Gen Supresor de Tumor de Wilms 1)

El tumor de Wilms, es un nefroblastoma pediátrico que fue descrito por primera vez por Max Wilms en 1899 (Breslow y Langholz, 1983; Matsunaga, 1981), cuya incidencia en niños menores de 15 años es aproximadamente de siete (7) casos por millón (National Cancer Institute 2014). El 5% de los niños con tumor de Wilms presentan un síndrome genético, que los predispone a esta neoplasia, como efecto de la alteración del gen *wt1* (Szychot et al. 2014).

La localización del gen *wt1* es en el cromosoma 11 en el brazo corto, en la banda 13, el cual se encuentra conformado por aproximadamente 50 kb y en su estructura contiene 10 exones que codifican para un RNA mensajero de alrededor de 3kb (Figura 1). El gen presenta diversas funciones derivadas de dos *splicing* alternativos que producen sus diversas isoformas. El primer *splicing* se encuentra en el exón 5, en el que se introducen 51 pb (17 aa) y el segundo *splicing* presente entre el exón 9 y exón 10, el cual inserta o elimina una región de 9pb denominada KTS (3 aminoácidos, Lisina [K] -Treonina [T] -Serina [S]). La combinación de ambos *splicing*, así como su ausencia [-] o presencia [+] da lugar a la existencia de cuatro isoformas (A [-/-], B [+/-], C [-/+] y D[+/+]) (Haber et al. 1991).

Además, se pueden originar isoformas de diferentes pesos moleculares debido a la existencia de tres lugares diferentes para iniciar la traducción. El primer triplete de nucleótidos se encuentra en la posición -68 [CTG], el segundo en la posición 0 [ATG] y el tercero en la posición 127, dando lugar a las isoformas de 60-62kD, 52-54kD y 36-38kD, respectivamente. Aunado a lo anterior se pueden originar combinaciones distintas debido a la edición del ARNm, dando lugar a 24 isoformas (Yang et al. 2007).

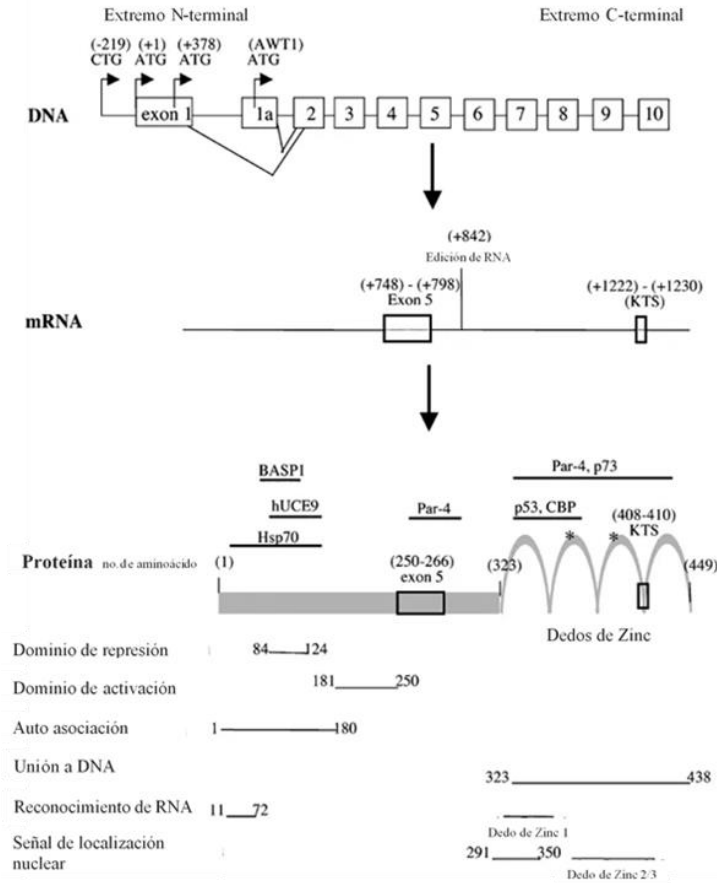


Figura 5. Estructura de *wt1* a nivel DNA (exones), mRNA y proteína (Yang *et al.* 2007)

Entre las isoformas posibles de WT1, la expresión o ausencia de la secuencia de aminoácidos KTS (+ KTS / – KTS) es relevante, para determinar su función. Por un lado la isoforma + KTS está localizada en el núcleo y en sitios adyacentes, por lo que su función se relaciona con el proceso de maduración del ARN mensajero y está involucrada en el corte y empalme de los exones (*splicing*); mientras que la isoforma – KTS, localizada en el núcleo, se involucra en los procesos de transcripción (Zamora-Avila *et al.* 2007).

Además, en su extremo C-terminal presenta cuatro dedos de zinc tipo Kruppel y en la región amino-terminal se encuentran de forma abundante glutamina y prolina (Call *et al.*, 1990; Menke *et al.* 1998). Adicionalmente, en la región 226-254 contiene una fracción de repeticiones de leucina, el cual está asociada con un rol en la mediación de las interacciones proteína-proteína (Madden *et al.* 1993).

La proteína WT1 es de suma importancia para el desarrollo embrionario del sistema urogenital, mientras que, en los adultos, su presencia es importante en el sistema nervioso central, médula espinal y nódulos linfáticos. Además, funge como factor transcripcional, y es primordial para la regulación del crecimiento celular, el metabolismo y generación de elementos de la matriz extracelular, diferenciación y programación de apoptosis (Menke *et al.* 1998; Yang *et al.* 2007). WT1 activa o reprime dichos procesos celulares, además tiene la capacidad de intervenir sobre su propia región promotora (Menke *et al.* 1998).

Se ha observado que las diferentes isoformas pueden presentar diversas funciones y posiblemente dependen del contexto en que se encuentran. La isoforma D [+/-] suele ser la más abundante y con mayor poder de represión con respecto a las demás isoformas (Rupprecht, *et al.* 1994). En leucemias primarias se han encontrado las principales cuatro isoformas de WT1 y se ha considerado que cada una de ellas posee funciones diferentes sobre la señalización en las vías de diferenciación celular, apoptosis y resistencia a fármacos (Shen *et al.* 2007).

Además, se ha reportado que las isoformas WT1 (+/+) / (+/-) poseen función antiapoptótica mediante la estabilización de la membrana mitocondrial en leucemias y tumores sólidos (Ito *et al.* 2006; Tatsumi *et al.* 2015). A la isoforma Ex4a(+)WT1 le ha sido atribuida la función fisiológica de regulación oncogénica (Tatsumi *et al.* 2015). Además, un estudio asoció la resistencia a diversos fármacos, en líneas celulares de leucemia a las isoformas WT1 (+/+) / (+/-), probablemente a través de la modulación del gen MDR1 (Shen *et al.* 2007).

Se ha encontrado a WT1 expresado en diversos tumores provenientes de tejido epitelial, mesenquimal, hematopoyético y neuronal; y ausente en los tejidos sanos correspondientes, por lo que se ha propuesto que *wt1* funciona como un oncogén en diversos contextos celulares (Hastie 2017; Inoue *et al.* 1994; Sugiyama 2010; Tamaki *et al.* 1999).

Debido a lo anterior, la expresión generalizada de WT1 en células neoplásicas ha dado lugar a que WT1 sea un blanco terapéutico experimental contra el cáncer (Nishida y Sugiyama 2016).

WT1 en cáncer pulmonar

En el cáncer pulmonar, *wt1* posee un rol importante como oncogén, promoviendo la proliferación celular, angiogénesis e inhibiendo la apoptosis. Por lo que, al ser encontrado en un nivel alto se ha correlacionado con un pronóstico adverso.

Desde 1999, se determinó que *wt1* tiene una función significativa en la oncogénesis de tumores sólidos, incluyendo el cáncer pulmonar (Oji et al. 1999). En el 2002, Oji et al. demostraron que la forma no mutada de *wt1* (*wild-type*) desempeña un papel relevante en la carcinogénesis pulmonar *de novo*, la cual se encuentra sobreexpresada en 96% de NCLC y en el 83% del carcinoma pulmonar de células microcíticas. No obstante, no se ha observado correlación entre la cantidad de expresión de esta proteína y las diferencias histopatológicas del carcinoma, que determinan los subtipos de este (células escamosas, células grandes, células pequeñas o adenocarcinoma) (Oji et al. 1999); ni entre la expresión de WT1 con las etapas del cáncer (Oji et al. 2002).

En la proliferación celular, WT1 tiene una función crítica para la transición entre las fases del ciclo celular de G2 a M (Ito et al. 2006; Xi Wang et al. 2013), así como la detención en G1 (Ito et al. 2006; Xi Wang et al. 2013) dado que, en NSCLC, se asocia a la amplificación de la actividad transcripcional de p-STAT3; el cual regula genes importantes como la Ciclina D1 y p-pRb (proteína de retinoblastoma hipofosforilada) (Xu et al. 2013).

En la angiogénesis, la promoción de la progresión tumoral por WT1 se encuentra determinada mediante la regulación de VEGF (factor de crecimiento endotelial vascular) (Wagner et al. 2014).

Además, WT1 funciona como inhibidor de la apoptosis, mediante la regulación transcripcional de Bax, miembro proapoptótico, de la vía intrínseca de este proceso (Ito *et al.*,2006; Johnstone *et al.*,1996; Xi Wang *et al.*,2013) Tatsumi *et al.*2008 citado por (Li 2015).

Por otro lado, en un estudio realizado en el 2013, se observó que el tratamiento quimioterapéutico con cisplatino (DDP) disminuye el nivel de expresión de RNA mensajero de WT1, lo que permite mejorar la sensibilidad al tratamiento con DDP en las células de cáncer de pulmón. Esto, a través de la vía de señalización PI3K/AKT (Xin Wang *et al.* 2020)(Xi Wang *et al.* 2013). Aunado a lo anterior, se ha demostrado que el silenciamiento de WT1 inhibe la proliferación celular y sensibiliza las células B16F10 a cisplatino y gemcitabina, provocando un efecto sinérgico *in vitro*. Además, *in vivo*, se potencia al cisplatino y la gemcitabina e inhibe la metástasis pulmonar (Zapata-Benavides et al. 2019).

Adicionalmente, WT1 regula la oncogénesis y la senescencia río abajo de la señalización oncogénica de KRAS. Se ha observado que los pacientes con carcinoma pulmonar con RAS activado, pero con una expresión disminuida de genes regulados por WT1 tienen un mejor pronóstico que los pacientes con una mayor expresión de WT1 (Oji *et al.* 1999; Vicent *et al.* 2010). Sin embargo, en pacientes con NCLC (en células escamosas) se ha observado que la baja expresión de WT1 en los tejidos tumorales predice un mal pronóstico (Hayashi et al. 2012).

También, se ha encontrado que WT1 interactúa con par-4, quien inhibe la activación transcripcional pero mejora la actividad de represión transcripcional de WT1 (Cheema *et al.* 2003; Johnstone *et al.*, 1996).

Par-4

La proteína Par-4 (por sus siglas en inglés, *prostate apoptosis response-4*) tiene un potencial efector de muerte celular y fue descrita por primera vez por Sells *et al.* en 1994, en experimentos realizados en células prostáticas con dependencias de andrógeno provenientes de ratón de ratones. Los cuales sufrieron de privación hormonal por medio de castración, lo que dio lugar a la entrada masiva de calcio a las células, dando lugar a la apoptosis, y durante este proceso se observó la expresión de Par-4 (Sells *et al.* 1994). Posteriormente, en 1998 se identificó el gen *pawr* codificante de esta proteína en el brazo largo del cromosoma 12 en la banda 21 (12q21), mediante hibridación *in situ* con inmunofluorescencia (Johnstone *et al.* 1998).

En humanos, Par-4 está constituida por 343 aminoácidos, de los cuales 59 están contenidos dentro de la región Selectiva para la Apoptosis en células de Cáncer (SAC, denominada así por sus siglas), la cual a través de un análisis delecional, fue identificada como la menor cadena de aminoácidos requerida en células neoplásicas para sensibilizarse e iniciar su apoptosis (El-Guendy *et al.* 2003).

La proteína Par-4 exhibe a NLS1 y NLS2 (secuencias localización nuclear) en la región N-terminal. La secuencia NLS-2, forma parte de la región SAC, esta le permite a Par-4 moverse del citoplasma hacia el núcleo, para desempeñarse como proteína pro-apoptótica (Figura 2). Además, en esta secuencia aminoacídica destaca la treonina 155, la cual es un objetivo de la proteína pKA para ser fosforilada, que le permite ser activada y le brinda el potencial de translocarse (Gurumurthy *et al.* 2005)

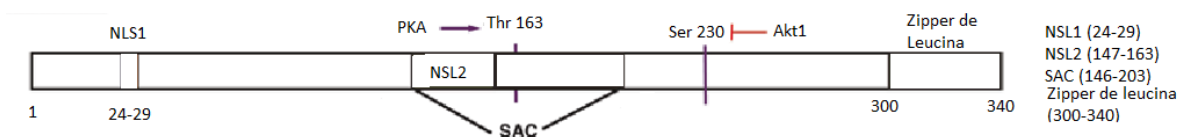


Figura 6. Estructura de Par-4

En la región carboxilo terminal de Par-4 se encuentra el dominio de cremallera de leucina (LZ), cuya función principal es permitir interacciones proteína-proteína. El dominio de cremallera de leucina tiene ~ 40 aa (aminoácidos) que se encuentran en repeticiones de héptada, y en cada una de ellas se localiza una leucina en la posición cuatro (El-Guendy y Rangnekar 2003). Mediante este dominio de cremallera de leucina, Par-4 interactúa con otras proteínas incluyendo la proteína WT1, Dlk y aPKCs (proteínas quinasas atípicas, principalmente PKC ζ y PKC λ/i) (Johnstone, *et al.* 1996; Diaz-Meco y Moscat, 1996; Diaz-Meco, *et al.* 2008; Kogel, *et al.* 1998). La fosforilación e inactivación de Par-4 por AKT1 también se ve facilitada por la unión de AKT1 al dominio LZ (Goswami *et al.* 2005). Esta fosforilación, en células cancerosas, permite que Par-4 de lugar a la muerte celular selectivamente, ya que en las células sanas la presencia de esta cinasa es menor. Por otro lado, la serina 249 es el sitio de fosforilación de Akt1; que da lugar al secuestro citoplasmático de Par-4 por las chaperonas 14-3-3 y por ende, a su inactivación (Goswami *et al.* 2005 y 2006).

Además, se ha demostrado que Par-4 actúa como gen supresor de tumores de SCLC y NSCLC (principalmente adenocarcinoma) (Diaz-Meco y Moscat 2008; Joshi, *et al.* 2008). Par-4 tienen la capacidad de inducir la apoptosis por vía extrínseca e vía intrínseca (Chakraborty *et al.* 2001).

