

**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
ESCUELA DE POSTGRADO**



**ROL DE CURCUMINA EN LA DISMINUCIÓN DE LA TRANSICIÓN
EPITELIAL-MESENQUIMAL MEDIADA POR PIRIN EN
CÉLULAS DE CÁNCER DE CUELLO UTERINO**

VICTOR MANUEL AEDO AGUILERA

TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE MAGISTER EN FARMACOLOGÍA

Director de Tesis: Prof. Dr. Francisco Aguayo G.

Co-Director de Tesis: Prof. Dra. Gloria Calaf S.

2018

**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
ESCUELA DE POSTGRADO**



**ROL DE CURCUMINA EN LA DISMINUCIÓN DE LA TRANSICIÓN
EPITELIAL-MESENQUIMAL MEDIADA POR PIRIN EN
CÉLULAS DE CÁNCER DE CUELLO UTERINO**

VICTOR MANUEL AEDO AGUILERA

TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE MAGISTER EN FARMACOLOGÍA

Director de Tesis: Prof. Dr. Francisco Aguayo G.

Co-Director de Tesis: Prof. Dra. Gloria Calaf S.

2018

**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
ESCUELA DE POSTGRADO**

INFORME DE APROBACION TESIS DE MAGISTER

Se informa a la Comisión de Grados Académicos de la Facultad de Medicina, que la Tesis de Magister presentada por el candidato

VICTOR MANUEL AEDO AGUILERA

ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito para optar al Grado de Magister en Farmacología en el Examen de Defensa de Tesis rendido el día/...../.....

**Prof. Dr. Francisco Aguayo G. Prof. Dra. Gloria Calaf S.
Director de Tesis Co-Director de Tesis
Universidad de Chile**

COMISION INFORMANTE DE TESIS

Prof. Dr. Ulises Urzúa..... Prof. Dra. Sandra Ampuero.....

Prof. Dra. Mónica Acevedo.....

Prof. Dr. Luis Quiñones.....

Presidente Comisión

DEDICATORIA

AGRADECIMIENTOS

ÍNDICE DE CONTENIDOS

INTRODUCCIÓN	1
CÁNCER: PRINCIPALES CAMBIOS MOLECULARES.....	1
CÁNCER DE CUELLO UTERINO: Epidemiología y Características	3
VIRUS PAPILOMA HUMANO: Ciclo Replicativo y Función en Cáncer	5
PIRIN Y ACTIVACIÓN DE TRANSICIÓN EPITELIAL-MESENQUIMAL	10
CURCUMINA Y SU POTENCIAL TERAPÉUTICO	11
HIPÓTESIS	14
OBJETIVOS	14
OBJETIVO GENERAL	14
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	14
MATERIALES Y MÉTODOS	15
CULTIVO CELULAR.....	16
KNOCKDOWN DE PIRIN	17
WESTERN BLOTTING	17
REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA CUANTITATIVA CON TRANSCRIPTASA INVERSA	18
ENSAYO DE MIGRACIÓN TRANSWELL	19
ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	20
RESULTADOS	20
DISCUSIÓN	31
REFERENCIAS	38

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Transición epitelial mesenquimal	2
Figura 2. Organización del genoma de VPH16.....	6
Figura 3. Representación esquemática de VPH E7.....	8
Figura 4. Representación esquemática de VPH E6.....	9
Figura 5. Estructura de la proteína Pirin.....	11
Figura 6. Estructura química de la curcumina (Diferuloilmetano).....	12
Figura 7. Mecanismo antioxidante de la curcumina.....	13
Figura 8. Curva de viabilidad	21
Figura 9. Curva de citotoxicidad	22
Figura 10. Cinética de tiempo de viabilidad a curcumina	22
Figura 11. Efecto de curcumina en la expresión génica de E6 y E7, y niveles proteicos de E7	23
Figura 12. Efecto de un ARNip en el knockdown de Pirin.....	24
Figura 13. Efecto de Pirin en la transición epitelial-mesenquimal.....	24
Figura 14. Efecto de Pirin y curcumina en la transición epitelial-mesenquimal.....	25
Figura 15. Efecto de curcumina en la expresión génica y los niveles proteicos de Pirin.....	26
Figura 16. Efecto de curcumina en la expresión génica y los niveles proteicos de E-cadherina	27
Figura 17. Efecto de curcumina en los niveles proteicos de N-cadherina y Vimentina.....	28
Figura 18. Efecto de curcumina en la expresión génica y los niveles proteicos de Slug	29
Figura 19. Efecto de curcumina en la expresión génica de Snail y Zeb1	29
Figura 20. Efecto de curcumina en la migración celular.....	30
Figura 21. Modelo final.....	37

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. VPH y lesiones clínicas.	7
Tabla 2. Partidores de genes utilizados en esta tesis	19

RESUMEN

El cáncer de cuello uterino (CCU) es un tipo de cáncer que tiene una etiología viral. Este agente es el virus papiloma humano de alto riesgo (VPH-AR), el cual en un proceso tumoral sobreexpresa las oncoproteínas E6 y E7. Éstas últimas regulan la expresión de Pirin, que es una proteína que participa en la transición epitelial-mesenquimal (TEM) y en la migración celular. Se ha reportado que la TEM y la migración celular disminuyen en presencia del compuesto natural curcumina. Por esta razón, se propuso que dicha disminución causada por curcumina ocurre a través de un mecanismo dependiente de Pirin. Para demostrar esto, se utilizó la línea celular *SiHa* de CCU, con 1-2 copias integradas de VPH16. Con los ensayos de viabilidad y citotoxicidad celular (MTS) a distintos tiempos y concentraciones de curcumina se determinó que la concentración a utilizar era de 20 μ M por 72 horas. Este tiempo y concentración están en concordancia con datos previamente publicados. Se analizó la expresión génica y los niveles proteicos de algunos marcadores de la TEM, con las técnicas RT-qPCR y *Western Blotting*, respectivamente. Para ello, en células tratadas con curcumina se extrajo ARN total y proteínas, los cuales se cuantificaron para ser utilizados en dichas técnicas. Los resultados obtenidos sugieren una disminución de la transición epitelial-mesenquimal en la línea celular *SiHa* expuesta a curcumina. Esto se respalda en la disminución de los niveles proteicos de N-cadherina, Vimentina y Slug en presencia de este compuesto natural. Además, se observó que la expresión de *PIR* y los niveles de Pirin disminuyeron en las células *SiHa*, al ser expuestas a curcumina. Luego, para analizar como la TEM depende de Pirin, las células *SiHa* utilizadas fueron transfectadas transientemente con un ARN interferente pequeño (ARNip) para el *knockdown* de *PIR*. Se observó un aumento significativo de transcritos de E-cadherina y una disminución significativa de N-cadherina en presencia del interferente. Además, se evidenció una disminución similar en la combinación del interferente con curcumina. Finalmente, se realizó un ensayo fenotípico de migración celular observándose una disminución significativa en presencia de este compuesto natural. La conclusión de esta tesis es que la disminución de la TEM inducida por curcumina, en este modelo experimental, ocurre por un mecanismo dependiente de Pirin. Se requieren experimentos adicionales para confirmar dicho mecanismo. La proteína Pirin podría ser un importante blanco farmacológico en el tratamiento del cáncer de cuello uterino.

