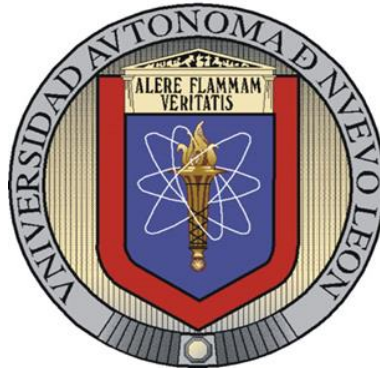


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**

**FACULTAD DE CIENCIA BIOLÓGICAS**



**CURCUMINA Y CÁNCER: PAR-4 COMO PRINCIPAL MEDIADOR EN  
MECANISMOS DE MUERTE Y SENSIBILIZACIÓN CELULAR**

POR

M.C. NORMA CESILIA ARELLANO RODRÍGUEZ

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


2024

**CURCUMINA Y CÁNCER: PAR-4 COMO PRINCIPAL MEDIADOR EN  
MECANISMOS DE MUERTE Y SENSIBILIZACIÓN CELULAR**

**Comité de Tesis**



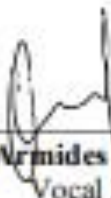
**Dr. Pablo Zapata Benavides**  
Director



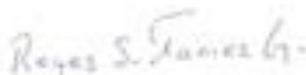
**Dra. Cristina Rodríguez Padilla**  
Secretario



**Dra. Ana Carolina Martínez Torres**  
Vocal 1



**Dr. Moisés Armides Franco Molina**  
Vocal 2



**Dr. Reyes Tamez Guerra**  
Vocal 3



**Dra. Katiushka Arcevaló Niño**  
Subdirector de posgrado

**SUBDIRECCIÓN  
DE POSGRADO**

**CURCUMINA Y CÁNCER: PAR-4 COMO PRINCIPAL MEDIADOR EN  
MECANISMOS DE MUERTE Y SENSIBILIZACIÓN CELULAR**

**Comité de Tesis**

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'P. Z. B.', is positioned above a horizontal line.

**Dr. Pablo Zapata Benavides**  
Director

## **AVISO DERECHOS DE AUTOR**

**DERECHOS RESERVADOS©  
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

**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 autor.

## AGRADECIMIENTOS

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

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

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

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

A la Dra. Mariela Arellano Rodríguez por su apoyo, consejos y ayuda durante la realización de este trabajo.

Al mi comité de tesis por enriquecer y apoyar el proyecto, por el seguimiento en cada seminario.

A mis compañeros del laboratorio y grandes amigos Juan Manuel, Gerardo, Juan Pablo, Adriana, Dr. Santiago, Gustavo y Alely por su apoyo en lo profesional, en lo personal y proporcionar un buen ambiente de trabajo, Gracias.



**CONAHCYT**  
CONSEJO NACIONAL DE HUMANIDADES  
CIENCIAS Y TECNOLOGÍAS

## DEDICATORIA

Este trabajo está dedicado:

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

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

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

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

A mi hermana Mariela y al Dr. Pablo Zapata por todo su apoyo y motivación.

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

## ÍNDICE

3. INTRODUCCIÓN.....	15
4. ANTECEDENTES.....	17
4.1 Cáncer de mama.....	17
4.1.1 Epidemiología.....	17
4.1.2 Clasificación.....	18
4.1.3 Factores de riesgo.....	20
4.1.4 Tratamiento.....	20
4.2 Curcumina.....	21
4.2.1 Mecanismos de muerte por curcumina.....	22
4.2.2 Curcumina en cáncer.....	23
4.3 Transición de epitelio mesénquima.....	24
4.4 Proteína de respuesta a la apoptosis de próstata-4 (Par-4).....	24
4.4.1 Función y localización de Par-4.....	26
4.4.2 Regulación de Par-4.....	30
5. JUSTIFICACIÓN.....	35
6. HIPÓTESIS.....	36
7. OBJETIVO GENERAL.....	37
8. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	37
9. RESULTADOS.....	38
9.1 CAPITULO I.....	38
9.2 CAPITULO II.....	42
9.3 CAPITULO III.....	44
9.4 CAPÍTULO IV.....	53
9.5 CAPÍTULO V.....	55
10. CONCLUSIONES.....	68
11. PERSPECTIVA.....	69
12. BIBLIOGRAFÍA.....	70

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Estructura de la curcumina.....	21
Figura 2 Representación esquemática de la proteína Par-4.....	26
Figura 3 Representación esquemática de la fosforilación de la proteína Par-4.....	27
Figura 4 Mecanismo para la apoptosis selectiva en células cancerígenas mediada por SAC.....	29
Figura 5 Representación esquemática de las vías mediante las cuales Par-4/ NF- $\kappa$ B Inducen apoptosis.....	30
Figura 6 Cascadas de señalización que involucran a Par-4.....	33



## LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

%	Por ciento
mg	Microgramos
mL	Microlitros
mg	miligramos
°C	Grados centígrados
μM	Micro molar
Cm <sup>2</sup>	Centímetros cuadrados
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
CQ	cloroquina
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
ADN	Ácido desoxirribonucleico
GRP78	proteína reguladora para la glucosa 78
h	horas
HDFn	Fibroblasto dérmico primario normal
MCF-7	Michigan Cancer Foundation
MDA-MB-231	MD Anderson-Melanoma Breast-231
min	Minutos
mM	milimolar
MTT	Bromuro de 3-(4,5dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol
NaCl	cloruro de sodio
Par-4	Respuesta a la apoptosis de próstata 4
PBS	Buffer salino de fosfatos
pH	Potencial de hidrógeno
PI	Yoduro de propidio
RE	retículo endoplásmico
rpm	revoluciones por minuto
SAC	Selectivo para Apoptosis de Células Cancerígenas
SDS	Dodecilsulfato sódico

SFB	siero fetal bovino
TBS	Solución salina tamponada con tris
V	Volts
Wb	Western blot
$\beta$ -actina	Beta actina
$\beta$ -mercaptoetanol	Beta mercaptoetanol
kDa	Kilodalton
PR	Receptor de progesterona
TNBC	Cáncer de mama triple negativo
WT1	Tumor de Wilm's
CC <sub>50</sub>	Concentración citotóxica 50
ng	nanogramos
nm	nanomolar
mL	mililitros
Ca <sub>2</sub> Cl	cloruro de calcio
CI <sub>50</sub>	concentración inhibitoria 50
HEPES	Ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N-2-etanosulfónico
DL <sub>50</sub>	dosis letal 50
SD	desviación estándar
V	Volumen
Kg	kilogramo
HRP	Peroxidasa de rábano
B16-F10	Línea celular de melanoma murino
ARN	Ácido Ribonucleico
ARNm	Ácido Ribonucleico mensajero
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
PCR	Reacción en cadena de polimerasa
NaOH	Hidróxido de sodio
M	Molar

## 1. RESUMEN

El cáncer es una de las principales causas de muerte a nivel mundial antes de los 70 años, el cáncer de mama afecta a hombres y mujeres, siendo más común en las mujeres representando la principal causa de muerte. La mayoría de las muertes por cáncer se deben principalmente a la recurrencia del tumor. Par-4 es una proteína proapoptótica que se expresa de manera basal en la mayoría de las células. Se ha observado que la expresión de Par-4 está disminuida en muchos tipos de cáncer y se asocia con la agresividad del tumor y una menor supervivencia de los pacientes. Par-4 induce apoptosis tanto por vía intrínseca como por vía extrínseca interactuando directamente con la proteína GRP78, Par-4 soluble puede ser inducida por diferentes secretagogos.

Curcumina, un compuesto polifenólico, tiene la capacidad de quimiosensibilizar e inducir la muerte en células cancerígenas. El objetivo de esta tesis fue analizar la capacidad de la curcumina para sensibilizar a las células cancerígenas e incrementar la expresión y secreción de Par-4, tanto *in vitro* como “*in vivo*” en células de cáncer de mama. Para ello, se utilizaron líneas celulares de cáncer de mama, cáncer cervicouterino y melanoma murino, así como ratones Balb/c.

Las células cancerígenas fueron tratadas con diferentes concentraciones de curcumina, sola y en combinación con cisplatino para evaluar su viabilidad. Las células de cáncer de mama se incubaron con diferentes concentraciones de curcumina y se analizó la expresión de Par-4 intracelular y soluble. Posteriormente, ratones Balb/c fueron inoculados con curcumina y se analizó la expresión de Par-4 soluble en suero. Finalmente, las células de cáncer de mama se incubaron con Par-4 soluble (proveniente de medio condicionado y plasma de ratones) para analizar si se sensibilizaban frente al cisplatino.

El análisis de viabilidad mediante la técnica de MTT mostró que la curcumina indujo una inhibición de la viabilidad celular y presentó sinergismo al combinarse con cisplatino. El análisis mediante inmunodetección (Western blot) e inmunofluorescencia reveló un incremento en la expresión de Par-4 y WT1 intracelulares, así como de Par-4 soluble en medio condicionado y plasma, después del tratamiento con curcumina. Además, el análisis de viabilidad (MTT) mostró que Par-4 soluble sensibilizó las células de cáncer de mama frente al cisplatino.

Finalmente, el ensayo en el modelo murino (ratones Balb/c) reveló una reducción significativa del tamaño del tumor y una menor incidencia de metástasis en comparación con el grupo control. Nuestros resultados sugieren que el tratamiento con curcumina puede incrementar la expresión y secreción de Par-4, lo cual sensibiliza a las células cancerígenas al cisplatino y reduce la viabilidad de estas.

Este estudio destaca la importancia de Par-4 en el cáncer de mama y sugiere que la curcumina podría ser una herramienta eficaz para mejorar los resultados clínicos y la supervivencia de los pacientes con cáncer de mama.

## 2. ABSTRACT

The cancer is one of the leading causes of death worldwide before the age of 70, breast cancer affects men and women, being more common in women representing the main cause of death. Most cancer deaths are mainly due to tumor recurrence. Par-4 is a pro-apoptotic protein that is expressed basally in most cells. Par-4 expression has been observed to decrease in many types of cancer and is associated with tumor aggressiveness and lower patient survival. Par-4 induces apoptosis both intrinsically and extrinsically by interacting directly with the GRP78 protein, soluble Par-4 can be induced by different secretagogues.

Curcumin, a polyphenolic compound, has the ability to chemosensitize and induce death in cancer cells. The aim of this thesis was to analyze the ability of curcumin to sensitize cancer cells and increase the expression and secretion of Par-4, both *in vitro* and "in vivo" in breast cancer cells. To do this, breast cancer, cervical cancer and murine melanoma cell lines were used, as well as Balb/c mice.

The cancer cells were treated with different concentrations of curcumin, alone and in combination with cisplatin to assess their viability. Breast cancer cells were incubated with different concentrations of curcumin and the expression of intracellular and soluble Par-4 was analyzed. Subsequently, Balb/c mice were inoculated with curcumin and the expression of soluble Par-4 in serum was analyzed. Finally, breast cancer cells were incubated with soluble Par-4 (from conditioned medium and mouse plasma) to analyze whether they were sensitized to cisplatin.

The viability analysis using the MTT technique showed that curcumin induced an inhibition of cell viability and presented synergism when combined with cisplatin. Analysis by Western blot and immunofluorescence revealed an increase in the expression of intracellular Par-4 and WT1, as well as soluble Par-4 in conditioned medium and plasma, after curcumin treatment. In addition, the viability analysis (MTT) showed that soluble Par-4 sensitized breast cancer cells to cisplatin.

Finally, the trial in the murine model (Balb/c mice) revealed a significant reduction in tumor size and a lower incidence of metastasis compared to the control group. Our results

suggest that curcumin treatment may increase Par-4 expression and secretion, which sensitizes cancer cells to cisplatin and reduces their viability.

This study highlights the importance of Par-4 in breast cancer and suggests that curcumin could be an effective tool for improving clinical outcomes and survival for breast cancer patients.

### 3. INTRODUCCIÓN

Par-4 juega un papel importante en la homeostasis celular, ya que ayuda en la regulación del ciclo menstrual y durante la embriogénesis. En cáncer se ha observado que puede jugar un papel pronóstico y terapéutico, debido a que los niveles más altos de Par-4 se correlacionaron con un buen pronóstico y un bajo nivel de expresión con un mal pronóstico en términos de supervivencia; de hecho, se ha demostrado que Par-4 está disminuido en más del 70% de los cánceres renales, neuroblastoma y formas agudas y crónicas de leucemia, páncreas, próstata y mama.

Par-4 es un regulador clave de la supervivencia de las células cancerígenas y puede ser un objetivo para terapias dirigidas selectivas contra el cáncer, la expresión de Par-4 modula la apoptosis y ejerce efectos inhibidores del crecimiento y quimiosensibiliza las células a docetaxel y otras drogas. Por otra parte, la disminución en la expresión basal de Par-4 se ha asociado con la EMT, un fenotipo tumoral agresivo y podría representar un marcador pronóstico y predictivo adicional, además de ser uno de los principales determinantes en la regresión del cáncer de mama.

Par-4 es una proteína nuclear con una secuencia de zipper de leucina de aproximadamente 39 kDa en su extremo carboxilo terminal, que le permite la unión a proteínas y ADN, dos secuencias de localización nuclear (NLS1 y NLS2), una secuencia de exportación nuclear y un único dominio selectivo para apoptosis de células cancerígenas (SAC) de 59 aminoácidos, localizado entre los aminoácidos 137 y 195, es la unidad funcional principal para la inducción de apoptosis. Par-4 tiene la capacidad de inducir selectivamente apoptosis en células cancerosas, pero no en normales. La apoptosis se lleva a cabo por dos vías: la vía extrínseca que es mediante la unión del dominio SAC al receptor GRP78 (proteína reguladora para la glucosa 78), el cual se encuentra altamente expresado en la superficie de células cancerosas, esta unión inicia la señalización para la activación de receptores de muerte como TRAIL y la activación de caspasa 8. La vía intrínseca se lleva a cabo mediante la inhibición de los mecanismos de sobrevivencia asociados a NF- $\kappa$ B superando los mecanismos protectores de las células, tales como la presencia de Bcl-xL, Bcl-2, la ausencia de la función p53 o PTEN y Al/Bfl1; y genes antiapoptóticos como inhibidor de apoptosis ligado a X (XIAP) que protegen de la apoptosis generada por TNF- $\alpha$ .

Para la activación de la apoptosis extrínseca es necesaria la presencia de Par-4 soluble (extracelular). Recientemente se ha probado el efecto de compuestos como la cloroquina (CQ), arilquin 1 y crizotinib, con actividad secretagogo para Par-4, es decir, tiene la capacidad de incrementar la secreción de Par-4. El incremento en la expresión de Par-4 intracelular como de Par-4 soluble, puede sensibilizar a las células cancerígenas a la apoptosis mediada por drogas.

En este trabajo se pretende demostrar si la curcumina incrementa y secreta Par-4 in vitro e in vivo, con efecto en células de cáncer de mama.



## **4. ANTECEDENTES**

### **4.1 Cáncer de mama**

#### **4.1.1 Epidemiología**

El cáncer se caracteriza por un crecimiento descontrolado de células debido a alteraciones genéticas. El cáncer de mama en mujeres es el tipo de cáncer más comúnmente diagnosticado, representando el 11.7% del total de casos, seguido por el cáncer de pulmón con un 11.4% y la principal causa de muerte por cáncer (Sung et al. 2021). Según la OMS, en 2022 se diagnosticaron 2.30 millones de mujeres con cáncer de mama, y 670,000 murieron por esta enfermedad. (World Health Organization. 2023., Sung et al. 2021).

El cáncer de mama afecta tanto a poblaciones de países desarrollados como en desarrollo. En Estados Unidos, representa el 30% de todos los nuevos cánceres diagnosticados cada año, el 12.5% de las mujeres han sido diagnosticadas con cáncer de mama, y el 3.5% fallece por esta causa, con tasas de mortalidad que aumentan con la edad según la sociedad Americana del Cáncer. El cáncer de mama también afecta a hombres, representa el 1% de los diagnósticos de cáncer de mama y el 0.5% de los casos de cáncer general (Weiss et al. 2005). Se estima que en 2024 habrá 310,720 nuevos casos de cáncer de mama invasivo en mujeres y 42,250 muertes en los Estados Unidos (American Cancer Society, 2024).

En México, el cáncer de mama también representa un problema de salud, durante el año 2022 se diagnosticaron 23,790 casos nuevos (27.64 por cada 100 mil habitantes en población de 20 años y más) y 7,888 muertes (9.0% del total de muertes por tumores) debido a este tipo de cáncer, de los cuales el 94.9% (7,838) fueron mujeres y 0.6% (50) hombres, Nuevo León alcanzó el segundo lugar con 24.72% defunciones (por cada 100,000 mujeres de 20 años o más) según datos registrados por el Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI, 2023).

#### 4.1.2 Clasificación

La clasificación de los carcinomas mamarios ha sido ampliamente estudiada. Existen varios criterios para clasificar el cáncer de mama. La clasificación histopatológica se basa en invasores y no invasores (*in situ*). El carcinoma ductal *in situ* (DCIS) representa del 15% al 20% de todos los cánceres de mama diagnosticado por lo general en etapas tempranas, mediante rastreo por mamografía y se caracteriza por la proliferación intraductal de células epiteliales malignas sin invasión a través de la membrana basal en el estroma circundante, aproximadamente el 49% de los casos de DCIS son de tipo luminal A (Ward et al. 2015; Kuo et al. 2018). El DCIS es el precursor inmediato del cáncer de mama invasivo, aproximadamente el 25% de los casos de DCIS son diagnosticados con cáncer de mama ductal invasivo después de la cirugía (Ward et al. 2015). El cáncer de mama ductal invasivo representa aproximadamente entre el 80%-90% de todos los casos de cáncer de mama y con mayor frecuencia (73.4%) presenta el fenotipo luminal A y de tipo basal (10.9%) en comparación con el DCIS con 62.5% y 7.7% respectivamente (Tamimi et al. 2008; Sharma et al. 2010; Mouabbi et al. 2022). El carcinoma lobulillar *in situ* (CLIS) se origina del lobulillo terminal ductal, y se puede distribuir de manera difusa por la mama. En las pacientes diagnosticadas con CLIS es común que más de un lobulillo este afectado, lo que incrementa el riesgo de desarrollar cáncer de mama invasor hasta un 30%. El carcinoma lobulillar invasivo (CLI) representa del 10% al 15% de todos los diagnósticos de cáncer de mama. El diagnóstico de CLIS generalmente se da antes de la menopausia, entre los 40 y 50 años. Menos del 10% de las mujeres diagnosticadas con CLIS ya han atravesado la menopausia, además de que se presenta con menos frecuencia en hombres (Castellanos et al. 2009; Breastcancer.org, 2018; Mouabbi et al. 2022). En contraste con el carcinoma invasor de mama que es capaz de invadir a través de la membrana basal en el estroma circundante (Kuo et al. 2018).

La clasificación del cáncer de mama ha sido categorizada en cuatro principales grupos basados en la expresión de receptores hormonales: Luminal A, luminal B, enriquecido con HER2, normal y basal (Irigoyen et al. 2011; Orrantia-Borunda et al. 2022). El cáncer de mama subtipo luminal A es el más frecuente, representa aproximadamente el 67% de los tumores, con alta expresión de genes relacionados con el receptor de estrógeno (RE) y baja expresión de genes relacionados con proliferación ( Ki67 menor al 20%) en

comparación con el luminal B, además de que puede ser tratado solo con hormonoterapia, por sus características se sugiere un mejor pronóstico para los pacientes en comparación con otros subtipos de cánceres de mama (Zepeda-Castilla et al. 2008; Inic et al. 2014; Gao et al. 2018). El subtipo luminal B tiende a ser de más alto grado y tiene peor pronóstico que el subtipo luminal A, este subtipo son RE positivos y pueden ser receptor de progesterona (PR) negativo, así como una expresión alta de Ki67 (mayor del 20%) requiere de terapia hormonal en combinación con quimioterapia ya que cuenta con más genes relacionados a proliferación (Zepeda-Castilla et al. 2008, Inic et al. 2014). El cáncer de mama HER2 positivo representa del 10% al 15% de los cánceres de mama diagnosticados, su característica principal es que cuenta con alta expresión de HER2, expresión o carencia de RE y PR y expresión de Ki67 (30% o más) lo cual le permite ser más agresivo y crecer con mayor rapidez en comparación con el subtipo luminal (Krishnamurti et al. 2014; Loibl & Gianni 2017). El cáncer de mama categorizado como basal es altamente agresivo, con frecuencia los pacientes que presentan este tipo de cáncer tienen mal pronóstico y son difíciles de tratar. Un gran porcentaje (70%-80%) de los cánceres de mama diagnosticados bajo el subtipo basal son triple negativo (TNBC), esto porque carecen de expresión de RE, PR y expresión de HER2. La nula presencia de estos marcadores tumorales son el principal obstáculo en la terapia de cáncer de mama, debido a que estos tumores tienden a ser altamente resistentes a la quimioterapia y terapias dirigidas con alta propensión a la recurrencia. Aproximadamente el 80% de todos los cánceres de mama presentan un comportamiento agresivo y están clasificados bajo el subtipo TNBC (Kuo et al. 2018; Hebbar et al. 2013; Rosales et al. 2016; Orrantia-Borunda et al. 2022).

La mayoría de las muertes por cáncer de mama se relacionan con metástasis y recaída de la enfermedad después del tratamiento del tumor primario. Esto se debe a que las células cancerosas residuales son capaces de sobrevivir a cirugía, radiaciones y terapias adyuvantes, sirviendo como un reservorio para la recurrencia del cáncer de mama. Sin embargo, se sabe poco sobre las vías que contribuyen a la supervivencia y recurrencia de las células residuales de cáncer de mama. Estudios han identificado a la proteína proapoptótica supresora de tumor Par-4 como un regulador crítico de la recurrencia del tumor mamario (Alvarez et al. 2013).

### **4.1.3 Factores de riesgo**

El cáncer de mama es una enfermedad multifactorial y, entre los factores de riesgo se incluyen la edad, historia familiar, consumo de alcohol, obesidad, sedentarismo, exposición a radiaciones ionizantes, factores endocrinos y reproductivos como: menarca temprana, edad avanzada al primer parto, nulidad, menopausia tardía, así como el uso de terapia de remplazo hormonal por más de cinco años (Hartmann et al. 2005; Eberl et al. 2005; Sant´Ana et al. 2016; Hebbar et al. 2013; Sifuentes-Alvarez et al. 2015).

Una alimentación saludable reduce el riesgo a padecer cáncer de mama, así como ejercicio regular, no fumar y mantener un peso adecuado, ya que existe una correlación positiva entre el incremento del riesgo de cáncer de mama y el creciente consumo de alimentos ricos en grasa, etanol y tabaco por las mujeres actuales (McTiernan et al. 2003; Sant´Ana et al., 2016; Pérez-Solis et al. 2016).