Por vía extrínseca, Par-4 interactúa con Fas y promueve la migración de su ligando hacia la membrana celular y da lugar a que TRAIL interactúe con el ligando DR5 (Chakraborty 2001; Lee 2010). Por otro lado, en el retículo endoplasmático de células

normales, la secreción de Par-4 es generada mediante agentes inductores de estrés, siendo la proteína GRP78, la proteína más relevante en este proceso, ya que su interacción con Par-4 en la membrana celular activa la apoptosis por esta vía. Además, para que Par-4 sea secretado es necesario que p53 sea activado, principalmente por la vía clásica que Brefeldin A bloquea; o mediante la vía no convencional, en donde interviene Rab8b como activador de vesículas. Se han determinado como secretagogos a la cloroquina, la hidroxiclороquina y la arelquin-1 (Burikhanov *et al.* 2009 2017).

Por vía intrínseca, es necesario que Par-4 sea traslocado del citoplasma al núcleo para inhibir a NF-κB, y decrementar la cantidad de proteínas anti-apoptóticas y que favorecen la supervivencia celular (Camandola y Mattson 2000). En esta vía, el zipper de leucina de Par-4 interacciona con WT1, y con PKA (proteína cinasa A), Akt1, PKC ζ y PKC (Moscat, Díaz Meco y Wooten 2009).

Asimismo, la deficiencia de Par-4 activa la vía Akt *in vivo*. Posiblemente regulado por el complejo Par-4 / PKCz, debido a la capacidad de PKCz para fosforilar directamente Ser124 de Akt y su impacto posterior en la fosforilación de los residuos Ser473 y Thr308, los cuales son indispensables para la regulación de la actividad de Akt y función (Joshi et al. 2008).

Par-4 en cáncer de pulmón

El detrimento de Par-4 promueve la formación de carcinoma de pulmón inducida por Ras *in vivo* (Diaz-Meco y Moscat 2008). Por otro lado, uno de los principales tratamientos para el cáncer pulmonar es cisplatino, el cual participa retroalimentando positivamente a la caspasa 3 y Par-4, mediante la escisión de Par-4 en el aa 131 lo que permite ser traslocada al núcleo en donde inhibe genes de NF-κB que favorecen la supervivencia; y activa la caspasa 3 (Chaudry et al. 2011). Además de su papel como inductor de apoptosis, Par-4 actúa como sensibilizador terapéutico que permita estimular la

apoptosis mediante radiación ionizante, radiación UV y/o quimioterapia (Boehrer et al. 2002; Chendil et al. 2002; Díaz Meco et al. 1999). Esto es posible mediante la regulación a la baja de Bcl-2, la cual es una proteína pro-supervivencia que impide que la membrana en la mitocontria sea permeada (Cheema, *et al.* 2003). También, la inducción de apoptosis por agentes quimioterapéuticos puede ser potenciado por Par-4, inhibiendo NF- κ B.

Además, la baja expresión de Par-4 en varios tumores y tipos de células cancerosas, es un indicador de pronóstico desfavorable, de recurrencia y resistencia al tratamiento (Alvarez, *et al.* 2013; Guo, *et al.* 2019; Méndez-López, *et al.* 2010; Nagai, *et al.* 2010; Santos, R. 2019; Satherley, *et al.* 2016). Además, Nagai *et al.* (2010) observaron que pacientes con que expresaban Par-4 en el núcleo presentaban una sobrevida global mayor que aquellos pacientes que expresaban a Par-4 principalmente en el citoplasma.

Curcumina

La curcumina es un compuesto polifenólico amarillento, 1,7-bis (4-hidroxi – 3 – metoxifenil) -1, 6 – heptadieno – 3 , 5 - diona) con fórmula $C_{21}H_{20}O_6$. Es un extracto de la planta cúrcuma (*Curcuma longa*) y es que fue aislado por primera vez en 1815 por Pelletier y Vogel (Milobedeska J, *et al.*, 1910). Se ha relacionado con diversas actividades biológicas como antioxidante, antiinflamatorio, antimicrobiano y antiviral. Además, se ha determinado que la curcumina podría ser un fármaco anticanceroso eficaz para ser administrado solo o con otros fármacos, ya que modula enzimas, factores de crecimiento, sus receptores, citocinas y diversas dianas moleculares implicadas en el desarrollo de varios cánceres, pues afecta las vías de señalización de proliferación celular y progresión del ciclo celular (Giordano y Tommonaro 2019; Shehzad et al. 2017).

Curcumina en cáncer

La curcumina posee un valor terapéutico potencial para los cánceres del sistema digestivo (esofágico, gástrico, intestinal, hepático, pancreático y colorrectal), cánceres urológicos (de vejiga, riñón y próstata), cánceres del sistema reproductivo (cervical, ovárico y uterino), cánceres hematológicos [leucemia, linfoma y mieloma múltiple (MM)] y tumores pulmonares, tímicos, cerebrales, mamarios y óseos (Shehzad y Lee 2010)

La curcumina se une a diversos blancos moleculares, disminuyendo sus actividades. La curcumina interactúa directamente con moléculas inflamatorias (ciclooxigenasa (COX-1,2), lipoxigenasa (LOX), TNF- α (*factor de necrosis tumoral*), AGP (glucoproteína ácida α 1 human), MD-2 (*proteína de diferenciación mieloide 2*), enzimas (histonas acetiltransferasas (HAT) y desacetilasas (HDAC), xantina oxidasa (XO), integrasa y proteasa del *virus de inmunodeficiencia humana tipo 1* (VIH1), metiltransferasas y polimerasas de ADN,

proteína quinasas y reductasas (glucógeno sintasa quinasa) (GSK-3b), fosforilasa-3 quinasa, PKC (*proteína quinasa C*), FAK (*quinasa de adhesión focal*), ErbB2 (HER2 / neu), TrxR (*tiorredoxina reductasa*), aldosa reductasa (ALR), proteínas antiapoptóticas como Bcl2 y Bcl-xL. También se ha demostrado que la curcumina se une directamente a proteínas transportadoras (caseínas, albúminas e inmunoglobulinas), ADN, ARN e iones de metales divalentes (Fe, Cu, Mn y Zn) (Gupta et al. 2011). Actúa directamente sobre NF-kB, AP-1, b-catenina, transductor de señal así como activador de proteínas de transcripción (STAT) y receptor gamma activado por PPARc (Shehzad y Lee 2010).

La inflamación es un componente importante asociado con el inicio y la progresión de casi todos los tipos de cáncer. Se ha demostrado que el mecanismo antiinflamatorio de la curcumina está relacionado con la inhibición de la iNOS y la expresión del gen COX-2, las cuales son enzimas proinflamatorias. Los ensayos han demostrado que la curcumina inhibe a COX-1 por el enlace directo a través de Ser15 y también la actividad de la COX-2 mediante la unión directa a través de Val523, Val116, Ala516 y Tyr355. La curcumina también interactuó con Ala562 a través de enlaces de hidrógeno y suprimió la generación de PGE2 (Padhye et al. 2009; Selvam et al. 2005). Se ha observado que la curcumina previene la fosforilación de Akt, inhibe las proteínas antiapoptóticas linfoma de células B 2 (Bcl2) y Bcl-xL, y bloquea el inhibidor de proteínas de apoptosis (IAP). También se ha encontrado que la curcumina promueve la liberación de citocromo c, expresiones de Bax, p53 y p21, así como la actividad de caspasa-3 inducida y la generación de ROS (especies reactivas de oxígeno), que disminuyen el potencial de la membrana en la mitocondria (Goel y Aggarwal 2010). También se ha demostrado que, la curcumina inhibe la desfosforilación dependiente de proteína fosfatasa de Akt / diana de rapamicina en mamíferos (mTOR) y la fosforilación de c-jun (Yu et al. 2008) y estimuló la actividad transcripcional de AP-1 (Collett y Campbell 2004) en varias células experimentales. Varios estudios han destacado el papel de NF-kB, citocinas y proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK) en la proliferación celular, transformación y promoción de tumores. Se ha encontrado que la curcumina suprime que NF-kB sea activado, lo que conduce a la inhibición de las citocinas inflamatorias TNF α , VEGF e interleucinas 1, 2, 6, 8 y 12 (Aggarwal *et al.* 2009; Camacho-

Barquero *et al.* 2007). También se ha demostrado que el efecto anticancerígeno de la curcumina está mediado por la supresión de miembros de la familia de MMP, como -2, -9 y -14, que regulan el crecimiento y la promoción tumorales asociados con la invasión y metástasis (Shehzad *et al.* 2010). Además, la b-catenina, el factor de células T (TCF) y el factor potenciador linfoide (LEF) son factores que existen en muchas células cancerosas y son objetivos de muchos medicamentos contra el cáncer. Se ha encontrado que la curcumina y sus derivados inhiben la señalización de b-catenina y TCF-4 al disminuir el traslado de b-cateína hacia el núcleo y la sobreexpresión de TCF-4 en líneas de células cancerosas (Park *et al.* 2005). La curcumina también activó la caspasa-7 y -9 e indujo la escisión de PARP (poli ADP-ribosa polimerasa) a través de la regulación a la baja de los marcadores inflamatorios en las líneas celulares MM. Además de ser un potente inhibidor de la PKC y del receptor de la tirosina quinasa de EGF, se descubrió que la curcumina suprime a las células cancerosas su proliferación mediante la inhibición de la asociación de la ciclina D1 con la quinasa dependiente de ciclina 4/6 (CDK4 / CDK6) y fosforilación de pRb (proteína de retinoblastoma) mediada por CDK (Sa y Das 2008).

Cáncer de pulmón

El tratamiento con curcumina induce la apoptosis mediante la disminución de la expresión proteica de p53, Bcl2 y Bcl-xL en las células A549 y H1299, y la disminución del potencial de Bcl2, Bcl-xL y la membrana mitocondrial, continuado de la liberación de citocromo c. Asimismo, mediante la activación de caspasas 9 y 3, y la generación de ROS en células pequeñas de cáncer de pulmón NCI-H446 (Yang *et al.* 2012). La curcumina incrementa el cantidad de la proteína de choque térmico 40 (HLJ1) supresora de tumores similar a Dna-J a través de la activación de la vía JNK / JunD e inhibió la invasión de células de adenocarcinoma de pulmón humano (CL1-0 y CL1-5) y la metástasis modulando la expresión de E-cadherina (Chen *et al.* 2008). Los efectos *in vivo* de la curcumina se han investigado en ratones transgénicos portadores del tumor pulmonar que produce el factor de crecimiento endotelial vascular humano A165 (hVEGF-A165). La curcumina inhibió el desarrollo de tumores en los pulmones de estos ratones transgénicos a través de la expresión

de hVEGF-A165, particularmente en células Clara. También inhibió la ciclina A y la ciclina B, e impidió la progresión de la fase S y la fase G2 a fase M (Tung et al. 2011).

Cáncer de mama

Varios estudios han descrito diversos mecanismos de acción asociados con la curcumina contra células con cáncer de mama, incluida la regulación a la baja de NF-kB, AP-1, COX1, COX2, VEGF, factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), ciclina E, IL6 y IL11, TGF- β , MMP (2,9 y13), la regulación positiva de TIMP-1, p21 y p27 (Anand et al. 2008; Shehzad y Lee 2010). Se descubrió que la curcumina induce la apoptosis de células mediante la expresión de Bax dependiente de p53 e inhibe la actividad de la telomerasa a través de la transcriptasa inversa de la telomerasa humana (Anand et al. 2008). La curcumina inhibió la ubiquitinación de p27 mediada por Skp2 en líneas celulares de cáncer que sobreexpresan Her2 / Skp2 (MDA-MB-231 / Her2). Reprimió la proliferación celular, deteniéndolas en la fase G1 y bloqueó la migración celular mediante una mayor expresión de p27. La curcumina disminuyó la expresión de Skp2, Her2, ciclina E y CDK quinasas en células MDA-MB-231 / Her2 (Sun et al. 2012). La curcumina también revirtió la inhibición mediada por exosomas tumorales de la activación de las células NK y los tumores de mama de ratón a través del aumento incremental de las proteínas exosomales ubiquitinadas en comparación con las células de tumor de mama TS / A no tratadas. Los exosomas tumorales aislados de células tumorales pretratadas con curcumina tenían una potencia reducida para inhibir la citotoxicidad de las células NK estimuladas por IL-2 (Zhang et al. 2007).

Melanoma

En la tabla 4 se observan los efectos anticancerígenos de la curcumina y sus análogos en melanoma. Así como los mecanismos en las diferentes dianas moleculares, las líneas celulares utilizadas, las concentraciones y tiempos utilizados en diversos experimentos (Nabavi et al. 2018).