ABSTRACT

Cervical cancer (CCU) has a viral etiology and it is induced by high-risk human papilloma virus (HR-HPV) that in turn, overexpresses E6 and E7 oncoproteins. These viral proteins regulate the expression of Pirin, which is a protein that participates in the epithelial-mesenchymal transition (EMT) and cell migration. It has been reported that EMT and cell migration decrease in the presence of the natural compound curcumin. For this reason, it was proposed in this thesis that such decrease is caused by curcumin through a Pirin-dependent mechanism. To demonstrate this statement, SiHa cell line derived from cervical cancer was used since it contains 1-2 integrated copies of HPV16. Viability and cytotoxicity cell tests (MTS) were used to determine curcumin dose and exposures times. Results indicated a significant decrease in EMT after exposure to 20 μ M curcumin for 72 hours in SiHa cell line. This is supported by a decrease in the protein levels of N-cadherin, Vimentin and Slug in the presence of curcumin. Furthermore, it was observed that PIR expression and Pirin protein levels significantly decreased in SiHa cells when exposed to curcumin. Then, to analyze if EMT depends on Pirin, SiHa cells were transfected with a small interfering RNA (siRNA) for the silencing of PIR. It was observed a significant increase of E-cadherin transcripts and a significant decrease of N-cadherin proteins levels in the presence of the siRNA. In addition, a similar decrease in the combination of the interferer with curcumin was evidenced. Finally, a phenotypic assay of cell migration was performed observing a significant decrease in the presence of this natural compound. It can be concluded in this thesis that the reduction of curcumin-induced EMT in this experimental model, occurs in a Pirin-dependent manner. To confirm this mechanism, additional experiments are warranted. Pirin protein could be an important pharmacological target in the treatment of cervical cancer.

INTRODUCCIÓN

CÁNCER: PRINCIPALES CAMBIOS MOLECULARES

El cáncer es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad a nivel mundial [1]. En el año 2012, los pacientes con cáncer fueron aproximadamente 1,8 millones, de los cuales cerca de 1,2 millones correspondieron a hombres y 0,6 a mujeres [2]. Respecto de los cánceres que afectan a mujeres, el cáncer de cuello uterino es la principal causa de muerte en mujeres jóvenes, en periodo de fertilidad [3]. Sin embargo, la formación de un tumor es un proceso complejo, en el cual ocurren importantes cambios moleculares.

Dentro de los cambios moleculares se encuentra la capacidad de producir señales de crecimiento celular [4]. Además, el genoma sufre mutaciones, las cuales alteran ciertas vías de señalización que están involucradas en el crecimiento y proliferación [5]. De igual forma, las células tumorales evaden señales de inhibición del crecimiento debido, entre otros factores, al daño en los genes supresores de tumor Rb, p53, PTEN, VHL, NF1, proteína Merlín y LKB1, encargados de controlar la proliferación y/o apoptosis [6, 7].

La apoptosis es un tipo de muerte celular que elimina células que presentan anomalías, incluyendo alteraciones de carácter cancerígenas. Por ende, la resistencia a este programa por parte de la célula puede contribuir al desarrollo de cáncer. En un proceso tumoral, la apoptosis es regulada por un incremento en la expresión de los inhibidores Bcl-2 y Bcl-xL o también por la disminución en la expresión de los activadores de apoptosis Bax, Bim y Puma [8, 9].

La inmortalización de las células y su capacidad replicativa ilimitada se debe fundamentalmente a la reactivación de la enzima telomerasa. Esta enzima permite la reparación de los telómeros, la cual agrega nucleótidos en el extremo de esta región. Entonces, la célula tumoral evade la senescencia y puede replicarse continuamente [10, 11].

Por otra parte, las células tumorales son capaces de estimular la angiogénesis, aumentando los niveles de factores proangiogénicos y disminuyendo aquellos que la inhiben [12]. El proceso angiogénico permite el desarrollo de nuevos vasos para obtener nutrientes, oxígeno y desechar residuos lo cual es necesario para el crecimiento tumoral [13].

Las células tumorales son capaces de estimular la invasión y metástasis, lo cual es realizado principalmente mediante la activación de la transición epitelial-mesénquimal (TEM) (**Fig. 1**). Este es un proceso que puede gatillar metástasis y también hay silenciamiento de E-cadherina, una importante proteína involucrada en adhesión celular. Esto último, ocurre a través de la activación de ciertos factores de transcripción (N-cadherina, Vimentina, Snail, Slug y Zeb1, entre otros) que participan como represores transcripcionales de E-cadherina, lo cual permite a una célula pasar de un estado epitelial a uno mesénquimal [14, 15]. N-cadherina promueve la migración e invasión de células tumorales, encontrándose sobreexpresada en numerosos modelos experimentales [16]. El aumento de la migración celular también es observado en células mesénquimales, que se caracterizan por expresar mayores niveles de Vimentina [17]. Además, Snail y Slug son represores directos que se unen al promotor de E-cadherina, lo cual promueve fenotipos invasores en células tumorales [18]. La proteína Zeb1 es regulada por la activación de Snail y también es un represor directo de E-cadherina. Se ha reportado que este marcador mesénquimal promueve la malignización en distintos tipos de tumores [19, 20].

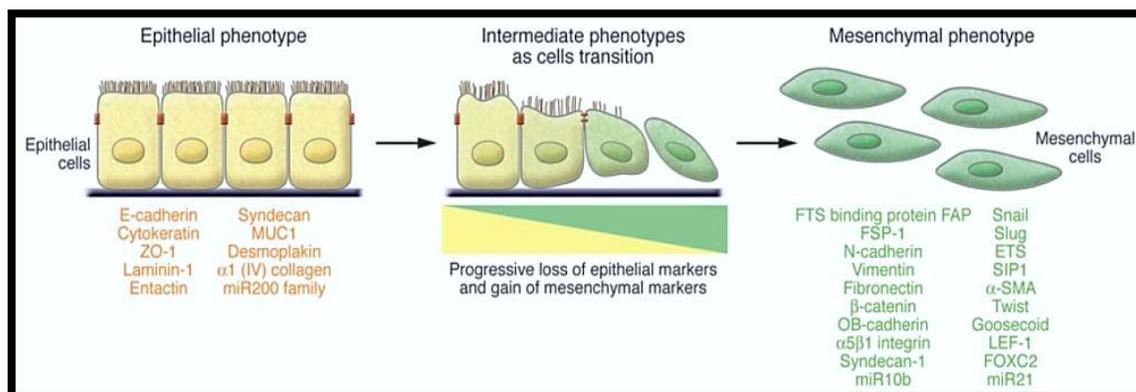


Figura 1. Transición epitelial mesénquimal. Se indican los marcadores aumentados para cada fenotipo. Además, se muestra el cambio de células desde un fenotipo epitelial hacia uno mesénquimal, lo cual se basa en la disminución de marcadores epiteliales y un incremento de los marcadores mesénquimales, indicándose también la presencia de estados intermedios [21].

Otro aspecto importante es que la célula tumoral sufre un incremento en mutaciones por inestabilidad genómica [22]. Estos daños ocurren por alteraciones en la maquinaria reparadora del ADN o por una cierta vulnerabilidad frente a agentes directos causales de mutaciones o también por ambos factores [7, 22]. Por otro lado, numerosas publicaciones describen que la inflamación, proceso de bastante complejidad, promueve y está implicada en procesos tumorales [23]. Se ha reportado previamente que las células del sistema inmune infiltradas en

tumores causan incipientes focos tumorales. Esto se traduce en que dichas células pueden producir factores que promueven la carcinogénesis, como también especies reactivas de oxígeno (ROS) y nitrógeno (RNS), que son importantes mutágenos causantes de daño celular [7, 24]. Por otra parte, las células tumorales sufren alteraciones en su metabolismo caracterizándose por la obtención de energía a través de la vía glicolítica [25]. Estas alteraciones son provocadas principalmente por la activación de ciertos oncogenes o por hipoxia, en zonas poco vascularizadas, con posterior aumento de HIF-1 [26]. Finalmente, el tumor se caracteriza por la evasión de la respuesta inmune, dado principalmente por alteraciones en el sistema inmunológico. Estas alteraciones son provocadas por factores inmunosupresores liberados por el propio tumor, que impiden a células citotóxicas eliminar células alteradas o tumores incipientes [27].