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

### **4.1.4 Tratamiento**

La terapia para este tipo de cáncer depende de la etapa y el estado clínico del paciente, además de las características anatómicas y patológicas de la enfermedad. El tratamiento local consiste en cirugía y radioterapia y el tratamiento sistémico consiste en terapia hormonal, quimioterapia y terapia biológica (Clarke et al. 2005; Maughan et al. 2010; Figueroa-Magalhães et al. 2014; Leal et al. 2016; Ben-Dror et al. 2022). El estatus

hormonal de las células de cáncer de mama determina las opciones de tratamiento. Durante varios años la cirugía y la quimioterapia neoadyuvante ha sido la base para el tratamiento del cáncer de mama. Sin embargo, han surgido otras opciones como las terapias dirigidas en combinación con la quimioterapia, la cual ha presentado una mejor respuesta a la enfermedad. Actualmente las terapias dirigidas son: el trastuzumab y (anticuerpo monoclonal dirigido contra HER2/neu), pertuzumab (anticuerpo monoclonal dirigido contra el dímero de HER2/neu) o tamoxifeno (fármaco antagonista del RE) que están diseñados para atacar los tumores que son HER2/neu y receptores hormonales positivos (Hebbar et al. 2013; IMSS, 2017; Fisusi & Akala et al. 2019; Ben-Dror et al. 2022; Pérez-García et al. 2022, Instituto Nacional del Cáncer HIH, 2023).

## 4.2 Curcumina

La curcumina (1,7-bis(4-hidroxi-3-metoxifenil)-1,6-heptadieno-3,5-diona fig. 6) es un compuesto polifenólico natural de pigmento amarillo extraído de la planta cúrcuma (*Cúrcuma longa*) aislado como un extracto crudo por Vogel y Pelletier en 1815 (Milobedeska et al. 1910), además de ser ampliamente utilizado como un agente colorante de alimentos, también se usa en diversos tratamientos de algunas enfermedades por su actividad biológica activa. Dentro de sus actividades se incluyen: antioxidante, anti-inflamatorio, anti-proliferativo, anti-angiogénico, anti-microbiano, anti-parasitario además de inmunomodulador. La curcumina también es capaz de suprimir la trombosis y protege contra el infarto del miocardio, así como de disminuir los niveles de azúcar en sangre en humanos (Aggarwal & Harikumar 2009; Waghela et al. 2015; Hewlings et al. 2017).

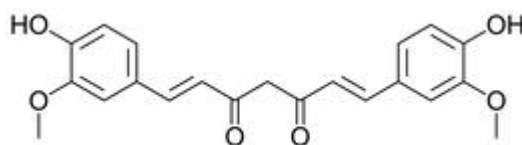


Figura 1 Estructura de la curcumina.

Durante los últimos años se han realizado estudios *in vivo* e *in vitro*, donde sugieren que la curcumina tiene efectos antivirales, antiartríticos además de anticancerígenas. Esto implica la regulación de varios blancos moleculares como NF-κB, factor de crecimiento celular endotelial vascular (VEGF) (Pan et al. 2018; Da et al. 2019) factor de necrosis tumoral (TNF), interleucina 1 (IL-1), interleucina 6 (IL-6), proteínas kinasas y ciclooxigenasa 2 (COX2) entre otras (Jurrmann et al. 2005; Aggarwal et al. 2013; Ghandadi et al. 2017; Ju et al. 2022). Por lo mencionado anteriormente, la curcumina es considerado un agente terapéutico potencial para la prevención y/o tratamiento de algunas enfermedades (Kiuchi et al. 1993; Lin et al. 2007).

#### **4.2.1 Mecanismos de muerte por curcumina**

La curcumina está involucrada en la modulación de varios blancos moleculares en los cuales se incluyen factores de transcripción, factores de crecimiento y sus receptores, citoquinas, enzimas y los genes que regulan la proliferación celular y la apoptosis (Aggarwal et al. 2007, Gupta et al. 2013). La apoptosis es un proceso de muerte celular programada esencial para el desarrollo normal y el mantenimiento del equilibrio celular. La investigación sobre los mecanismos de la apoptosis ha llevado a identificar diversas vías y moléculas clave involucradas en este proceso como:

- Vía extrínseca o vía del receptor de muerte donde las células reciben señales de muerte a través de receptores de la membrana celular, como el receptor de TNF (Elmore et al. 2007).
- Vía intrínseca o mitocondrial donde Implica la liberación de factores proapoptóticos desde las mitocondrias, como el citocromo c, que activan caspasas, enzimas clave en el proceso apoptótico (Green & Llambi et al. 2015)
- Regulación de las proteínas de la familia Bcl-2, como Bcl-2 y Bax, regulan la permeabilidad de la membrana mitocondrial y, por lo tanto, la liberación de citocromo c (Cory & Adams et al. 2002).
- Activación de caspasas las cuales son enzimas clave en la ejecución de la apoptosis. Se activan en cascada, llevando a la fragmentación del ADN y la degradación de proteínas celulares (Riedl & Salvesen et al. 2007).

- Fosfatidilserina externa donde durante la apoptosis, se transloca a la superficie celular, marcando las células para la fagocitosis (Fadeel & Xue et al. 2009).

Se sugiere que la curcumina induce muerte celular mediante la activación de las vías de muerte celular y la inhibición del crecimiento de las vías de proliferación (Ravindran et al. 2009). Algunos estudios sugieren que la curcumina también puede desencadenar la necrosis en ciertas condiciones (Mosieniak et al. 2012), y la autofagia (Aoki et al. 2007).

#### **4.2.3 Curcumina en cáncer**

Las células cancerígenas se caracterizan principalmente por la alteración de vías de señalización involucradas en procesos como: metabolismo, angiogénesis, proliferación, supervivencia y migración (Zoi et al. 2021). La curcumina está relacionada con la modulación de varias enzimas involucradas con patologías como el cáncer y la inflamación. Moléculas como las especies reactivas de oxígeno (ROS), NF- $\kappa$ B, COX-2, APA-1 y AKT son moléculas proinflamatorias que participan al inicio y durante el crecimiento del tumor (Mohamed et al. 2017). La COX-2 por ejemplo, mediante estímulos mitogénicos e inflamatorios resulta en una mayor síntesis de prostaglandinas en tejido inflamado y neoplásico (Seibert & Masferrer 1994). Se ha observado que COX-2 está sobreexpresado en una gran cantidad de cánceres en el humano como: colon (Sheng et al. 2020) hígado, páncreas (Matsubayashi et al. 2007), mama (Shim et al. 2003) pulmón (Castelao et al 2001), vejiga (Boström et al. 2001), piel (Buckman et al. 1998) estómago (Joo et al. 2002) y cánceres de cabeza y cuello (Subbaramaiah & Dannenberg 2003).

Yoysungnoen et al. 2006 observaron que en ratones desnudos que habían sido implantados con células de carcinoma hepatocelular, y recibieron tratamiento con curcumina, la sobreexpresión de COX-2 y VEGF inducida por el tumor disminuyó, lo que sugiere que la curcumina inhibe la angiogénesis tumoral. Por otra parte, se ha observado que la curcumina tiene efecto en P53 un gen supresor de tumores que regula vías celulares y moleculares previniendo la formación del cáncer. Han et al. 1999 mostraron que la curcumina modula a la baja la expresión de P53, así como de los genes de supervivencia *egr-1*, *c-myc* y *bcl-XL* en células B, dando como resultado la detención del crecimiento y la apoptosis del linfoma de células B (Ramachandran & You 1999), en cáncer de mama

Lv et al. 2014 observaron en ratones desnudos tratados con curcumina una disminución o inhibición del crecimiento del tumor, así como la inducción de apoptosis.

### **4.3 Transición de Epitelio a Mesénquima**

Gran parte de tejidos y órganos adultos se originan de la conversión de células epiteliales a mesenquimales a través de un proceso denominado transición epitelial a mesenquimal (TEM) y su proceso inverso, es decir, transición mesenquimal a epitelial (TME). Durante la TEM las células epiteliales pierden sus características de adhesión y adquieren características migratorias e invasivas, lo cual es fundamental durante el desarrollo embrionario (Thiery et al. 2009). La TEM es un fenómeno biológico en el cual las células epiteliales con características inmóviles y polarizadas se transforman en células mesenquimales obteniendo la capacidad para migrar (Kalluri & Neilson 2003). La TEM se categoriza en tres grupos, tipo 1: durante el proceso de embriogénesis y desarrollo de órganos (Viciovac & Aplin 1996; Acloque et al. 2009), tipo 2: asociada a fibrosis de órganos (Kim et al. 2006; Acloque et al. 2009) y tipo 3: asociada a progresión del cáncer y metástasis (Thiery 2002; Roche 2018; Kalluri & Weinberg 2009; Moreno-Jaime et al. 2016). Durante este proceso, se producen alteraciones en la estructura del citoesqueleto, la sustitución E-cadherina por N-cadherina es una de las características principales durante la TEM (Nieman et al. 1999; Hugo et al. 2007).

Los factores de transcripción asociados a TEM están involucrados en el silenciamiento de marcadores epiteliales como E-cadherina y la activación de marcadores mesenquimales como N-cadherina y vimentina, dentro de los marcadores se incluye: Snail1, Snail2, Twist1/2 y ZEB1/2 (Krebs et al. 2017; Goossens et al. 2017; Lamouille & Derynck 2014; Evdokimova et al. 2009).

### **4.4 Proteína de respuesta a la apoptosis de próstata-4 (Par-4)**

Par-4 se identificó en células de próstata sometidas a apoptosis (Sells et al. 1994) y es expresada por el gen *Par-4*, se encuentra localizado en el cromosoma 12q21 en humanos, en el cromosoma 7q21 en ratas y el cromosoma 10D1 en ratones. El gen se identificó por inducción en respuesta a la elevación de Ca<sup>2+</sup> en las células. También se descubrió que



la ablación de andrógenos era igualmente eficaz para inducir la expresión de Par-4 en células de próstata dependientes de andrógenos (Sells et al. 1994). Par-4 contiene en su estructura dominios funcionales conservados en los cuales se incluye la secuencia de zipper de leucina con una longitud aproximada de 342 aa en humanos, 332 aa en ratas y 333 aa en ratones, con un peso molecular de 39 kDa, dos secuencias de localización nuclear (NLS1 y NLS2), las cuales son esenciales para la translocación de Par-4 del citoplasma al núcleo, y necesarias para inducir apoptosis una secuencia de exportación al núcleo localizada en el extremo carboxilo terminal de la proteína (El-Guendy et al. 2003). En su estructura también se incluye un único dominio SAC (Selectivo para Apoptosis de Células Cancerígenas) de 59 aminoácidos, el cual es exclusivo para Par-4 y es 100% conservado en humanos, ratas y ratones. El dominio de zipper de leucina le permite unirse al DNA y proteínas chaperonas como AKT1, contiene aproximadamente 40 aminoácidos encontrados en forma de repeticiones heptad, donde en la cuarta posición de cada repetición se encuentra una leucina, la cual se une al surco mayor del DNA (figura 2), (QiNan et al. 2016; Brasseur et al. 2016; Sarkar et al. 2015).

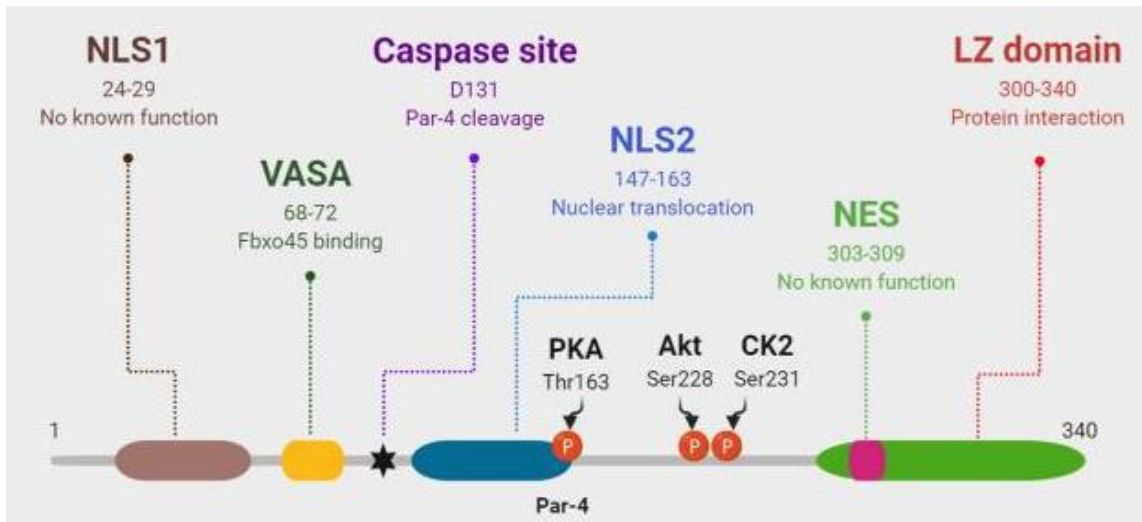


Figura 2 Representación esquemática de la proteína de Par-4.

#### 4.4.1 Función y localización de Par-4

La proteína Par-4 induce apoptosis selectiva en células de cáncer, pero no en células normales, dependiendo de la naturaleza del estímulo, Par-4 induce apoptosis a través de dos mecanismos distintos como la activación de la maquinaria de muerte y la inhibición de los factores de sobrevivencia, es decir, vía intrínseca y extrínseca (Goswami et al. 2008).

##### 4.4.1.1 Vía intrínseca

La actividad intrínseca inicia con la sobre expresión de Par-4 endógeno, la capacidad de Par-4 para causar apoptosis directamente se asocia con su translocación al núcleo mediante la fosforilación en la posición aminoacídica Thr155 por PKA ( PKA se encuentra elevada en diversas células cancerosas) en el dominio NLS2 (figura 3) (Acloque et al. 2009), permitiendo inhibir los mecanismos de sobrevivencia asociados al factor nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B) superando los mecanismos protectores de las células, tales como la presencia de Bcl-xL, Bcl-2 o la ausencia de la función p53 o PTEN, A1/Bfl1; y genes anti apoptóticos como el inhibidor de apoptosis ligado a X (XIAP) que protegen de la apoptosis generada por TNF- $\alpha$  (Barkett & Gilmore 1999).

Par- 4 interacciona directamente con proteínas e inhibe la proliferación celular, una proteína es tumor de Wilm's (WT-1), Par-4 secuestra e inhibe las funciones

transcripcionales mediadas por WT1, por ejemplo, la transactivación de la proteína anti-apoptótica Bcl2. Uniéndose específicamente a los dedos de zinc de WT1 y desregulando su actividad promotora del gen BCL-2 conduciendo apoptosis (Johnstone et al. 1996; Cheema et al. 2003), por otro lado, también se une directamente con la proteína topoisomerasa 1 (TOPO-1) para impedir la relajación de AND y la progresión del ciclo celular (Goswami et al. 2008). Par-4 también interactúa directamente con la proteína telomerasa humana transcriptasa reversa (TERT por sus siglas en inglés) inhibiendo su actividad e induciendo apoptosis en células  $\beta$  de los islotes en diabetes tipo 2 (Liu et al. 2018).

La sobreexpresión de Par-4 es suficiente para inducir directamente la apoptosis en algunos tipos de células cancerosas en ausencia de un segundo estímulo. Interesantemente Par-4 es incapaz de inducir directamente la apoptosis en células normales (debido a la baja expresión de PKA) o en células cancerosas hormonas dependientes como LNCaP de cáncer de próstata y en células de cáncer de mama MCF-7, en las cuales Par-4 se localiza principalmente en el citoplasma. Se ha observado que AKT1 se une al zipper de leucinas e induce la fosforilación de Par-4 en la Ser249 (figura 3) para mantener a la proteína en el citoplasma e inhibir su actividad apoptótica, lo que conduce a la supervivencia de la célula cancerosa (Acloque et al. 2009; Brasseur et al. 2016).

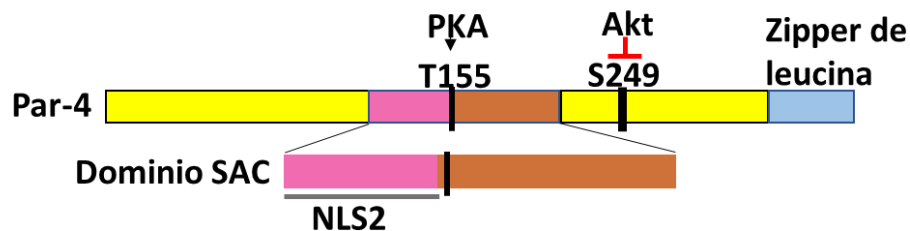


Figura 3 Representación esquemática de la fosforilación de la proteína Par-4. La proteína Par-4 tiene 2 sitios de fosforilación, uno para PKA y otro para AKT que determinan su traslado al núcleo y actividad apoptótica. Imagen tomada y modificada de Zhao et al. 2007.

Las células resistentes a Par-4 están sensibilizadas por la sobreexpresión de Par-4 a una amplia gama de estímulos apoptóticos, tales como aumento de  $Ca^{2+}$  intracelular,

extracción del factor de crecimiento, TNF- $\alpha$  o rayos X y radiación gamma (Chakraborty et al. 2001; El-Guendy et al. 2003; Nalca et al. 1999).

#### **4.4.1.2 Vía extrínseca**

Par-4 está implicado en la inducción de apoptosis mediada por varios ligandos de muerte como: Fas / FasL donde la fosforilación mediada por PKA de Par-4 en Thr155 permite el tráfico de Fas / FasL a la membrana como para la inhibición de NF- $\kappa$ B, como se observa en la figura 4 (Chakraborty et al. 2001; Zhao et al. 2008), también favorece la activación del complejo DISC mediado por TRAIL (Burikhanov et al. 2009) y es necesario para la inducción de muerte mediada por TNF $\alpha$  (Treude et al. 2014).

Por otro lado, se observó que Par-4 es secretado tanto por células normales como por células de cáncer, la secreción de Par-4 ocurre por la vía clásica y es asociado al estrés del retículo endoplásmico (RE) (Burikhanov et al. 2009). Par-4 puede iniciar el estrés del retículo endoplásmico resultando en un incremento en la secreción de Par-4, se cree que esta es la principal casusa de disfunción en la diabetes de tipo 2 (QiNan et al. 2016; Zhao et al. 2008).

Par-4 extracelular, tiene la capacidad de inducir selectivamente apoptosis en células cancerosas, pero no en células normales, mediante la unión al receptor GRP78 (proteína reguladora para la glucosa 78) que se encuentra en la superficie de células cancerosas en niveles elevados y es asociado con la severidad y quimioresistencia del tumor (Fernandez et al. 2000; Lee 2007, Burikhanov et al. 2009) en contraste con las células normales que presentan baja expresión, por la activación de la vía dependiente de FADD- caspasa 8/caspasa 3 (Burikhanov et al. 2009). Sin embargo, se ha observado que Par-4 es capaz de iniciar la vía extrínseca sin necesidad de un receptor/ligando, es decir, alterando la señalización intrínseca, Par-4 incrementa la activación de caspasa 8 después de un estímulo apoptótico resultando en la activación de caspasa 8, liberación de Bid y citocromo c (Boehrer et al. 2004).

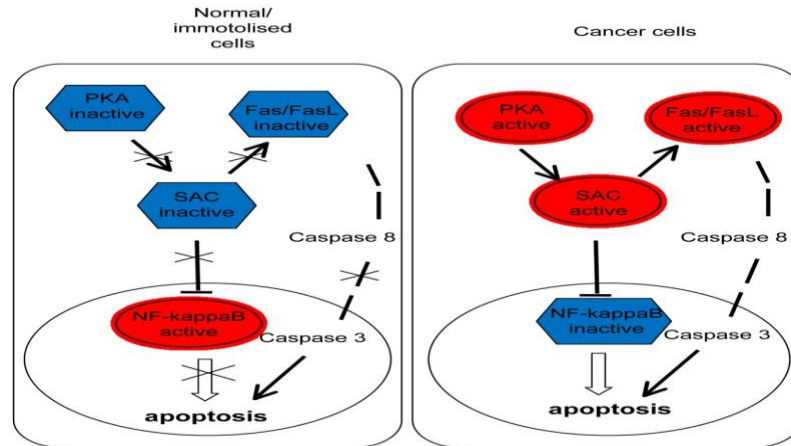


Figura 4 Mecanismo para la apoptosis selectiva en células cancerígenas mediada por SAC. SAC es activado mediante PKA que se encuentra elevado en células cancerosas. El SAC induce apoptosis mediante la activación del receptor de muerte Fas / FasL y la inhibición de la vía de supervivencia de células NF-KB. Imagen tomada de Zhao et al. 2008.

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

Recientemente se ha observado que Par-4 endógeno juega un papel importante como agente apoptótico en enfermedades neurodegenerativas, y en diabetes de tipo 2. Se ha observado en las células  $\beta$  de los islotes del páncreas induce apoptosis mediada por Par-4/NF- $\kappa$ B, donde su expresión es aumentada por el estrés de retículo endoplasmático producido por trastornos metabólicos crónicos severos donde la apoptosis se lleva a cabo a través de la membrana del retículo endoplasmático y las vías mitocondriales como se observa en la figura 5 (QiNan et al. 2014,2016).

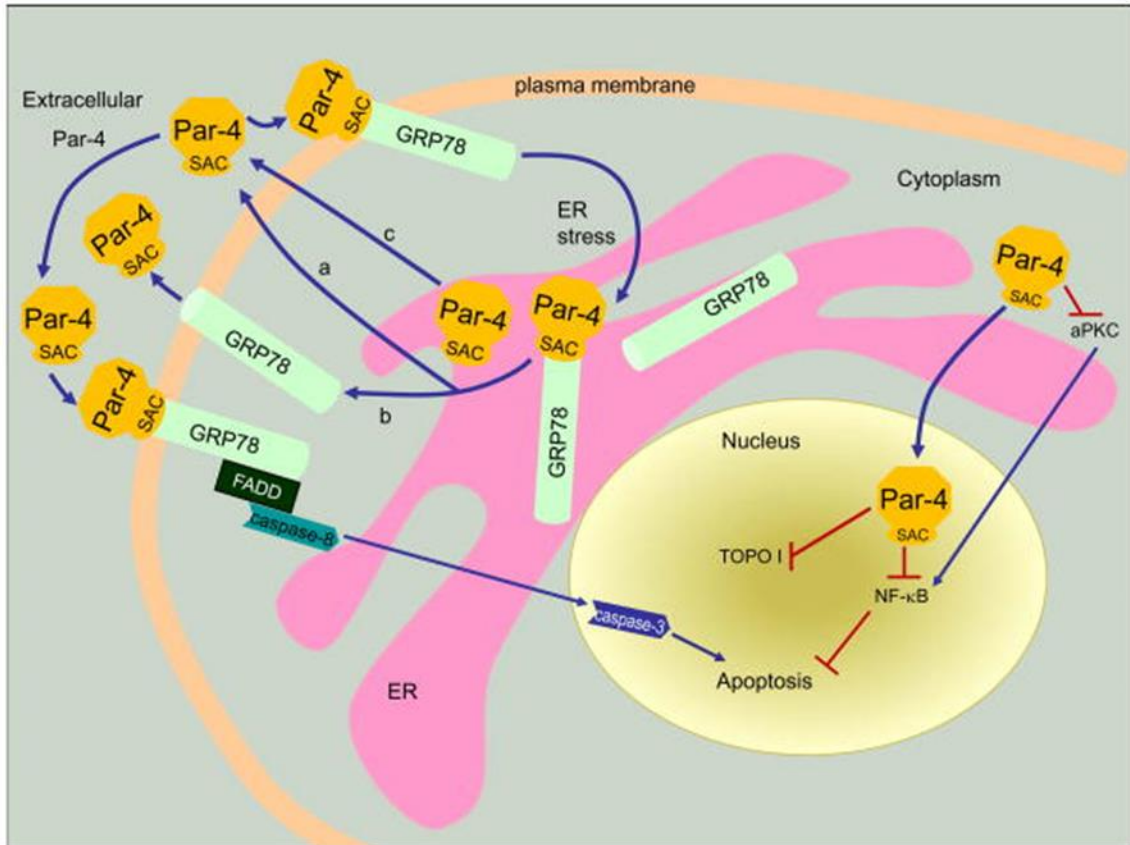


Figura 5 Representación esquemática de las vías mediante las cuales Par-4/NF-κB inducen apoptosis. Estrés ER y disfunción mitocondrial inducen la expresión en el núcleo de Par-4/NF-κB. Imagen modificada de QiNan et al. 2016.