Materials tested	Cell lines	Effects	Mechanisms	Conc. (Time)
Curcumin	MMAN, MMRU, RPEP, PMWK, Sk-mel-2, Sk-mel-5, Sk-mel-28, MeWO	Induced cell death	↑Apoptosis; ↓NF-κB; ↓XIAP; activated Fas-FADD/caspase-8	30–100 μM (48 h)
Curcumin	A375, MeWO	Inhibited cell growth	↑Apoptosis; ↓G2/M; ↓NF-κB; ↓DNA-PKCs; ↓I-NOS; ↑p53; ↑p21; ↑p27; ↑CHEK2; ↑CK-2	10–50 μM (96 h)
Curcumin	C32, G-361, Wm 266-4	Decreased cell viability	↓NF-κB; ↓IKK; ↑p-Akt	10–40 μM (120 h)
Curcumin	4046T	Inhibited cell proliferation	↑Apoptosis; ↑sub-G1 phase; ↓NF-κB; ↓p-IκBα; ↓COX; ↓cyclin D1; ↑caspase-3	10–50 μM (36 h)
Curcumin	M21, SP6.5	Induced cell death	↑cyt c; ↑caspase-9; ↑caspase-3	10–100 μM (48 h)
Curcumin	A375, Hs294T	Induced cell death	↑Apoptosis; ↓P-STAT3; ↓Bcl-2; ↓IFN-α; ↓IFN-γ-STAT3-Phosphorylation; PARP Cleavage	10–30 μM (48 h)
Curcumin	B16F10	Inhibited proliferation	↓PDE1; ↓PDE4; ↑c-GMP; ↓PDE1A; ↓cyclin A; ↓UHRF1; ↓DNMT; ↓G2/M	10–20 μM (24 h)
Curcumin	WM-115	Induced cell death	↓MPP; ↑cyt c; mPTP opening; ↓ANT-1	25 μM (48 h)
Curcumin	A375, C8161	Inhibited cell proliferation	↑Apoptosis; ↑autophagy; ↓G2/M; ↓Akt; ↓mTOR; ↓P70S6K	15–75 μM (96 h)
Curcumin	A375	Displayed antiproliferative activity	↑Apoptosis; ↓p-JAK-2; ↓p-STAT3; ↓Bcl-2	12.5–50 μM (48 h)
Curcumin	B78H1	Inhibited cell proliferation	↓PCNA; ↑mmu-miR-205-5P; ↓Bcl-2	20–40 μM (48 h)
Curcumin	M-14	Induced no cytotoxicity	↑Apoptosis; ↓NF-κB; ↓p65; ↓Bcl-2; ABCA1-silencing	25 μM (24 h)
Curcumin	LB24DAGI, CN-MeIA, GR-Mel,	Induced cell cycle arrest	↑Apoptosis; ↓MMP; ↓cyt c	1–25 μM (72 h)
D6	WM-266-4, 13443, M14			
D6	LB24DAGI	Induced cell death	↑Apoptosis; ↑p53; ↓PI3K/Akt; ↓NF-Kb; ↓G2/M; ↑p21; ↑GADD45A; ↑Noxa; ↑CDKN1A; ↓cyclin B; ↓cdc25; ↓cyt F	10 μM (24 h)
FLLL32	A375, HT144, Hs294T	Induced cell death	↑Apoptosis; ↓p-STAT3; ↓MMP	2 μM (48 h)
FLLL32, FLLL62	A375, Hs294T	Induced cytotoxicity	↑Apoptosis; ↓VEGF; ↓MDSC; ↓p-STAT3; ↓cyclin D1; ↓IFN-γ	2–10 μM (48 h)
EF24	LU1205, A375	Inhibited cancer cell viability	↓HMG2; ↑miR-33b; ↑E-cadherin; ↓p-STAT3; ↓vimentin; ↓N-cadherin	0.5–16 μM (24 h)
G6-Ceramide & curcumin	B16, WM-115	Induced cell death	↑Apoptosis; ↑caspase-3; ↑caspase-9; ↓Bcl-XL; ↓XIAP	5–20 μM (48 h) (curcumin) 1–20 μM (48 h) (ceramide)
Curcumin	B16-R	Induced cytotoxicity	↑Bax; ↑cyt c; ↓VEGF; ↓ANGPT1; ↓ANGPT2; ↓KDR	10–100 μM (48 h)
Curcumin & tamoxifen	A375, G361	Reduced cell viability	↑Apoptosis; ↑autophagy; ↑ROS	10–100 μM (96 h)
Curcumin & UVA, VL	G361, A375	Decreased proliferation and cell viability	↑Apoptosis; ↑caspase-3; ↑caspase-8; ↑caspase-9; ↑DNA fragmentation	0.2–5 μg/ml (15 h)
NB & curcumin	A375	Displayed antiproliferative activity	↑Apoptosis; ↑p-JNK; ↓p-ERK; ↓Akt; ↑ROS; ↑Patm; ↑p-Brca1; ↑p-p53; ↑PARP cleavage	40 μg/ml (24 h) (NB) 20–30 μM (72 h) (curcumin)
ABT-737 & curcumin	WM-115, B-16	Induced cell death	↑Apoptosis; ↑mPTP opening; ↓MPP; ↓cyPD; ↓ANT-1	10–80 μM (curcumin) 100 nM (ABT-737)
Cur-LNC & Cur-PNC	B16F10	Reduced cell viability	↓NF-κB; ↓AP-1; ↓Erg-1; ↓MAPK; ↓COX1; ↓LOX; ↓NOS; ↓MMP; ↓TNF-α; ↓cyclin D1	10–100 μM (72 h)
Curcumin +Magnetite NP	Sk-mel-37	Inhibited cell growth		10–554 μM (48 h)
NC2067, NC2081 cyclodextrin	A375	Induced cytotoxicity	↑Apoptosis; ↑caspase-3; ↑caspase-7	0.01–200 μM (48 h)
Curcumin-ISG	B16F10	Inhibited cell proliferation	↑Apoptosis; ↓G2/M; ↑ROS	1–300 μg/ml (48 h)
Curcumin chitosan NP	B16F10	Decreased cell viability	↑Apoptosis; ↓MMP	1–100 μM (72 h)

Tabla 4. Efectos anticancerígenos de la curcumina y sus análogos en melanoma (Nabavi et al. 2018).

JUSTIFICACIÓN:

De acuerdo con la OMS, se espera que en el año 2040 la cifra de muertes por cáncer ascienda un 63% (16,300,000) con respecto a la cifra actual (9,960,000).

En los últimos años se ha determinado que la curcumina podría ser un fármaco anticanceroso eficaz, la cual tiene un efecto en diferentes dianas moleculares, entre ellas factores de transcripción, proteínas apoptóticas (Bax) y proteínas implicadas en la proliferación celular y supervivencia (Bcl-2, Bcl X).

Asimismo, se ha investigado sobre el mecanismo inhibitor de la curcumina en la expresión proteica de WT1 en líneas celulares leucémicas y la activación de Par-4 en células con glioma maligno humano, así como la inducción simultánea de apoptosis y autofagia por Par-4 en células de carcinoma hipofaríngeo. Por lo anterior, se desea estudiar el efecto de la curcumina en la localización y expresión proteica de Par-4 y WT1 en las líneas celulares A549, MCF-7 y B16F10, así como en el gen *bcl-2* que se encuentra río debajo de WT1 y Par-4. Lo que a su vez permitiría validar su potencial antioncogénico.

HIPÓTESIS:

La curcumina modula la expresión y la localización de WT1 y PAR-4 y en las células A549, MCF-7 y B16F10.

OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto de la curcumina en la modulación de la expresión y la localización de PAR-4 y WT1 en las líneas celulares A549, MCF-7 Y B16F10.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Determinar el efecto en la expresión de Par-4 y WT1 en las líneas celulares A549, MCF-7 y B16F10 al ser tratadas con curcumina.
2. Determinar el efecto la curcumina en la localización nuclear o citoplasmática de Par-4 y WT1 en las líneas celulares A549, MCF-7 y B16F10.
3. Evaluar el efecto de curcumina en el gen *bcl-2* que se encuentra río abajo de WT1 y Par-4 en la vía de señalización de apoptosis.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Estrategia experimental general

En el siguiente diagrama se muestra la estrategia experimental general que se realizará en este proyecto. Primeramente, se realizó un tratamiento de las células con curcumina a diferentes concentraciones y se realizó un ensayo de viabilidad con MTT. Después se llevarán a cabo inmunocitoquímicas en las líneas de células A549, MCF-7, B16F10 y se cuantificó la expresión de WT1 y PAR-4 de forma basal y después de recibir tratamiento por 24h con curcumina. Además, se evaluó su expresión por medio de RT-PCR, así como la expresión del gen *bcl-2*. Finalmente, se analizó la modulación de los genes por el tratamiento de curcumina.

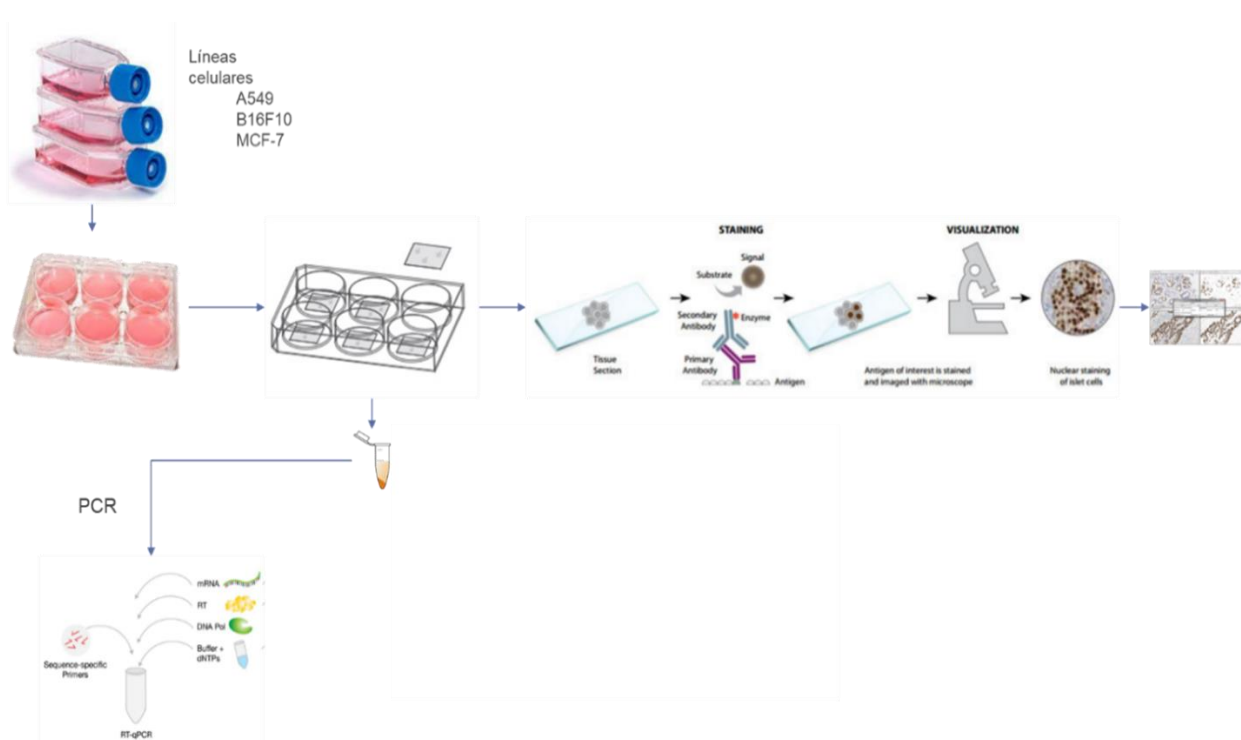


Figura 7. Diagrama que muestra la estrategia experimental general del proyecto.

Tratamiento de células con Curcumina

Con la finalidad de determinar el efecto citotóxico que presentan las células cancerígenas al ser tratadas con curcumina (Sigma - Aldrich, c1386), se cultivaron 3 mil células en una placa de 96 pozos con medio DMEM / F12 con las siguientes concentraciones de tratamiento 0, 10, 20, 30, 40 y 50 μM , elaborado a partir de una solución de Curcumina en DMSO (20 mM). Esto fue realizado en forma triplicada y después la viabilidad celular fue evaluada a través del ensayo colorimétrico MTT.

Ensayo colorimétrico MTT

Este ensayo permitió determinar las células viables presentes. Primeramente, fue preparada una solución en un buffer estéril de PBS y 5 mg/mL de MTT; después 20 μL de esta solución fueron añadidos a cada pozo y la placa de cultivo celular fue incubada 45 min (a 37°C). Enseguida, el sobrenadante fue decantado y las sales precipitadas fueron solubilizadas con 100 μL de DMSO. De forma similar, se realizó un ensayo por triplicado a las diferentes concentraciones de curcumina sin incluir las líneas celulares para descartar el color amarillo de la curcumina. Por último, las placas fueron analizadas por un lector de placas a 570nm.

Extracción de proteínas

De cada línea celular, fueron lavados con PBS los paquetes celulares y las células fueron resuspendidas en 100 μL de buffer de lisis (Tris 25mM, NaCl 150 mM, Tritón 1%, pH 7.6), fueron incubadas durante 30 min en hielo, después, fueron centrifugadas durante 5 min a 7,500 rpm, finalmente se colocó el sobrenadante en tubo estéril, para almacenarlo a -80°C.

Cuantificación de proteínas

Para determinar la concentración proteínica, se utilizó el set *Bio-Rad DC Protein Assay*®. Para cuantificar los extractos proteínicos se diluyeron 1 a 5 usando el buffer de lisis como diluyente. Después, se diluyeron con las sustancias S y A (1:20). Enseguida, se añadió el reactivo B (200 μ L) y fue incubado a temperatura ambiente durante 15 min. Después, la concentración proteínica fue cuantificada a una longitud de onda de 570 nm, con el lector *MultiskanFC de Thermo Scientific*.

Electroforesis (en gel de poliacrilamida-SDS)

Primeramente, del extracto celular en un buffer de carga con β -mercaptoetanol y SDS, fueron desnaturalizados 50 μ g de proteína. Enseguida, se calentaron durante 5 min a 95°C, después fueron cargados en geles de poliacrilamida-SDS (al 12%), se corrieron a 50V durante 30 min y luego el voltaje fue incrementado a 100 volts, y se corrieron durante 90 min; enseguida las proteínas se trasladaron a la membrana de nitrocelulosa desde el gel, para lo que se utilizó un casete de transferencia de proteínas, esto se dejó a 4°C y 25V durante 12 h. Finalmente, la membrana fue bloqueada con solución de TBS, Tween (al 5%) y leche (al 5%) durante una h.

Revelado e Inmunodetección

Los anticuerpos primarios utilizados para la inmunodetección fueron anti-Par-4 monoclonal (A-10), anti-WT1 (c-19) (Santa Cruz Biotechnology) y β -actina monoclonal (Sigma-Aldrich); y como anticuerpo secundario, se utilizó anti-ratón y anti-conejo respectivamente (BIORAD); Y para detectarlo se utilizó un kit de quimioluminiscencia, después de la exposición, las películas fueron reveladas en un cuarto completamente oscuro.

Inmunocitoquímica de líneas celulares

Primeramente, se realizó un cultivo de celular de las líneas celulares A549 (cáncer de pulmón), MCF-7 (cáncer de mama) y B16F10 (melanoma murino). Una vez que se logró una confluencia celular aproximada al 85%, el medio de cultivo fue retirado y las células se disgregaron con tripsina y enseguida se resuspendieron en medio de cultivo celular DMEM F12 con SFB al 10%. Estas células se transfirieron a una placa de cultivo con 6 pocillos, y en cada uno de ellos se colocó un cubreobjetos; y se cultivaron hasta alcanzar una confluencia del 85% aproximadamente. Una vez que las células fueron adheridas al cubreobjetos, se retiró el medio de cultivo celular y durante 10 min se mantuvieron los cubreobjetos en metanol frío para fijar las células. Después, las placas fueron almacenadas a -20°C, durante un día o hasta su uso. Después, las células se rehidrataron con PBS durante 10 min, enseguida el PBS fue retirado y se añadió una solución de peróxido de hidrógeno (al 3%) para inactivar la peroxidasa endógena, a continuación, los sitios inespecíficos fueron bloqueados con leche descremada (al 2.5%) durante una h. Después, se extrajo la solución de bloqueo y las células fueron incubadas por 13 h con el anticuerpo primario correspondiente (anti-Par-4 o anti-WT1), los cuales se usaron en una dilución de 1 a 100 (1:100) en buffer TBS. El exceso de anticuerpo primario se retiró con tres lavados con PBS, y luego se incubaron con el anticuerpo secundario. El revelado fue mediante la exposición de las células a *diaminobenzidina* (ImmPACT DAB, Vector Laboratories, SK-41005) por 8 min, como contraste se utilizó hematoxilina durante 3 min y se efectuó el aclaramiento con alcohol a diferentes concentraciones (50-60-70-80-90-100%), por 5 min, en cada grado de alcohol, y luego fueron sometidas a xilol durante 10 min. Para examinar las células en el microscopio se realizó el montaje en portaobjetos y se capturaron fotografías para posteriormente cuantificar la expresión.

Cuantificación de la expresión de WT1 y Par-4

Las imágenes capturadas de las células fueron procesadas a través del Software Fiji (anteriormente conocido como ImageJ), el cual se llevó a cabo la deconvolución de colores, para poder cuantificar el área distinta de tinción café, debida a la reacción antígeno-anticuerpo revelada mediante diaminobencidina. Por cada cubreobjetos se obtuvo el promedio de los tres valores obtenidos.