CÁNCER DE CUELLO UTERINO: EPIDEMIOLOGÍA Y CARACTERÍSTICAS

El cáncer de cuello uterino (CCU) es uno de los tipos de cáncer que presenta los mayores índices de prevalencia y una alta mortalidad. En el año 2012, se reportó que del total de muertes causadas por cáncer en el mundo, 266.000 corresponden a este tipo de tumor [28, 29]. Se ha establecido que el 15% de los cánceres en el mundo tiene una etiología viral. En efecto, se ha determinado que el agente etiológico de CCU es el virus papiloma humano (VPH) [30], fundamentalmente ciertos tipos virales llamados de alto riesgo oncogénico, como por ejemplo los tipos VPH16 y 18. Además, este virus es capaz de persistir en el epitelio cervical y participa en la promoción del desarrollo tumoral, escapando al reconocimiento del sistema inmunológico del individuo [31, 32]. Se ha reportado que la infección por VPH es muy frecuente en la población mundial. Particularmente, en la ciudad de Santiago de Chile se ha documentado una prevalencia del 14% de infección por VPH [33].

Epidemiológicamente, el cáncer de cuello uterino corresponde al 12% de los cánceres en mujeres a nivel mundial [34]. En consecuencia, la Organización Mundial de la salud (OMS) en el año 2015 estimó que un millón de mujeres padecen esta enfermedad [35]. Presentando un 11,9% de mortalidad. En EE. UU, se han implementado programas eficientes de tamizaje para CCU, disminuyendo considerablemente las tasas de prevalencia y mortalidad. Esta disminución no ha ocurrido en Chile donde la prevalencia claramente va en aumento, aunque

la tasa de mortalidad ha disminuido. Las tasas de mortalidad entre los años 1990 y 2011, han disminuido de 14,3 a 5,7 por cada 100.000 mujeres [36-38].

El CCU se clasifica histológicamente en: a) carcinoma de células escamosas, caracterizado principalmente por ser queratinizado el cual consiste de células grandes bien diferenciadas, como también no queratinizados de células grandes o pequeñas poco diferenciadas; b) adenocarcinoma cervical, aparecen en el endocérvix, tienen carácter mucinoso, principalmente en mujeres jóvenes presentándose como benignos, recurrentes y poco frecuentes; c) carcinoma adenoescamoso, caracterizado por ser poco diferenciado, consta de un componente escamoso y glandular malignos; y finalmente d) tumores neuroendocrinos del cérvix, que son de células grandes, pequeñas y no diferenciadas que se caracterizan por ser los más agresivos de esta clasificación [39].

El tratamiento para el CCU consiste en un manejo quirúrgico, radioterapia y quimioterapia. En el caso de estadios avanzados y pacientes con metástasis, la combinación que ha obtenido mejores resultados es cisplatino y platicaxel [40]. Sin embargo, como esta respuesta es baja, existen nuevas terapias dirigidas a blancos moleculares que están activados en CCU. Dentro de estas terapias que se encuentran en estudios clínicos: por ejemplo, el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), diana de rapamicina en células de mamífero (mTOR) y poli ADP-ribosa polimerasa (PARP) [34].

El CCU no se caracteriza por poseer mutaciones características, sino que la inestabilidad genómica se desencadena por la actividad de las oncoproteínas E6 y E7 de VPH y por su integración al genoma del hospedero. El proceso de inestabilidad genómica se inicia cuando la maquinaria reparadora celular aumenta su actividad, provocando amplificaciones del genoma, que es una característica propia de CCU y no de otros tipos de tumores. Una amplificación común se encuentra en el cromosoma que codifica el componente de ARN telomerasa (TERC) y la subunidad catalítica PI3-kinasa (PI3K), los cuales son factores importantes en desarrollo de CCU. Además, se describen alteraciones en la estabilización de los microfilamentos de actina, obteniendo características antiapoptóticas y alteraciones en más de treinta genes supresores de tumor [41, 42]. Un evento característico en CCU es la alteración en el ADN mitocondrial (ADNmt), cuyos genes son sobreexpresados posiblemente por el aumento de ROS [43]. En otro estudio realizado en CCU, se determinaron mutaciones en PI3KCA

(31,3%), KRAS (8,8%) y EGFR (3,8). En este último trabajo mencionado también se encontró que las mutaciones en KRAS son frecuentes en adenocarcinomas y mutaciones en EGFR son más frecuentes en carcinomas de células escamosas [44].

Usando herramientas proporcionadas por la biología molecular como reacción de polimerasa en cadena (PCR) o hibridación *in situ* (ISH), se ha establecido que la mayoría de los CCU presentan secuencias de ADN de VPH integrado aleatoriamente en el genoma celular. Este fue uno de los primeros antecedentes moleculares, que ha permitido incriminar a la infección por este virus en el desarrollo de CCU [45, 46].

VIRUS PAPILOMA HUMANO: CICLO REPLICATIVO Y FUNCIÓN EN CÁNCER

El virus papiloma humano (VPH) es un virus que posee ADN doble hebra cerrado de aproximadamente 8.000 pares de bases (pb) como material genético, tiene forma icosaédrica y no presenta envoltura [47]. El genoma de este virus codifica ocho proteínas virales, de las cuales seis son tempranas y dos son tardías (**Fig. 2**) [48]. Mediante secuenciación se han identificado más de 300 genotipos de VPH, la mayoría de ellos se encuentran agrupados en dos géneros: alpha y beta *papillomavirus* [49]. Además, dado el tipo de VPH asociado a manifestaciones clínicas se clasifican según riesgo (**Tabla 1**). Se han descrito varios tipos de VPH que tienen una participación etiológica en otros tumores, como en carcinomas de cabeza y cuello y tumores anogenitales. Sin embargo, es en CCU donde se presentan los tipos más malignos, como son VPH16 y 18 que se encuentran con una prevalencia aproximada del 70% en este tipo de tumor [50, 51].

El ciclo replicativo de VPH está estrechamente relacionado con el estado de diferenciación del epitelio. La infección viral ocurre a través de lesiones en el epitelio, que permiten el acceso del virus a células de la capa basal. En estas células el VPH permanece de forma episomal posibilitando su replicación. Posteriormente, cuando esa célula infectada se diferencia a estratos más superficiales, el virus expresa genes tempranos y tardíos en aquella célula, posibilitando la generación de viriones [52-54]. La infección productiva de este virus se caracteriza por la formación de coilocitos. Estos últimos son células que poseen vacuolización perinuclear, representando una lesión celular particular de la infección por VPH [55].

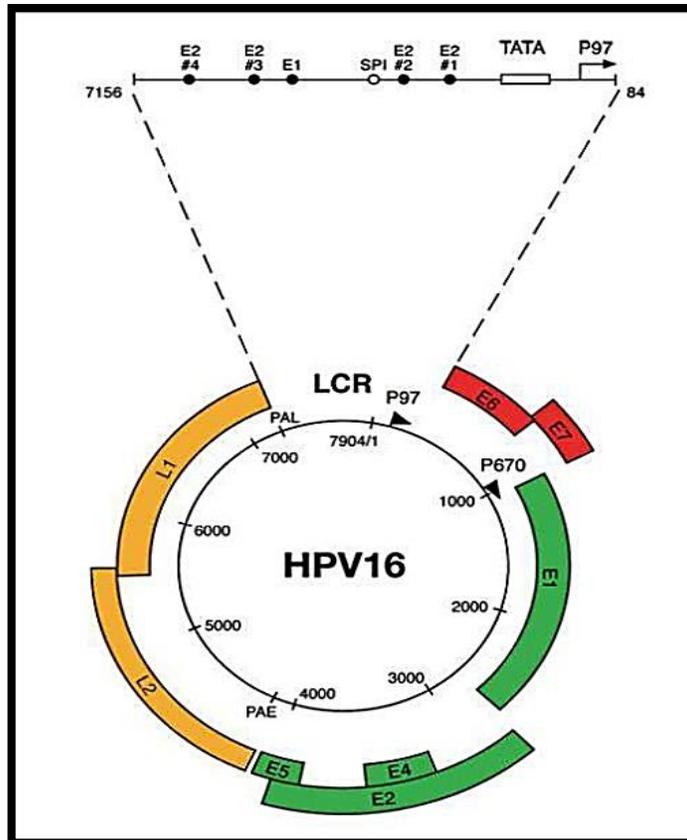


Figura 2. Organización del genoma de VPH16. Se muestra el genoma con los respectivos genes que codifican proteínas tempranas (E1, E2, E4, E5, E6 y E7) y tardías (L1 y L2). Además, se expone el promotor temprano p97 y el tardío p670 [49].