#### 4.4.2 Regulación de Par-4

La resistencia a la apoptosis mediada por Par-4 en células cancerígenas se debe principalmente a la inactividad de Par-4, recientemente se ha demostrado que Par-4 es regulado por mecanismos postraduccionales como la fosforilación, sino también por ubiquitinación, secuestro y clivaje proteolítico. La ubiquitinación se lleva a cabo por la proteína Fbxo45 en su dominio VASA, este mecanismo es usado para bajar los niveles de la proteína. Tanto las células cancerosas como las células normales secuestran a Par-4, e inhiben los efectos de dicha proteína endógena autogenerada, en las células cancerígenas se lleva a cabo mediante la sobreexpresión de la proteína de filamento intermedio, vimentina. En el caso de las células normales el secuestro también lo lleva a cabo la proteína vimentina, y solo lo exporta a niveles bajos, con excepción de cuanto se encuentra en situaciones de estrés, donde su liberación se incrementa (Sviripa et al. 2016), además

se ha observado que Par-4 interactúa con la transcriptasa reversa de telomerasa humana (h-TERT) y se sugiere que bloquea la apoptosis inducida por Par-4 bloqueando su translocación al núcleo ya que al bloquear h-TERT aumenta la expresión nuclear de Par-4 (Sheng et al. 2010; Zhou et al. 2013). Recientemente se observó que en diferentes células de cáncer que Par-4 es escindido por caspasa-3 en la posición D131 durante el proceso de apoptosis, generando un fragmento clivado de la proteína (cl-Par-4) de 25 kDa que contiene la NLS2 (Chaudhry et al. 2012), la inducción selectiva en la apoptosis en el dominio de las células cancerosas (SAC) y el dominio de zipper de leucina. Además, la acumulación de cl-Par-4 bajo estímulos apoptóticos se relaciona con la quimiosensibilidad de células cancerosas y el nivel de apoptosis observado (Brasseur et al. 2016). Las células cancerosas poseen mecanismos para inhibir el efecto de Par-4, en estos también está incluido el secuestro de la proteína. Se ha observado que el autoantígeno uveal con un dominio super enrollado y repeticiones de anquirinas (UACA) compite con Par-4 por la unión con el receptor GRP78 previniendo su traslocación del citoplasma al núcleo, regulando positivamente la expresión de NF- $\kappa$ B y bloqueando la apoptosis mediada por Par-4 (Qinan et al. 2014). El aumento en la expresión de Par-4 regula positivamente WTN1, se ha observado que, en cáncer de mama invasivos, la expresión de WNT1 promueve la diferenciación y la apoptosis e inhibe la proliferación, además de asociarse con un mejor pronóstico en un subgrupo de pacientes de cáncer de mama invasivo en estadio II (Yoysungnoen et al. 2006.). La sobreexpresión de Par-4 disminuye la expresión de FZD8. Los Frizzled (FZD) son receptores de superficie celular transmembrana activados por la familia de lipoglicoproteínas WNT para activar la señalización WNT canónica y/o no canónica (Walerych et al. 2012).

Par-4 es una proteína que juega un papel importante en la homeostasis celular en la regulación del ciclo menstrual y durante la embriogénesis. En cáncer se ha observado que puede jugar un papel pronóstico y terapéutico debido a que los niveles más altos de expresión de Par-4 se correlacionaron con un mejor pronóstico en términos de supervivencia (Ahmed et al. 2008), además se ha observado que Par-4 está disminuido en más del 70% de los cánceres renales (Cook et al. 1999). neuroblastoma (Kögel et al. 2001), formas agudas y crónicas de leucemia (Boehrer et al. 2001). Y en aproximadamente el

32% de los carcinomas endometriales, por el silenciamiento mediante la hipermetilación del promotor, mutación de una base en el exón 3 del gen Par-4, que convierte un residuo de arginina (CGA) en un codón de terminación (TGA) en cáncer de endometrio (Moreno-Bueno et al. 2007). O inestabilidad en una región 12q21 del cromosoma humano se encuentra el gen Par-4 en cáncer que a menudo se elimina en el cáncer gástrico y pancreático (Johnstone et al. 1998), las mutaciones K-Ras son las mutaciones más frecuentes en el cáncer de páncreas (Almoguera et al. 1988), y regulan negativamente Par-4 en cánceres pancreáticos que albergan mutaciones puntuales de K-Ras (Ahmed et al. 2008). En el caso del cáncer de próstata, Par-4 no está regulado negativamente, silenciado o mutado, pero si esta inactivado debido a la fosforilación por Akt1, que impide la translocación nuclear de Par-4, reteniéndolo en el citoplasma y haciéndolo incapaz de causar apoptosis (Goswami et al. 2005). En la figura 6 se muestran las cascadas de señalización que involucran a Par-4.



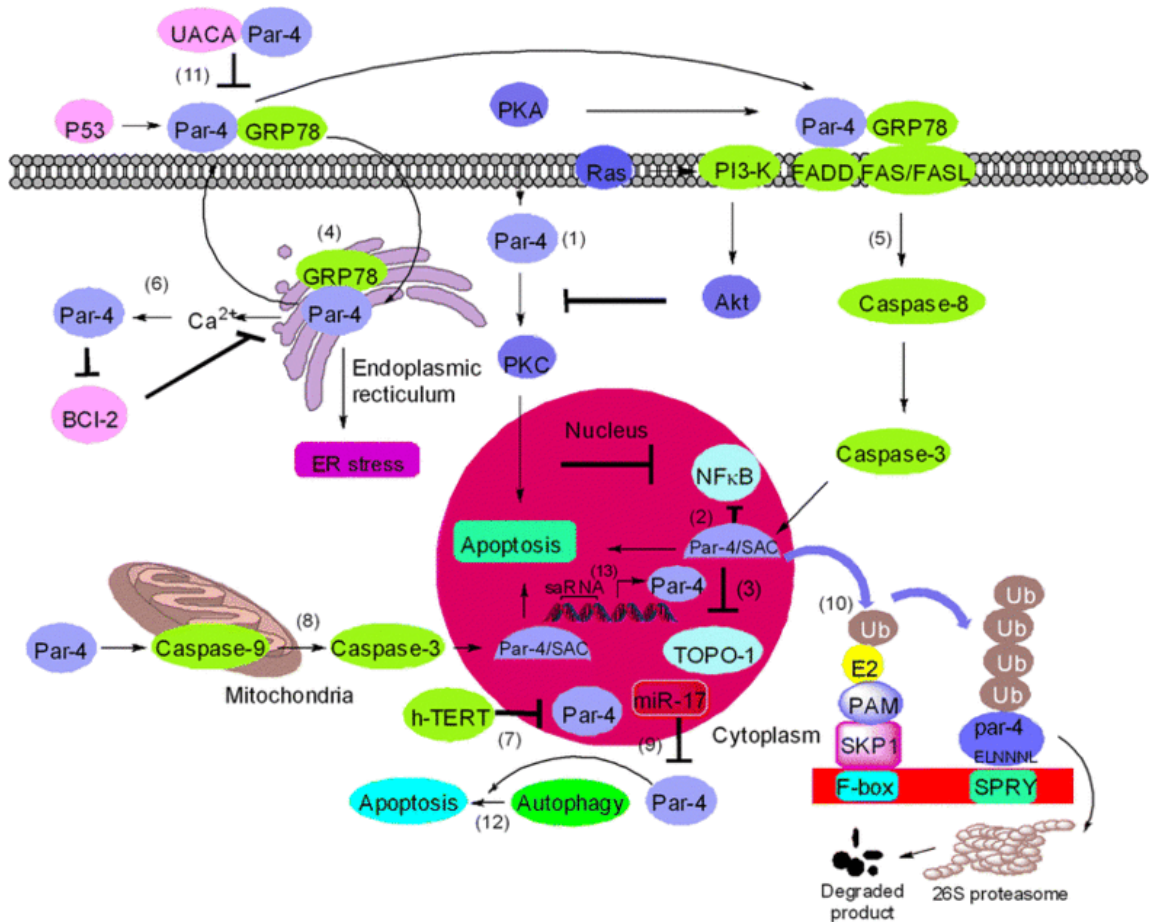


Figura 6 Cascadas de señalización que involucran a Par-4. 1) PKA activa Par-4, que luego se une a una PKC, lo que lleva a la apoptosis. 2) Par-4 se transloca al núcleo e inhibe NF-KB. 3) Par-4 se transloca al núcleo e inhibe la actividad de TOPO1, lo que lleva a la apoptosis. 4) el estrés de RE puede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

Compuestos como Arylquins, CQ y Crizotinib se utilizan como secretagogos para la estimulación la secreción de Par-4. Burikhanov et al. 2017 observaron que al tratar líneas celulares normales de humano y de ratón (MEF, PrSCs, PrECs, HEL y HBEC), con una serie de fármacos que contenían el farmacóforo de quinolina o quinolona, incremento la expresión y secreción de Par-4, además de que Par-4 secretado está involucrado en la apoptosis específica de células cancerosas *in vitro*, Burikhanov et al. 2009 demostraron que Par-4 también se secreta *in vivo* y se puede detectar en el suero, la actividad de Par-4

en el suero fue capaz de inducir apoptosis específicamente en células cancerosas. Recientemente en el 2023, demostró que crizotinib induce la secreción de Par-4 en células normales con efecto apoptótico en células cancerígenas (Burikhanov et al. 2023).

## 5. JUSTIFICACIÓN

El cáncer es uno de los principales problemas de salud pública a nivel mundial y su incidencia aumenta paulatinamente con el envejecimiento de la población, las condiciones ambientales y el estilo de vida de las personas. Hoy en día existen grandes avances tanto en el diagnóstico como en el tratamiento de diversos tipos de cáncer, pero no son suficientes para contrarrestar la alta mortalidad asociada a la enfermedad. Por esta razón, siempre se está en la búsqueda constante de mejores (alternativas) fármacos que puedan destruir las células cancerígenas o potenciar el efecto de otras (las) drogas, quimiosensibilizando las células tumorales con el objetivo de obtener mejores resultados en la eliminación del tumor y reducir la dosis de drogas anticancerígenas administradas al paciente, disminuyendo así los efectos secundarios y proporcionando una mejor calidad de vida. El cuerpo humano cuenta con diversos mecanismos de defensa para contrarrestar la formación de neoplasias, entre ellos la proteína Par-4, que es capaz de inducir la muerte en células cancerígenas, pero no en células normales, a través de estímulos apoptóticos mediante las vías intrínseca y extrínseca. La proteína Par-4 que induce la apoptosis extrínseca es secretada por las células normales y cancerígenas en respuesta a diversos secretagogos, una vez en el torrente sanguíneo, puede llegar a (las células cancerígenas) los tumores e inducir la muerte tumoral. Se ha observado que la curcumina ofrece una alternativa terapéutica al inducir apoptosis en las células cancerígenas además protege contra los efectos provocados por la quimio y radioterapia.

## **6. HIPÓTESIS**

Curcumina es capaz de sensibilizar a las células de cáncer frente a cisplatino e incrementar y secretar Par-4 en células de cáncer de mama y no tumorales, teniendo un efecto en células cancerígenas.

## **7. OBJETIVO GENERAL**

Determinar el efecto de la curcumina en la sensibilización de células cancerosas tratadas con cisplatino, así como en la inducción y secreción de Par-4, y su impacto en células de cáncer de mama.

## **8. OBJETIVOS ESPECIFICOS**

1. Evaluar la capacidad de la curcumina para sensibilizar células cancerosas al tratamiento con cisplatino.
2. Analizar la expresión de genes apoptóticos en células cáncer tratadas con curcumina.
3. Analizar la expresión y localización de Par-4 en células sometidas a tratamiento con curcumina.
4. Determinar la capacidad de la curcumina para inducir la secreción de Par-4 tanto in vitro como in vivo.
5. Evaluar el efecto del Par-4 soluble presente en el medio condicionado sobre la viabilidad de células de cáncer de mama.
6. Analizar el efecto combinado de la curcumina y del cisplatino en la reducción de la masa tumoral de la línea celular 4T1 en ratones Balb/C

## 9. CAPÍTULOS

### 8.1 CAPITULO 1

---

#### **CURCUMINA INDUCE MUERTE CELULAR Y QUIMIOSENSIBILIZACIÓN EN CELULAS CANCERIGENAS.**

La curcumina es un compuesto poli fenólico obtenido de la planta cúrcuma longa con propiedades anticancerígenas induciendo apoptosis, y sensibilizando a las células cancerígenas contra quimioterapéuticos, lo que ayuda a reducir los efectos secundarios de la terapia mejorando la calidad de vida del paciente, además protege contra la radioterapia y quimioterapia.

#### **Objetivo**

Analizar el efecto de la curcumina en las líneas celulares de cáncer de mama y cáncer cérvico cervicouterino y su efecto cuando se combina con cis platino

#### **Resultados**

La curcumina indujo inhibición de la viabilidad celular, Las células HeLa mostraron una mayor sensibilidad al efecto citotóxico de la curcumina en comparación con las células MCF-7. Las células HeLa mostraron una concentración citotóxica del 50% (CC50) de 10,01  $\mu\text{M}$  y las células MCF-7 mostraron una CC50 de 26,23  $\mu\text{M}$ . Ambas líneas celulares mostraron un sinergismo significativo al efecto citotóxico en la combinación de curcumina y cisplatino

#### **Conclusiones**

la curcumina potencializa el efecto citotóxico del cisplatino en ambas líneas celulares, sugiriendo el uso combinado.

## **Productos obtenidos**

Curcumin chemosensitizes the antiproliferative effect of cisplatin in MCF-7 and HeLa cells.

Norma Cesila Arellano Rodríguez, Saavedra-Alonso Santiago, Evelin Nallely Muñoz Guzmán, Pablo Zapata Benavides, Moisés A. Franco Molina, Cristina Rodríguez Padilla.

## **Effect of Curcumin on Cell Death and Chemo sensitization in Cancer Cells: Study in MCF-7 and HeLa as a model of cancer in women**

Norma Cesila Arellano Rodríguez, Pablo Zapata Benavides Saavedra-Alonso Santiago, Evelin Nallely Muñoz Guzmán, Moises A. Franco Molina, Cristina Rodríguez Padilla.

Departamento de Microbiología e Inmunología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León, (UANL), San Nicolas De Los Garza, México.

Key: MCF-7, HeLa, Curcumin, Cisplatin

### **Correspondence and Reprint Requests:**

Dr. Pablo Zapata Benavides

Departamento de Microbiología e Inmunología

Universidad Autónoma de Nuevo León, Pedro de Alba S/N

Facultad de Ciencias Biológicas, San Nicolás de los Garza

Nuevo León 66450, México

E-mail: [pablo.zapatabn@uanl.edu.mx](mailto:pablo.zapatabn@uanl.edu.mx)

Tel.: +52-818-329-4115; Fax: +52-818-352-4212

## Summary

Breast cancer is one of the main public health problems and its mortality is due to drug resistance, metastasis and recurrence, which is associated with low par-4 expression and even poor prognosis, curcumin is a polyphenolic compound of turmeric longa that has anticancer properties. In this work, the effect of curcumin on the induction and secretion of par-4 and its promotion to cell death was analyzed. To determine the impact of curcumin and soluble Par-4 on cell viability and proliferation, the MTT assay was performed on the cancer cell lines MCF-7, MDA-MB-231 and SKBR-3, evaluating the cytotoxic effect of curcumin and soluble Par-4 present in the serum of mice and in the conditioned media of curcumin-treated fibroblasts. The synergistic effect of curcumin and soluble Par-4 with cisplatin was also analyzed. Using WB, the expression of the Par-4 protein in cells treated with curcumin and/or cisplatin was studied. The study showed that curcumin induces cytotoxic effect in breast cancer cell lines and can induce the expression and secretion of Par-4 in serum from curcumin-treated mice and secrete it into culture medium, thereby promoting cell death in vitro. In addition, it chemosensitizes cells to cis platinum in breast cancer cells. The study suggests that curcumin could be a promising therapeutic candidate for breast cancer. This discovery could be useful in the fight against breast cancer and could help overcome challenges in the treatment of this disease.



## 8.2 CAPITULO II

---

### **EFFECTO DE LA CURCUMINA EN LA SECRECIÓN DE PAR-4 SOLUBLE EN CÉLULAS DE CÁNCER DE MAMA.**

Par-4 es una proteína con un gran potencial terapéutico contra cáncer ya que induce apoptosis después de un estímulo apoptótico como la quimio o radioterapia, además su expresión inhibe la metástasis y recurrencia del tumor, existen algunos secretagogos que inducen la Par-4 soluble en las células sanas incrementando Par-4 soluble en el suero y teniendo un efecto específico en el tumor.

#### **Objetivo**

Analizar el efecto de la curcumina en las líneas celulares de cáncer de mama y la modulación de la expresión de Par-4 además determinar si Par-4 soluble secretado de células de fibroblastos y de ratones inducen inhibición de la viabilidad celular y sensibiliza las células al cisplatino.

#### **Resultados**

La curcumina induce la expresión de Par-4 endógena y exógena, tanto en células de cáncer de mama, fibroblastos humanos. La expresión de Par-4 soluble se analizó en los medios del cultivo y fibroblasto y suero de ratones tratados con curcumina observándose que es capaz de inhibir la proliferación celular y quimiosensibilizar a las células de cáncer de mama.

#### **Conclusiones**

La curcumina modula la expresión de Par-4 y quimiosensibiliza las células de cáncer de mama, además induce la secreción de Par-4 soluble en fibroblastos humanos y en modelo murino teniendo un efecto en la viabilidad celular tanto en células receptor de estrógeno positivo y negativo.

## Productos obtenidos

Curcumina induce la expresión y secreción de Par-4 y promueve la muerte celular en células de cáncer de mama in vitro e in vivo. 1Norma Cesilia Arellano-Rodríguez, 1Pablo Zapata-Benavides, 2Mariela Arellano-Rodríguez, 1Santiago Saavedra-Alonso, 1Moisés Armides Franco-Molina, 1Adriana Guadalupe Niño-Salazar, 3Diana E. Zamora-Avila, , 1Juan Manuel Izaguirre-Álvarez, , 1Cristina Rodríguez-Padilla

### **CURCUMIN INDUCES THE EXPRESSION AND SECRETION OF Par-4 AND PROMOTES CELL DEATH IN BREAST CANCER CELLS IN VITRO IN "IN VIVO".**

<sup>1</sup>Norma Cesilia Arellano-Rodríguez, <sup>1</sup>Pablo Zapata-Benavides, <sup>2</sup>Mariela Arellano-Rodríguez, <sup>1</sup>Moisés Armides Franco-Molina, <sup>1</sup>Adriana Guadalupe Niño-Salazar, <sup>1</sup>Oscar Alberto Álvarez-Quezada, <sup>1</sup>Juan Manuel Izaguirre-Álvarez, <sup>1</sup>Cristina Rodríguez-Padilla

<sup>1</sup>*Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Biological Sciences, Autonomous University of Nuevo Leon (UANL), San Nicolas de los Garza, Mexico*

<sup>2</sup>*Department of Genetics, Faculty of química, Autonomous University of Nuevon (UANL), San Nicolas de los Garza, Mexico*

Keywords: Par-4, Curcumin, Breast cancer, apoptosis, death cell.

Correspondence to: Dr. Pablo Zapata-Benavides, Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Biological Sciences, Autonomous University of Nuevo Leon (UANL), Unit C, Pedro de Alba S/N, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, 66450, México. Tel: +52 8183294115, Fax: +52 8183524212, e-mail: pablozapata@hotmail.com; pablo.zapatabn@uanl.edu.mx

## Summary

Breast cancer is one of the main public health problems and its mortality is due to drug resistance, metastasis and recurrence, which is associated with low par-4 expression and even poor prognosis, curcumin is a polyphenolic compound of turmeric longa that has anticancer properties. In this work, the effect of curcumin on the induction and secretion of par-4 and its promotion to cell death was analyzed. To determine the impact of curcumin and soluble Par-4 on cell viability and proliferation, the MTT assay was performed on the cancer cell lines MCF-7, MDA-MB-231 and SKBR-3, evaluating the cytotoxic effect of curcumin and soluble Par-4 present in the serum of mice and in the conditioned media of curcumin-treated fibroblasts. The synergistic effect of curcumin and soluble Par-4 with cisplatin was also analyzed. Using WB, the expression of the Par-4 protein in cells treated with curcumin and/or cisplatin was studied. The study showed that curcumin induces cytotoxic effect in breast cancer cell lines and can induce the expression and secretion of Par-4 in serum from curcumin-treated mice and secrete it into culture medium, thereby promoting cell death in vitro. In addition, it ~~chemosensitizes~~ cells to cis platinum in breast cancer cells. The study suggests that curcumin could be a promising therapeutic candidate for breast cancer. This discovery could be useful in the fight against breast cancer and could help overcome challenges in the treatment of this disease.

### INDUCCIÓN DE LA SECRECIÓN DE PAR-4 *IN VITRO* E “*IN VIVO*”

Par-4 es una proteína apoptótica que induce apoptosis por vía intrínseca y extrínseca, el estrés en el retículo endoplásmico induce la secreción de la proteína GRP78, una proteína chaperona que secreta la expresión de Par-4 y en la superficie celular interacciona con esta misma proteína para inducir apoptosis vía Fas y activación de caspasa 8, se han utilizados secretagogos como la hidroxiclороquina para la secreción de Par-4 sistémica en modelos murinos.

#### **Objetivo**

En este capítulo se aborda la capacidad de la curcumina para afectar la viabilidad celular e inducir la secreción de Par-4 en un modelo murino con cáncer de mama inducido por las células 4T1

#### **Resultados**

La curcumina mostró efectos dependientes de la dosis y el tiempo sobre la viabilidad celular en células 4T1, además de aumentar la expresión de PAR4. Comparado con el grupo de control (solución salina tamponada con fosfato), ratones tratados con curcumina mostraron una reducción significativa del tamaño del tumor y una menor incidencia de metástasis. La combinación de curcumina y cisplatino tuvo un efecto sinérgico sobre la inhibición del crecimiento tumoral y la metástasis.

#### **Conclusiones**

Estos resultados sugieren que la curcumina podría representar una opción terapéutica prometedora en las terapias antitumorales, destacando el efecto sinérgico de la curcumina en combinación con el cisplatino. De manera que los datos obtenidos, permiten abrir la

posibilidad a futuras investigaciones con enfoque sinérgico entre curcumina y cisplatino, resaltando el potencial de la combinación de ambos como estrategia antitumoral

**Productos obtenidos**

Arellano-Rodríguez, N. C., Alvarez-Quezada, O. A., Benavides, P. Z., Vargas-Alanís, Gerardo & Franco-Molina, Moises. (2022). Curcumin Sensitizes 4t1 Murine Breast Cancer Cells To Cisplatin Through Par4 Secretion. *In Vivo*, 36(6).