Extracción de RNA

Primeramente, se llevó a cabo la lisis celular, para lo cual las células fueron incubadas con 1 mL de Trizol y se incubaron a 23°C por 5 min. Posteriormente, se homogenizó con 200 µL de cloroformo por 15 segundos, y se incubaron a 23°C por 3 min fueron centrifugadas 12,000 rpm por 5 min a 4°C. En un tubo Eppendorf, se depositó la fase acuosa con 500 µL de isopropanol y se incubó (10 min), posteriormente se centrifugaron a 12,000 rpm a 4°C (10 min). Después, se lavó la pastilla celular con 1 mL de etanol (al 75%), se homogenizaron y centrifugaron a 7,500 rpm a 4°C por 5 min. Enseguida, una vez que se secaron, fueron resuspendidas en 50 µL de agua libre de RNasas. Finalmente, las muestras fueron incubadas a 55° C durante 10 min y mediante un espectrofotómetro (NanoDrop) se obtuvo la pureza y concentración del RNA.

Obtención de la concentración y la pureza del RNA

En un espectrofotómetro (NanoDrop), se colocó 1 µL de cada muestra de RNA, las cuales fueron leídas a 260 y 280 nm.

Síntesis de ADNc

En tubos de microcentrífuga, se colocó el RNA de cada muestra y se le agregó agua libre de RNAsa para resuspender la muestra en un volumen de 10 μL en total, posteriormente se agregaron 2 μL de 10x TR Buffer, 0.8 μL de mix 25x dNTP, 2 μL de 10x RT *Random Primers*, 1 μL de transcriptasa reversa (*MultiscribTM*) y 4.2 μL de agua libre de RNAsas.

A continuación, las reacciones se realizaron mediante un termociclador con las siguientes condiciones para la síntesis de ADNc:

Temperatura	Tiempo
25° C	1 min
37° C	120 min
85° C	5 min

El ADNc se almacenó en tubos de microcentrífuga a 4°C, para ser analizados posteriormente.

PCR

Se analizaron los transcritos mediante una PCR, amplificando como control endógeno el gen codificante a GAPDH y como control de expresión Bcl-2. La reacción fue efectuada con 5 μ L de cada ADNc, 5 μ L de 5X “*My Taq Reaction*”, 0.5 μ L de “*Primers Forward y Reverse*”, 0.5 μ L “*My Taq ADN Polymerase*” y se aforó a 25 μ L con agua libre de DNasa.

Gen por amplificar	<i>Primers</i>
	<i>(Forward and reverse)</i>
WT1	5'-AACGCCCTTCATGTGTGC-3' 5'-GCTGGTCTGAACGAGAAAACCTTC-3'
GAPDH	5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3' 5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'
Par-4	5'-AAGAACCCCGTTTCCCTTA-3' 5'-CCCAGCTGTGTGACCTTCTC-3'
<i>bcl-2</i>	5'-TCATGTGTGTGGAGAGCGTCAA-3' 5'-GTGTGTGTCTGTCTGTGTGTGTGA-3'

Tabla 5. *Primers* para la amplificación de WT1, GAPDH, Par-4 y *bcl-2*

Las condiciones de reacción para cada gen se especifican en la tabla 6.

Gen por amplificar	Condiciones	Número de ciclos
WT1	96°C – 40 s 64°C – 30 s 72°C – 40 s	35
GAPDH	95°C – 15 s 60°C – 15 s 72°C – 10 s	35
PAR-4	94°C – 40 s 56°C – 30 s 72°C – 30 s	35
Bcl-2	94°C – 30 s 60°C – 35 s 72°C – 30 s	35

Tabla 6. Condiciones de reacción para la amplificación de WT1, GAPDH, Par-4 y Bcl-2.

En un gel de agarosa (al 1.2%), se corrieron los productos del PCR y los resultados se capturaron con un fotodocumentador; las imágenes obtenidas fueron analizadas mediante densitometría con el *Software Fiji*.

RESULTADOS:

1. Efecto de la curcumina en la expresión proteica de Par-4 y WT1 en las líneas celulares MCF-7, A549 y B16F10.

La determinación del efecto causado por el tratamiento con curcumina en la viabilidad de las células (**MCF-7, A549 y B16F10**) fue evaluada a través del ensayo colorimétrico de MTT, las células se trataron a concentraciones disímiles de curcumina (0-50 μM). En las líneas celulares probadas se visualizó un decremento de la viabilidad celular hasta del 40% a las 24 h a una concentración de 50 μM por lo que se demostró que la cantidad de células viables depende de la dosis del tratamiento (figura 8). Asimismo, mediante el *Software Python*, se corroboró que la concentración de curcumina y la viabilidad celular se correlacionan negativamente, encontrando un coeficiente de correlación de Pearson -0.96, -0.91 y -0.79, para A549, B16F10 y MCF-7 respectivamente.

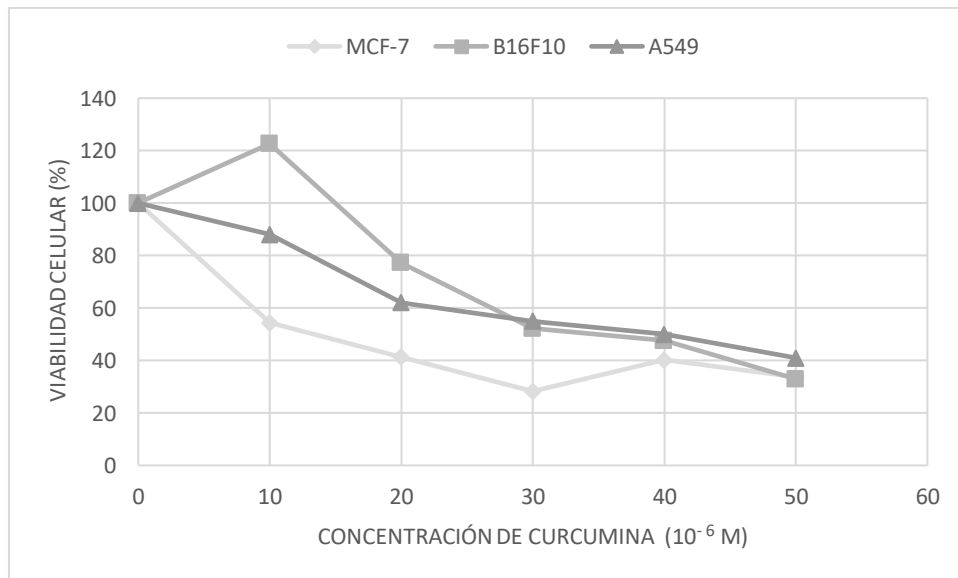


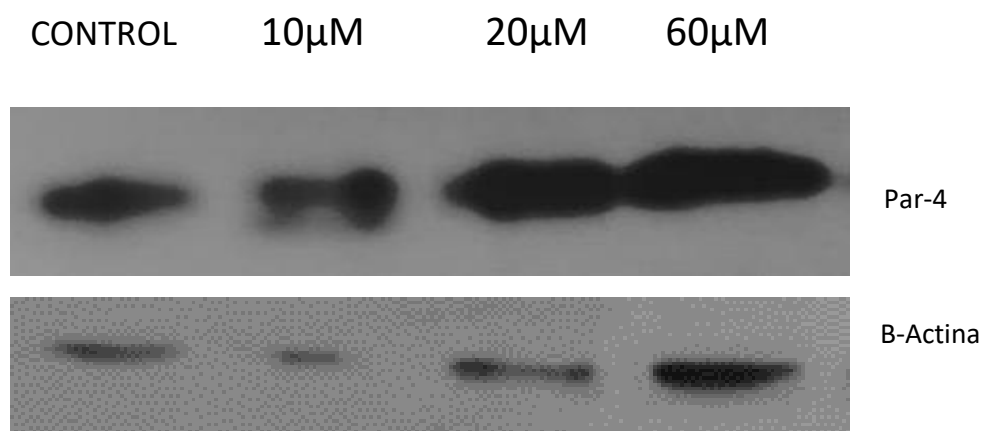
Figura 8. Viabilidad de células MCF-7, B16F10 y A549 tratadas con diferentes concentraciones de curcumina.

Las células de cáncer fueron tratadas con distintas concentraciones de curcumina (0 a 50 μM) durante 24 h y el porcentaje de viabilidad celular se obtuvo a través del ensayo colorimétrico de MTT.

Para analizar el nivel de expresión proteica de Par-4, en las células cancerígenas que

recibieron tratamientos con curcumina a diferentes concentraciones (10 20 y 60 μM) se realizó mediante el ensayo de Western Blot (WB). En la figura 9A se observa como la curcumina incrementa la expresión de Par-4 es dosis dependiente, y se usó como gen constitutivo β -Actina; el análisis de densitometría refleja que la máxima expresión de Par-4 se lleva a cabo con 10 μM de curcumina (figura 9B).

A)



B)

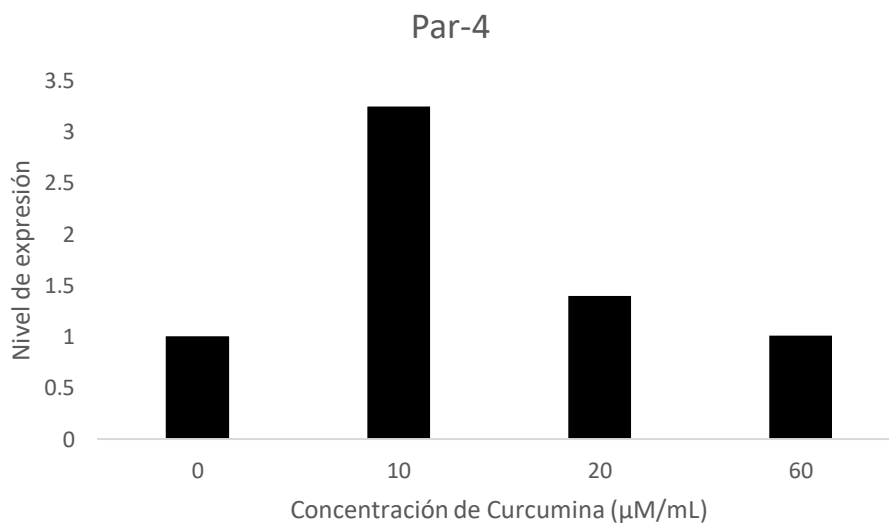
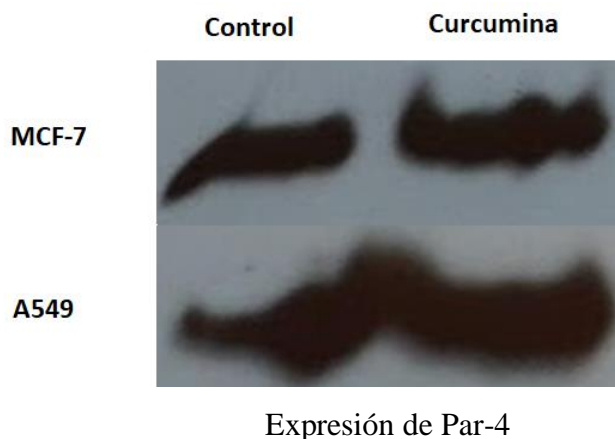


Figura 9. Expresión de Par-4 en la línea celular B16F10. Las células recibieron diferentes concentraciones de tratamiento de curcumina 10 20 y 60 μM encontrándose una expresión dosis dependiente. A) Análisis de WB Expresión. B) Análisis de densitometría

En la figura 10 se muestra el Western Blot realizado a las líneas celulares MCF-7 y A549, en el lado izquierdo se observa el control y en el lado derecho las células tratadas con curcumina a una concentración de 20 μM (figura 10A). De acuerdo con el análisis de densitometría se observa un incremento proteico de Par-4, en las líneas celulares MCF-7 (41%) y A549 (23%) (figura 10). De lo anterior, se observa que la expresión de Par-4 se incrementó a una concentración de 20 μM del tratamiento con curcumina, asimismo se observa una mayor muerte celular en las células que son tratadas con curcumina dependiente de la dosis y tiempo.

A)



B)

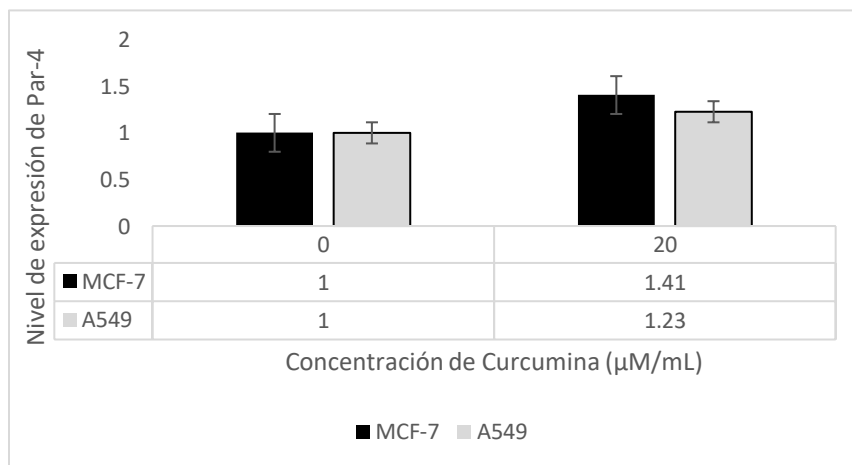


Figura 10. Expresión proteica de Par-4, en las líneas celulares MCF-7 y A549. A) Análisis de WB en las líneas MCF-7 y A549 tratadas con 20 μM de curcumina. B) Análisis de densitometría.

2. La curcumina induce sobre expresión de Par-4 y WT1 en las líneas de cáncer A549, MCF-7 y B16F10

La expresión de Par-4 después de un estímulo de estrés o daño celular induce muerte celular por apoptosis mientras que WT1 actúa como un oncogén en muchos tipos de neoplasias, sin embargo, sus funciones se ven alteradas por la interacción física de las dos proteínas, Par-4 modula negativamente la expresión de Bcl-2 y WT1 es un activador transcripcional.

Por la técnica de RT-PCR, se evaluaron las expresiones basales de Par-4, WT1 y Bcl-2. En la figura 11, se muestra la expresión de Par-4 y Bcl-2 en las líneas celulares B16F10 y A549 usando como gen de constitutivo G3PDH, en la cual se observa una mayor expresión de Par-4 en las células que fueron tratadas con curcumina comparadas con el control, observándose una máxima expresión con 20 μ M de curcumina, con respecto a Bcl-2 se encuentra una expresión opuesta a la expresión de Par-4, en aquellas células que fueron con curcumina.