Durante el proceso neoplásico, el virus es capaz de integrarse al genoma, lo cual se traduce en la sobreexpresión de los oncogenes E6 y E7. Las oncoproteínas traducidas E6 y E7 inducen la degradación de p53 y retinoblastoma (Rb) respectivamente, modificando la reparación del ADN e interrumpiendo el control del ciclo celular [56]. Además, se alteran regiones promotoras de genes, la expresión de algunos micro-ARN (miARN), genes supresores y se promueve la inestabilidad genómica. Por otro lado, se sobreexpresan los reguladores inhibitorios de VEGF, promoviendo angiogénesis [57].

Tabla 1. VPH y lesiones clínicas. Clasificación epidemiológica de los tipos de VPH asociados con enfermedad clínica. Los genotipos de VPH son caracterizados según secuenciación de su genoma [58].

Riesgo	Tipos de VPH	Manifestaciones clínicas
Alto	16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73, 82	Lesiones genitales de bajo riesgo Lesiones genitales de alto riesgo Cáncer cervical Cáncer de vagina, vulva, ano y pene Cáncer de orofaringe Cáncer de cavidad oral y laringe
Bajo	6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81, CP6108	Lesiones genitales de bajo riesgo Lesiones genitales de alto grado Condilomas acuminados (verrugas genitales) Papilomatosis respiratoria recurrente
Intermedio	26, 53, 66	Cáncer cervical

Las oncoproteínas E6 y E7 de VPH16 han sido estudiadas con bastante detalle y se ha descrito que ejercen diversas funciones distintas a las ya mencionadas. Dentro de estas otras funciones destaca el hecho que ambas oncoproteínas incrementan la proliferación celular. Además, E6 posee efectos antiapoptóticos, desestabilización cromosomal, bloqueo de las funciones de interferón, promueve la integración de ADN foráneo y mutagenicidad. Por su parte, E7 activa a las ciclinas A y E, induce apoptosis y funciona como inhibidor de los inhibidores de kinasas dependientes de ciclinas [59].

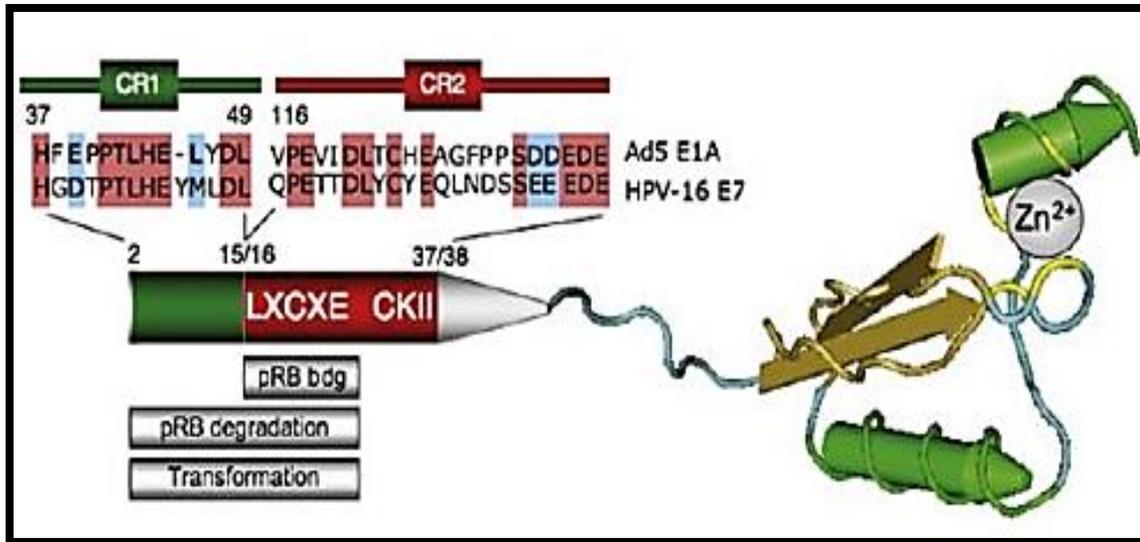


Figura 3. Representación esquemática de VPH E7. Se observan los sitios de unión con los cuales esta oncoproteína genera cambios en la célula, principalmente a través de la unión a pRb [60].

La oncoproteína E7 (**Fig. 3**) de VPH16 posee 98 aminoácidos y presenta un motivo conservado en el dominio homólogo CR2 que interactúa con pRb [60, 61]. Esta proteína viral está involucrada en la activación de TGF, que también se encuentra en niveles altos en mujeres con CCU. Se ha demostrado que la inhibición de E7, promueve una disminución de TGF evidenciándose una relación entre ambos [57]. Por otro lado, en un estudio se determinó que E7 puede aumentar la carcinogénesis mediante la activación de la vía Wnt por β -catenina [62]. Se ha descrito que la expresión de esta oncoproteína está regulada por STAT3 en un modelo de *SiHa* y *CaSki*. Se observó también una disminución de la viabilidad, en estas líneas celulares utilizando el silenciamiento y un inhibidor de STAT3 [63]. Además, se ha reportado que E7 aumenta la expresión de p63, un factor de transcripción que pertenece a la familia de p53, en células de cáncer de cuello uterino [64].

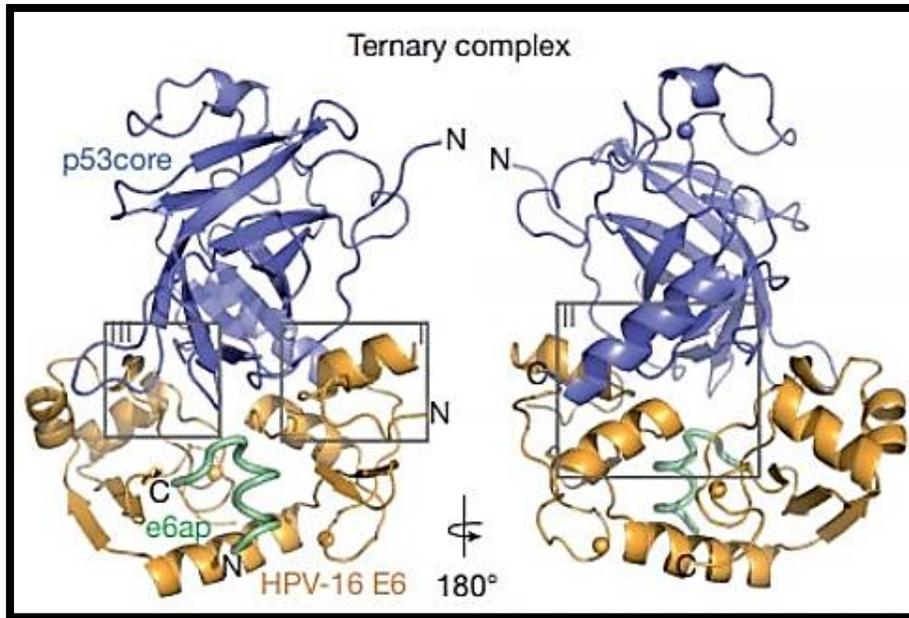


Figura 4. Representación esquemática de VPH E6. Se observa la estructura por ambos lados de E6 y el sitio de unión a p53 [65].

La proteína viral E6 (**Fig. 4**) estructuralmente está formada por 150 aminoácidos aproximadamente, posee dos repeticiones de secuencias internas conservadas [66]. Se ha descrito que esta oncoproteína aumenta los niveles de micro-ARNs, miARN-218 y miARN-23b; el primero relacionado con crecimiento celular y motilidad, a través de la proteína LAMB3 y el segundo está relacionado a migración celular. Además, la expresión de E6 entrega señales de activación para mTOR, AKT, PDK1 y mTORC2 río arriba de kinasas. Así, la proteína E6 mantiene la proliferación celular [30, 67-69]. Se ha reportado que esta proteína viral regula la expresión del miARN-496, en muestras clínicas de pacientes con cáncer orofaríngeo [70].