## Curcumin Sensitizes 4T1 Murine Breast Cancer Cells to Cisplatin Through PAR4 Secretion

NORMA CESILIA ARELLANO-RODRÍGUEZ<sup>1</sup>, OSCAR ALBERTO ALVAREZ-QUEZADA<sup>1</sup>,  
PABLO ZAPATA BENAVIDES<sup>1</sup>, GERARDO VARGAS-ALANÍS<sup>1</sup>, MOISÉS FRANCO-MOLINA<sup>1</sup>,  
DIANA ZAMORA-ÁVILA<sup>2</sup>, MARIELA ARELLANO-RODRÍGUEZ<sup>1,3</sup>, SANTIAGO SAAVEDRA-ALONSO<sup>1</sup>,  
JUAN MANUEL IZAGUIRRE-ÁLVAREZ<sup>1</sup> and CRISTINA RODRÍGUEZ-PADILLA<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Microbiology and Immunology, School of Biological Sciences,  
Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza, Mexico;

<sup>2</sup>Virology Department, School of Veterinary Medicine and Zootechnics,  
Universidad Autónoma de Nuevo León, Escobedo, Mexico;

<sup>3</sup>Universidad Autónoma de Nuevo León, School of Chemical Sciences,  
Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza, Mexico

**Abstract.** *Background/Aim:* Prostate apoptosis response 4 (PAR4), a tumour-suppressor protein, selectively induces apoptosis of cancer cells without affecting normal cells. Its soluble form is induced by secretagogues (e.g., chloroquine), and it induces apoptosis by interacting with the receptor of glucose-regulated protein 78, which is overexpressed in cancer cells. In this study, curcumin was analyzed as an inducer of PAR4 expression in 4T1 murine breast cancer cell and its ability to induce PAR4 secretion in Balb/c mice. In addition, the cisplatin sensitizing effect of soluble PAR4 was analyzed. *Material and Methods:* The 4T1 cell line was treated in vitro using different concentrations of curcumin; cell viability was analyzed using 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay and PAR4 expression by western blotting. The expression of soluble PAR4 in the serum of mice treated with intraperitoneal curcumin was analyzed using the dot-blot method. Moreover, MTT assay was used to analyze the effects of serum from

curcumin-treated mice on cell viability. Tumor size was analyzed in mice treated with curcumin alone and in combination with cisplatin. *Results:* Curcumin showed a dose- and time-dependent effects on cell viability on 4T1 cells, as well as increasing PAR4 expression. Compared with the control group (phosphate-buffered saline), mice treated with curcumin showed an increase in plasma PAR4. In the Balb/C tumor model, mice treated with curcumin and cisplatin showed greater tumor shrinkage than the control group. *Conclusion:* These results indicate that curcumin induces expression of soluble PAR4 and sensitizes tumor cells to cisplatin.

Prostate apoptosis response 4 (PAR4) is a tumor-suppressor gene that induces apoptosis via extracellular and intracellular mechanisms in cancer cells without affecting normal cells (1, 2). Its expression is decreased in some neoplasms, and it is associated with a poor prognosis (3, 4). In breast cancer, metastasis, resistance, and recurrence require PAR4 dysregulation (5-7). Recently, PAR4 has been observed to be secreted spontaneously in normal cell culture and not in cancer cells by various agents that induce endoplasmic reticulum stress in both mice and humans; this increases cellular secretion of PAR4 via a P53-dependent mechanism (5, 8, 9). Chloroquine and hydroxychloroquine are antimalarial drugs that act as robust secretagogues of PAR4 (5). On the other hand, arylquinoline 1 disrupts the integration between PAR4-vimentin, increasing its secretion (9, 10). Through the extracellular interaction with glucose-regulated protein 78 (GRP78), which is overexpressed on the surface of cancer cells and is correlated with malignancy, soluble PAR4 causes extrinsic apoptosis via FAS-associated death domain/caspase 8 and caspase 3 pathways in various

**Correspondence to:** Pablo Zapata Benavides,  
Department of Microbiology and Immunology,  
School of Biological Sciences, Universidad  
Autónoma de Nuevo León (UANL), Manuel L.  
Barragán y Pedro de Alba, San Nicolás de los Garza,  
Nuevo León, 66450, Mexico, Tel: +52  
8183294115, Fax: +52 8183524212,  
e-mail: pablozapata@hotmail.com

**Key Words:** Curcumin, PAR4, cisplatin, breast cancer, triple-negative.



This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY-NC-ND) 4.0 international license (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0>).

tumor cell types (8, 11, 12). Furthermore, the overexpression of PAR4 has been observed to increase the translocation of GRP78 from the endoplasmic reticulum to the cell surface (13). Soluble PAR4 in the plasma of mice and patients with kidney cancer (treated with chloroquine) induced the inhibition of cell proliferation (5), and reduced tumor volume and inhibited metastasis in a murine model (14).

Curcumin, which is highly effective at inducing cell death in various types of cancer, is a polyphenolic yellow pigment derived from *Curcuma longa* (15). It can selectively chemosensitize tumor cells (16), thereby protecting normal cells from chemotherapy and radiotherapy (17). As GRP78 silencing promotes resistance to curcumin, it is possible that the GRP78 protein mediates the therapeutic effects of curcumin in hepatocellular carcinoma and colon cancer (18, 19). On the other hand, curcumin has been reported to induce reactive oxygen species-dependent expression of PAR4 (20).

Therefore, this study aimed to determine whether curcumin can induce PAR4 secretion *in vivo* and affect viability and tumor mass volume in the 4T1 murine breast cancer model.

## Materials and Methods

**Breast cancer cell line culture.** The murine breast cancer cell line 4T1 was cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium/nutrient mixture F-12 medium, which was supplemented with 10% fetal bovine serum and 1% antibiotic-antimycotic solution, at 37°C in an atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub>.

**Viability testing using 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT).** To determine the cytotoxic effects of curcumin on the 4T1 cell line, 5×10<sup>3</sup> cells were incubated in a 96-well plate in Dulbecco's modified Eagle's medium/F12 with different concentrations (*i.e.*, 0–50 μM) of curcumin (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) using dimethyl sulfoxide (DMSO) for solubilization. Treatments for 24 and 48 h were analyzed in triplicate. After incubation, 20 μl of MTT (5 mg/ml) was added to each well, and the plate was incubated for 1 h at 37°C. Subsequently, the culture medium was removed, and 100 μl of DMSO was added to each well. Finally, the plate was measured using a plate reader at a wavelength of 570 nm (Microplate Autoreader EL311; BioTek Instruments Inc., Winooski, VA, USA).

**PAR4 protein expression.** To determine the effects of curcumin on PAR4 expression in 4T1 cells, 1×10<sup>5</sup> cells were cultured in 6-well plates, and 0, 10 and 60 μM of curcumin was added. Cells were harvested after 4 h and 24 h and lysed in 100 μl of lysis buffer (1% Triton, 150 mmol/l NaCl, 25 mmol/l Tris, pH 7.6), and the protein concentration was measured using a DC Protein Assay kit (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Proteins were separated using 12% polyacrylamide-sodium dodecyl sulfate gels and analyzed using western blotting with anti-PAR4 (sc-1666 HRP; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA). The samples were normalized using anti-β-actin (Sigma, St. Louis, MO, USA). A Western Lumi-Light sc-2048 Western blot system (Santa Cruz Biotechnology) was used for detecting protein.

***In vivo secretion of soluble PAR4.*** Approximately 8-week-old BALB/c mice were acquired from the Immunology and Virology Department, School of Biological Sciences, Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, Mexico. Mice were administered curcumin (100 mg/kg) and chloroquine (50 mg/kg) as a positive control of secretagogue of PAR4, or with 1× phosphate-buffered saline (PBS) intraperitoneally, as a negative control. After 24 h, mice were anaesthetized using xylazine/ketamine (10 and 95 mg/kg) injections. Thereafter, whole blood was obtained using cardiac puncture, samples were centrifuged, and sera were inactivated at 56°C for 30 min. Soluble PAR4 expression was determined using the immunodetection.

**Immunodetection by dot-blot.** Mouse serum (5 μl) was diluted in 200 μl of 1× PBS and was fixed on a nitrocellulose membrane by suction through Bio-Rad Bio-Dot 96-Well Microfiltration equipment. Proteins were detected using anti-PAR4 (sc-1666 HRP; Santa Cruz Biotechnology) and a Western Lumi-Light sc-2048 (Santa Cruz Biotechnology) transfer system was used for the detection of proteins.

**Effect of curcumin on cell viability.** To determine the effect of serum extracted from curcumin-treated mice on viability of 4T1 cells, 3,000 4T1 cells per well were cultured in a 96-well plate. Thereafter, they were incubated for 24 h with 10% and 20% (v/v) of serum in triplicate. Subsequently, the cell viability was assessed using MTT assay as described above.

**Chemosensitization assay.** A total of 3,000 cells per well were cultured in a 96-well plate and incubated with 10% (v/v) of mouse serum in combination with 10 ng/μl cisplatin (Pisa, Ciudad de México, México). After 24 h, cell viability was determined using MTT assay as described above.

***In vivo assay.*** Groups of five 7-week-old female BALB/c mice acquired from the Immunology and Virology Department were used. They were maintained under standard conditions, with 12-hour light/dark cycles, as well as *ad libitum* access to water and food. Animal maintenance was approved and granted by the Animal Ethics and Management Committee of the Department of Immunology and Virology (CEIBA-2022-004).

In total, 5×10<sup>5</sup> 4T1 cells were implanted in the right upper breast of each mouse. After 10 days, the measurement of the tumor mass began and administration of treatments with curcumin (100 mg/kg), chloroquine (50 mg/kg), cisplatin (70.5 μl), curcumin–cisplatin (100 mg/kg; 70.5 μl) and chloroquine–cisplatin (50 mg/kg; 70.5 μl) were performed intraperitoneally every 3 days for a period of 21 days.

**Statistical analysis.** The results were evaluated using one-way variance analysis and Tukey's test, with *p*<0.05 being considered statistically significant.

## Results

**Basal expression of PAR4 and GRP78.** Before initiating treatment with curcumin in the 4T1 cell line, the basal expression of PAR4 and GRP78 was determined (Figure 1A) using the MDA-MB-231 cell line as a control (21, 22). Densitometric analysis revealed that compared with the

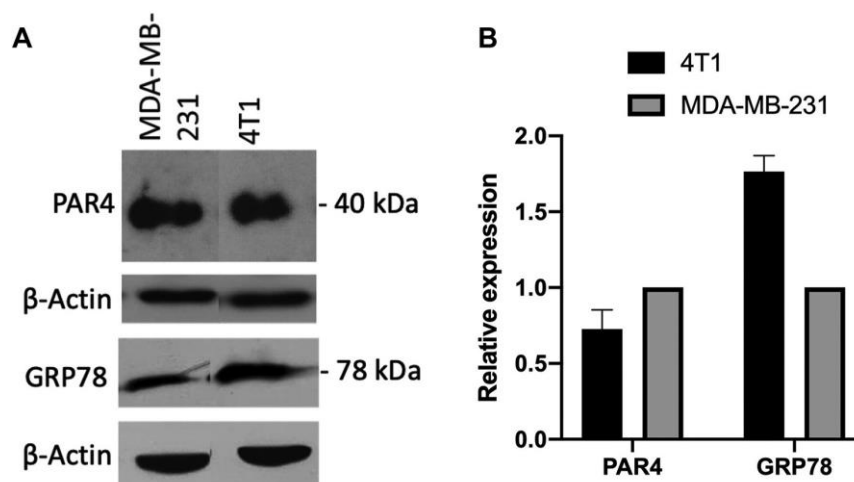


Figure 1. Basal expression of prostate apoptosis response 4 (PAR4) protein and glucose-regulated protein 78 (GRP78). A: Basal expression of PAR4 and GRP78 proteins in 4T1 and MDA-MB-231 cell lines were determined using western blot. B: Densitometric analysis of PAR4 and GRP78 expression.

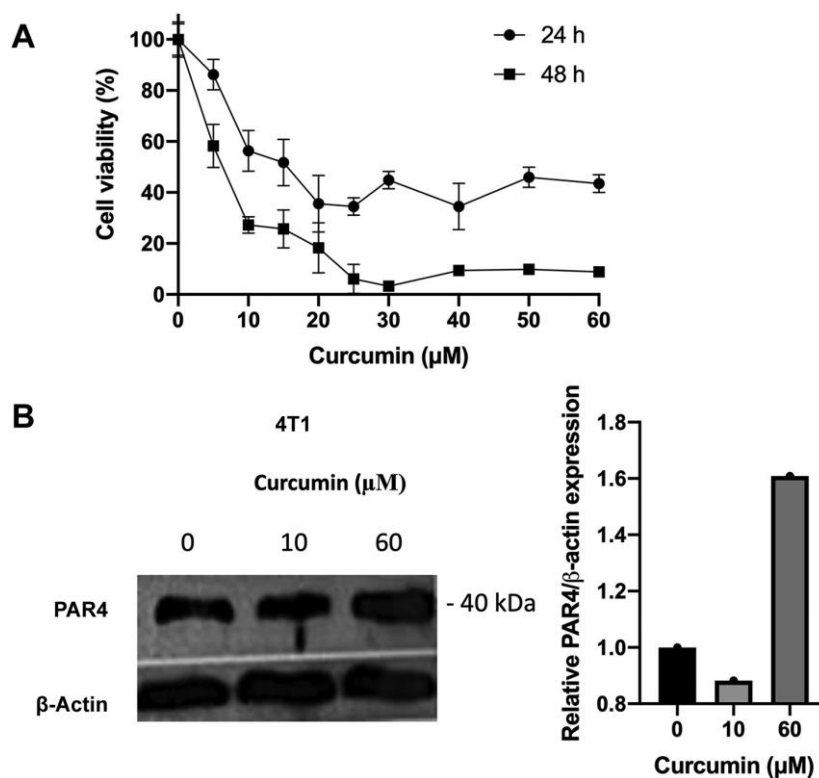


Figure 2. Analysis of prostate apoptosis response 4 protein (PAR4) expression after curcumin treatment. A: Cell viability was analyzed after 24 and 48 h by 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide assay. B: Cells were treated with curcumin for 24 and 48 hours, and the analysis of PAR4 protein expression was conducted using western blot.



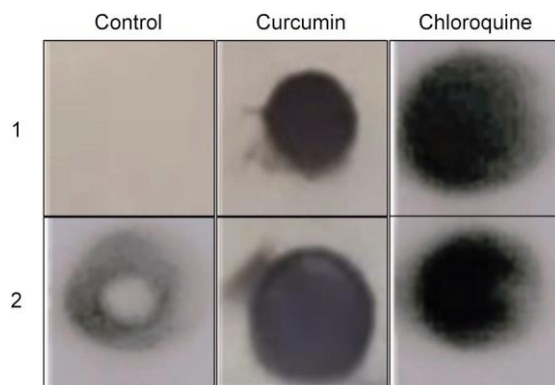


Figure 3. Expression of soluble prostate apoptosis response 4 protein in serum from mice treated with curcumin and chloroquine. Results from independent mice are indicated for each treatment (1 and 2).

MDA-MB-23 cell line, the relative expression of PAR4 in the 4T1 cell line was 0.58, whereas that of GRP78 was 1.64 (Figure 1B).

**Curcumin increased PAR4 expression in 4T1 cells.** Curcumin concentrations used for PAR4 analysis by western blot were determined based on cell viability assay. Cells were treated with different concentrations of curcumin (0 to 50  $\mu$ M) for 24 and 48 h. Cell viability decreased depending on the dose and time (Figure 2A). Subsequently to analyze the effect of curcumin on PAR4 expression, cells were treated with curcumin at 10 and 60  $\mu$ M for 24 h. The relative expression of PAR4 at 10  $\mu$ M was 0.88, and its expression increased to 1.60 at 60  $\mu$ M (Figure 2B).

**Curcumin increased PAR4 expression in mouse serum.** To determine whether curcumin increases the concentration of PAR4 in mouse serum, 100 mg/kg was administered to mouse intraperitoneally; chloroquine (50 mg/kg) was used as a positive control as a PAR4 secretagogue, and PBS as a negative control. The analysis using dot-blotting revealed an increase in the PAR4 signal in the serum of mice treated with curcumin compared to the negative control. Similar results were observed for the serum from chloroquine-treated mice (Figure 3).

**Serum from mice treated with curcumin sensitized 4T1 cells to cisplatin.** To determine whether PAR4 in the serum of mice treated with curcumin affected cell viability and sensitization to cisplatin, 4T1 cells were treated with serum alone (10% and 20%) and in combination with cisplatin. No significant effects on cell viability were observed in cells treated with 10% serum from mice treated with curcumin, chloroquine, and DMSO, whereas in cells treated with 20% serum from

DMSO-treated and chloroquine-treated mice, a slight decrease in viability was observed. However, in cells cultured with 20% serum, a 50.2% increase in cell proliferation compared with the control was observed (Figure 4A).

For the analysis of the sensitization of 4T1 cells, culture was performed using 10% mouse serum, which showed no relevant effect on cell viability, in combination with 10 ng/ $\mu$ l cisplatin. No significant effect on cell viability was observed with sera from DMSO-treated and chloroquine-treated mice, whereas a 26% decrease in viability was observed in cells cultured with serum from curcumin-treated mice and treated with cisplatin compared without cisplatin (Figure 4B).

**Curcumin/cisplatin reduced tumor mass in BALB/c mice.** To determine whether curcumin in combination with cisplatin inhibits the growth of the 4T1 cell-derived tumors in BALB/c mice, treatment response was evaluated for 21 days. The tumor mass was significantly lower in mice treated with curcumin than in the controls ( $p < 0.0001$ ); however, a greater effect was observed in those treated with the curcumin–cisplatin combination than in those treated with curcumin alone, although there was no significant difference between the different treatments (Figure 5).

## Discussion

Currently, breast cancer is a serious public health concern, and the World Health Organization (23) reported that out of 19.3 million patients with cancer in 2020, 2.3 million had breast cancer, making it the most common type of cancer in women and the one with the highest mortality rate. Therefore, it is crucial to continue searching for novel medications and treatment approaches. The main causes of death in patients with breast cancer are drug resistance, recurrence, and metastasis (24–26). It has been observed that PAR4 is involved in these oncogenic mechanisms. PAR4 is reduced in patients in the late stages of the disease; this is considered a poor prognostic factor (3). PAR4 protein plays a fundamental role in the apoptosis of cancer cells but not in normal cells (27, 28). It participates in cell apoptosis both intrinsically and extrinsically through caspase-dependent mechanisms, and it plays an important role in sensitizing cells to the action of various therapeutic agents. It is known that PAR4 at baseline expression levels is unable to induce massive apoptosis of cancer cells and generating stress in the ER is necessary for its induction and secretion (29). Rangnekar *et al.* have extensively studied different secretagogues for the induction of PAR4 secretion (5, 9, 29), including chloroquine an antimalarial drug that has been used as an inhibitor of the immune response in systemic lupus erythematosus (30, 31) and against cancer (32–34). Thayyullathil *et al.* have reported reactive oxygen species-dependent activation of PAR4 in human malignant glioma cells (20). In this study, the effect

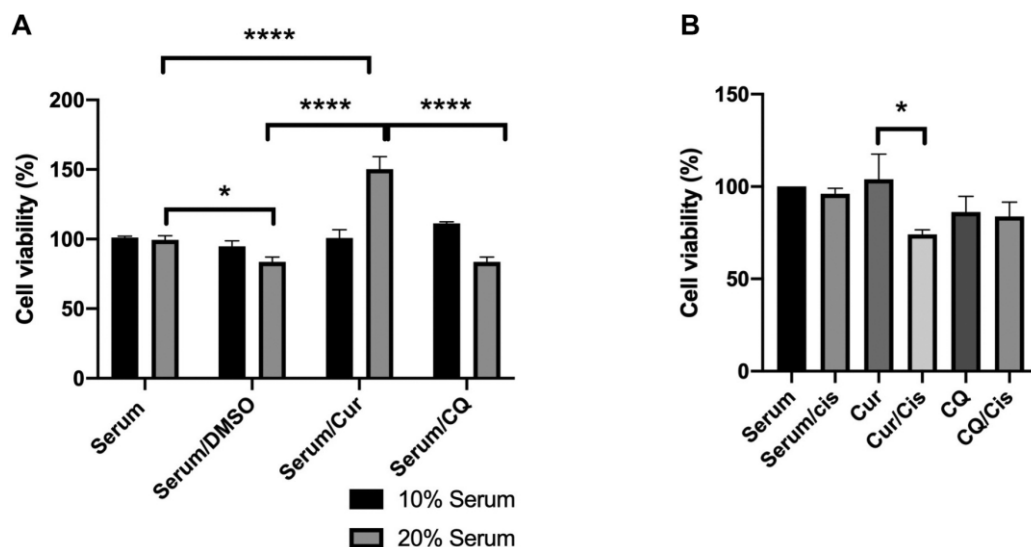


Figure 4. Analysis of viability of 4T1 cells exposed to serum from curcumin-treated mice A: Viability of cells treated with 10% and 20% serum from mice treated for 24 h with dimethyl sulfoxide (DMSO), curcumin (Cur) or chloroquine (CQ). B: Viability of cells incubated with 10% serum from mice and treated with/without cisplatin. Significantly different at  $*p<0.05$  and  $****p<0.0001$ .

of curcumin was analyzed as an endogenous PAR4 inducer and possible secretagogue. Before determining the effect of curcumin on the 4T1 cell line, analysis of the basal expression of PAR4 and GRP78 was performed; GRP78, an ER chaperone protein which is also found in the cell membrane, is preferentially overexpressed in aggressive, metastatic and chemoresistant cancers (13). Moreover, PAR4 interacts with GRP78 (both are expressed in the 4T1 cell line) and induces extrinsic apoptosis mediated by ER stress and activation of the FAS-associated death domain–caspase-8/caspase-3 pathway (8). Furthermore, the effect of curcumin on cell viability and PAR4 modulation was analyzed. A dose- and time-dependent decrease in cell viability was observed in the present study, as reported by Meiyanto *et al.* (35, 36). Curcumin dose-dependently increased PAR4 expression, and this was associated with the inhibition of cell proliferation. Similar results were published by Thayyullathil *et al.*, wherein they observed dose-dependent expression with maximal expression after 3 h (20).

Soluble PAR4 has been reported in conditioned media of mouse cells, as well as in sera of mice stimulated with different secretagogues, such as chloroquine, hydroxychloroquine and arilquin 1, and these can sensitize cancer cells (5, 9, 29, 30). In this study, we analyzed whether curcumin stimulates secretion of soluble PAR4 in mouse serum, and an increase in PAR4 expression in the serum of mice treated with curcumin and chloroquine was identified. We found that treatment of cells with 10% mouse serum did not significantly change cell

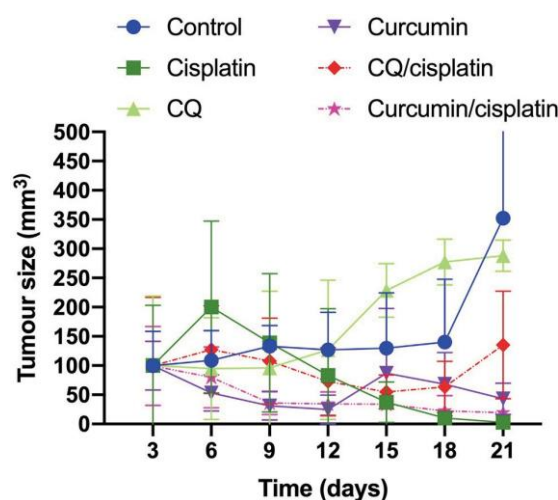


Figure 5. Treatment with curcumin and cisplatin in 4T1 tumor-bearing BALB/c mice. Tumor mass volume after treatment of BALB/c mice dimethyl sulfoxide (DMSO), curcumin or chloroquine (CQ).

viability; these results are very similar to those found by Burikhanov *et al.* (5). However, in cells cultured with 20% mouse serum, an increase in cell proliferation of approximately 50% within 24 h was seen in both 4T1 cells and other breast cancer cell lines (data not shown). The trace amounts of

curcumin present in serum may have induced the increase in cell proliferation, given the radio- and chemo-protective capacity of curcumin, and it may have promoted the expression of proliferation-inducing molecules (37, 38). Gardane *et al.* reported that low concentrations of curcumin (10 µg/ml and 20 µg/ml) stimulated the proliferation of KG-1a cells, whereas high concentrations (30 µg/ml to 100 µg/ml) induced an inhibitory effect (39).