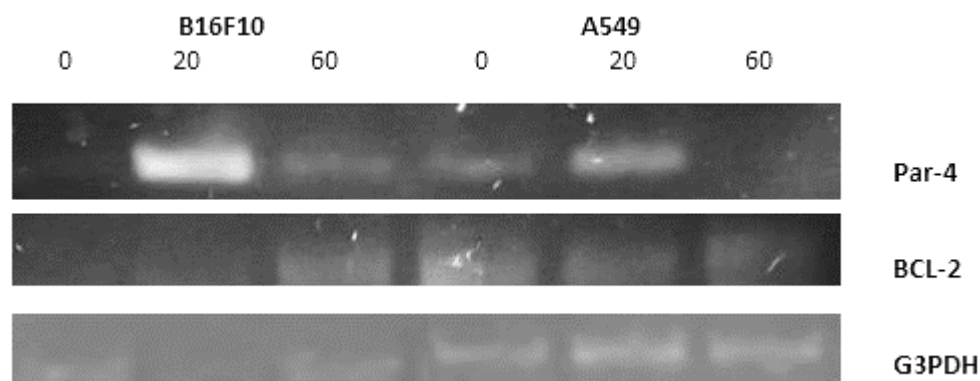


Figura 11. Análisis de expresión de Par-4, en las líneas celulares B16F10 y A549. Se encontró un incremento de la expresión de Par-4 principalmente a 20 μ M de curcumina. Par-4 modula negativamente la expresión de Bcl-2.

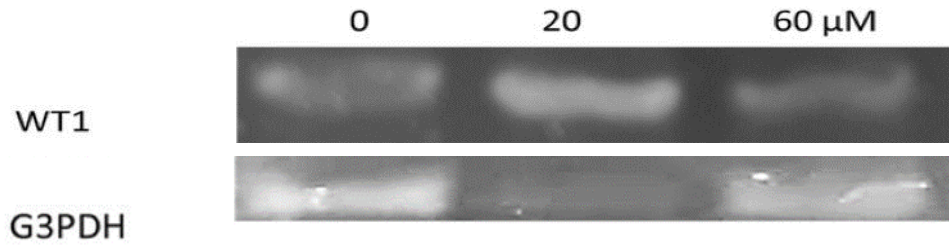


Figura 12. Análisis de expresión de WT1, en la línea celular B16F10. El factor de transcripción WT1 modula al alza genes involucrados en la apoptosis como Bcl-2, en este trabajo se encontró un aumento de WT1 principalmente a 20 μ M de curcumina.

Adicionalmente, en la línea celular MCF-7 se evaluó la expresión basal de Bcl-2 usando como gen de constitutivo G3PDH (figura 13).

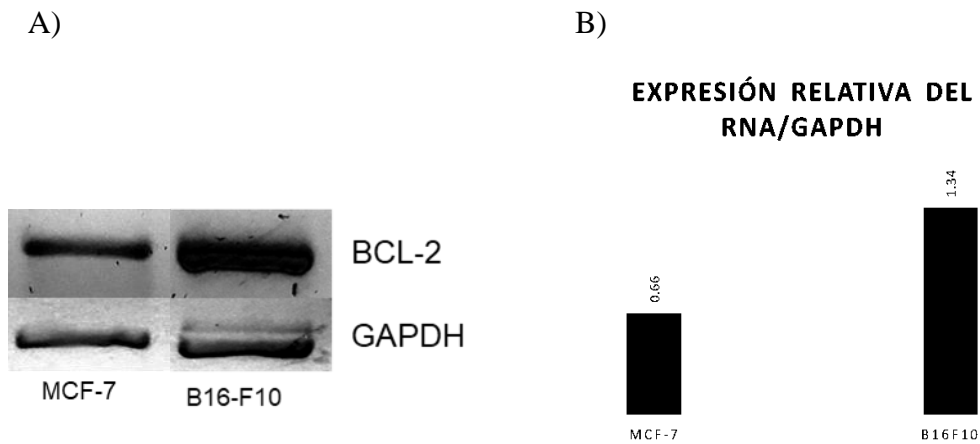


Figura 13. Análisis de expresión basal de Bcl-2, en líneas celulares de cáncer MCF-7 y B16F10. A) Análisis de expresión del RNAm del gen Bcl-2 mediante electroforesis (en gel de agarosa al 2%) B) Densitometría

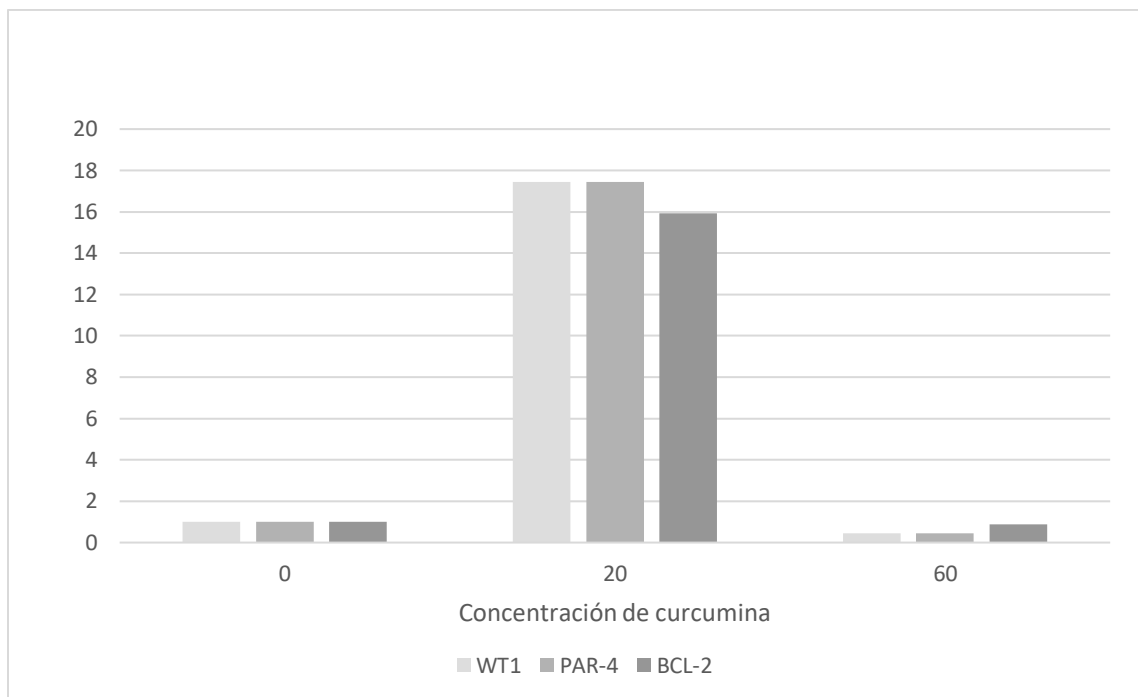


Figura 14. Análisis de expresión de Bcl-2, en la línea B16F10 de melanoma murino tratadas con 0 20 y 60 μM de curcumina.

En la figura 14, se observa la expresión de WT1, Par-4 y Bcl-2, analizada mediante densitometría de en la línea celular B16F10, tratada con 0 20 y 60 μM de curcumina, del análisis mediante RT-PCR mostrado previamente en las figuras 11 y 12. Asimismo, se observa un incremento de los tres genes involucrados en este proyecto WT1, Par-4 y BCL-2 a una concentración de 20 μM de curcumina.

3. La curcumina induce localización citoplasmática de WT1 en las líneas celulares de cáncer A549, MCF-7, B16F10 y de Par-4 en las líneas cáncer A549 y B16F10.

La localización de Par-4 y WT1 son fundamentales para su funcionamiento, las dos proteínas como factores de transcripción requieren una localización nuclear para desempeñar su función para observar la localización se realizaron tinciones inmunocitoquímicas en las líneas A549, MCF-7 y B16F10 previamente tratadas con 20μM de curcumina por 24 h.

En la línea celular A549 no tratada con curcumina se observó una expresión basal de Par-4 nuclear y citoplasmática. Mientras que en las células que recibieron tratamientos de curcumina durante 24 h se observó la expresión de Par-4 con localización muy semejante a las células sin tratamiento (Figura 15). Por otro lado, no se observó una expresión basal de WT1 nuclear ni citoplasmática en las células tratadas, mientras que en las células que recibieron tratamiento con curcumina durante 24 h se observó una mayor expresión de WT1 con localización nuclear y citoplasmática y algunas células con expresión nuclear predominante (ver Figura 15).

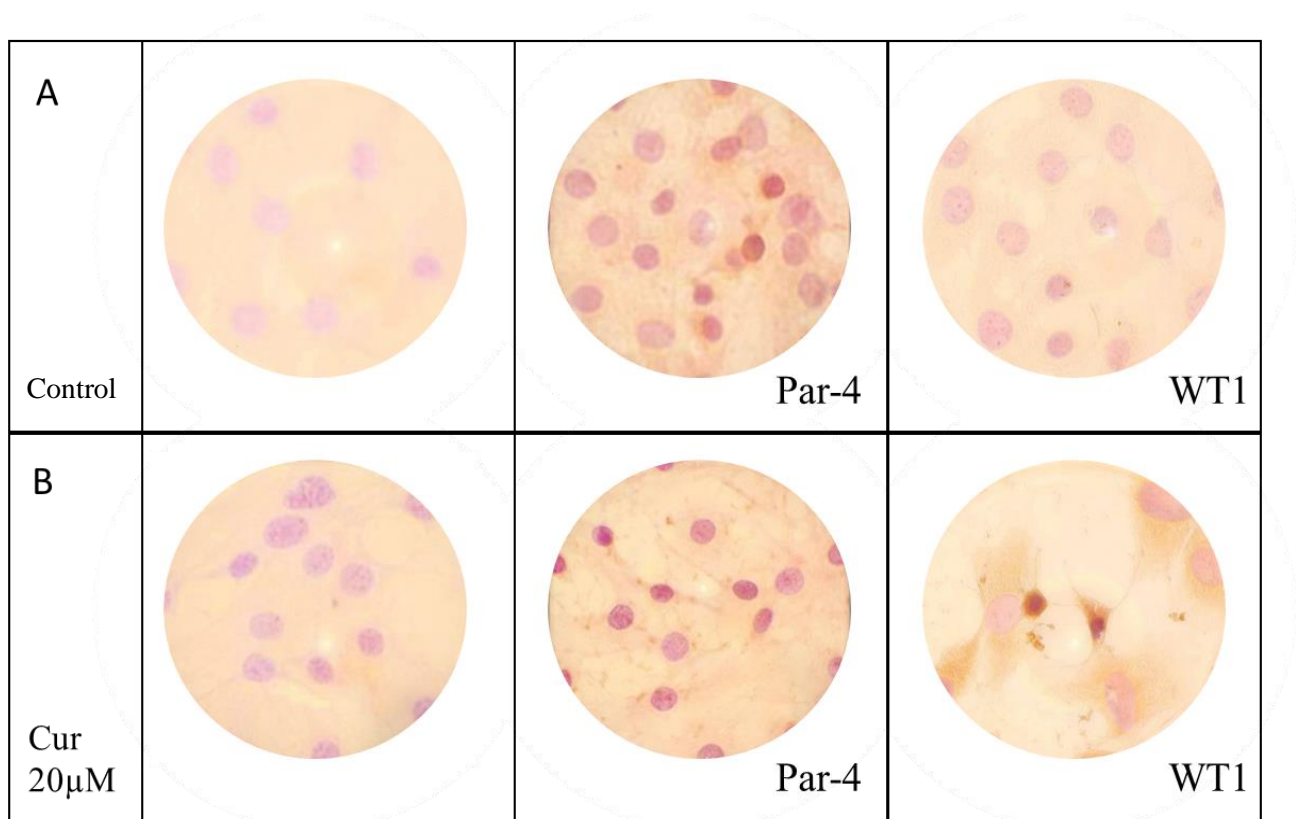


Figura 15. Análisis de la localización celular de Par-4 y WT1 inducida por el tratamiento de curcumina en 24 h, en células A549 teñidas con Hematoxilina de Harris. A) Izquierda, Control. Centro, Expresión basal Par-4 (A-10). Derecha, Expresión basal WT1 (C-19). B) Células tratadas con curcumina 20 μ M por 24h. Izquierda, Control. Centro, Expresión Par-4 (A-10). Derecha, Expresión WT1 (C-19).

En la línea celular MCF-7 no tratada se observó una baja expresión basal de Par-4 nuclear y en las células tratadas con curcumina por 24 h, se visualizó un ligero incremento en la expresión citoplasmaticonuclear de Par-4 (figura 16).

Es esta misma línea celular MCF-7 al ser evaluada la expresión de WT1 se visualizó una baja expresión basal citoplasmática de WT1 (figura 16A, derecha). Y un aumento de la expresión proteica de WT1 en células con tratamiento de curcumina durante 24 h (figura 16B, derecha).

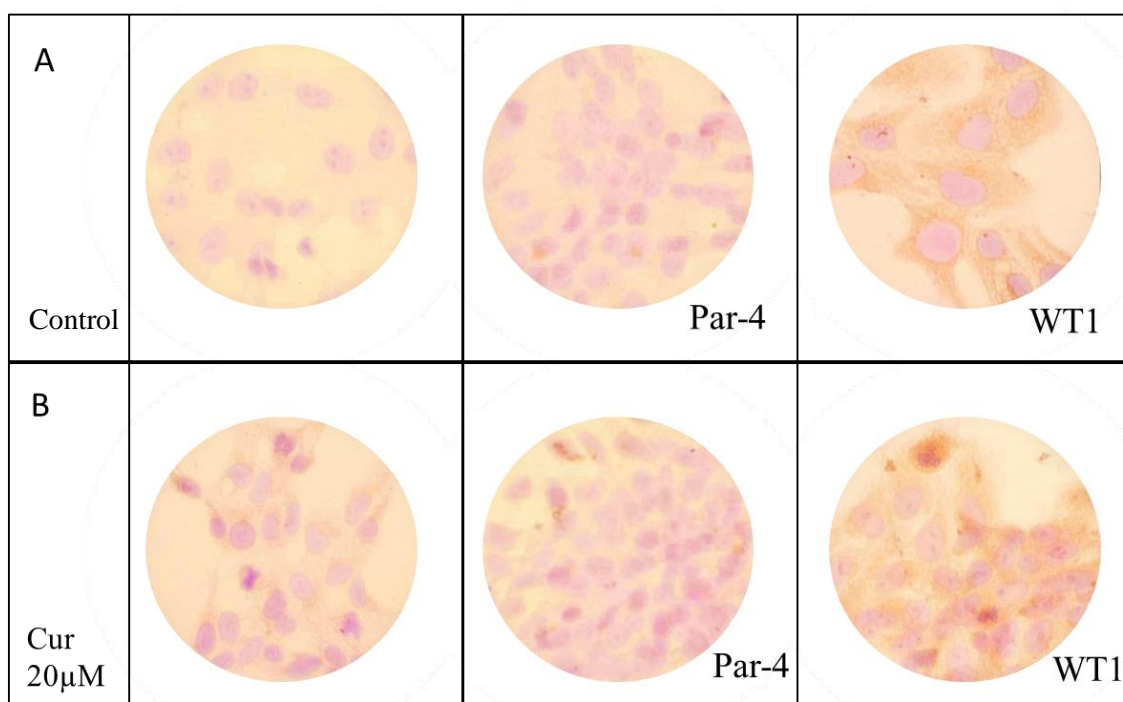


Figura 16. Análisis de la localización celular de Par-4 y WT1 inducida por el tratamiento de curcumina en 24 h, en células MCF-7 teñidas con Hematoxilina de Harris. A) Izquierda, Control. Centro, Expresión basal Par-4 (A-10). Derecha, Expresión basal WT1 (C-19). B) Células tratadas con curcumina 20 µM por 24h. Izquierda, Control. Centro, Expresión Par-4 (A-10). Derecha, Expresión WT1 (C-19).