Mediante el uso de un complejo de Cu^{2+} , se demostró un aumento en los niveles de p53 e inducción de apoptosis en células de CCU y cáncer de mama en presencia de la oncoproteína viral E6. Dada la importante acción de este complejo sobre E6, se propuso como una terapia farmacológica de los tipos de cáncer causados por VPH [71]. Además, en un modelo de cáncer orofaríngeo se sugirió un mecanismo, que promueve la expresión de E6. Dicho mecanismo se basa en la interacción de la matriz hialurónica y CD44 (HA-CD44), la cual vía c-JUN activan el promotor de la oncoproteína E6 [72]. Por otro lado, se ha descrito que estas proteínas virales están involucrados en la sobreexpresión de Pirin en líneas celulares de CCU [73].

PIRIN Y ACTIVACIÓN DE TRANSICIÓN EPITELIAL-MESENQUIMAL

Pirin es una proteína codificada por el gen *PIR* (**Fig. 5**), la cual se expresa en múltiples tejidos dentro del organismo, formada aproximadamente por 288 aminoácidos y un peso molecular de 32,118 kDa. Por espectrometría de masas se determinó que Pirin contiene 1 mol de Fe²⁺ por mol de proteína, metal que participa como grupo prostético en múltiples actividades [74-76].

Dentro de las funciones de Pirin destaca la unión a BCL3, que permite potenciar la TEM [74]. En contraste, en otro estudio se utilizó a Pirin control y con un mutante, obteniéndose una disminución de la expresión de E-cadherina para ambos casos. Sin embargo, la proteína Pirin mutante no pudo unirse a BCL3 [77]. Entonces, estos últimos autores propusieron a Pirin como agente de activación de la TEM, lo cual puede ocurrir independiente de la unión a BCL3, realizado en una línea celular de CCU (*HeLa*) [77]. BCL3 se describe como inhibidor del factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NF-κB). Este último es un factor transcripcional involucrado en varios procesos biológicos, como también en múltiples enfermedades dentro de las cuales se incluye el cáncer [78].

Una función fundamental de Pirin es su participación como regulador en la TEM, proceso en que esta proteína se encuentra sobreexpresada. Se ha reportado en modelos de tumores de CCU, que esta sobreexpresión se relaciona principalmente con los niveles de la oncoproteína E7, lo cual ha permitido sugerir una relación directa entre los niveles de E7 y un incremento de los niveles de Pirin durante la activación de la TEM [73]. Por otro lado, se ha descrito que *PIR* participa en la maduración de las células hematopoyéticas y por tanto se ha propuesto que estaría involucrado en el desarrollo de leucemias mieloides agudas [79].

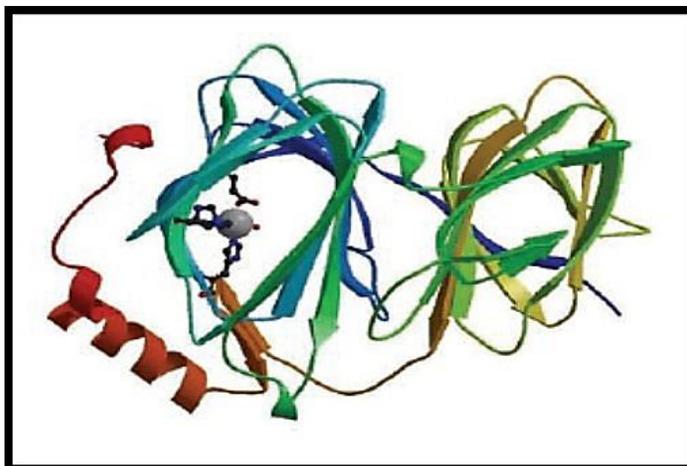


Figura 5. Estructura de la proteína Pirin. Se observa el N-terminal en azul y en rojo el C-terminal, como también en plomo el ion de metal [75].

Mediante el uso de un modelo *knockout* dirigido a Pirin, se ha documentado un aumento de la capacidad migratoria de células de melanoma, lo cual ha permitido demostrar una relación directa entre Pirin y migración celular [80]. Además, en melanoma se evidenció que la proteína Pirin está involucrada en la progresión tumoral. En este estudio se observó que esta proteína se desplaza hacia el citoplasma, porque normalmente tiene una ubicación nuclear. Este cambio de localización subcelular se asoció a malignización tumoral [81]. Finalmente, la activación de la TEM por Pirin provocaría un aumento de efectos metastásicos, los cuales podrían ser potencialmente regulados por curcumina [82].

CURCUMINA Y SU POTENCIAL TERAPÉUTICO

Diferuloil metano o curcumina, es una molécula simétrica, hidrofóbica, poco soluble, que contiene dos anillos aromáticos con grupos o-metoxi fenólicos unidos por una cadena alifática de siete carbonos, que posee un peso molecular de 368,38 g/mol y su origen proviene del vegetal *Cúrcuma longa* [83-85] (**Fig. 6**). Es usada como aditivo en comidas, siendo un componente del curry [86].

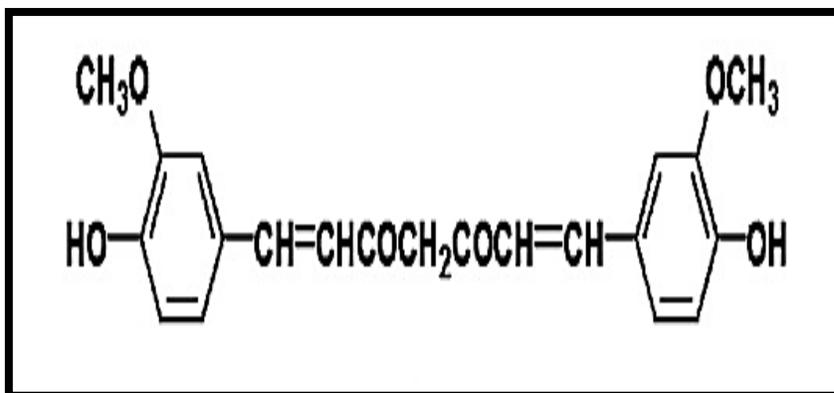


Figura 6. Estructura química de la curcumina (Diferuloil metano). Se observa químicamente la estructura de este compuesto, la cual está formada por dos anillos aromáticos con un grupo o-metoxi fenólicos en cada uno de ellos, unidos por una cadena alifática de siete carbonos [87].

Dentro de las propiedades de la curcumina, se ha reportado que este compuesto previene varios tipos de cáncer, hallazgo que se ha documentado en numerosas publicaciones [67, 85, 86, 88]. Se ha descrito que este efecto preventivo se basa principalmente en inhibir la proliferación, inducir la apoptosis y la detención del ciclo celular. Reportes sugieren que estos últimos cambios ocurren a través de la interacción de este compuesto con factores de las vías de señalización NF- κ B y PI3K/AKT [89, 90]. Además, se ha observado que curcumina es un compuesto capaz de disminuir la expresión génica de E6/E7 de VPH-AR, debido a que induce una disminución en los niveles de AP-1. Este último es un importante factor de transcripción que participa en la activación del promotor temprano de VPH, el cual dirige la expresión de los oncogenes virales [91]. Otra propiedad de la curcumina es su seguridad farmacológica y baja toxicidad, incluso a dosis altas de 12 g/día en pacientes, lo cual está dado por su baja biodisponibilidad [88, 92]. La curcumina afecta a la vía NF- κ B funcionando como agente anti-inflamatorio y eventualmente teniendo un rol protector en casos de nefrotoxicidad, a través de la disminución de los niveles de TNF- α [93].

Se ha descrito que curcumina tiene un rol antioxidante, mediante la captura de radicales libres. En efecto, esta molécula posee tres lugares donde puede ser oxidada cediendo electrones, los cuales pueden ser restaurados por el ácido ascórbico (**Fig. 7**). La acción antioxidante está dirigida a los ROS producidos durante la peroxidación de los lípidos, evitando así daños e injurias a la membrana plasmática [83, 94]. Sin embargo, otros autores señalan que curcumina potenciaría la apoptosis, mediante el aumento de otros radicales libres, a través de la vía ROS con participación de AP-1, NF- κ B y Nrf2 [95].