In this study, treatment of mice with curcumin led to a decrease in tumor mass. However, treatment with curcumin followed by cisplatin led to complete tumor mass regression in mice compared with the control group. Zhao *et al.* reported that high levels of PAR4 in the serum and plasma of mice inhibited the growth of metastatic lung tumor nodules derived from Lewis lung carcinoma cells in syngeneic mice (14). On the other hand, Burikhanov *et al.* reported high levels of PAR4 in plasma samples from patients with renal cell carcinoma after the use of chloroquine (5).

In our results, the mice treated with chloroquine showed an unexpected effect because tumor inhibition was not observed, rather, there was an increase in tumor mass compared with the control group without treatment. Hence, the effects of this treatment in this group of mice should be analyzed in further studies.

Curcumin is a good inducer of PAR4 expression in breast cancer cells and a secretagogue in non-tumor cells *in vivo*. In addition, it sensitizes cells to the effect of cisplatin; hence, curcumin, alone or in combination with chemotherapy, might be used as an alternative treatment for breast cancer.

### Conflicts of Interest

The Authors declare that they have no conflicts of interest.

### Authors' Contributions

Formal analysis: Pablo Zapata Benavides, Oscar Alberto Alvarez-Quezada and Mariela Arellano-Rodríguez. Acquisition of funds: María Cristina Rodríguez-Padilla. Research: Norma Cesilia Arellano-Rodríguez, Pablo Zapata Benavides and Santiago Saavedra-Alonso. Methodology: Norma Cesilia Arellano-Rodríguez, Gerardo Vargas-Alanís, Juan Manuel Izaguirre-Alvarez and Diana Elisa Zamora-Ávila. Writing and final approval: All Authors.

### References

- Mundle SD: Par-4: a common facilitator/enhancer of extrinsic and intrinsic pathways of apoptosis. *Leuk Res* 30(5): 515-517, 2006. PMID: 16289745. DOI: 10.1016/j.leukres.2005.10.010
- Hebbar N, Wang C and Rangnekar VM: Mechanisms of apoptosis by the tumor suppressor Par-4. *J Cell Physiol* 227(12): 3715-3721, 2012. PMID: 22552839. DOI: 10.1002/jcp.24098
- Nagai MA, Gerhard R, Salaorni S, Fregnani JH, Nonogaki S, Netto MM and Soares FA: Down-regulation of the candidate tumor suppressor gene PAR-4 is associated with poor prognosis in breast cancer. *Int J Oncol* 37(1): 41-49, 2010. PMID: 20514395. DOI: 10.3892/ijo\_00000651
- Méndez-López LF, Zapata-Benavides P, Zavala-Pompa A, Aguado-Barrera ME, Pacheco-Calleros J, Rodríguez-Padilla C, Cerda-Flores RM, Cortés-Gutiérrez EI and Dávila-Rodríguez MI: Immunohistochemical analysis of prostate apoptosis response-4 (Par-4) in Mexican women with breast cancer: a preliminary study. *Arch Med Res* 41(4): 261-268, 2010. PMID: 20637369. DOI: 10.1016/j.arcmed.2010.05.005
- Burikhanov R, Hebbar N, Noothi SK, Shukla N, Sledziona J, Araujo N, Kudrimoti M, Wang QJ, Watt DS, Welch DR, Maranchie J, Harada A and Rangnekar VM: Chloroquine-inducible Par-4 secretion is essential for tumor cell apoptosis and inhibition of metastasis. *Cell Rep* 18(2): 508-519, 2017. PMID: 28076793. DOI: 10.1016/j.celrep.2016.12.051
- Guo H, Treude F, Krämer OH, Lüscher B and Hartkamp J: PAR-4 overcomes chemo-resistance in breast cancer cells by antagonizing cIAP1. *Sci Rep* 9(1): 8755, 2019. PMID: 31217499. DOI: 10.1038/s41598-019-45209-9
- Mabe NW, Fox DB, Lupo R, Decker AE, Phelps SN, Thompson JW and Alvarez JV: Epigenetic silencing of tumor suppressor Par-4 promotes chemoresistance in recurrent breast cancer. *J Clin Invest* 128(10): 4413-4428, 2018. PMID: 30148456. DOI: 10.1172/JCI99481
- Burikhanov R, Zhao Y, Goswami A, Qiu S, Schwarze SR and Rangnekar VM: The tumor suppressor Par-4 activates an extrinsic pathway for apoptosis. *Cell* 138(2): 377-388, 2009. PMID: 19632185. DOI: 10.1016/j.cell.2009.05.022
- Burikhanov R, Sviripa VM, Hebbar N, Zhang W, Layton WJ, Hamza A, Zhan CG, Watt DS, Liu C and Rangnekar VM: Arylquins target vimentin to trigger Par-4 secretion for tumor cell apoptosis. *Nat Chem Biol* 10(11): 924-926, 2014. PMID: 25218743. DOI: 10.1038/nchembio.1631
- Sviripa VM, Burikhanov R, Obiero JM, Yuan Y, Nickell JR, Dvoskin LP, Zhan CG, Liu C, Tsoodikov OV, Rangnekar VM and Watt DS: Par-4 secretion: stoichiometry of 3-arylquinoline binding to vimentin. *Org Biomol Chem* 14(1): 74-84, 2016. PMID: 26548370. DOI: 10.1039/c5ob01980j
- Hebbar N, Shrestha-Bhattarai T and Rangnekar VM: Cancer-selective apoptosis by tumor suppressor par-4. *Adv Exp Med Biol* 818: 155-166, 2014. PMID: 25001535. DOI: 10.1007/978-1-4471-6458-6\_7
- Lee AS: The Par-4-GRP78 TRAIL, more twists and turns. *Cancer Biol Ther* 8(22): 2103-2105, 2009. PMID: 19823030. DOI: 10.4161/cbt.8.22.10140
- Cohen M, Ribaux P, Epiney M and Irion O: Role of prostate apoptosis response 4 in translocation of GRP78 from the endoplasmic reticulum to the cell surface of trophoblastic cells. *PLoS One* 8(11): e80231, 2013. PMID: 24282526. DOI: 10.1371/journal.pone.0080231
- Zhao Y, Burikhanov R, Brandon J, Qiu S, Shelton BJ, Spear B, Bondada S, Bryson S and Rangnekar VM: Systemic Par-4 inhibits non-autochthonous tumor growth. *Cancer Biol Ther* 12(2): 152-157, 2011. PMID: 21613819. DOI: 10.4161/cbt.12.2.15734
- Mittal L, Aryal UK, Camarillo IG, Raman V and Sundararajan R: Effective electrochemotherapy with curcumin in MDA-MB-231-human, triple negative breast cancer cells: A global proteomics study. *Bioelectrochemistry* 131: 107350, 2020. PMID: 31518962. DOI: 10.1016/j.bioelechem.2019.107350

- 1 Jayarajan J, Angandoor S, Vedula SH, Sritharan S, Ganesan K, War AR and Sivalingam N: Curcumin induces chemosensitization to doxorubicin in Duke's type B coloadenocarcinoma cell line. *Mol Biol Rep* 47(10): 7883-7892, 2020. PMID: 33025506. DOI: 10.1007/s11033-020-05866-w
- 2 Johnson JJ and Mukhtar H: Curcumin for chemoprevention of colon cancer. *Cancer Lett* 255(2): 170-181, 2007. PMID: 17448598. DOI: 10.1016/j.canlet.2007.03.005
- 3 Chang YJ, Tai CJ, Kuo LJ, Wei PL, Liang HH, Liu TZ, Wang W, Tai CJ, Ho YS, Wu CH and Huang MT: Glucose-regulated protein 78 (GRP78) mediated the efficacy to curcumin treatment on hepatocellular carcinoma. *Ann Surg Oncol* 18(8): 2395-2403, 2011. PMID: 21347788. DOI: 10.1245/s10434-011-1597-3
- 4 Chang YJ, Huang CY, Hung CS, Chen WY and Wei PL: GRP78 mediates the therapeutic efficacy of curcumin on colon cancer. *Tumour Biol* 36(2): 633-641, 2015. PMID: 25277658. DOI: 10.1007/s13277-014-2640-3
- 5 Thayyullathil F, Rahman A, Pallichankandy S, Patel M and Galadari S: ROS-dependent prostate apoptosis response-4 (Par-4) up-regulation and ceramide generation are the prime signaling events associated with curcumin-induced autophagic cell death in human malignant glioma. *FEBS Open Bio* 4: 763-776, 2014. PMID: 25349781. DOI: 10.1016/j.fob.2014.08.005
- 6 Satherley LK, Sun PH, Ji KE, Mason M, Hargest R, Jiang WG and Ye L: Prostate apoptosis response-4 (PAR4) suppresses growth and invasion of breast cancer cells and is positively associated with patient survival. *Anticancer Res* 36(3): 1227- 1235, 2016. PMID: 26977019.
- 7 Niu S, Bremner DH, Wu J, Wu J, Wang H, Li H, Qian Q, Zheng H and Zhu L: I-Peptide functionalized dual-responsive nanoparticles for controlled paclitaxel release and enhanced apoptosis in breast cancer cells. *Drug Deliv* 25(1): 1275-1288, 2018. PMID: 29847177. DOI: 10.1080/10717544.2018.1477863
- 8 Global Health Estimates 2020: incidence and mortality. Geneva, World Health Organization (WHO), 2022. Available at <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/breast-cancer> [Last accessed on July 2, 2022]
- 9 Longley DB and Johnston PG: Molecular mechanisms of drug resistance. *J Pathol* 205(2): 275-292, 2005. PMID: 15641020. DOI: 10.1002/path.1706
- 10 Dent R, Valentini A, Hanna W, Rawlinson E, Rakovitch E, Sun P and Narod SA: Factors associated with breast cancer mortality after local recurrence. *Curr Oncol* 21(3): e418-e425, 2014. PMID: 24940101. DOI: 10.3747/co.21.1563
- 11 Dillekås H, Rogers MS and Straume O: Are 90% of deaths from cancer caused by metastases? *Cancer Med* 8(12): 5574-5576, 2019. PMID: 31397113. DOI: 10.1002/cam4.2474
- 12 Sells SF, Wood DP Jr, Joshi-Barve SS, Muthukumar S, Jacob RJ, Crist SA, Humphreys S and Rangnekar VM: Commonality of the gene programs induced by effectors of apoptosis in androgen-dependent and -independent prostate cells. *Cell Growth Differ* 5(4): 457-466, 1994. PMID: 8043520.
- 13 Shrestha-Bhattarai T, Hebbar N and Rangnekar VM: Par(-4)oxysm in breast cancer. *Cancer Cell* 24(1): 3-5, 2013. PMID: 23845436. DOI: 10.1016/j.ccr.2013.06.010
- 14 Wang P, Burikhanov R, Jayswal R, Weiss HL, Arnold SM, Villano JL and Rangnekar VM: Neoadjuvant administration of hydroxychloroquine in a phase I clinical trial induced plasma Par-4 levels and apoptosis in diverse tumors. *Genes Cancer* 9(5-6): 190-197, 2018. PMID: 30603055. DOI: 10.18632/genesandcancer.181
- 15 Ponticelli C and Moroni G: Hydroxychloroquine in systemic lupus erythematosus (SLE). *Expert Opin Drug Saf* 16(3): 411- 419, 2017. PMID: 27927040. DOI: 10.1080/14740338.2017.1269168
- 16 Esteve-Valverde E, Tapiz-Reula A, Ruiz D and Alijotas-Reig J: Systemic lupus erythematosus and hydroxychloroquine-related acute intermittent porphyria. *Rheumatol Int* 40(5): 777-783, 2020. PMID: 31865445. DOI: 10.1007/s00296-019-04500-8
- 17 Ovejero-Sánchez M, González-Sarmiento R and Herrero AB: Synergistic effect of Chloroquine and Panobinostat in ovarian cancer through induction of DNA damage and inhibition of DNA repair. *Neoplasia* 23(5): 515-528, 2021. PMID: 33930758. DOI: 10.1016/j.neo.2021.04.003
- 18 Anand K, Niravath P, Patel T, Ensor J, Rodriguez A, Boone T, Wong ST and Chang JC: A Phase II study of the efficacy and safety of chloroquine in combination with taxanes in the treatment of patients with advanced or metastatic anthracycline- refractory breast cancer. *Clin Breast Cancer* 21(3): 199-204, 2021. PMID: 34159901. DOI: 10.1016/j.clbc.2020.09.015
- 19 Hwang JR, Kim WY, Cho YJ, Ryu JY, Choi JJ, Jeong SY, Kim MS, Kim JH, Paik ES, Lee YY, Han HD and Lee JW: Chloroquine reverses chemoresistance via upregulation of p21<sup>WAF1/CIP1</sup> and autophagy inhibition in ovarian cancer. *Cell Death Dis* 11(12): 1034, 2020. PMID: 33277461. DOI: 10.1038/s41419-020-03242-x
- 20 Farhangi B, Alizadeh AM, Khodayari H, Khodayari S, Dehghan MJ, Khori V, Heidarzadeh A, Khaniki M, Sadeghizadeh M and Najafi F: Protective effects of dendrosomal curcumin on an animal metastatic breast tumor. *Eur J Pharmacol* 758: 188-196, 2015. PMID: 25863259. DOI: 10.1016/j.ejphar.2015.03.076
- 21 Meiyanto E, Putri H, Arum Larasati Y, Yudi Utomo R, Istighfari Jenie R, Ikawati M, Lestari B, Yoneda-Kato N, Nakamae I, Kawaichi M and Kato JY: Anti-proliferative and anti-metastatic potential of curcumin analogue, pentagamavunon-1 (PGV-1), toward highly metastatic breast cancer cells in correlation with ROS generation. *Adv Pharm Bull* 9(3): 445-452, 2019. PMID: 31592109. DOI: 10.15171/apb.2019.053
- 22 Farombi EO, Shrotriya S, Na HK, Kim SH and Surh YJ: Curcumin attenuates dimethylnitrosamine-induced liver injury in rats through Nrf2-mediated induction of heme oxygenase-1. *Food Chem Toxicol* 46(4): 1279-1287, 2008. PMID: 18006204. DOI: 10.1016/j.fct.2007.09.095
- 23 Zhang Q and Wu L: *In vitro* and *in vivo* cardioprotective effects of curcumin against doxorubicin-induced cardiotoxicity: a systematic review. *J Oncol* 2022: 7277562, 2022. PMID: 35237323. DOI: 10.1155/2022/7277562
- 24 Gardane A, Poonawala M and Vaidya A: Curcumin sensitizes quiescent leukemic cells to antimetabolic drug 5-fluorouracil by inducing proliferative responses in them. *Journal of Cancer Metastasis and Treatment* 2(7): 245, 2016. DOI: 10.20517/2394-4722.2016.11

Received July 12, 2022

Revised August 13, 2022

Accepted August 26, 2022

## 8.4 CAPITULO IV

---

### APOPTOSIS EN CÁNCER DE MAMA

La curcumina tiene un efecto anticancerígeno por su capacidad de inducir apoptosis en muchas líneas celulares y el modelo molinos a través de p 53, de las vías de fas, NF-kB sin embargo no se ha explorado su efecto en la expresión de los genes WT1 y Par-4, dos proteínas importantes, en el proceso carcinogénico. se ha asociado con la resistencia a la quimioterapia y un mal pronóstico de cáncer.

#### **Objetivo**

El trabajo analiza el efecto de la curcumina en la línea celular B16F10 como modulador de la expresión de WT1, Par-4 y Bcl-2, proteínas involucradas en la inhibición de la proliferación, la apoptosis y la quimiorresistencia celular.

#### **Resultados**

La curcumina disminuyó significativamente la viabilidad celular e incrementó la apoptosis y la fragmentación de ADN en las células B16F10. Asimismo, la curcumina redujo la expresión de WT1 y elevó la expresión de Par-4. En comparación con el cisplatino, la curcumina tuvo mayor efecto en la inducción de muerte celular.

#### **Conclusiones**

Estos resultados sugieren que la curcumina podría representar una opción terapéutica prometedora en las terapias antitumorales, destacando el efecto sinérgico de la curcumina en combinación con el cisplatino. De manera que los datos obtenidos, permiten abrir la posibilidad a futuras investigaciones con enfoque sinérgico entre curcumina y cisplatino, resaltando el potencial de la combinación de ambos como estrategia antitumoral.

## Productos obtenidos

Curcumin induces cellular death in b16f10 cell line by modulation of WT1 and Par-4 expression .<sup>1</sup>Pablo Zapata-Benavides, <sup>1</sup>Norma Cesilia Arellano-Rodríguez, <sup>1</sup>Juan Manuel Izaguirre-Alvarez, <sup>2</sup>Diana E. Zamora-Ávila, <sup>1</sup>Santiago Saavedra-Alonso, <sup>1</sup>Moisés Armides Franco-Molina, <sup>1</sup>Felipe de Jesús Torres-Del Muro, <sup>1</sup>Óscar Alberto Álvarez-Quezada, <sup>1</sup>Juan Pablo Molina-Morales & <sup>1</sup>Cristina Rodríguez-Padilla

Article

# Curcumin Induces Cellular Death in B16F10 Cell Line by Modulation of WT1 and Par-4 Expression

Pablo Zapata-Benavides<sup>1,\*</sup>, Norma Cesilia Arellano-Rodríguez<sup>1</sup>, Juan Manuel Izaguirre-Alvarez<sup>1</sup>, Diana Elisa Zamora-Ávila<sup>2</sup>, Santiago Saavedra-Alonso<sup>1</sup>, Moisés Armides Franco-Molina<sup>1</sup>, Felipe de Jesús Torres-Del Muro<sup>1</sup>, Óscar Alberto Álvarez-Quezada<sup>1</sup>, Juan Pablo Molina-Morales<sup>1</sup>, María Cristina Rodríguez-Padilla<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Autonomous University of Nuevo Leon (UANL), Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Biological Sciences, Pedro de Alba S/N, San Nicolas de los Garza, NL, 66455, México

<sup>2</sup> Autonomous University of Nuevo Leon (UANL), Department of Genetics, Faculty of Medicine Veterinary and Zootechnics, Av. Francisco Villa s/n, Ex Hacienda el Canadá, 66050 Gral. Escobedo, NL, México

\* Correspondence: Pablozapata@hotmail.com; Tel.: +52 811 050 3490

**Abstract:** Curcumin, a polyphenol derived from turmeric, has been shown to inhibit tumor growth in several types of cancer. This study explored how curcumin induces cell death in the B16-F10 cell line, focusing on regulating WT1 and Par-4 expression. B16-F10 cells were exposed to various concentrations of curcumin and cisplatin. Different parameters were evaluated, including cell viability, DNA fragmentation, apoptosis, and the expression and localization of WT1 and Par-4 using immunofluorescence and Pearson correlation analysis. The results revealed that curcumin had a robust impact on B16-F10 cells, which resulted in a significant reduction in cell viability, increased apoptosis levels, and substantial DNA fragmentation. Additionally, exposure to curcumin resulted in decreased WT1 and increased Par-4 expressions. These results suggest that curcumin may be a promising therapeutic option in antitumor therapies, highlighting the synergistic effect of curcumin in combination with cisplatin. Thus, the data obtained opens the possibility of future research with a synergistic approach using curcumin and cisplatin, emphasizing the potential of combining both as an antitumor strategy.

**Keywords:** WT1; Par-4; Curcumin; Cisplatin.

### **PAR-4 EN LA RECURRENCIA DE CÁNCER DE MAMA**

En cáncer de mama la recurrencia y metástasis, que son las principales causas de muerte por esta enfermedad. El estatus hormonal del tumor influye en su capacidad de diseminarse; los tumores que no expresan receptores de estrógeno o que son triples negativos tienen un peor pronóstico. Par-4 es una proteína que se encuentra disminuida o inhibida en los tumores más agresivos, especialmente después de la quimioterapia o durante la transición epitelio-mesenquimal (EMT), que es un proceso clave para la invasión y metástasis. Por lo tanto, Par-4 juega un papel importante en la recurrencia del cáncer de mama y podría ser un blanco terapéutico potencial.

#### **Objetivo**

En este capítulo, se analiza el papel de Par-4 en el cáncer de mama, en los procesos carcinogénico y la recurrencia de esta enfermedad. Para ello, se revisaron artículos publicados en el PubMed y otros bancos de datos que abordan la relación entre Par-4 y el cáncer de mama, así como los mecanismos moleculares por los que Par-4 ejerce su función antitumoral. Con esto se pretende aportar una visión actualizada y crítica sobre el estado del conocimiento de Par-4 en el contexto del cáncer de mama.

#### **Resultados**

La expresión de Par-4 es un factor clave en la resistencia y la recurrencia del cáncer de mama. Par-4 es una proteína proapoptótica que se expresa en las células normales y tumorales, y que se activa por el estrés celular. Cuando las células tumorales sufren una transición epitelio-mesenquimal, Par-4 se inhibe o se pierde, lo que favorece la supervivencia y la invasión de las células remanentes. Por lo tanto, Par-4 es un objetivo potencial para mejorar la eficacia de los tratamientos contra el cáncer de mama y prevenir su recurrencia

## **Conclusiones**

el conocimiento de la función del Par-4 en la oncogénesis mamaria ofrece una oportunidad de utilizarlo como un agente terapéutico para potenciar la erradicación de los tumores de cáncer de mama que presentan resistencia o recurrencia

## **Productos obtenidos**

Papel de Par-4 en tumores de cáncer de mama en etapas tardías y recurrentes Pablo Zapata-Benavides\*, Norma Cesilia Arellano-Rodríguez, María Cristina Rodríguez-Padilla  
Revista Biomédica <https://revistabiomedica.m>



## Papel de Par-4 en tumores de cáncer de mama en etapas tardías recurrentes

Pablo Zapata-Benavides\*, Norma Cesilia Arellano-Rodríguez, María Cristina Rodríguez-Padilla.

Departamento de Microbiología e Inmunología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL)

### ABSTRACT

#### Role of Par-4 in late-stage and recurrent breast cancer tumors.

Deaths in patients with breast cancer occur mainly due to recurrence and metastasis and not by the primary tumor, the aggressiveness of the tumor is associated with hormonal status, and estrogen receptor negative or triple negative tumors are neoplasms of poor prognosis that can induce metastasis or recurrence the low expression of Par-4 is associated with a poor prognosis, for this reason, we analyzed the involvement of Par-4 in tumor recurrence. A search was carried out for articles related to breast cancer, recurrence, and Par-4 in PubMed and other databases, to understand the relationship of *Par-4* as a tumor suppressor gene with the carcinogenic process and recurrence of breast cancer. Low Par-4 expression is associated with estrogen receptor negative tumors or with a high degree of transformation, the expression of Par-4 decreases or is blocked in the remaining cells after chemotherapy and during the process of epithelial mesenchymal transition (EMT) in tumor recurrence, noting that Par-4 is necessary and essential for the recurrence of breast cancer. The understanding of the biology of Par-4 in breast cancer opens the possibility of being used as a therapeutic strategy to contribute to the elimination of resistant or recurrent breast cancer tumors.