En células B16F10 sin tratamiento, se encontró una expresión basal nuclear y citoplasmática de Par-4 (figura 17A, centro) predominando la expresión citoplasmática, mientras que en las células con tratamiento por 24 h se observó una expresión citoplasmática predominante y un incremento en la misma (figura 17B, centro).

Posteriormente, fue evaluada la expresión de WT1 y se encontró una expresión basal nuclear y citoplasmática; y en las células con tratamiento por 24h se observó un accenso en la expresión citoplasmática y además una expresión nuclear en algunas células.

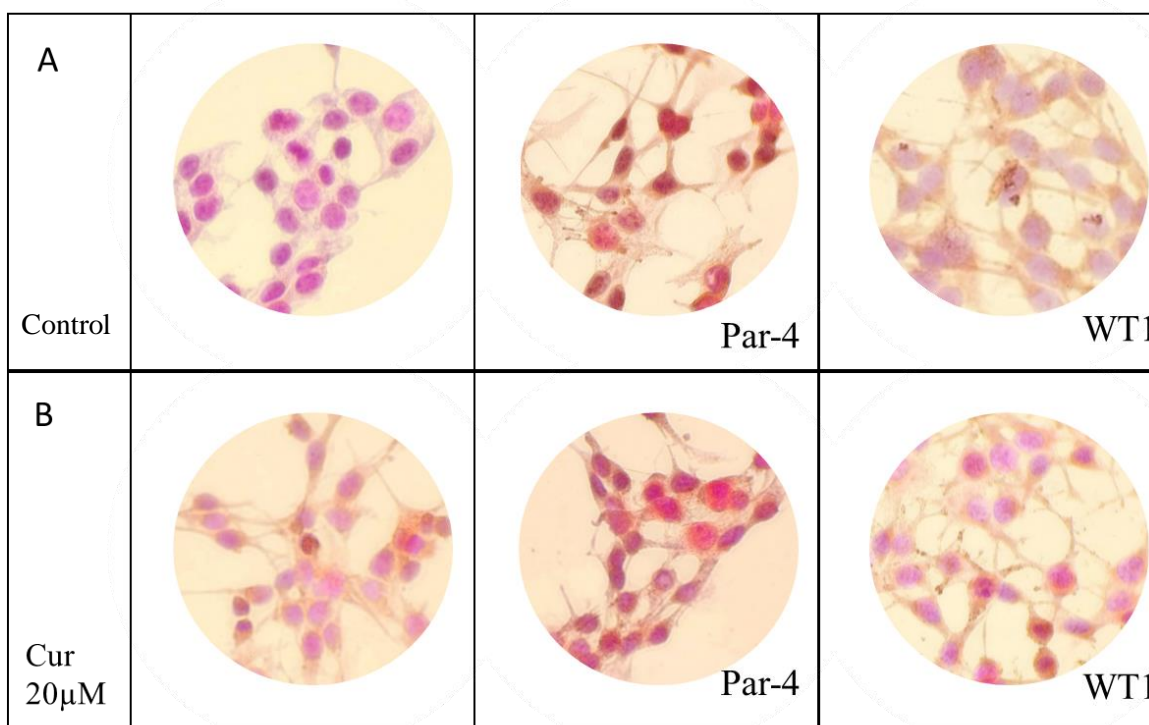


Figura 17. Análisis de la localización celular de Par-4 y WT1 inducida por el tratamiento de curcumina en 24 h, en células B16F10 teñidas con Hematoxilina de Harris. A) Izquierda, Control. Centro, Expresión basal Par-4 (A-10). Derecha, Expresión basal WT1 (C-19). B) Células tratadas con curcumina 20 µM por 24h. Izquierda, Control. Centro, Expresión Par-4 (A-10). Derecha, Expresión WT1 (C-19).

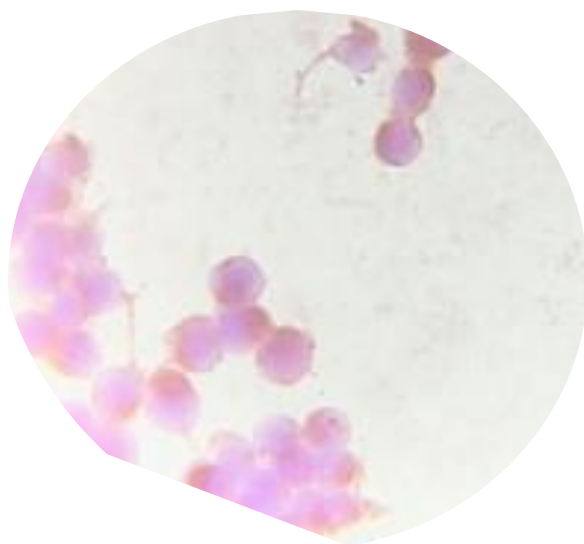


Figura 18. Análisis de la localización celular de Par-4 inducida por el tratamiento de curcumina en 24 h, en células B16F10 teñidas con Hematoxilina de Harris. Células tratadas con curcumina 60 μ M por 24h.

En la figura 18 se observa la expresión de Par-4 en células tratadas con curcumina a una concentración de 60 μ M por 24h. Así como los cambios morfológicos inducidos en esta línea celular, observándose una forma circular de las células.

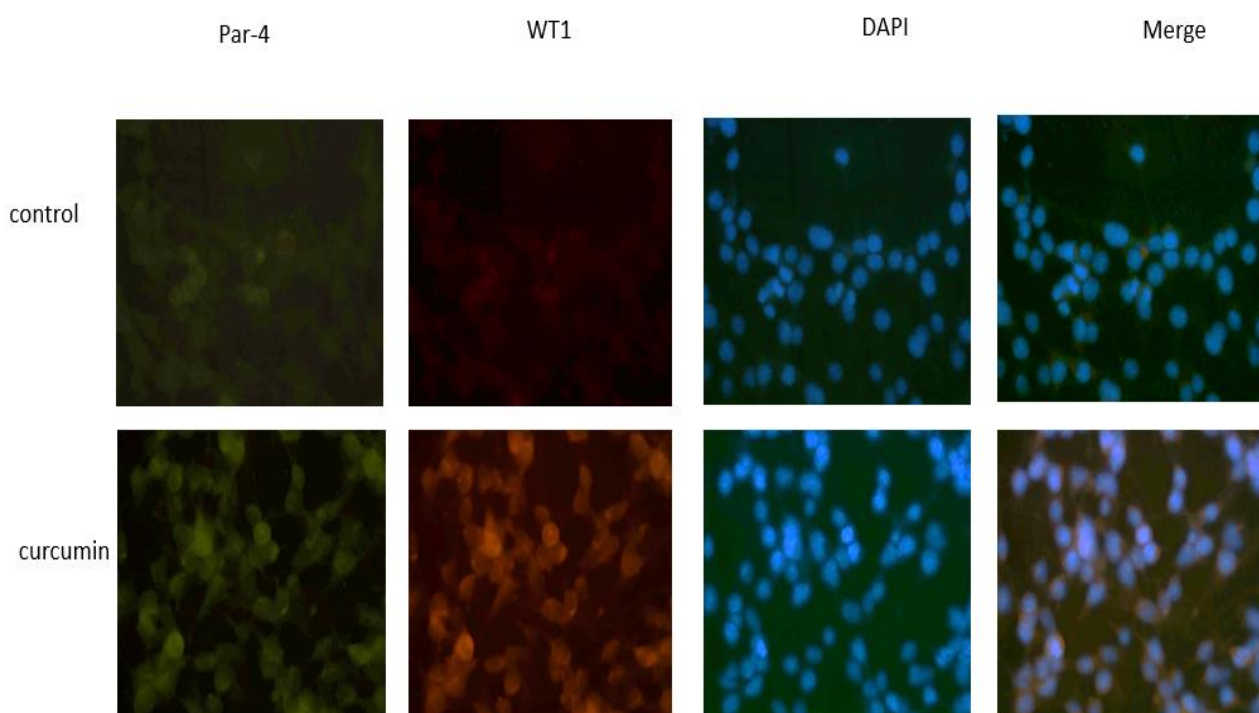
Análisis de Par-4 y WT1 por Inmunofluorescencia

Para determinar con mayor precisión la expresión de las proteínas Par-4 y WT1 se realizó una Inmunofluorescencia. Para analizar la expresión y co-localización de WT1 y Par-4, en las células se realizó mediante la intensidad en pixeles en el Software Imagen pro plus; la localización de las proteínas se realizó mediante el ensayo de la co-localización DAPI (núcleo)/Rojo Tx (WT1) y Fic para Par-4 manifestando una diferencia estadística significativa tanto en la expresión como en la localización (figura 19A).

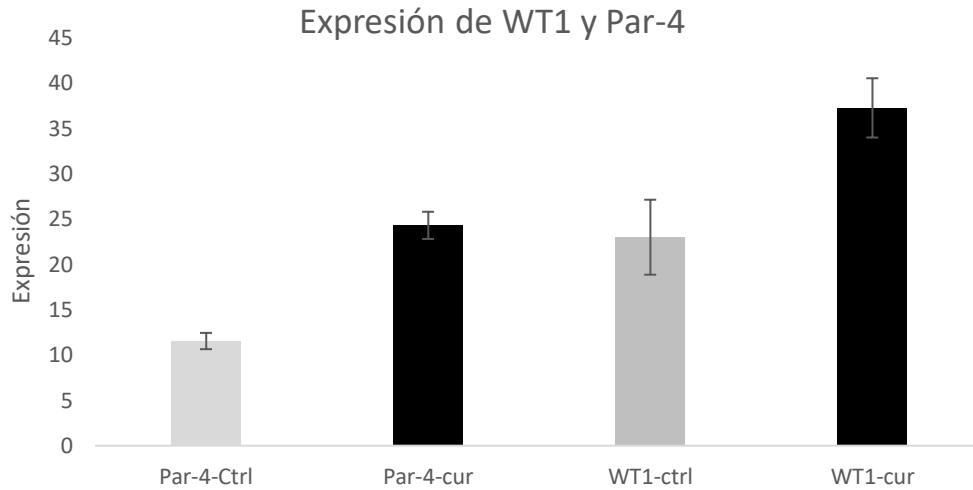
Las células B16F10 después de ser tratadas con curcumina por 24 h incrementaron la expresión tanto de Par-4 como de WT1, Par-4 presentó un incremento en su expresión del 110% mientras que la proteína WT1 un incremento del 47% (figura 19B).

De acuerdo con la co-localización con el DAPI, Par-4 se localiza en el núcleo, en un 96 % de las células con y sin tratamiento de curcumina. Mientras que WT1 en un 20% de las células sin tratamiento, y un 97% de células que recibieron tratamiento. Además, la localización Par-4-WT1 en las células no tratadas fue de un 30% mientras que en las células tratadas se incrementa a un 75%, lo que indica que la curcumina modula la movilidad de WT1 (figura 19C).

A)



B)



C)

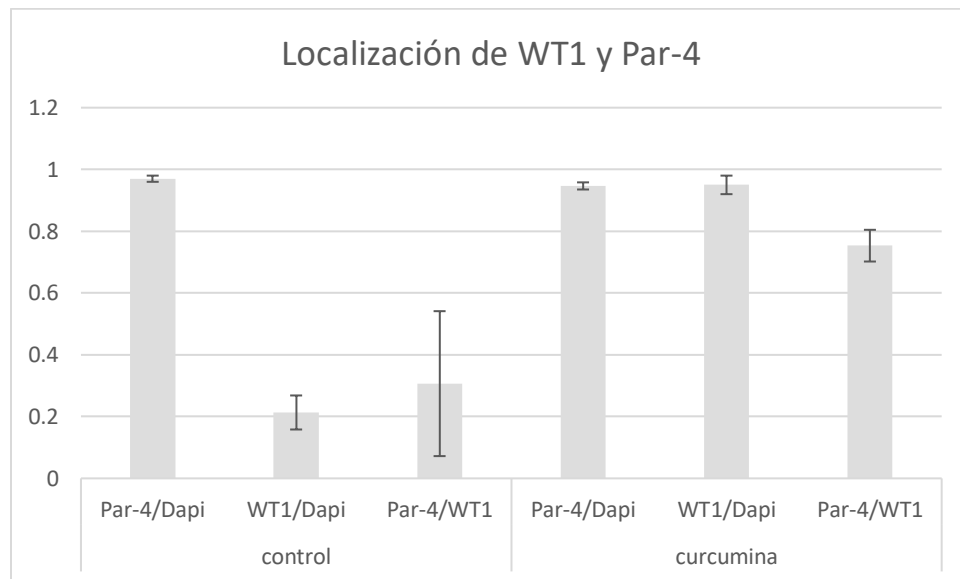


Figura 19. Inmunofluorescencia de Par-4 y WT1. en células B16F10 tratadas curcumina 20 μ M en 24 h. A) Inmunofluorescencia en células tratadas con curcumina 20 μ M por 24h. B) Análisis de la expresión de Par-4 y WT1. C) Análisis de la localización nuclear Par-4 y WT1 Análisis densito métrico se realizó utilizando 5 células de 5 campos diferentes y se realizó el promedio y la desviación estándar.

DISCUSIÓN

En este estudio se evaluó la modulación de los genes Par-4 y WT1 en las líneas celulares A549 (adenocarcinoma pulmonar), MCF-7 (cáncer de mama) y B16F10 (melanoma murino), tratadas con curcumina por 24 h. Previamente, se ha reconocido que Par-4 actúa como un gen supresor de tumores, debido a que modula selectivamente la apoptosis en células carcinogénicas y el rol de WT1 como oncogén en estos tipos de cáncer. Y se ha observado que Par-4 interactúa con WT1 (Johnstone et al. 1996); mecanismo mediante el cual puede activar la función de p53 de inducir apoptosis, a través de la regulación represora de WT1, (Maheswaran et al. 1995). Además, Par-4 regula Bcl-2 a través de un sitio de unión a WT1, en el promotor de Bcl-2 (Cheema et al. 2003).

En las líneas celulares A549, MCF-7 y B16F10, evaluadas mediante un ensayo de MTT realizado con el tratamiento a 24h se observó un decremento de células viables dependiendo de la dosis del tratamiento. Asimismo, en las células MCF-7 se analizó a 24h, observando una disminución de viabilidad celular con dependencia del tiempo. Se observó que había una correspondencia entre el incremento de expresión de Par-4 con el decremento en la viabilidad por lo que se decidió elegir el tiempo de 24h, para observar la diferencia morfológica celular, así como la localización de la expresión proteica de Par-4 y WT1.