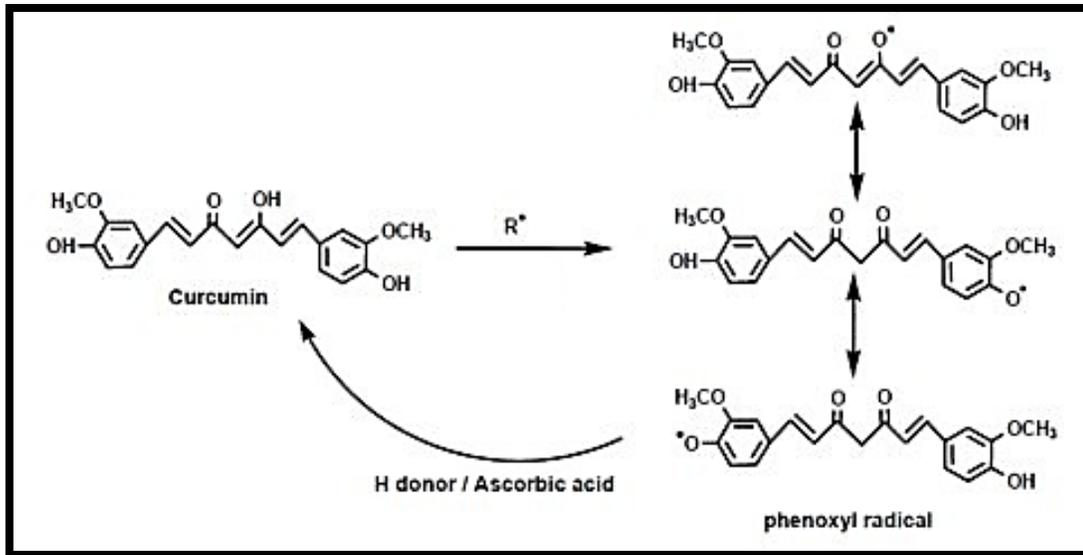


Figura 7. Mecanismo antioxidante de la curcumina. Curcumina en presencia de ROS cede electrones pasando a llamarse radicales fenoxilos, los cuales poseen una estructura distinta, pero nombres similares. Además, este electrón cedido es regenerado por el ácido ascórbico [83].

Hay evidencia que la curcumina inhibe la angiogénesis mediante una baja en la expresión de VEGF y MMP9, éstos últimos participan en la reorganización de la matriz y activación de la formación de nuevos vasos sanguíneos. De la misma manera, hay evidencia que curcumina III que pertenece a la familia de los *curcuminoides*, posee un efecto citotóxico que permite la disminución del tamaño de tumores tanto en estudios *in vitro* como *in vivo* [87].

Estas propiedades de la curcumina recientemente mencionadas, tienen un carácter preventivo de un proceso tumoral o de alterar el desarrollo de un tumor ya establecido. Además, es importante destacar que estas propiedades han sido documentadas en diversos tipos de tumores [87, 90].

Finalmente, según los antecedentes entregados señalan que VPH, a través de sus proteínas virales E6 y E7 sobreexpresan a Pirin y éste a su vez activa la TEM. Además, curcumina disminuye a estas oncoproteínas, como también a la TEM y la migración por un mecanismo desconocido. Entonces, en base a todo esto se propone la siguiente hipótesis.

HIPÓTESIS

La curcumina está involucrada en la disminución de la transición epitelial-mesenquimal y la migración de células de cáncer de cuello uterino VPH16 positivo de una manera Pirin-dependiente.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de curcumina como compuesto natural sobre la transición epitelial-mesenquimal y la migración dependiente de Pirin en células de cáncer de cuello uterino.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Evaluar si la transición epitelial-mesenquimal depende de la expresión de la proteína Pirin en células tumorales de cuello uterino.
2. Evaluar los niveles de la proteína Pirin en células de cáncer de cuello uterino tratadas con curcumina.
3. Evaluar el efecto de curcumina en la transición epitelial-mesenquimal de células tumorales de cuello uterino.
4. Determinar la migración en células de cáncer de cuello uterino tratadas con curcumina.

MATERIALES Y MÉTODOS

Objetivo 1. Evaluar si la transición epitelial-mesenquimal depende de la expresión de la proteína Pirin en células tumorales de cuello uterino.

Racional: Se ha reportado que curcumina regula la expresión de E6 y E7. Entonces, para comenzar con la hipótesis planteada es necesario validar tales hallazgos en este modelo. Además, existen reportes que la proteína Pirin está involucrada en un incremento de la transición epitelial-mesenquimal, en algunos modelos de cáncer. Entonces, es necesario evaluar tal relación en la línea celular tumoral *SiHa*.

Métodos: Las células *SiHa* fueron tratadas con 20 μ M de curcumina por 72 horas, para evaluar la expresión de E6 y E7, como también los niveles proteicos de E7. Posteriormente, las células fueron transfectadas con 30 nM de ARNi_p dirigido a Pirin y expuestas a curcumina. Luego, se realizaron ensayos de *Western Blotting* y RT-qPCR para medir expresión génica y niveles proteicos de los marcadores de transición epitelial-mesenquimal (E-cadherina, Vimentina y N-cadherina) y Pirin.

Objetivo 2. Evaluar los niveles de la proteína Pirin en células de cáncer de cuello uterino tratadas con curcumina.

Racional: No se ha reportado que curcumina pueda tener un efecto sobre la proteína Pirin. Entonces, es necesario evaluar a la proteína Pirin en células tumorales de cuello uterino expuestas a curcumina.

Métodos: Las células *SiHa* fueron expuestas por 72 horas a una concentración de 20 μ M de curcumina, luego se utilizaron ensayos de *Western Blotting* y RT-qPCR para medir niveles proteicos y expresión génica de Pirin.

Objetivo 3. Evaluar el efecto de curcumina en la transición epitelial-mesenquimal de células tumorales de cuello uterino.

Racional: Estudios previos han demostrado que curcumina participa en disminución de TEM en distintos modelos celulares. Por tanto, es relevante demostrar que en el modelo de células *SiHa* ocurre el mismo efecto.

Métodos: Las células *SiHa* fueron expuestas por 72 horas a 20 μM de curcumina, luego se realizaron ensayos de *Western Blotting* y RT-qPCR para medir niveles proteicos y expresión génica de E-cadherina, N-cadherina, Vimentina, Slug, Snail y Zeb1.

Objetivo 4. Determinar la migración en células de cáncer de cuello uterino tratadas con curcumina.

Racional: Se evaluaron los eventuales cambios en los biomarcadores de TEM inducidos por curcumina y dependientes de Pirin que se traducen en alteraciones en la capacidad migratoria de células de cáncer de cuello uterino.

Métodos: Se realizó el ensayo de migración mediante *transwell*. Las células *SiHa* fueron sembradas en una cámara de *transwell* tratadas con curcumina, luego se realizó conteo con microscopio para determinar la migración celular.

CULTIVO CELULAR

La línea celular *SiHa* (HTB-35) se obtuvo directamente de la *American Type Culture Collection* (ATTC, Manassas, VA, EE.UU.). Las células se incubaron en medio basal RPMI1640 (Gibco, Carlsbad, CA, EE.UU.) suplementado con suero bovino fetal (FBS) al 10% (Hyclone, Fremont, CA, EE.UU.) con antibióticos (gentamicina, penicilina y estreptomycin 1X) y se mantuvieron a 37°C con una atmósfera de 5% de CO₂. Para subcultivo, las células se incubaron con tripsina durante 3-5 min y se mantuvieron con nuevo medio de cultivo que contenía FBS.