#### RESUMEN

Las muertes en los pacientes con cáncer de mama ocurren principalmente por la recurrencia y metástasis y no por el tumor primario. La agresividad del tumor se asocia al estatus hormonal; tumores receptores de estrógeno o triple negativos son neoplasias de mal pronóstico que tienen la capacidad de inducir metástasis o recurrencia.

#### Historial del artículo

Recibido: 26 nov 2022

Aceptado: 31 mar 2023

Disponible en línea: 1 may 2023

#### Palabras clave

Par-4, cáncer de mama, recurrencia

#### Keywords

Par-4, breast cancer, recurrence

Copyright © 2023 por autores y Revista Biomédica.

Este trabajo está licenciado bajo las atribuciones de la *Creative Commons* (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

\*Autor para correspondencia:

Pablo Zapata Benavides, Departamento de Microbiología e Inmunología. Universidad Autónoma de Nuevo León, Pedro de Alba s/n. Facultad de Ciencias Biológicas, San Nicolás de los Garza. Nuevo León 66450, México.

Tel: +52-818-329-4115

E-mail: [pablo.zapatabn@uanl.edu.mx](mailto:pablo.zapatabn@uanl.edu.mx)

<https://revistabiomedica.mx>

La baja expresión de la proteína Par-4 se asocia a un mal pronóstico, por esa razón analizamos la participación de la proteína de respuesta de apoptosis protáica (Par-4) en la recurrencia tumoral. Se realizó una búsqueda de artículos relacionados con cáncer de mama, recurrencia y Par-4 en el PubMed y en otros bancos de datos, con la finalidad de comprender la relación de *Par-4* como gen supresor de tumor con el proceso carcinogénico y recurrencia de cáncer de mama. La baja expresión de Par-4 está asociado con tumores receptor de estrógeno negativo o con alto grado de transformación. La expresión de Par-4 disminuye o es bloqueada en las células remanes después de la quimioterapia y durante el proceso de la transición epitelial a mesenquimal (EMT, por sus siglas en inglés) en la recurrencia del tumor, observándose que Par-4 es necesaria y esencial para la recurrencia del cáncer de mama. El entendimiento de la biología del Par-4 en el cáncer de mama abre la posibilidad de ser empleado como una estrategia terapéutica para que coadyuve con la eliminación de los tumores resistentes o recurrentes de cáncer de mama.

## INTRODUCCIÓN

### Epidemiología del cáncer de mama

El cáncer de mama es un conjunto de enfermedades que se caracteriza por una proliferación excesiva de las células como consecuencia de una inestabilidad genómica y se clasifican en cuatro subtipos moleculares y 21 histológicos distintos, de acuerdo con el tipo de tejido donde se originó el tumor.

El número de casos de cáncer de mama va en aumento constante, a nivel mundial ha superado al cáncer de pulmón como el tipo de cáncer más comúnmente diagnosticado. La probabilidad de que una mujer desarrolle cáncer de mama invasivo es de 12.9%. El número de casos nuevos diagnosticados en 2021 en los Estados Unidos fue de 290,560 de los cuales el 99.7% se presentó en mujeres y el 0.93% en hombres. La mortalidad en mujeres fue de 98.79% mientras que en hombres fue de 1.21% (1, 2).

La mortalidad por cáncer de mama en mujeres norteamericanas de raza negra es un 41% más alto

que en mujeres blancas, a pesar de tener tasas de incidencia similares o más bajas, superando al cáncer de pulmón (1, 2). La severidad del cáncer depende de su carácter invasivo o no invasivo; el cáncer de mama *in situ* representa el 19 % del total, siendo el carcinoma ductal y el carcinoma lobular los dos tipos principales de cáncer de mama *in situ*. Por otro lado, el cáncer invasivo o infiltrante se presenta alrededor del 81 a 82% de los casos, y es el carcinoma globular invasivo el subtipo histológico más común (2).

### Clasificación del cáncer de mama

Con base en el conocimiento de la biología del cáncer de mama y con la finalidad de contar con herramientas que permitan un mejor diagnóstico, pronóstico y estrategias terapéuticas, se clasifica de acuerdo con su estatus hormonal. Existe una serie de biomarcadores de cáncer de mama asociados a la evolución tumoral, como son: receptor de estrógeno (RE), receptor de progesterona (RP) y receptor-2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2, por sus siglas en inglés); que se usan en forma rutinaria en la evaluación clínica y permiten clasificarlos en tipo luminal con expresión de RE y cuya frecuencia que oscila entre el 75 y 80% de los tumores de mama y los no luminales que no expresan RE, tienen un comportamiento más agresivo y representan entre el 20 y el 25% de los tumores de mama. La proteína Par-4 se encuentra disminuida en tumores receptor estrógeno negativo y tumores triple negativos indicando que puede ser considerado como un biomarcador predictivo del pronóstico del paciente (Figura 1). De acuerdo con esta clasificación surgen cuatro subtipos diferentes descritos de forma ascendente de acuerdo con su agresividad (3-5):

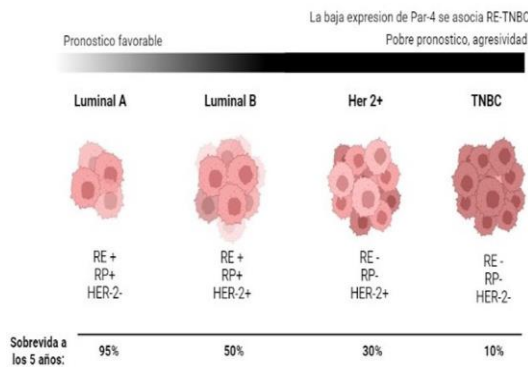
Luminal A [receptor hormonal (HR, por sus siglas en inglés)+/HER2-): es el tipo más común de cáncer de mama y se asocian a un pronóstico más favorable, responde mejor a la terapia hormonal, presenta menor recurrencia y su incidencia es del 50 al 60%.

Luminal B (HR+/HER2+/-): este grupo se caracteriza por ser HR+ y HER2+/-, se asocian con un peor pronóstico en comparación con el tipo

luminal A y se presenta entre un 10 y un 20% del cáncer de mama.

HER-2+: tiene un pobre pronóstico, responde a las terapias anti HER-2 y a los inhibidores de Tirosina quinasa.

Basal o triple negativo (HR-/HER2-): este tipo de cáncer se denominan triple negativo porque no cuenta con expresión de RE, RP y HER2. Se caracteriza por ser más agresivo y tener un mal pronóstico. El cáncer de mama triple-negativo (TNBC) representa del 15 al 20% de los casos de cáncer de mama.



**Figura 1. Expresión de Par-4 y su relación con el pronóstico en cáncer de mama.** Tumores RE+, RP+ y HER2- tienen un mejor pronóstico que aquellos tumores con RE-, RP- y HER2+, sin embargo, los tumores TNBC son más agresivos, por lo cual los pacientes tienen un pronóstico pobre.

### Recurrencia de cáncer de mama

Los avances tecnológicos han impactado en el diagnóstico y la terapia del cáncer de mama, disminuyendo la mortalidad hasta en un 38% de los casos (6). La mayoría de las muertes no son consecuencia del tumor primario, sino como consecuencia de la metástasis y la recurrencia del tumor, que suelen invadir órganos vitales y generar resistencia a la quimioterapia. Estas dos características tumorales son los dos aspectos más desafiantes en el tratamiento del cáncer de mama, que la hacen ser una enfermedad incurable. La tasa

de supervivencia a 5 años para las mujeres con cáncer de mama invasivo localizado es del 90 %, para cáncer invasivo regional diseminado en ganglios linfáticos regionales de 86% y para la recurrencia metastásica diseminada a partes distantes del cuerpo de 29 % (7).

La recurrencia del cáncer de mama es la reaparición del tumor después de cierto periodo, que puede ir de meses a años después de su tratamiento. Como se ha mencionado previamente la recurrencia puede ser local si presenta en la misma área donde se originó el tumor, regional si aparece cerca del área donde se originó o metastásico si la aparición del tumor es en áreas distantes al sitio de aparición original, como son pulmones, hueso y cerebro (8-10). Por años se ha tratado de establecer el patrón de recurrencia de cáncer de mama, hasta el momento se sugiere que el cáncer de mama con RE negativo se asocia a un mayor riesgo de recurrencia durante los primeros 5 años desde su diagnóstico, en comparación con los cánceres de mama RE positivo. El subtipo luminal A muestra tasas más bajas de recurrencia en comparación con los otros, el luminal B es de riesgo intermedio y TNBC el de mayor riesgo después de la conservación de la mama o mastectomía (11). Los tumores TNBC se relacionan con alto riesgo de recurrencias distales a cerebro y metástasis visceral en comparación con los tumores que tiene expresión positiva de receptores hormonales (12). Los tumores recurrentes de cáncer de mama por lo general tienen las mismas características del tumor original en su estatus hormonal; sin embargo, en algunos casos éste puede cambiar, por ejemplo, el cáncer de mama RE positivo en la recurrencia puede convertirse en estatus hormonal negativo (8, 9).

Las recurrencias regionales han disminuido con el tiempo debido al diagnóstico clínico y molecular oportunos, así como a los avances en el tratamiento. Los factores que predisponen a la recurrencia están asociados con la aparición del cáncer en etapas tempranas, tumores grandes con receptores hormonales negativos e invasión en los ganglios (8, 9). La obesidad juega un papel importante como factor de riesgo que reduce significativamente la supervivencia en los pacientes obesos con cáncer de

mama se incrementa el riesgo de recurrencia del 30 al 40%, debido a que se asocia con el aumento de la supervivencia y persistencia de las células tumorales residuales (13-16). En personas obesas se ha observado una menor expresión de la proteína Par-4 en comparación con los delgados; tanto en tejido adiposo como a niveles plasmáticos (17). Conforme avanza el proceso carcinogénico los factores genéticos y epigenéticos influyen en la recurrencia tumoral por la pérdida de la expresión de genes supresores de tumor como es el caso del gen *Par-4* (18).

#### **Par-4**

La proteína Par-4 fue identificada como un producto de genes tempranos durante la apoptosis en cáncer de próstata mediante una selección diferencial, por el grupo del Dr. V M Rangnekar (19). *Par-4* es un gen supresor de tumor que codifica una proteína de 40 kDa que contiene 340 aminoácidos, y se caracteriza por tener en su extremo carboxilo terminal una estructura de cremallera de leucinas, se encuentra en la región 12q21 y está altamente conservada en humanos, ratones y ratas (20). Recientemente se le han descubierto múltiples funciones; no obstante, la más estudiada es su capacidad de inducir apoptosis en células cancerígenas, pero no en células normales (21, 22). Par-4 es una proteína que se encuentra principalmente en citoplasma y se transloca al núcleo, y su estructura cuenta con dos secuencias de localización nuclear y una secuencia de exportación al núcleo, además, de una secuencia corta de 52 aminoácidos denominada dominio selectivo para la inducción de apoptosis en células cancerosas (SAC), que es la responsable de la actividad apoptótica. En su extremo carboxilo terminal donde se encuentra la cremallera de leucinas, interacciona con varias proteínas induciendo su autoregulación o la regulación de otras proteínas, por ejemplo, con la proteína del tumor de *Wilms* (WT1) a través de sus dedos de zinc modula la transcripción y suprimiendo la expresión de la proteína 2 del linfoma de células B (Bcl-2) uniéndose directamente a su promotor (23-25). Existe una relación estrecha entre Par-4 y Bcl-2, la inducción de Par-4 en líneas celulares de

cáncer de mama disminuye la expresión de Bcl-2, así como la reducción del crecimiento y la invasión celular; por el contrario, la inhibición de la expresión de Par-4 con RNA de interferencia (iRNA) induce un incremento de Bcl-2 (26, 27).

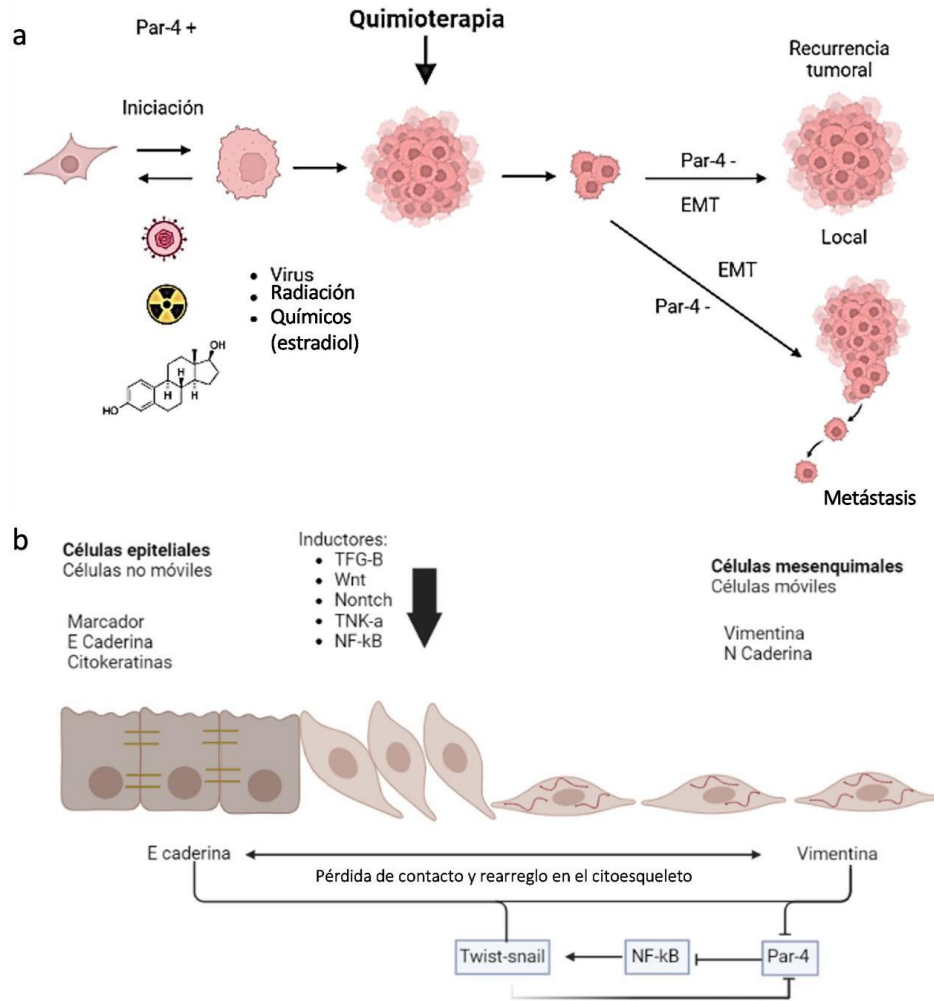
Par-4 es una proteína pro apoptótica que se encuentra de forma basal en muchos tipos de células normales y tumorales, e induce apoptosis después de un estímulo de muerte por drogas (22). Cuando se encuentra presente en las células tumorales puede sensibilizar a las células a diferentes tipos de drogas anticancerígenas induciendo apoptosis tanto por vía intrínseca como por vía extrínseca (28). Por la vía intrínseca, Par-4 endógeno migra del citoplasma al núcleo donde ejerce su acción apoptótica a través de su dominio SAC (29), mientras que Par-4 soluble ejerce su efecto en forma exógena mediante la interacción con la proteína 78 regulada por glucosa (GRP78) (22). GRP78 es una proteína chaperona del retículo endoplásmico (ER, por sus siglas en inglés) que ejerce su función en el control de calidad durante el plegamiento de las proteínas y en la señalización transmembrana del ER (22). Esta proteína incrementa su nivel de expresión conforme incrementa el proceso carcinogénico en cáncer de mama (29). GRP78 se encuentra en la superficie celular y manda una señal que promueve la apoptosis a través de los dominios de muerte y la activación de caspasas 8 y 3 (30, 31). En las células trofoblásticas se ha visto una relación entre la expresión de Par-4 y la localización de GRP78 en la superficie celular (32). Por otro lado, las células cancerígenas se caracterizan por tener una elevada expresión de GRP78 relacionada con la agresividad lo cual lo hace un blanco ideal para que Par-4 induzca muerte celular a través de esta vía (31). Otra particularidad de la proteína Par-4 es que está expresada en las células sanas (no cancerígenas) y puede ser secretada por secretagogos que inducen la activación de la secreción vía p53, después de una estimulación del ER (33).

#### **Par-4 en recurrencia**

La pérdida de la expresión del gen *Par-4* se ha reportado como un marcador de pobre pronóstico

en pacientes con cáncer de mama (34). Su expresión se encuentra disminuida en cáncer de páncreas, carcinoma renal, adenocarcinoma de pulmón, carcinoma de próstata y cáncer de mama (34-37). Su expresión disminuida es necesaria y suficiente

para promover la recurrencia y la resistencia a la quimioterapia (Figura 2a); por lo tanto, su baja expresión se asocia con una respuesta deficiente a la quimioterapia y con una posible recaída en los pacientes con cáncer de mama (18).



**Figura 2. Pérdida de la expresión de Par-4 y la promoción de la recurrencia y/o metástasis en cáncer de mama.** a: La pérdida de la expresión de Par-4 después de la administración de quimioterapia puede inducir recurrencia tumoral y/o metástasis generando células cancerígenas con características especiales que incrementan su agresividad. b: La transición epitelial mesotelial está implicada en el silenciamiento de Par-4 a través del factor de transcripción de Twist y el secuestro por los filamentos de vimentina en tumores recurrentes y metastásicos

La baja expresión de Par-4 está asociada con los subtipos de cáncer de mama agresivos y los diferentes estudios muestran, una menor expresión de la proteína en tumores receptores de estrógeno negativo, tumores grado 3 y de tipo basal (38). Estos tipos presentan mayor riesgo de recurrencia (10-12). Los trabajos realizados por nuestro equipo sugieren que los bajos niveles de expresión de Par-4 están relacionados con un pronóstico desfavorable, ya que se encontró baja reactividad de Par-4 en tejidos de pacientes con una supervivencia corta comparado con los pacientes con tumor benigno o con una supervivencia larga, sugiriendo que Par-4 puede jugar un papel como gen supresor de tumor (39, 40).

La regulación de Par-4 es un proceso complejo ya que existen factores que modulan su expresión génica vía promotor o a través de modificaciones epigenéticas, además de las postraduccionales y la interacción con otras proteínas que activan o reprimen su función (18, 36, 41).

La fosforilación juega un papel importante en la actividad proapoptótica, localización y escisión de la proteína Par-4 por las caspasas 3 y 8, así como la capacidad de inducir apoptosis selectivamente en células cancerígenas (20). La apoptosis selectiva en células cancerígenas y no de las células normales está dada en parte por la alta expresión de la proteína quinasa A (PKA), que juega un papel precanceroso en las células tumorales. PKA induce la capacidad proapoptótica de Par-4 al fosforilar el residuo de treonina 155 (T155) en el dominio SAC en células cancerosas, el cual es esencial para la apoptosis (41,42). La translocación nuclear de Par-4 es fundamental para la inhibición de la actividad de supervivencia celular por el factor nuclear  $\kappa$ B [NF- $\kappa$ B, por sus siglas en inglés] (20). Por el contrario, la fosforilación en los residuos de serina 124 y 231 (S124 y S231) por la caseína cinasa 2 (CK2, por sus siglas en inglés) impide la escisión de Par-4 mediada por caspasas (43, 44). Además, la fosforilación en el residuo de serina 249 (S249) por proteína quinasa B (Akt1) bloquea la traslocación de Par-4 al núcleo, alterando la función proapoptótica de la proteína, por lo que promueve así la supervivencia celular (41).

Se ha observado la disminución de la expresión de Par-4 en las células residuales después de la administración de quimioterapia (30). Además, en un modelo murino genéticamente modificado con una baja expresión de la proteína Par-4, se observó la aparición y recurrencia de cáncer de mama, por lo que Par-4 es considerado un regulador negativo de la recurrencia del cáncer de mama (38).

#### **Par-4 en la transición epitelial a mesenquimal**

La EMT se ha identificado como un impulsor crítico de la patología del cáncer, como son carcinogénesis, metástasis y la resistencia a los medicamentos por lo que promueve un pobre pronóstico clínico (45-48).

La EMT es un proceso biológico involucrado en la embriogénesis, en el que las células epiteliales inmóviles adquieren las características de movilidad de las células mesenquimales. Para que se lleve a cabo el proceso de transición de células epiteliales a células mesenquimatosas, se requiere una reprogramación genética donde se reprimen los genes epiteliales y se activan los genes mesenquimales (48). Existen tres grupos principales de genes que intervienen en el desarrollo de la EMT, los inductores como factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), Wnt (el nombre del gen proviene de la fusión de las palabras Wingless e integrated), Notch (nombre del gen proviene de la cepa de la mosca Notch donde se observó por primera vez), factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) y factor inducible por hipoxia (HIF) (49-52), que activan a los factores de transcripción dedos de Zinc de la caja E vinculantes con la caja homeótica (Zeb, por sus siglas en inglés), Twist [también conocida como class A basic helix-loop-helix protein 38 (bHLHa38 por sus siglas en inglés)] y Snail, denominados reguladores (53-55), y estos a su vez modulan la expresión de E-cadherina y vimentina, genes efectores que reorganizan a las proteínas de unión y de citoesqueleto (Figura 2b) para disociar el arreglo de las células epiteliales (56, 57).

Se ha propuesto que la EMT contribuye a la diseminación metastásica de las células de cáncer de mama. Los factores de transcripción que

promueven la EMT determinan un continuo cambio de diferentes estados del proceso. Por el contrario, el receptor de estrógeno  $\alpha$  (RE $\alpha$ ) ayuda a mantener el fenotipo epitelial de las células de cáncer de mama, afectando los factores de transcripción que modulan la EMT y su expresión es crucial para las terapias endocrinas eficaces (54, 55).

Durante el proceso de transición de las células epiteliales a mesenquimatosas en tumores recurrentes de cáncer de mama se promueve el silenciamiento epigenético, a través de modificaciones bivalentes de las histonas de *Par-4* y de la represión de *Twist* sobre el promotor de *Par-4*. Se ha observado que el silenciamiento de *Par-4* puede revertirse con inhibidores farmacológicos de la modificación de las histonas y sensibiliza a los tumores recurrentes a la quimioterapia tanto *in vivo* como *in vitro* (18). Por otra parte, en células de cáncer de páncreas metastásico se ha observado una doble función de *Par-4* en la anulación de la EMT y el cambio en la transición mesenquimal a epitelial (58).

Uno de los principales problemas en cáncer de mama es la resistencia a la quimioterapia en células triples negativas; el cisplatino o cis-diaminodicloroplatino (CDDP, quimioterapéutico que inhibe la síntesis de DNA y se usa para diferentes tipos de cáncer, puede revertir la metástasis del cáncer de mama mediante el bloqueo de la EMT (59). La sobreexpresión de *Par-4* combinada con CDDP ejerce un efecto sinérgico en líneas celulares y suprime el crecimiento del xenoinjerto en ratones desnudos (60). La curcumina incrementa la expresión de *Par-4* y sensibiliza la línea celular de cáncer de mama murino 4T1 al CDDP (61). Por otra parte, Tan y col. observaron que la regulación negativa de *Par-4* confiere resistencia a CDDP a través de la EMT dependiente de la vía fosfatidilinositol-3-kinasa (PI3K/Akt) en la línea celular primaria de tumor pancreático humano (BXPC-3); por lo tanto, *Par-4* puede ser un objetivo potencial para superar la resistencia a CDDP en el cáncer de páncreas. Además, la expresión ectópica de *Par-4* revirtió la resistencia a EMT y CDDP en células BXPC-3/CDDP (62). Durante la apoptosis

inducida por CDDP y otros compuestos en líneas celulares humanas normales y tumorales, *Par-4* es cortado por las caspasas 3 y 8 en el ácido aspártico 47. de la posición 131 de la proteína generando dos productos, el fragmento de 25 kDa se acumula en el núcleo generando apoptosis y bloqueando la actividad de NF- $\kappa$ B (63-65).