Además, mediante RT-PCR se encontró que a una concentración de 20 μ M de curcumina, existe un aumento de la expresión proteica de Par-4, WT1 y Bcl-2, el cual decreciente al incrementar la dosis a 60 μ M de curcumina (Figuras 10, 11 y 20). Lo cual se puede correlacionar con la disminución de estos genes a 60 μ M de curcumina cuando la viabilidad celular ya se encuentra muy baja.

En las tres líneas celulares analizadas mediante inmunocitoquímica, A549 (adenocarcinoma pulmonar), MCF-7 (cáncer de mama) y B16F10 (melanoma murino), se observó un aumento de expresión citoplasmática de WT1 después que las células se trataron con curcumina por 24 h. También, se observaron pocas células con expresión nuclear (Figuras 12, 13 y 14). Anuchapreeda et al. en 2006 reportó el mecanismo inhibitorio de la curcumina en células leucémicas en la expresión de WT1. Sin embargo, aquí se muestra un incremento en la expresión, esto puede deberse a que WT1 se expresa en el núcleo para

realizar sus funciones oncogénicas, favoreciendo la proliferación celular, lo que concuerda con la observación de su expresión nuclear únicamente en células en mitosis. Por lo anterior, el mecanismo inhibitor de la curcumina en la expresión de WT1, puede estar dado por un cambio en su localización de núcleo a citoplasma, inhibiendo con esto su función oncogénica.

En cuanto a la expresión de Par-4 los resultados fueron diferentes en las líneas celulares analizadas. En la línea celular A549, se observó una reducción en la expresión de Par-4 (A-10) y una localización citoplasmática predominante (Figura 14). Lo cual fue contrario a lo esperado, ya que se esperaba una mayor expresión de Par-4 después del tratamiento con curcumina. Tal como se encontró en la línea celular MCF-7, en las cuales se observó un ligero incremento de la expresión nuclear de Par-4 (Figura 13). Lo cual concuerda con lo anteriormente reportado por (Arellano-Rodríguez 2018).

Y en la línea B16F10, se observó un accenso en la expresión citoplasmática (Figura 12) y una disminución del número de células, lo cual indica que se está produciendo una muerte celular; sin embargo, al no encontrarse en el núcleo la expresión de Par-4 es importante elucidar el mecanismo de muerte celular.

En la figura 15 se observa la expresión de Par-4 en células tratadas con curcumina 60µM por 24h. Así como los cambios morfológicos inducidos en esta línea celular. Esto puede deberse a la inducción de la apoptosis a través de Par-4.

Posteriormente, se encontró que la expresión del gen Bcl-2 es mayor en la línea celular de B16F10.

En otros estudios, se ha documentado que la curcumina inhibe la proliferación de NSCLC, a través de la regulación de citocromo C y Bcl-2 / Bax (Li Y 2013). Asimismo, que la curcumina tiene efectos anti proliferativos debido a la disminución con STAT3 y TGF-B, por otro lado, una inhibición de la carcinogénesis a través de la disminución de Ras. Mientras que una pérdida de Par-4 se ha relacionado con la formación de carcinomas a través de la vía Ras.

En relación con la metástasis y angiogénesis, se ha demostrado que la curcumina inhibe estos procesos mediante la disminución de VEGF-1. En el proceso de angiogénesis,

la promoción de la progresión tumoral por WT1 está determinada por medio de la regulación de VEGF (Wagner et al. 2014).

También, se ha comprobado que la curcumina tiene un efecto en la sensibilización a radioterapia y quimioterapia a través del incremento de Bax y un descenso de Bcl-2.

Además, WT1 funciona como inhibidor de la apoptosis, mediante la regulación transcripcional de Bax, proteína proapoptótica de la vía intrínseca de este proceso (Ito, *et al.* 2006; Johnstone, *et al.* 1996; Xi Wang, *et al.* 2013) Tatsumi et al. 2008 citado por (Li 2015).

Por lo anterior, los resultados demuestran que la curcumina tiene la capacidad de modular el gen Bcl-2 que se encuentra río abajo de WT1 y Par-4 en la vía de señalización de apoptosis.

CONCLUSIONES

1. La curcumina incrementa el nivel de expresión proteica de Par-4, en las líneas celulares (humanas y murino) de cáncer A549, MCF-7 y B16F10.
2. La curcumina modula positivamente el gen *bcl-2* que se encuentra río abajo de WT1 y Par-4 en la vía de señalización de apoptosis.
3. La curcumina induce localización citoplasmática de WT1 en las líneas de cáncer A549, MCF-7 y B16F10.
4. La curcumina induce localización citoplasmática de Par-4 en las líneas celulares A549 y B16F10.
5. La morfología celular de la línea celular B16F10 cambia a una concentración de 60 μM .

PERSPECTIVAS

- 1. Determinar el efecto de la curcumina en los genes Bax, Bcl-X que se encuentran río abajo de WT1 y Par-4 en la vía de señalización de apoptosis.**
- 2. Determinar en la línea celular MCF-7, los niveles de expresión proteica de Par-4 a concentraciones distintas de curcumina.**

BIBLIOGRAFÍA

- Abbas, M., Kassim, S. A., Habib, M., Li, X., Shi, M., Wang, Z. C., Hu, Y., y Zhu, H. L. (2020). Clinical Evaluation of Serum Tumor Markers in Patients With Advanced-Stage Non-Small Cell Lung Cancer Treated With Palliative Chemotherapy in China. *Frontiers in Oncology*, 10(June). <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.00800>
- Alavanja, M. C. R. (2002). Biologic damage resulting from exposure to tobacco smoke and from radon: Implication for preventive interventions. *Oncogene*, 21(48 REV. ISS. 6), 7365–7375. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1205798>
- Alvarez, J. V., Pan, T. chi, Ruth, J., Feng, Y., Zhou, A., Pant, D., Grimley, J. S., Wandless, T. J., DeMichele, A., y Chodosh, L. A. (2013). Par-4 Downregulation Promotes Breast Cancer Recurrence by Preventing Multinucleation following Targeted Therapy. *Cancer Cell*, 24(1), 30–44.
- Anuchapreeda, S., Thanarattanakorn, P., Sittipreechacharn, S., y Chanarat, P. (2006). *Curcumin inhibits Wt1 gene expression in human leukemic K562 cells 1*. <https://doi.org/10.1111/j.1745-7254.2006.00291.x>
- Arellano-Rodríguez, N. C. (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*.
- Breslow, N. E., y Langholz, B. (1983). Childhood cancer incidence: Geographical and temporal variations. *International Journal of Cancer*, 32(6), 703–716. <https://doi.org/10.1002/ijc.2910320609>
- Busund, M., Bugge, M., Braaten, T., Waaseth, M., Rylander, C., y Lund, E. (2018). Progestin-only and combined oral contraceptives and receptor-defined premenopausal breast cancer risk: The Norwegian Women and Cancer Study. *International Journal of Cancer*, 142(11), 2293–2302. <https://doi.org/10.1002/IJC.31266>
- Call, K. M., Glaser, T., Ito, C. Y., Buckler, A. J., Pelletier, J., Haber, D. A., Rose, E. A., Kral, A., Yeger, H., Lewis, W. H., Jones, C., y Housman, D. E. (1990). Isolation and characterization of a zinc finger polypeptide gene at the human chromosome 11 Wilms' tumor locus. *Cell*, 60(3), 509–520. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(90\)90601-A](https://doi.org/10.1016/0092-8674(90)90601-A)
- Cardnell, R. J., Li, L., Sen, T., Bara, R., Tong, P., Fujimoto, J., Ireland, A. S., Guthrie, M. R., Bheddah, S., Banerjee, U., Kalu, N. N., Fan, Y. H., Dylla, S. J., Johnson, F. M., Wistuba, I. I., Oliver, T. G., Heymach, J. V., Glisson, B. S., Wang, J., y Byers, L. A. (2017). Protein expression of TTF1 and cMYC define distinct molecular subgroups of small cell lung cancer with unique vulnerabilities to aurora kinase inhibition, DLL3 targeting, and other targeted therapies. *Oncotarget*, 8(43), 73419–73432. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.20621>

- Chakraborty, M., Qiu, S. G., Rangnekar, V. M., Vasudevan, K. M., Rangnekar, V. M., y Rangnekar, V. M. (2001). Par-4 drives trafficking and activation of Fas and FasL to induce prostate cancer cell apoptosis and tumor regression. *Cancer Research*, *61*(19), 7255–7263.
- Cheema, S. K., Mishra, S. K., Rangnekar, V. M., Tari, A. M., Kumar, R., y Lopez-Berestein, G. (2003). Par-4 transcriptionally regulates bcl-2 through a WT1-binding site on the bcl-2 promoter. *Journal of Biological Chemistry*, *278*(22), 19995–20005. <https://doi.org/10.1074/jbc.M205865200>
- Colomer, R., Aranda-López, • I, Albanell, • J, García-Caballero, • T, Ciruelos, • E, López-García, • M A ´, Cortés, • J, Rojo, • F, Martín, • M, y Palacios-Calvo, • J. (2017). *Biomarkers in breast cancer: A consensus statement by the Spanish Society of Medical Oncology and the Spanish Society of Pathology*. <https://doi.org/10.1007/s12094-017-1800-5>
- Danaei, G., Vander Hoorn, S., Lopez, A., Murray, C., y Ezzati, M. (2005). Causes of cancer in the world: comparative risk assessment of nine behavioural and environmental risk factors. *Lancet (London, England)*, *366*(9499), 1784–1793. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)67725-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)67725-2)
- de Groot, P. M., Wu, C. C., Carter, B. W., y Munden, R. F. (2018). The epidemiology of lung cancer. In *Translational Lung Cancer Research* (Vol. 7, Issue 3, pp. 220–233). AME Publishing Company. <https://doi.org/10.21037/tlcr.2018.05.06>
- Del Pup, L., Codacci-Pisanelli, G., y Peccatori, F. (2019). Breast cancer risk of hormonal contraception: Counselling considering new evidence. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, *137*, 123–130. <https://doi.org/10.1016/J.CRITREVONC.2019.03.001>
- Diaz-Meco, M. T., y Moscat, J. (2008). Akt regulation and lung cancer: A novel role and mechanism of action for the tumor suppressor Par-4. In *Cell Cycle* (Vol. 7, Issue 18, pp. 2817–2820). Taylor and Francis Inc. <https://doi.org/10.4161/cc.7.18.6735>
- Flaherty, K., Robert, P., Hersey, C., Nathan, C., Garbe, P., Milhem, M., Demidov, L., Hassel, J., Rutkowski, P., Mohr, P., Dummer, R., Trefzer, U., Larkin, J., Utikal, J., Dreno, B., Nyakas, M., Middleton, M., Becker, J., Casey, M., ... Schadendorf, D. (2012). Improved survival with MEK inhibition in BRAF-mutated melanoma. *The New England Journal of Medicine*, *367*(2), 107–114. <https://doi.org/10.1056/NEJMOA1203421>
- Giordano, A., y Tommonaro, G. (2019). Curcumin and Cancer. *Nutrients*, *11*(10). <https://doi.org/10.3390/NU11102376>
- Guo, H., Treude, F., Krämer, O. H., Lüscher, B., y Hartkamp, J. (2019). PAR-4 overcomes chemo-resistance in breast cancer cells by antagonizing cIAP1. *Scientific Reports*, *9*(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-45209-9>
- Haber, D. A., Sohn, R. L., Buckler, A. J., Pelletier, J., Call, K. M., y Housman, D. E. (1991). Alternative splicing and genomic structure of the Wilms tumor gene WT1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*,

88(21), 9618–9622. <https://doi.org/10.1073/pnas.88.21.9618>

- Harbeck, N., Penault-Llorca, F., Cortes, J., Gnant, M., Houssami, N., Poortmans, P., Ruddy, K., Tsang, J., y Cardoso, F. (2019). Breast cancer. In *Nature Reviews Disease Primers* (Vol. 5, Issue 1). <https://doi.org/10.1038/s41572-019-0111-2>
- Hastie, N. D. (2017). Wilms' tumour 1 (WT1) in development, homeostasis and disease. *Development*, *144*(16), 2862–2872. <https://doi.org/10.1242/dev.153163>
- Hayashi, S., Oji, Y., Kanai, Y., Teramoto, T., Kitaichi, M., Kawaguchi, T., Okada, M., Sugiyama, H., y Matsumura, A. (2012). Low Wilms' Tumor Gene Expression in Tumor Tissues Predicts Poor Prognosis in Patients with Non-Small-Cell Lung Cancer. *Cancer Investigation*, *30*(2), 165–171. <https://doi.org/10.3109/07357907.2011.633291>
- Horvath, E. (2021). Molecular subtypes of breast cancer-What breast imaging radiologists need to know. *Rev Chil Radiol*, *27*(1), 17–26.
- Huen, M., Sy, S., y Chen, J. (2010). BRCA1 and its toolbox for the maintenance of genome integrity. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, *11*(2), 138–148. <https://doi.org/10.1038/NRM2831>
- Inoue, K., Sugiyama, H., Ogawa, H., Nakagawa, M., Yamagami, T., Miwa, H., Kita, K., Hiraoka, A., Masaoka, T., y Nasu, K. (1994). WT1 as a new prognostic factor and a new marker for the detection of minimal residual disease in acute leukemia. *Blood*, *84*(9), 3071–3079. <https://doi.org/10.1182/blood.V84.9.3071.3071>
- Ito, K., Oji, Y., Tatsumi, N., Shimizu, S., Kanai, Y., Nakazawa, T., Asada, M., Jomgeow, T., Aoyagi, S., Nakano, Y., Tamaki, H., Sakaguchi, N., Shirakata, T., Nishida, S., Kawakami, M., Tsuboi, A., Oka, Y., Tsujimoto, Y., y Sugiyama, H. (2006). Antiapoptotic function of 17AA(+)WT1 (Wilms' tumor gene) isoforms on the intrinsic apoptosis pathway. *Oncogene*, *25*(30), 4217–4229. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209455>
- Iwasa, J., Marshall, W. (2019) *Biología celular y molecular: conceptos y experimentos*. McGraw-Hill
- Jenkins, R. W., y Fisher, D. E. (2021). Treatment of Advanced Melanoma in 2020 and Beyond. *Journal of Investigative Dermatology*, *141*, 23–31. <https://doi.org/10.1016/j.jid.2020.03.943>
- Johnstone, R. W., See, R. H., Sells, S. F., Wang, J., Muthukkumar, S., Englert, C., Haber, D. A., Licht, J. D., Sugrue, S. P., Roberts, T., Rangnekar, V. M., y Shi, Y. (1996). A novel repressor, par-4, modulates transcription and growth suppression functions of the Wilms' tumor suppressor WT1. *Molecular and Cellular Biology*, *16*(12), 6945–6956. <https://doi.org/10.1128/mcb.16.12.6945>
- Joshi, J., Fernandez-Marcos, P. J., Galvez, A., Amanchy, R., Linares, J. F., Duran, A., Pathrose, P., Leitges, M., Cañamero, M., Collado, M., Salas, C., Serrano, M., Moscat, J., y Diaz-Meco, M. T. (2008). Par-4 inhibits Akt and suppresses Ras-induced lung tumorigenesis. *EMBO Journal*, *27*(16), 2181–2193. <https://doi.org/10.1038/emboj.2008.149>