ENSAYO DE VIABILIDAD CELULAR

La viabilidad de la línea celular *SiHa* se determinó usando el ensayo MTS, que evalúa el porcentaje de células viables que son metabólicamente activas. Las células fueron expuestas a una depleción de suero durante 24 horas y después fueron sembradas en una placa de 96 pocillos. Se sembraron 4×10^4 células por pocillo y se ensayaron las siguientes concentraciones de curcumina: 0, 10, 20 y 30 μM . El ensayo de viabilidad se llevó a cabo 72 horas después del tratamiento con curcumina. Se usó la exposición a DMSO (solvente) como control. Para ello se utilizó la solución CellTiter 96® AQueous (MTS) (Promega), de la cual se tomaron 20 μL y se agregaron a cada pocillo; los pocillos libres de células se consideraron como blanco. Las

células se incubaron a 37° C con CO₂ al 5% y una atmósfera humidificada durante 3 horas. Luego, se determinó la OD (densidad óptica) de los pocillos a 550 nm a través de un lector de microplacas espectrofotométrico.

KNOCKDOWN DE PIRIN

Las células fueron expuestas a una depleción de suero durante 24 horas. Luego, se transfectaron con 30 µM de ARNip dirigido a Pirin (Santa Cruz Biotechnology Inc.) y una concentración similar de control negativo de silenciamiento (Negative Control #1 siRNA, Ambion), durante 24 horas. El procedimiento de transfección usando Lipofectamina 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE. UU.) fue realizado de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

WESTERN BLOTTING

Las proteínas totales se extrajeron de las células mediante un tampón de lisis (100 mmol / L Tris pH 8,0, SDS al 1%) que contenía un inhibidor de proteasa (Roche, Basilea, Suiza). Las células se incubaron a 4 °C durante 1 hora, se sonicaron sobre hielo durante 20 s y se centrifugaron a 12.000 g durante 10 min. Las proteínas se cuantificaron utilizando el kit de ensayo Pierce BSA Protein (Pierce, Rockford, IL, EE.UU.) y se cargaron 30 µg del extracto por pocillo. Después de PAGE-SDS al 12%, las proteínas fueron transferidas a una membrana Hybond-P ECL (Amersham, Piscataway, NJ, EE.UU.) usando Tris 20 mM, glicina 150 mM pH 8,3, en metanol al 20% con el aparato de transferencia semi-dry (Bio-Rad). Las membranas se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente con el reactivo de bloqueo (5% de leche desnatada, solución salina tamponada con Tris-Tween 20 al 0,5% pH 7,6 (TBS-T). Después, se incubaron toda la noche con los anticuerpos primarios (1:1000) comerciales contra E7 (Santa Cruz Biotechnology), E-cadherina (Abcam), Vimentina (Abcam), Slug (Santa Cruz Biotechnology), N-cadherina (Santa Cruz Biotechnology) y Pirin (Abcam). Las membranas se lavaron tres veces en TBS-T y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente con peroxidasa secundaria (1:1000) anti-IgG marcada (BD), usando un anticuerpo primario (1:5000) y secundario (1:1000) para β-actina como control de carga. Posteriormente, se lavaron tres veces en TBS-T20, se detectaron complejos inmunes usando el sistema ECL (Amersham Pharmacia Biotech) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA CUANTITATIVA CON TRANSCRIPTASA INVERSA

El ARN de la línea celular se aisló usando el reactivo Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Después de la purificación con cloroformo y la precipitación con isopropanol, el ARN se suspendió en agua-DEPC y se almacenó a -80°C. El ARN se trató con RQ1 RNasa libre de DNasa (Promega Madison, WI, EE.UU.) a 37°C durante 60 min y luego se incubó con RQ1 DNasa Stop Solution durante 10 min. El ADNc se preparó utilizando un volumen de reacción de 20 µL que contiene ARN tratado con ADNasa (1µg), inhibidor de ARNasa 1 U (Promega Madison, WI, EUA), partidores aleatorios de 0,04 µg / µL (Promega Madison, WI, EE.UU.), 2 mMdNTP (Promega Madison, WI, EE.UU.) y la transcriptasa inversa del virus de la leucemia murina de 10 U (MMLV-RT) (Promega Madison, WI, EE.UU.). La mezcla de reacción se incubó durante 1 hora a 37° C. El ADNc se sometió a cuantificación en tiempo real de la expresión génica con partidores específicos para cada gen (**Tabla 2**) en un sistema RotorGene 6000 (Corbett Research, Sydney, Australia) bajo las siguientes condiciones: 95° C durante 10 minutos, seguido de desnaturalización a 95° C durante 15 s, entre 55 y 60° C durante 20 s según el partidador y extensión a 72° C durante 20 s. La condición para la curva de disociación fue el aumento de la temperatura de 70° C a 90° C, 0,5° C en cada paso. La reacción se realizó utilizando 2 x SYBR Green Master Mix (Bioline, Londres, Reino Unido), un par de partidores de 0,4 µM, 10,5 µl de agua libre de RNasa y 1 µl de ADNc en un volumen final de 25 µl. Los partidores específicos y las condiciones de amplificación se ajustaron para cada secuencia de ARN (**Tabla 2**). El número de copias relativas de cada muestra, se calculó de acuerdo con sus curvas estándar utilizando el software Rotor-Gene. Se usaron niveles de ARNm de β-actina endógena para la normalización de la expresión de ARN, el cual fue estandarizado previamente en el laboratorio. Todas las reacciones se realizaron por triplicado.

Tabla 2. Partidores de genes utilizados en esta tesis. ^aTamaño del producto de ADNc amplificado por RT-qPCR específico de cada gen. ^bSecuencias de partidores usadas para generar un producto del tamaño indicado. F, forward; R, reverse.

Gen	Tamaño del Producto (pb) ^a	Secuencia del Partidor ^b	T° de Hibridación
E6	96	F: 5`-CTGCAAGCAACAGTTACTGCGA-3` R: 5`-TCACACACTGCATATGGATTCCC-3`	58°
E7	120	F: 5`-CAATATTGTAATGGGCTCTGTCC-3` R: 5`-ATTTGCAACCAGAGACAAGTATGAT-3`	58°
E-cadherina	135	F: 5`-GCACCGGTGCGACAAAGGACA-3` R: 5`-AGTCCCAGGCGTAGACCAAGA-3`	58°
N-cadherina	121	F: 5`-AAGAACGCCAGGCCAAACAA-3` R: 5`-TGCAGCTGGCTCAAGTCATA-3`	58°
Vimentina	131	F: 5`-GCCCTTGACATTGAGATTGCCA-3` R: 5`-TCAACCAGAGGGAGTGAATCCA-3`	58°
Slug	117	F: 5`-CTCCATTCCACGCCAGCTAC-3` R: 5`-AGCCACTGTGGTCCTTGGAG-3`	60°
Snail	84	F: 5`-AGGCTCGAAAGGCCTTCAACT-3` R: 5`-TGTGGCTTCGGATGTGCATCT-3`	60°
Zeb1	157	F: 5`-ACTGCCTGGTGTGCTGAAA-3` R: 5`-CCCAAAGTCAAGAAACGCT-3`	60°
PIR	131	F: 5`-TCAAATTGGACCCAGGAGCC-3` R: 5`-TCCAAGCACTGCTGTGTGAT-3`	55°

ENSAYO DE MIGRACIÓN TRANSWELL

Para el ensayo de migración en 3D, se recubrió el lado inferior de una cámara superior *transwell* (Corning, México) con fibronectina y se incubó durante la noche a 4°C. Se sembraron 50.000 células en medio no suplementado dentro de la cámara superior y se añadirán 500 µl de medio completo a la placa. Las células se dejaron migrar durante 7 horas. Las células migradas se fijaron y tiñeron con solución de cristal violeta / MetOH. Las células no migradas se eliminaron con un algodón de algodón. Las células migradas que pasaron por el *transwell* se contaron en 8 campos en cada experimento. Este experimento fue realizado en triplicado.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

La comparación de los promedios se hizo usando la prueba Mann-Whitney con el software GraphPadPrism V7. Los p-valores de menos de 0.05 se consideraron estadísticamente significativos.