El restablecimiento en la expresión de *Par-4* revierte el proceso de la EMT, restringe la resistencia a la quimioterapia y promueve la regresión tumoral. En un modelo murino y en pacientes con cáncer renal se ha observado un incremento en la expresión de la proteína *Par-4*, en suero o plasma, después de la administración de cloroquina o hidroxicloroquina, induciendo una marcada reducción del volumen tumoral o inhibición de la metástasis (66). Por otro lado, la regulación ascendente de *Par-4* por *Forkhead box O3* (Foxo3a, por sus siglas en inglés) después del tratamiento con medicamentos, dirigidos hacia la vía de señalización fosfatidilinositol-3-kinasa/proteína kinasa B/diana de rapamicina en células de mamífero (PI3K/Akt/mTOR, por sus siglas en inglés), limita la supervivencia a largo plazo de las células de cáncer residuales (67). El incremento de *Par-4* mediado por el fármaco 1,1'- $\beta$ -d-glucopiranosil-3,3'-bis(5-bromoindolil)-octilmetano (NGD16) inhibe la capacidad de las células de cáncer de mama triple negativo (MDA-MB-231) para migrar e invadir (68).

Por lo tanto, la proteína *Par-4* puede ser una buena propuesta terapéutica contra diferentes tipos de cáncer (69-71), como el cáncer de mama agresivo (HER-2 positivo o triple negativo), por su capacidad de inducir apoptosis selectivamente en células cancerígenas, su capacidad de quimio sensibilizar y bloquear o revertir los procesos de recurrencia y metástasis a través de la sobreexpresión de la proteína con plásmidos o vectores virales, así como la inducción de *Par-4* soluble por secretagogos (72, 73).

## REFERENCIAS

- Giaquinto AN, Miller KD, Tossas KY, Winn RA, Jemal A, Siegel RL. Cancer statistics for African American/Black people 2022. *CA Cancer J Clin.* 2022 Feb;72(3):202-29.

- Siegel RL, Miller KD, Fuchs HE, Jemal A. Cancer statistics, 2022. *CA Cancer J Clin.* 2022 Jan;72(1):7–33. <http://dx.doi.org/10.3322/caac.21708>
- Alcaide-Lucena M, Rodríguez-González CJ, de Reyes-Lartategui S, Gallart-Aragón R, Sánchez-Barrón MT, García-Rubio J, et al. Molecular classification of breast cancer. Treatment and prognosis implications. *Cir Andal.* 2021 May;32(2):155–9. doi: 10.37351/2021322.9
- Marchiò C, Annaratone L, Marques A, Casorzo L, Berrino E, Sapino A. Evolving concepts in HER2 evaluation in breast cancer: Heterogeneity, HER2-low carcinomas and beyond. *Semin Cancer Biol.* 2021 Jul; 72: 123–135. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2020.02.016>
- Sakach E, O'Regan R, Meisel J, Li X. Molecular Classification of Triple Negative Breast Cancer and the Emergence of Targeted Therapies. *Clin Breast Cancer.* 2021 Sep;21(6): 509–520. <https://doi.org/10.1016/j.clbc.2021.09.003>
- DeSantis CE, Ma J, Goding-Sauer A, Newman LA, Jemal A. Breast cancer statistics, 2017, racial disparity in mortality by state: Breast Cancer Statistics, 2017. *CA Cancer J Clin.* 2017 Oct;67(6):439–48. <http://dx.doi.org/10.3322/caac.21412>
- Scully OJ, Bay BH, Yip G, Yu Y. Breast cancer metastasis. *Cancer genomics & proteomics.* 2012 Oct; 9(5): 311–320. <https://cgp.iiarjournals.org/content/9/5/311.long>
- He XM, Zou DH. The association of young age with local recurrence in women with early-stage breast cancer after breast-conserving therapy: a meta-analysis. *Sci Rep.* 2017 Sep;7(1):11058. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-017-10729-9>
- Fragomeni SM, Sciallis A, Jeruss JS. Molecular subtypes and local-regional control of breast cancer. *Surg Oncol Clin N Am.* 2018 Jan; 27(1): 95–120. doi: 10.1016/j.soc.2017.08.005
- Jin L, Han B, Siegel E, Cui Y, Giuliano A, Cui X. Breast cancer lung metastasis: Molecular biology and therapeutic implications. *Cancer Biol. Ther.* 2018 Mar; 19(10): 858–868. doi: 10.1080/15384047.2018.1456599
- Belkacemi Y, Hanna NE, Besnard C, Majdoul S, Gligorov J. Local and regional breast cancer recurrences: Salvage therapy options in the new era of molecular subtypes. *Front Oncol.* 2018 Apr; 8: 112. doi: 10.3389/fonc.2018.00112
- O'Reilly D, Al Sendi M, Kelly CM. Overview of recent advances in metastatic triple negative breast cancer. *World J Clin Oncol.* 2021 Mar; 12(3): 164. doi: 10.5306/wjco.v12.i3.164
- Lee K, Kruper L, Dieli-Conwright CM, Mortimer JE. The impact of obesity on breast cancer diagnosis and treatment. *Curr Oncol Rep.* 2019 Mar;21(5):41. <http://dx.doi.org/10.1007/s11912-019-0787-1>
- Ecker BL, Lee JY, Sterner CJ, Solomon AC, Pant DK, Shen, F, et al. Impact of obesity on breast cancer recurrence and minimal residual disease. *Breast Cancer Res.* 2019 Mar; 21(1): 1–16. doi: 10.1186/s13058-018-1087-7
- Kothari C, Diorio C, Durocher F. The Importance of Breast Adipose Tissue in Breast Cancer. *Int J Mol Sci.* 2020 Aug; 21(16): 5760. <https://doi.org/10.3390/ijms21165760>
- Jiralerspong S, Goodwin PJ. Obesity and Breast Cancer Prognosis: Evidence, Challenges, and Opportunities. *J Clin Oncol: official journal of the American Society of Clinical Oncology.* 2016 Dec; 34(35): 4203–4216. doi: 10.1200/JCO.2016.68.4480
- Araujo N, Sledziona J, Noothi SK, Burikhanov R, Hebbar N, Ganguly S, et al. Tumor Suppressor Par-4 Regulates Complement Factor C3 and Obesity. *Front Oncol.* 2022 Mar; 12: 860446. <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.860446>
- Mabe NW, Fox DB, Lupo R, Decker AE, Phelps SN, Thompson JW, et al. Epigenetic silencing of tumor suppressor Par-4 promotes chemoresistance in recurrent breast cancer. *J Clin Invest.* 2018 Aug;128(10):4413–28. <http://dx.doi.org/10.1172/JCI99481>
- Sells SF, Wood DP Jr, Joshi-Barve SS, Muthukumar S, Jacob RJ, Crist SA, et al. Commonality of the gene programs induced by effectors of apoptosis in androgen-dependent and -independent prostate cells. *Cell Growth Differ.* 1994 Apr;5(4):457–66. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8043520/>
- Cheratta AR, Thayyullathil F, Pallichankandy S, Subburayan K, Alakkal A, Galadari S. Prostate apoptosis response-4 and tumor suppression: it's not just about apoptosis anymore. *Cell Death Dis.* 2021 Jan;12(1):47. <http://dx.doi.org/10.1038/s41419-020-03292-1>
- Tiruttani Subhramanyam UK, Kubicek J, Eidhoff UB, Labahn J. Structural basis for the regulatory interactions of proapoptotic Par-4. *Cell Death Differ.* 2017 Jun; 24(9): 1540–1547. <https://doi.org/10.1038/cdd.2017.76>
- Ghosalkar J, Sonawane V, Pisal T, Achrekar S, Pujari R, Chugh A. Prostate Apoptosis Response-4 (Par-4): A Novel Target in Pyronaridine-Induced Apoptosis in Glioblastoma (GBM) Cells. *Cancers.* 2022 Jun; 14(13): 3198. <https://doi.org/10.3390/cancers14133198>
- Zhang J, Sun A, Dong Y, Wei D. Recombinant production and characterization of SAC, the core domain of par-4, by SUMO fusion system. *Appl Biochem Biotechnol.* 2018 Oct;184(4):1155–67. <http://dx.doi.org/10.1007/s12010-017-2599-9>
- Santiago SA, Pablo ZB, Edgar MG, Karina CA, Mariela AR, Cristina RP. Truncated WT1 Protein Isoform Expression Is Increased in MCF-7 Cells with Long-Term Estrogen Depletion. *Int J Breast Cancer.* 2021 Nov; 2021:6282514. doi: 10.1155/2021/6282514.



- Cheema SK, Mishra SK, Rangnekar VM, Tari A M, Kumar R, Lopez-Berestein G. Par-4 transcriptionally regulates Bcl-2 through a WT1-binding site on the bcl-2 promoter. *J Biol Chem.* 2003 May;278(22): 19995–20005. <https://doi.org/10.1074/jbc.M205865200>
- Satherley LK, Sun PH, Ji KE, Mason M, Hargest R, Jiang WG, et al. Prostate Apoptosis Response-4 (PAR4) Suppresses Growth and Invasion of Breast Cancer Cells and Is Positively Associated with Patient Survival. *Anticancer Res.* 2016 Mar; 36(3): 1227–1235. <https://ar.iiarjournals.org/content/36/3/1227>
- de Bessa Garcia SA, Pavanelli AC, Cruz E Melo N, Nagai MA. Prostate apoptosis response 4 (PAR4) expression modulates WNT signaling pathways in MCF7 breast cancer cells: A possible mechanism underlying PAR4-mediated docetaxel chemosensitivity. *Int J Mol Med.* 2017 Feb; 39(4): 809–818. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2017.2900>
- Burikhanov R, Zhao Y, Goswami A, Qiu S, Schwarze SR, Rangnekar VM. The tumor suppressor Par-4 activates an extrinsic pathway for apoptosis. *Cell.* 2009 Jul;138(2):377–88. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2009.05.022>
- Shrestha-Bhattarai T, Rangnekar VM. Cancer-selective apoptotic effects of extracellular and intracellular Par-4. *Oncogene.* 2010 May;29(27):3873–80. <http://dx.doi.org/10.1038/onc.2010.141>
- Guo H, Treude F, Krämer OH, Lüscher B, Hartkamp J. PAR-4 overcomes chemo-resistance in breast cancer cells by antagonizing cIAP1. *Sci Rep.* 2019 Jun;9(1):8755. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-019-45209-9>
- Yao X, Liu H, Zhang X, Zhang L, Li X, Wang C, et al. Cell surface GRP78 accelerated breast cancer cell proliferation and migration by activating STAT3. *PLoS One.* 2015 May;10(5):e0125634. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0125634>
- Cohen M, Ribaux P, Epiney M, Irion O. Role of prostate apoptosis response 4 in translocation of GRP78 from the endoplasmic reticulum to the cell surface of trophoblastic cells. *PLoS One.* 2013 Nov;8(11):e80231. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0080231>
- Burikhanov R, Shrestha-Bhattarai T, Hebbar N, Qiu S, Zhao Y, Zambetti GP, et al. Paracrine apoptotic effect of p53 mediated by tumor suppressor par-4. *Cell Rep.* 2014 Jan;6(2):271–7. <http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2013.12.020>
- Nagai MA, Gerhard R, Salaorni S, Fregnani JHTG, Nonogaki S, Netto MM, et al. Down-regulation of the candidate tumor suppressor gene PAR-4 is associated with poor prognosis in breast cancer. *Int J Oncol.* 2010 Jul;37(1):41–9. [http://dx.doi.org/10.3892/ijo\\_00000651](http://dx.doi.org/10.3892/ijo_00000651)
- Ahmed MM, Sheldon D, Fruitwala MA, Venkatasubbarao K, Lee EY, Gupta S, et al. Downregulation of PAR-4, a pro-apoptotic gene, in pancreatic tumors harboring K-ras

- Mol Oncol. 2017 May;11(7): 847–859. <https://doi.org/10.1002/1878-0261.12080>
47. Georgakopoulos Soares I, Chartoumpakis DV, Kyriazopoulou V, Zaravinos A. EMT Factors and Metabolic Pathways in Cancer. *Front Oncol.* 2020 Apr; 10: 499. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.00499>
  48. Oghbaei F, Zarezadeh R, Jafari-Gharabaghloou D, Ranjbar M, Nouri M, Fattahi A, et al. Epithelial-mesenchymal transition process during embryo implantation. *Cell Tissue Res.* 2022 Jan; 388(1): 1–17. <https://doi.org/10.1007/s00441-021-03574-w>
  49. Francesco EM, Maggiolini M, Musti AM. Crosstalk between Notch, HIF-1 $\alpha$  and GPER in Breast Cancer EMT. *Int J Mol Sci.* 2018 Jul;19(7): 2011. <https://doi.org/10.3390/ijms19072011>
  50. Xu X, Zhang L, He X, Zhang P, Sun C, Xu X, et al. TGF- $\beta$  plays a vital role in triple-negative breast cancer (TNBC) drug-resistance through regulating stemness, EMT and apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2018 Jul;502(1):160–5. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.05.139>
  51. Yoshimatsu Y, Wakabayashi I, Kimuro S, Takahashi N, Takahashi K, Kobayashi M, et al. TNF- $\alpha$  enhances TGF- $\beta$ -induced endothelial-to-mesenchymal transition via TGF- $\beta$  signal augmentation. *Cancer science.* 2020 May;111(7): 2385–2399. <https://doi.org/10.1111/cas.14455>
  52. Takatani-Nakase T, Matsui C, Hosotani M, Omura M, Takahashi K, Nakase I. Hypoxia enhances motility and EMT through the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger NHE-1 in MDA-MB-231 breast cancer cells. *Exp Cell Res.* 2022 Mar;412(1):113006. <http://dx.doi.org/10.1016/j.yexcr.2021.113006>
  53. Xu Y, Qin L, Sun T, Wu H, He T, Yang Z, et al. Twist1 promotes breast cancer invasion and metastasis by silencing Foxa1 expression. *Oncogene.* 2017 Feb;36(8):1157–66. <http://dx.doi.org/10.1038/onc.2016.286>
  54. Mohammadi-Ghahhari N, Sznurkowska MK, Hulo N, Bernasconi L, Aceto N, Picard D. Cooperative interaction between ER $\alpha$  and the EMT-inducer ZEB1 reprograms breast cancer cells for bone metastasis. *Nat Commun.* 2022 Apr;13(1):2104. <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-022-29723-5>
  55. Karamanou K, Franchi M, Vynios D, Brézillon S. Epithelial-to-mesenchymal transition and invadopodia markers in breast cancer: Lumican a key regulator. *Semin Cancer Biol.* 2020 May; 62: 125–133. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2019.08.003>
  56. Na TY, Schecterson L, Mendonsa AM, Gumbiner BM. The functional activity of E-cadherin controls tumor cell metastasis at multiple steps. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2020 Mar;117(11):5931–7. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1918167117>
  57. Naderi R, Aziz SGG, Haghigi Asl AS. Evaluating the effect of Alantolactone on the expression of N-cadherin and Vimentin genes effective in epithelial-mesenchymal transition (EMT) in breast cancer cell line (MDA-MB-231). *Ann Med Surg.* 2022 Jan; 73: 103240. <https://doi.org/10.1016/j.amsu.2021.103240>
  58. Katoch A, Suklabaidya S, Chakraborty S, Nayak D, Rasool RU, Sharma D, et al. Dual role of Par-4 in abrogation of EMT and switching on Mesenchymal to Epithelial Transition (MET) in metastatic pancreatic cancer cells. *Mol Carcinog.* 2018 Apr;57(9):1102–1115. <https://doi.org/10.1002/mc.22828>
  59. Wang H, Guo S, Kim SJ, Shao F, Ho JWK, Wong KU, et al. Cisplatin prevents breast cancer metastasis through blocking early EMT and retards cancer growth together with paclitaxel. *Theranostics.* 2021 Jan;11(5):2442–59. <http://dx.doi.org/10.7150/thno.46460>
  60. Wang J, Li Y, Ma F, Zhou H, Ding R, Lu B, et al. Inhibitory effect of Par-4 combined with cisplatin on human Wilms' tumor cells. *Tumour Biol.* 2017 Jul;39(7):1010428317716689. DOI: 10.1177/1010428317716689
  61. Arellano-Rodríguez NC, Alvarez-Quezada OA, Benavides PZ, Vargas-Alanís G, Franco-Molina M, Zamora-Ávila D, et al. Curcumin Sensitizes 4T1 Murine Breast Cancer Cells to Cisplatin Through PAR4 Secretion. In vivo (Athens, Greece). 2022 Nov;36(6): 2767–2773. <https://doi.org/10.21873/in vivo.13013>
  62. Tan J, You Y, Xu T, Yu P, Wu D, Deng H, et al. Par-4 downregulation confers cisplatin resistance in pancreatic cancer cells via PI3K/Akt pathway-dependent EMT. *Toxicol Lett.* 2014 Jan;224(1):7–15. <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxlet.2013.10.008>
  63. Thayyullathil F, Pallichankandy S, Rahman A, Kizhakkayil J, Chathoth S, Patel M, et al. Caspase-3 mediated release of SAC domain containing fragment from Par-4 is necessary for the sphingosine-induced apoptosis in Jurkat cells. *J Mol Signal.* 2013 Feb; 8(1): 2. DOI: 10.1186/1750-2187-8-2
  64. Chaudhry P, Singh M, Parent S, Asselin E. Prostate apoptosis response 4 (Par-4), a novel substrate of caspase-3 during apoptosis activation. *Mol Cell Biol.* 2012 Jan;32(4):826–39. <http://dx.doi.org/10.1128/MCB.06321-11>
  65. Clark AM, Ponniah K, Warden MS, Raitt EM, Smith BG, Pascal SM. Tetramer formation by the caspase-activated fragment of the Par-4 tumor suppressor. *The FEBS journal.* 2019 Jun; 286(20): 4060–4073. <https://doi.org/10.1111/febs.14955>
  66. Burikhanov R, Hebbar N, Noothi SK, Shukla N, Sleziona J, Araujo N, et al. Chloroquine-inducible par-4 secretion is essential for tumor cell apoptosis and inhibition of metastasis. *Cell Rep.* 2017 Jan;18(2):508–19. <http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2016.12.051>

47. Damrauer JS, Phelps SN, Amuchastegui K, Lupo R, Mabe NW, Walens A, et al. Foxo-dependent Par-4 Upregulation Prevents Long-term Survival of Residual Cells Following PI3K–Akt Inhibition. *Mol Cancer Res.* 2018 Apr;16(4): 599-609. DOI: 10.1158/1541-7786.MCR-17-0492
48. Ahmad SM, Nayak D, Mir KB, Faheem MM, Nawaz S, Yadav G, et al. Par-4 activation restrains EMT-induced chemoresistance in PDAC by attenuating MDM-2. *Pancreatol.* 2020 Oct;20(8): 1698-1710. DOI: 10.1016/j.pan.2020.09.021
49. McKenna MK, Noothi SK, Alhakeem SS, Oben KZ, Greene JT, Mani R et al. Novel role of prostate apoptosis response-4 tumor suppressor in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 2018 Jun; 131(26): 2943–2954. <https://doi.org/10.1182/blood-2017-10-813931>
50. Santos RVC, de Sena WLB, Dos Santos FA, da Silva Filho AF, da Rocha Pitta MG, da Rocha Pitta MG. Potential Therapeutic Agents Against Par-4 Target for Cancer Treatment: Where Are We Going?. *Curr. Drug Targets.* 2019; 20(6): 635–654. <https://doi.org/10.2174/1389450120666181126122440>
51. Zhang J, Dong W, Ren Y, Wei D. SAC-TRAIL, a novel anticancer fusion protein: expression, purification, and functional characterization. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2022 Feb; 106(4): 1511–1520. <https://doi.org/10.1007/s00253-022-11807-3>
52. Kim K, Araujo P, Hebbar N, Zhou Z, Zheng X, Zheng F et al. Development of a novel prostate apoptosis response-4 (Par-4) protein entity with an extended duration of action for therapeutic treatment of cancer. *Protein engineering, design & selection: PEDS.* 2019 Nov; 32(3): 159–166. <https://doi.org/10.1093/protein/gzz034>
53. Chen YT, Tseng TT, Tsai HP, Huang MY. Arylquin 1 (Potent Par-4 Secretagogue) Inhibits Tumor Progression and Induces Apoptosis in Colon Cancer Cells. *Int J Mol Sci.* 2022 May;23(10): 5645. <https://doi.org/10.3390/ijms23105645>

## 10. CONCLUSIONES

- La curcumina inhibe la viabilidad celular de las líneas celulares tratadas e indica que no hay sobrevivencia en células Hela tratadas con 15  $\mu\text{M}/\mu\text{l}$  curcumina.
- Curcumina quimiosensibilizó las células así es platino en concentraciones pequeñas y mostró sinergismo (curcumina 15 $\mu\text{M}/\mu\text{l}$ -cisplatino 2.5 ng/ $\mu\text{l}$ ).
- Curcumina induce muerte mediada por apoptosis modulando genes involucrados en ella.
- Curcumina incrementa la expresión de par cuatro en todas las líneas celulares tratadas e induce su movilización hacia el núcleo.
- Curcumina incrementa la secreción de Par-4 en medios condicionados de FDHn, pero no en medios condicionados de células de cáncer de mama.
- Curcumina induce la secreción de Par-4 soluble, en plasma de ratones tratados.
- El plasma de ratones tratados con curcumina incrementa la proliferación en células de cáncer de mama humanas y murina, Sin embargo, las sensibiliza frente a cisplatino.
- Curcumina potencia el efecto de cisplatino en la disminución de la masa tumoral “*in vivo*”, presumiblemente vía Par-4.

## 11. PERSPECTIVAS

- Analizar mediante inmunoprecipitación si existe un incremento en la interacción Par-4/WT1.
- Analizar por inmunofluorescencia la fosforilación de WT1.
- Analizar activación de caspasas.
- Analizar si dosis menores a  $10\mu\text{M/ml}$  de curcumina inducen la secreción de Par-4.
- Analizar el uso la proteína recombinante de Par-4 como terapia en cáncer de mama
- Analizar la capacidad de curcumina para revertir el proceso de TEM

## 12. BIBLIOGRAFÍA

Acloque, H., Adams, M. S., Fishwick, K., Bronner-Fraser, M., & Nieto, M. A. (2009). Epithelial-mesenchymal transitions: the importance of changing cell state in development and disease. *The Journal of clinical investigation*, *119*(6), 1438-1449.

Aggarwal, B. B., & Harikumar, K. B. (2009). Potential therapeutic effects of curcumin, the anti-inflammatory agent, against neurodegenerative, cardiovascular, pulmonary, metabolic, autoimmune and neoplastic diseases. *The international journal of biochemistry & cell biology*, *41*(1), 40-59.