- Li, X. (2015). *Wilms' tumor gene 1 in different types of cancer*.
- Lo, J. A., y Fisher, D. E. (2014). The melanoma revolution: From UV carcinogenesis to a new era in therapeutics. *Science*, 346(6212), 945–949.
<https://doi.org/10.1126/science.1253735>
- Madden, S. L., Cook, D. M., y Rauscher, F. J. (1993). A structure-function analysis of transcriptional repression mediated by the WT1, Wilms' tumor suppressor protein. *Oncogene*, 8(7), 1713–1720.
- Martínez-Amores Martínez, B., Vicente Martín, F. J., Durán Poveda, M., y Molina Villaverde, R. (2017). Melanoma. *Medicine (Spain)*, 12(33), 1980–1989.
<https://doi.org/10.1016/j.med.2017.04.022>
- Matsunaga, E. (1981). Genetics of Wilms' Tumor. *Human Genetics*, 57(7), 231–246.
- Méndez-López, L. F., Zapata-Benavides, P., Zavala-Pompa, A., Aguado-Barrera, M. E., Pacheco-Calleros, J., Rodríguez-Padilla, C., Cerda-Flores, R. M., Cortés-Gutiérrez, E. I., y Dávila-Rodríguez, M. I. (2010). Immunohistochemical Analysis of Prostate Apoptosis Response-4 (Par-4) in Mexican Women with Breast Cancer: A Preliminary Study. *Archives of Medical Research*, 41(4), 261–268.
<https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2010.05.005>
- Menke, A. L., Van Der Eb, A. J., y Jochemsen, A. G. (1998). The Wilms' tumor 1 gene: Oncogene or tumor suppressor gene? *International Review of Cytology*, 181(44), 151–212. [https://doi.org/10.1016/s0074-7696\(08\)60418-0](https://doi.org/10.1016/s0074-7696(08)60418-0)
- México, G. de. (2021). *Cáncer de piel duplica su incidencia cada 10 años* | Secretaría de Salud | Gobierno | [gob.mx](https://www.gob.mx/salud/prensa/cancer-de-piel-duplica-su-incidencia-cada-10-anos). <https://www.gob.mx/salud/prensa/cancer-de-piel-duplica-su-incidencia-cada-10-anos>
- Mørch, L. S., Skovlund, C. W., Hannaford, P. C., Iversen, L., Fielding, S., y Lidegaard, Ø. (2017). Contemporary Hormonal Contraception and the Risk of Breast Cancer. [Http://Dx.Doi.Org/10.1056/NEJMoa1700732](http://Dx.Doi.Org/10.1056/NEJMoa1700732), 377(23), 2228–2239.
<https://doi.org/10.1056/NEJMoa1700732>
- Nabavi, S. M., Russo, G. L., Tedesco, I., Daglia, M., Orhan, I. E., Nabavi, S. F., Bishayee, A., Nagulapalli Venkata, K. C., Abdollahi, M., y Hajheydari, Z. (2018). Curcumin and Melanoma: From Chemistry to Medicine. *Nutrition and Cancer*, 70(2), 164–175.
<https://doi.org/10.1080/01635581.2018.1412485>
- Nagai, M. A., Gerhard, R., Salaorni, S., Guerreiro Fregnani, J. H. T., Nonogaki, S., Netto Mário, M., y Augusto Soares, F. (2010). Down-regulation of the candidate tumor suppressor gene PAR-4 is associated with poor prognosis in breast cancer. *International Journal of Oncology*, 37(1), 41–49.
https://doi.org/10.3892/ijo_00000651
- National Cancer Institute. (2014). *Browse the Tables and Figures - SEER Cancer Statistics Review (CSR) 1975-2014*.
https://seer.cancer.gov/archive/csr/1975_2014/browse_csr.php?sectionSEL=1ypageSEL=sect_01_zfig.02

- National Cancer Institute. (2019). *SEER*Stat Databases: November 2019 Submission*. Surveillance, Epidemiology, and End Results Program. <https://seer.cancer.gov/data-software/documentation/seerstat/nov2019/>
- Nishida, S., y Sugiyama, H. (2016). Immunotherapy targeting WT1: Designing a protocol for WT1 peptide-based cancer vaccine. *Methods in Molecular Biology*, 1467(1), 221–232. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-4023-3_19
- O'Reilly, K. M. A., McLaughlin, A. M., Beckett, W. S., y Sime, P. J. (2007). Asbestos-Related Lung Disease. In *American Family Physician* (Vol. 75, Issue 5). www.aafp.org/afp.
- Oji, Y., Miyoshi, S., Maeda, H., Hayashi, S., Tamaki, H., Nakatsuka, S. I., Yao, M., Takahashi, E., Nakano, Y., Hirabayashi, H., Shintani, Y., Oka, Y., Tsuboi, A., Hosen, N., Asada, M., Fujioka, T., Murakami, M., Kanato, K., Motomura, M., ... Sugiyama, H. (2002). Overexpression of the Wilms' tumor gene WT1 in de novo lung cancers. *International Journal of Cancer*, 100(3), 297–303. <https://doi.org/10.1002/ijc.10476>
- Oji, Y., Ogawa, H., Tamaki, H., Oka, Y., Tsuboi, A., Kim, E. H., Soma, T., Tatekawa, T., Kawakami, M., Asada, M., Kishimoto, T., y Sugiyama, H. (1999). Expression of the Wilms' tumor gene WT1 in solid tumors and its involvement in tumor cell growth. *Japanese Journal of Cancer Research*, 90(2), 194–204. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.1999.tb00733.x>
- Pandit, P., Patil, R., Palwe, V., Gandhe, S., Patil, R., y Nagarkar, R. (2020). Prevalence of Molecular Subtypes of Breast Cancer: A Single Institutional Experience of 2062 Patients. *European Journal of Breast Health*, 16(1), 39. <https://doi.org/10.5152/EJBH.2019.4997>
- Rupprecht, H. D., Drummond, I. A., Madden, S. L., Rauscher, F. J., y Sukhatme, V. P. (1994). The Wilms' Tumor Suppressor Gene WT1 Is Negatively Autoregulated. *The Journal Of Biological Chemistry*, 269(8), 6198–6206.
- Satherley, L. K., Sun, P.-H., Ji, K., Mson, M., Hargest, R., Jiang, W. G., y Ye, L. (2016). Prostate Apoptosis Response-4 (PAR4) Suppresses Growth and Invasion of Breast Cancer Cells and Is Positively Associated with Patient Survival. *Anticancer Research*, 1227–1235. <http://ar.iarjournals.org/content/36/3/1227.full.pdf>
- Shehzad, A., Qureshi, M., Anwar, M. N., y Lee, Y. S. (2017). Multifunctional Curcumin Mediate Multitherapeutic Effects. *Journal of Food Science*, 82(9) 2006–2015. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.13793>
- Shen, H., Xu, W., Wu, Z., Tang, H., Xie, Y., y Zhong, X. (2007). Down-regulation of WT1/+17AA gene expression using RNAi and modulating leukemia cell chemotherapy resistance. *Haematologica*, 92(9), 1270–1272. <https://doi.org/10.3324/haematol.11010>
- Shiovitz, S., y Korde, L. A. (2015). Genetics of breast cancer: a topic in evolution. *Annals of Oncology*, 26(7), 1291. <https://doi.org/10.1093/ANNONC/MDV022>
- Srivastava, S., y Kramer, B. S. (2018). Validation: a critical step in bringing biomarkers to

- clinical fruition. *Annals of Epidemiology*, 28(2), 135–138.
<https://doi.org/10.1016/j.annepidem.2017.10.013>
- Sugiyama, H. (2010). WT1 (Wilms' tumor gene 1): Biology and cancer immunotherapy. *Japanese Journal of Clinical Oncology*, 40(5), 377–387.
<https://doi.org/10.1093/jjco/hyp194>
- Szychot, E., Apps, J., y Pritchard-Jones, K. (2014). Wilms' tumor: biology, diagnosis and treatment. *Translational Pediatrics*, 3(1), 12–24. <https://doi.org/10.3978/j.issn.2224-4336.2014.01.09>
- Tamaki, H., Ogawa, H., Ohyashiki, K., Ohyashiki, H., Iwama, H., Inoue, K., Soma, T., Oka, Y., Tatekawa, T., Oji, Y., Tsuboi, A., Kim, E. H., Kawakami, M., Fuchigami, K., Tomonaga, M., Toyama, K., Aozasa, K., Kishimoto, T., y Sugiyama, H. (1999). The Wilms' tumor gene WT1 is a good marker for diagnosis of disease progression of myelodysplastic syndromes. *Leukemia*, 13(3), 393–399.
<https://doi.org/10.1038/sj.leu.2401341>
- Tarhini, A., y Kudchadkar, R. R. (2018). Predictive and on-treatment monitoring biomarkers in advanced melanoma: Moving toward personalized medicine. *Cancer Treatment Reviews*, 71, 8–18. <https://doi.org/10.1016/J.CTRV.2018.09.005>
- Tatsumi, N., Hojo, N., Sakamoto, H., Inaba, R., Moriguchi, N., Matsuno, K., Fukuda, M., Matsumura, A., Hayashi, S., Morimoto, S., Nakata, J., Fujiki, F., Nishida, S., Nakajima, H., Tsuboi, A., Oka, Y., Hosen, N., Sugiyama, H., y Oji, Y. (2015). Identification of a novel C-terminal truncated WT1 isoform with antagonistic effects against major WT1 isoforms. *PLoS ONE*, 10(6), 1–21.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0130578>
- Taylor, A., Brady, A., Frayling, I., Hanson, H., Tischkowitz, M., Turnbull, C., y Side, L. (2018). Consensus for genes to be included on cancer panel tests offered by UK genetics services: guidelines of the UK Cancer Genetics Group. *Journal of Medical Genetics*, 55(6), 372–377. <https://doi.org/10.1136/JMEDGENET-2017-105188>
- Thayyullathil, F., Rahman, A., Pallichankandy, S., Patel, M., y Galadari, S. (2014). *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.*
<https://doi.org/10.1016/j.fob.2014.08.005>
- Travis, W. D., Brambilla, E., Nicholson, A. G., Yatabe, Y., Austin, J. H. M., Beasley, M. B., Chirieac, L. R., Dacic, S., Duhig, E., Flieder, D. B., Geisinger, K., Hirsch, F. R., Ishikawa, Y., Kerr, K. M., Noguchi, M., Pelosi, G., Powell, C. A., Tsao, M. S., y Wistuba, I. (2015). The 2015 World Health Organization Classification of Lung Tumors: Impact of Genetic, Clinical and Radiologic Advances since the 2004 Classification. *Journal of Thcic Oncology*, 10(9), 1243–1260.
<https://doi.org/10.1097/JTO.0000000000000630>
- Vicent, S., Chen, R., Sayles, L. C., Lin, C., Walker, R. G., Gillespie, A. K., Subramanian, A., Hinkle, G., Yang, X., Saif, S., Root, D. E., Huff, V., Hahn, W. C., y Sweet-

- Cordero, E. A. (2010). Wilms tumor 1 (WT1) regulates KRAS-driven oncogenesis and senescence in mouse and human models. *The Journal of Clinical Investigation*, 120. <https://doi.org/10.1172/JCI44165>
- Villalobos, P., y Wistuba, I. I. (2017). Lung Cancer Biomarkers Guideline. *Hematol Oncol Clin North Am.*, 31(1), 13–29. <https://doi.org/10.1016/j.hoc.2016.08.006>.Lung
- Wagner, K. D., Cherfils-Vicini, J., Hosen, N., Hohenstein, P., Gilson, E., Hastie, N. D., Michiels, J. F., y Wagner, N. (2014). The Wilms tumour suppressor Wt1 is a major regulator of tumour angiogenesis and progression. *Nature Communications*, 5. <https://doi.org/10.1038/ncomms6852>
- Wang, L. J., Chen, P. R., Hsu, L. P., Hsu, W. L., Liu, D. W., Chang, C. H., Hsu, Y. C., y Lee, J. W. (2014). Concomitant induction of apoptosis and autophagy by prostate apoptosis response-4 in hypopharyngeal carcinoma cells. *American Journal of Pathology*, 184(2), 418–430. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2013.10.012>
- Wang, Xi, Gao, P., Lin, F., Long, M., Weng, Y., Ouyang, Y., Liu, L., Wei, J., Chen, X., He, T., Zhang, H., y Dong, K. (2013). Wilms' tumour suppressor gene 1 (WT1) is involved in the carcinogenesis of Lung cancer through interaction with PI3K/Akt pathway. *Cancer Cell International*, 13(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/1475-2867-13-114>
- Wang, Xin, Zhang, Y., Zhang, Y., Mu, H., Hu, M., Wang, R., Wang, R., y Liu, L. (2020). *Estudio sobre la correlación de marcadores inmunohistoquímicos TTF- 1 , CD56 , P40 y otras características clínicas con el pronóstico del cáncer de pulmón microcítico*. 20(8), 522–527.
- WHO, W. H. O. (2021). Globocan 2020, Chart. In *The Global Cancer Observatory* (Vol. 929).
- Xu, C., Wu, C., Xia, Y., Zhong, Z., Liu, X., Xu, J., Cui, F., Chen, B., Røe, O. D., Li, A., y Chen, Y. (2013). WT1 Promotes Cell Proliferation in Non-Small Cell Lung Cancer Cell Lines through Up-Regulating Cyclin D1 and p-pRb In Vitro and In Vivo. *PLoS ONE*, 8(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0068837>
- Yang, L., Han, Y., Saurez Saiz, F., y Minden, M. D. (2007). A tumor suppressor and oncogene: The WT1 story. In *Leukemia* (Vol. 21, Issue 5, pp. 868–876). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2404624>
- Zamora-Avila, D. E., Franco-Molina, M. A., Trejo-Avila, L. M., Rodríguez-Padilla, C., Reséndez-Pérez, D., y Zapata-Benavides, P. (2007). RNAi silencing of the WT1 gene inhibits cell proliferation and induces apoptosis in the B16F10 murine melanoma cell line. *Melanoma Research*, 17(6), 341–348. <https://doi.org/10.1097/CMR.0b013e3282efd3ae>
- Zapata-Benavides, P., Thompson-Armendariz, F. G., Arellano-Rodríguez, M., Franco-Molina, M. A., Mendoza-Gamboa, E., Saavedra-Alonso, S., Zacarias-Hernández, J. L., Trejo-Avila, L. M., y Rodríguez-Padilla, C. (2019). ShRNA-WT1 potentiates anticancer effects of gemcitabine and cisplatin against B16F10 lung metastases in vitro and in vivo. *In Vivo*, 33(3), 777–785. <https://doi.org/10.21873/invivo.11539>