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

Aggarwal, B. B., Sundaram, C., Malani, N., & Ichikawa, H. (2007). Curcumin: the Indian solid gold. *The molecular targets and therapeutic uses of curcumin in health and disease*, 1-75.

Ahmed, M. M., Sheldon, D., Fruitwala, M. A., Venkatasubbarao, K., Lee, E. Y., Gupta, S.,... & Strodel, W. E. (2008). Downregulation of PAR-4, a pro-apoptotic gene, in pancreatic tumors harboring K-ras mutation. *International journal of cancer*, *122*(1), 63-70.

Almoguera, C., Shibata, D., Forrester, K., Martin, J., Arnheim, N., & Perucho, M. (1988). Most human carcinomas of the exocrine pancreas contain mutant cK-ras genes. *Cell*, *53*(4), 549-554.

[https://doi.org/10.1016/0092-8674\(88\)90571-5](https://doi.org/10.1016/0092-8674(88)90571-5)

Alvarez, J. V., Pan, T. C., Ruth, J., Feng, Y., Zhou, A., Pant, D., Grimley, J. S., Wandless, T. J., Demichele, A., I-SPY 1 TRIAL Investigators, & Chodosh, L. A. (2013). Par-4 downregulation promotes breast cancer recurrence by preventing multinucleation following targeted therapy. *Cancer cell*, *24*(1), 30-44.

<https://doi.org/10.1016/j.ccr.2013.05.007>

Key Statistics for Breast Cancer, American Cancer Society. 2024, <https://www.cancer.org/cancer/types/breast-cancer/about/how-common-is-breast-cancer.html>.

Aoki, H., Takada, Y., Kondo, S., Sawaya, R., Aggarwal, B. B., & Kondo, Y. (2007). Evidence that curcumin suppresses the growth of malignant gliomas in vitro and in vivo through induction of autophagy: role of Akt and extracellular signal-regulated kinase signaling pathways. *Molecular pharmacology*, 72(1), 29-39.

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

Ben-Dror J, Shalamov M, Sonnenblick A. The History of Early Breast Cancer Treatment. *Genes (Basel)*. 2022 May 27;13(6):960.  
doi: 10.3390/genes13060960.

Bohrer, S., Chow, K. U., Puccetti, E., Ruthardt, M., Godziszard, S., Krapohl, A., ... & Weidmann, E. (2001). Deregulated expression of prostate apoptosis response gene-4 in les differentiated lymphocytes and inverse expressional patterns of Par-4 and bcl-2 in acute lymphocytic leukemia. *The Hematology Journal*, 2(2), 103-107.

Bohrer, S., Kukoc-Zivojnov, N., Nowak, D., Bergmann, M., Baum, C., Puccetti, E., ... & Chow, K. U. (2004). Upon drug-induced apoptosis expression of prostate-apoptosis response-gene-4 promotes cleavage of caspase-8, bid and mitochondrial release of cytochrome c. *Hematology*, 9(5-6), 425-431.

Boström, P. J., Aaltonen, V., Söderström, K. O., Uotila, P., & Laato, M. (2001). Expression of cyclooxygenase-1 and-2 in urinary bladder carcinomas in vivo and in vitro and prostaglandin E2 synthesis in cultured bladder cancer cells. *Pathology*, 33(4), 469-474.

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

Breast Cancer, 12 jul 2023, World Health Organization, <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/breast-cancer>.

Buckman, S. Y., Gresham, A., Hale, P., Hruza, G., Anast, J., Masferrer, J., & Pentland, A. P. (1998). COX-2 expression is induced by UVB exposure in human skin: implications for the development of skin cancer. *Carcinogenesis*, *19*(5), 723-729.

Burikhanov, R., Ganguly, S., Ellingson, S., Sviripa, V. M., Araujo, N., Li, S., ... & Rangnekar, V. M. (2023). Crizotinib induces Par-4 secretion from normal cells and GRP78 expression on the cancer cell surface for selective tumor growth inhibition. *American Journal of Cancer Research*, *13*(3), 976.

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

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

<https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.05.022>

Castelao, J. E., Bart III, R. D., DiPerna, C. A., Sievers, E. M., & Bremner, R. M. (2003). Lung cancer and cyclooxygenase-2. *The Annals of thoracic surgery*, *76*(4), 1327-1335.

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

Chakraborty, M., Qiu, S. G., Vasudevan, K. M., & 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.

Chaudhry, P., Singh, M., Parent, S., & Asselin, E. (2012). Prostate apoptosis response 4 (Par-4), a novel substrate of caspase-3 during apoptosis activation. *Molecular and cellular biology*, *32*(4), 826-839.

Cheema, S. K., Mishra, S. K., Rangnekar, V. M., Tari, A. M., Kumar, R., & 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.

Clarke, M., Collins, R., Darby, S., Davies, C., Elphinstone, P., Evans, E., ... & Wang, Y. (2005). Early Breast Cancer Trialists Collaborative Group (EBCTCG). Effects of radiotherapy and of differences in the extent of surgery for early breast cancer on local



recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. *Lancet*, 366(9503), 2087-2106.

Cook, J., Krishnan, S., Ananth, S., Sells, S. F., Shi, Y., Walther, M. M., ... & Rangnekar, V. M. (1999). Decreased expression of the pro-apoptotic protein Par-4 in renal cell carcinoma. *Oncogene*, 18(5), 1205-1208.

Cory, S., & Adams, J. M. (2002). The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nature Reviews Cancer*, 2(9), 647-656.

Da, W., Zhang, J., Zhang, R., & Zhu, J. (2019). Curcumin inhibits the lymphangiogenesis of gastric cancer cells by inhibition of HMGB1/VEGF-D signaling. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*, 33, 2058738419861600.

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

Eberl, M. M., Sunga, A. Y., Farrell, C. D., & Mahoney, M. C. (2005). Patients with a family history of cancer: identification and management. *The Journal of the American Board of Family Practice*, 18(3), 211-217.

El-Guendy, N., Zhao, Y., Gurumurthy, S., Burikhanov, R., & Rangnekar, V. M. (2003). Identification of a unique core domain of Par-4 sufficient for selective apoptosis induction in cancer cells. *Molecular and cellular biology*, 23(16), 5516-5525. <https://doi.org/10.1128/MCB.23.16.5516-5525.2003>

Elmore, S. (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic pathology*, 35(4), 495-516.

Evdokimova, V., Tognon, C., Ng, T., Ruzanov, P., Melnyk, N., Fink, D., ... & Sorensen, P. H. (2009). Translational activation of snail1 and other developmentally regulated transcription factors by YB-1 promotes an epithelial-mesenchymal transition. *Cancer cell*, 15(5), 402-415.

Fadeel, B., & Xue, D. (2009). The ins and outs of phospholipid asymmetry in the plasma membrane: roles in health and disease. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, 44(5), 264-277.

Fernandez, P. M., Tabbara, S. O., Jacobs, L. K., Manning, F. C., Tsangaris, T. N., Schwartz, A. M., ... & Patierno, S. R. (2000). Overexpression of the glucose-regulated

stress gene GRP78 in malignant but not benign human breast lesions. *Breast cancer research and treatment*, 59, 15-26.

Figueroa-Magalhães, M. C., Jelovac, D., Connolly, R. M., & Wolff, A. C. (2014). Treatment of HER2-positive breast cancer. *The Breast*, 23(2), 128-136.

Fisusi, F. A., & Akala, E. O. (2019). Drug combinations in breast cancer therapy. *Pharmaceutical nanotechnology*, 7(1), 3-23.

Gao, J. J., & Swain, S. M. (2018). Luminal a breast cancer and molecular assays: a review. *The oncologist*, 23(5), 556-565.

Ghandadi, M., & Sahebkar, A. (2017). Curcumin: An effective inhibitor of interleukin 6. *Current pharmaceutical design*, 23(6), 921-931.

Goossens, S., Vandamme, N., Van Vlierberghe, P., & Berx, G. (2017). EMT transcription factors in cancer development re-evaluated: Beyond EMT and MET. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, 1868(2), 584-591.

Goswami, A., Burikhanov, R., de Thonel, A., Fujita, N., Goswami, M., Zhao, Y., ... & Rangnekar, V. M. (2005). Binding and phosphorylation of Par-4 by akt is essential for cancer cell survival. *Molecular cell*, 20(1), 33-44.

Goswami, A., Qiu, S., Dexheimer, T. S., Ranganathan, P., Burikhanov, R., Pommier, Y., & Rangnekar, V. M. (2008). Par-4 binds to topoisomerase 1 and attenuates its DNA relaxation activity. *Cancer research*, 68(15), 6190-6198.

Green, D. R., & Llambi, F. (2015). Cell death signaling. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 7(12), a006080.

Gupta, S. C., Patchva, S., & Aggarwal, B. B. (2013). Therapeutic roles of curcumin: lessons learned from clinical trials. *The AAPS journal*, 15, 195-218.

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

Hartmann, L. C., Sellers, T. A., Frost, M. H., Lingle, W. L., Degenim, A. C., Ghosh, K., ... & Visscher, D. W. (2005). Benign breast disease and the risk of breast cancer. *New England Journal of Medicine*, 353(3), 229-237.

- Hebbar, N., Shrestha-Bhattarai, T., & Rangnekar, V. M. (2013). Par-4 prevents breast cancer recurrence. *Breast cancer research: BCR*, *15*(5), 314. <https://doi.org/10.1186/bcr3562>
- Hewlings, S. J., & Kalman, D. S. (2017). Curcumin: A review of its effects on human health. *Foods*, *6*(10), 92.
- Hugo, H., Ackland, M. L., Blick, T., Lawrence, M. G., Clements, J. A., Williams, E. D., & Thompson, E. W. (2007). Epithelial—mesenchymal and mesenchymal—epithelial transitions in carcinoma progression. *Journal of cellular physiology*, *213*(2), 374-383.
- Inic, Z., Zegarac, M., Inic, M., Markovic, I., Kozomara, Z., Djuriscic, I., ... & Jancic, S. (2014). Difference between luminal A and luminal B subtypes according to Ki-67, tumor size, and progesterone receptor negativity providing prognostic information. *Clinical Medicine Insights: Oncology*, *8*, CMO-S18006.
- Irigoyen, A., Vicente García, F., Córdoba Iturriagoitia, A., Ibáñez Beroiz, B., Santamaría Martínez, M., & Guillén Grima, F. (2011, August). Subtipos moleculares del cáncer de mama: implicaciones pronósticas y características clínicas e inmunohistoquímicas. In *Anales del Sistema Sanitario de Navarra* (Vol. 34, No. 2, pp. 219-233). Gobierno de Navarra. Departamento de Salud.
- Johnstone, R. W., See, R. H., Sells, S. F., Wang, J., Muthukkumar, S., Englert, C., ... & 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.
- Johnstone, R. W., Tommerup, N., Hansen, C., Vissing, H., & Shi, Y. (1998). Mapping of the human PAWR (Par-4) gene to chromosome 12q21. *Genomics*, *53*(2), 241-243.
- Joo, Y. E., Oh, W. T., Rew, J. S., Park, C. S., Choi, S. K., & Kim, S. J. (2002). Cyclooxygenase-2 expression is associated with well-differentiated and intestinal-type pathways in gastric carcinogenesis. *Digestion*, *66*(4), 222-229.
- Ju, Z., Li, M., Xu, J., Howell, D. C., Li, Z., & Chen, F. E. (2022). Recent development on COX-2 inhibitors as promising anti-inflammatory agents: The past 10 years. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, *12*(6), 2790-2807.

Jurmann, N., Brigelius-Flohé, R., & Böhl, G. F. (2005). Curcumin Blocks Interleukin-1 (IL1) Signaling by Inhibiting the Recruitment of the IL-1 Receptor–Associated Kinase IRAK in Murine Thymoma EL-4 Cells. *The Journal of nutrition*, *135*(8), 1859-1864.

<https://doi.org/10.1093/jn/135.8.1859>

Kalluri, R., & Neilson, E. G. (2003). Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis. *The Journal of clinical investigation*, *112*(12), 1776-1784.

Kalluri, R., & Weinberg, R. A. (2009). The basics of epithelial-mesenchymal transition. *The Journal of clinical investigation*, *119*(6), 1420-1428.

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

Kim, K. K., Kugler, M. C., Wolters, P. J., Robillard, L., Galvez, M. G., Brumwell, A. N., ... & Chapman, H. A. (2006). Alveolar epithelial cell mesenchymal transition develops in vivo during pulmonary fibrosis and is regulated by the extracellular matrix. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *103*(35), 13180-13185.

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

Kögel, D., Reimertz, C., Mech, P., Poppe, M., Frühwald, M. C., Engemann, H., ... & Prehn, J. H. M. (2001). Dlk/ZIP kinase-induced apoptosis in human medulloblastoma cells: requirement of the mitochondrial apoptosis pathway. *British journal of cancer*, *85*(11), 1801-1808.

Krebs, A. M., Mitschke, J., Lasierra Losada, M., Schmalhofer, O., Boerries, M., Busch, H.,... & Brabletz, T. (2017). The EMT-activator Zeb1 is a key factor for cell plasticity and promotes metastasis in pancreatic cancer. *Nature cell biology*, *19*(5), 518-529.

Krishnamurti, U., & Silverman, J. F. (2014). HER2 in breast cancer: a review and update. *Advances in anatomic pathology*, *21*(2), 100-107.

Kuo, S. H., Lo, C., Chen, Y. H., Lien, H. C., Kuo, W. H., Wang, M. Y., ... & Huang, C. S. (2018). Prognostic significance of clinicopathologic features in patients with breast ductal carcinoma-in-situ who received breast-conserving surgery. *Clinical breast cancer*, *18*(6),441-450.

<https://doi.org/10.1016/j.clbc.2018.04.002>

- Lamouille, S., Xu, J., & Derynck, R. (2014). Molecular mechanisms of epithelial mesenchymal transition. *Nature reviews Molecular cell biology*, 15(3), 178-196.
- Leal, N. F. B. D. S., Oliveira, H. F. D., & Carrara, H. H. A. (2016). Supervised physical therapy in women treated with radiotherapy for breast cancer. *Revista Latino Americana de Enfermagem*, 24.
- Lee, A. S. (2007). GRP78 induction in cancer: therapeutic and prognostic implications. *Cancer research*, 67(8), 3496-3499.
- Lesueur, F., Song, H., Ahmed, S., Luccarini, C., Jordan, C., Luben, R., ... & Ponder, B.A. J. (2006). Single-nucleotide polymorphisms in the RB1 gene and association with breast cancer in the British population. *British journal of cancer*, 94(12), 1921-1926.
- Lin, J. K. (2007). Molecular targets of curcumin. *The molecular targets and therapeutic uses of curcumin in health and disease*, 227-243.
- Liu, C., QiNan, W., XiaoTian, L., MengLiu, Y., XiaGuang, G., WeiLing, L., ... & Bing, C. (2018). TERT and Akt are involved in the Par-4-dependent apoptosis of islet  $\beta$  cells in type 2 diabetes. *Journal of Diabetes Research*, 2018.
- Loibl, S., & Gianni, L. (2017). HER2-positive breast cancer. *The Lancet*, 389(10087), 2415-2429.
- Lv, Z. D., Liu, X. P., Zhao, W. J., Dong, Q., Li, F. N., Wang, H. B., & Kong, B. (2014). Curcumin induces apoptosis in breast cancer cells and inhibits tumor growth in vitro and in vivo. *Int J Clin Exp Pathol*, 7(6), 2818-2824.
- Matsubayashi, H., Infante, J. R., Winter, J. M., Klein, A. P., Schulick, R., Hruban, R., ... & Goggins, M. (2007). Tumor COX-2 expression and prognosis of patients with resectable pancreatic cancer. *Cancer Biology & Therapy*, 6(10), 1569-1575.
- Maughan, K. L., Lutterbie, M. A., & Ham, P. S. (2010). Treatment of breast cancer. *American family physician*, 81(11), 1339-1346.
- McTiernan, A. (2003). Behavioral risk factors in breast cancer: can risk be modified?. *The oncologist*, 8(4), 326-334.
- Milobedenska J, Kostanecki V, Lampe V. 1910. Structure of curcumin. *Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft*; 43:2163–2170. 11

- Mohamed, S. I. A., Jantan, I., & Haque, M. A. (2017). Naturally occurring immunomodulators with antitumor activity: An insight on their mechanisms of action. *International immunopharmacology*, *50*, 291-304.
- Moreno-Bueno, G., Fernandez-Marcos, P. J., Collado, M., Tendero, M. J., Rodriguez Pinilla, S. M., Garcia-Cao, I., ... & Palacios, J. (2007). Inactivation of the candidate tumor suppressor Par-4 in endometrial cancer. *Cancer research*, *67*(5), 1927-1934.
- Moreno-Jaime, B., Esparza-Lopez, J., Castro-Sanchez, A., Escobar-Arriaga, E., Medina Franco, H., Leon-Rodriguez, E., & de Jesus Ibarra-Sanchez, M. (2016). Epidermal growth factor induces epithelial-mesenchymal transition in primary breast cancer cell cultures. *GACETA MEXICANA DE ONCOLOGIA*, *15*(1), 10-15.
- Mosieniak, G., Adamowicz, M., Alster, O., Jaskowiak, H., Szczepankiewicz, A. A., Wilczynski, G. M., ... & Sikora, E. (2012). Curcumin induces permanent growth arrest of human colon cancer cells: link between senescence and autophagy. *Mechanisms of ageing and development*, *133*(6), 444-455.
- Mouabbi, J. A., Hassan, A., Lim, B., Hortobagyi, G. N., Tripathy, D., & Layman, R. M. (2022). Invasive lobular carcinoma: an understudied emergent subtype of breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, *193*(2), 253-264.
- Nalca, A., Qiu, S. G., El-Guendy, N., Krishnan, S., & Rangnekar, V. M. (1999). Oncogenic Ras sensitizes cells to apoptosis by Par-4. *Journal of Biological Chemistry*, *274*(42), 29976-29983.
- Nieman, M. T., Prudoff, R. S., Johnson, K. R., & Wheelock, M. J. (1999). N-cadherin promotes motility in human breast cancer cells regardless of their E-cadherin expression. *The Journal of cell biology*, *147*(3), 631-644.
- Orrantia-Borunda E, Anchondo-Nuñez P, Acuña-Aguilar LE, et al. Subtypes of Breast Cancer. In: Mayrovitz HN, editor. Breast Cancer [Internet]. Brisbane (AU): Exon Publications; 2022 Aug 6. Chapter 3. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK583808/> doi:10.36255/exon-publications breast-cancer-subtypes
- Ortiz, M., Lafuente-Sanchis, A., Cuevas, J. M., & Zúñiga, Á. (2016). Prevalencia mutacional de los genes BRCA1 y BRCA2 en pacientes con cáncer de mama y ovario

atendidos en el Área de Salud de La Ribera (Comunidad Valenciana, España). *Revista Española de Patología*, 49(4), 214-218.

Pan, Z., Zhuang, J., Ji, C., Cai, Z., Liao, W., & Huang, Z. (2018). Curcumin inhibits hepatocellular carcinoma growth by targeting VEGF expression. *Oncology letters*, 15(4), 4821-4826.

Pérez-García, J. M., Gebhart, G., Borrego, M. R., Schmid, P., Marmé, F., Prat, A., ... & Llombart-Cussac, A. (2022). Trastuzumab and pertuzumab without chemotherapy in early stage HER2+ breast cancer: a plain language summary of the PHERGain study. *Future Oncology*, 18(33), 3677-3688.

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

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

QiNan, W., XiaGuang, G., XiaoTian, L., WuQuan, D., Ling, Z., & Bing, C. (2016). Par4/NF- $\kappa$ B mediates the apoptosis of islet  $\beta$  cells induced by glucolipototoxicity. *Journal of Diabetes Research*, 2016.

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

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

Riedl, S. J., & Salvesen, G. S. (2007). The apoptosome: signalling platform of cell death. *Nature reviews Molecular cell biology*, 8(5), 405-413.

Roche, J. (2018). The epithelial-to-mesenchymal transition in cancer. *Cancers*, 10(2), 52.

Rosales, A. M., Molina, M. C., Moo, J. G., Morelos, P. R., & Bandala, C. (2016). Breast cancer metastasis associations with clinicopathological characteristics in mexican women younger than 40 years of age. *Asian Pacific journal of cancer prevention: APJCP*, 17(11),5019.

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

Sarkar, S., Jain, S., Rai, V., Sahoo, D. K., Raha, S., Suklabaidya, S., ... & Dey, N. (2015). Plant-derived SAC domain of PAR-4 (Prostate Apoptosis Response 4) exhibits growth inhibitory effects in prostate cancer cells. *Frontiers in plant science*, 6, 822.

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

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

Sharma, G. N., Dave, R., Sanadya, J., Sharma, P., & Sharma, K. (2010). Various types and management of breast cancer: an overview. *Journal of advanced pharmaceutical technology & research*, 1(2), 109.

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

Sheng, J., Sun, H., Yu, F. B., Li, B., Zhang, Y., & Zhu, Y. T. (2020). The role of cyclooxygenase-2 in colorectal cancer. *International journal of medical sciences*, 17(8), 1095.

Shim, J. Y., An, H. J., Lee, Y. H., Kim, S. K., Lee, K. P., & Lee, K. S. (2003). Overexpression of cyclooxygenase-2 is associated with breast carcinoma and its poor prognostic factors. *Modern pathology*, 16(12), 1199-1204.

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

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

Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021). Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and



mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians*, 71(3), 209-249.

<https://doi.org/10.3322/caac.21660>

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

Tamimi, R. M., Baer, H. J., Marotti, J., Galan, M., Galaburda, L., Fu, Y., ... & Collins, L. C. (2008). Comparison of molecular phenotypes of ductal carcinoma in situ and invasive breast cancer. *Breast Cancer Research*, 10(4), 1-9.

Thiery, J. P. (2002). Epithelial–mesenchymal transitions in tumour progression. *Nature reviews cancer*, 2(6), 442-454.

Thiery, J. P., Acloque, H., Huang, R. Y., & Nieto, M. A. (2009). Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *cell*, 139(5), 871-890.

Treude, F., Kappes, F., Fahrenkamp, D., Müller-Newen, G., Dajas-Bailador, F., Krämer, O. H., ... & Hartkamp, J. (2014). Caspase-8-mediated PAR-4 cleavage is required for TNF $\alpha$  induced apoptosis. *Oncotarget*, 5(10), 2988.

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

Vićovac, L., & Aplin, J. D. (1996). Epithelial-mesenchymal transition during trophoblast differentiation. *Cells Tissues Organs*, 156(3), 202-216.

Waghela, B. N., Sharma, A., Dhumale, S., Pandey, S. M., & Pathak, C. (2015). Curcumin conjugated with PLGA potentiates sustainability, anti-proliferative activity and apoptosis in human colon carcinoma cells. *PloS one*, 10(2), e0117526.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0117526>

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

Ward, E. M., DeSantis, C. E., Lin, C. C., Kramer, J. L., Jemal, A., Kohler, B., ... & Gansler, T. (2015). Cancer statistics: breast cancer in situ. *CA: a cancer journal for clinicians*, 65(6), 481-495.

<https://doi.org/10.3322/caac.21321>

Weiss, J. R., Moysich, K. B., & Swede, H. (2005). Epidemiology of male breast cancer. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, *14*(1), 20-26.

<https://doi.org/10.1158/1055-9965.20.14.1>

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

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

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

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

Zoi, V., Galani, V., Lianos, G. D., Voulgaris, S., Kyritsis, A. P., & Alexiou, G. A. (2021). The role of curcumin in cancer treatment. *Biomedicines*, *9*(9), 1086.