RESULTADOS

1.- LA TRANSICIÓN EPITELIAL-MESENQUIMAL DEPENDE DE LA EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA PIRIN EN CÉLULAS TUMORALES DE CUELLO UTERINO

Inicialmente se realizó un ensayo de viabilidad de la línea celular *SiHa* (**Fig. 8**) para establecer el tiempo de exposición a curcumina y se determinó que a las 72 horas las células mantenían un crecimiento exponencial. Posteriormente, las células fueron expuestas a distintas concentraciones de curcumina, obteniéndose un IC50 de 15,67 μM . Utilizando esta concentración como referencia y tomando en consideración datos previamente reportados [96, 97], se decidió trabajar con la concentración de 20 μM (**Fig. 9**). Luego, se realizó una cinética de tiempo y viabilidad celular a dicha concentración (**Fig. 10**), mediante lo cual la concentración final y tiempo de exposición para los análisis subsecuentes fueron fijados en 20 μM durante 72 horas. Preliminarmente, se evaluaron los transcritos de E6 y E7, como también los niveles proteicos de este último frente a la exposición a curcumina. Se observó una disminución significativa (**Fig. 11**) en ambos casos, lo cual confirma lo previamente reportado en otros modelos celulares.

La participación de Pirin en la TEM, se evaluó utilizando un ARNiP dirigido a Pirin con el objetivo de interferir y degradar el ARNm. En la figura 11 se muestra la eficiencia de la transfección por *Western Blotting*. Posteriormente, se evaluó la expresión génica de los marcadores de la TEM, medición realizada mediante PCR en tiempo real. Se observó un aumento significativo de la expresión génica de E-cadherina (**Fig. 12**), aunque cabe destacar que para N-cadherina y Vimentina no se detectaron transcritos (**datos no mostrados**). Este aumento de los transcritos de E-cadherina permite sugerir que existe una dependencia entre

Pirin y la TEM. Luego, células *knockdown* para Pirin se expusieron a curcumina con la misma concentración y tiempo de exposición determinado anteriormente, obteniéndose cuatro condiciones experimentales. En la condición del interferente de Pirin más DMSO se detectó que los niveles proteicos de N-cadherina (**Fig. 14**) disminuyen significativamente. Esto sugiere la existencia de una asociación entre la proteína Pirin y la TEM, lo cual permite complementar a lo observado anteriormente con E-cadherina (**Fig. 13**). Esta disminución de N-cadherina fue similar en todas las demás condiciones (**Fig. 12**), indicando que curcumina y Pirin regulan a N-cadherina. La condición de ambos tratamientos, mostró una disminución similar a las condiciones mencionadas anteriormente, descartando un efecto sinérgico entre ellas.

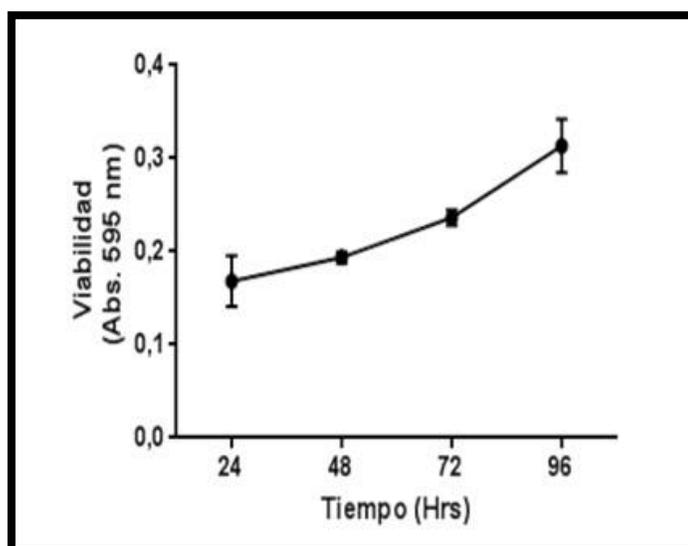


Figura 8. Curva de viabilidad celular. Las células *SiHa* fueron mantenidas con RPMI completo (10 % SFB) y se evaluó su viabilidad por medio del ensayo MTS a 24, 48, 72 y 96 horas. Los datos fueron expresados como promedios con error estándar de tres experimentos independientes.

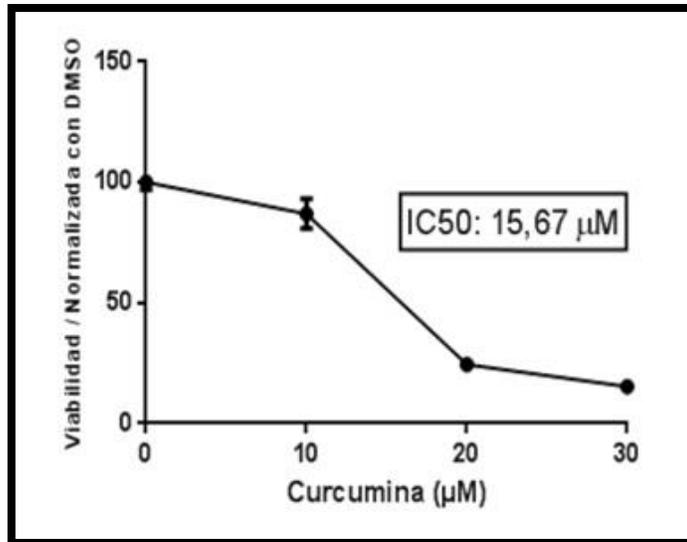


Figura 9. Curva de citotoxicidad. Las células *SiHa* fueron expuestas a distintas concentraciones de curcumina. El IC50 fue medido mediante un ensayo MTS después de 72 horas de tratamiento. Los datos fueron expresados como promedios con error estándar de tres experimentos independientes.

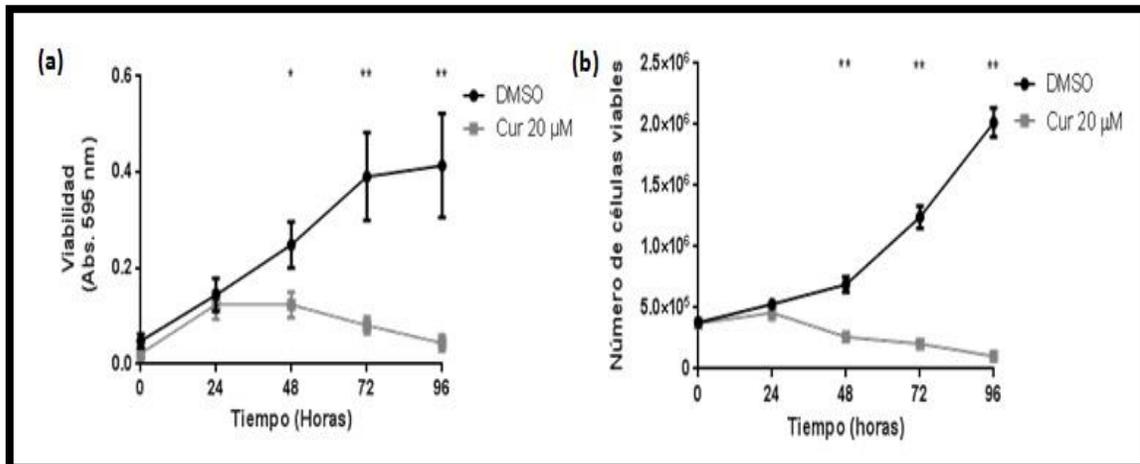


Figura 10. Cinética de tiempo de viabilidad celular a curcumina. Las células *SiHa* fueron expuestas a un tratamiento con 20 µM de curcumina con DMSO como control. La viabilidad fue evaluada mediante dos técnicas para los siguientes tiempos: 0, 24, 48, 72 y 96 horas. En (a) se muestran los datos del ensayo MTS y en (b) se muestra por conteo celular. Los datos fueron expresados como promedios con error estándar de tres experimentos independientes. La significancia estadística corresponde a células expuestas y no expuestas a curcumina en cada tiempo * p<0,05; ** p<0,01 (Mann-Whitney test).

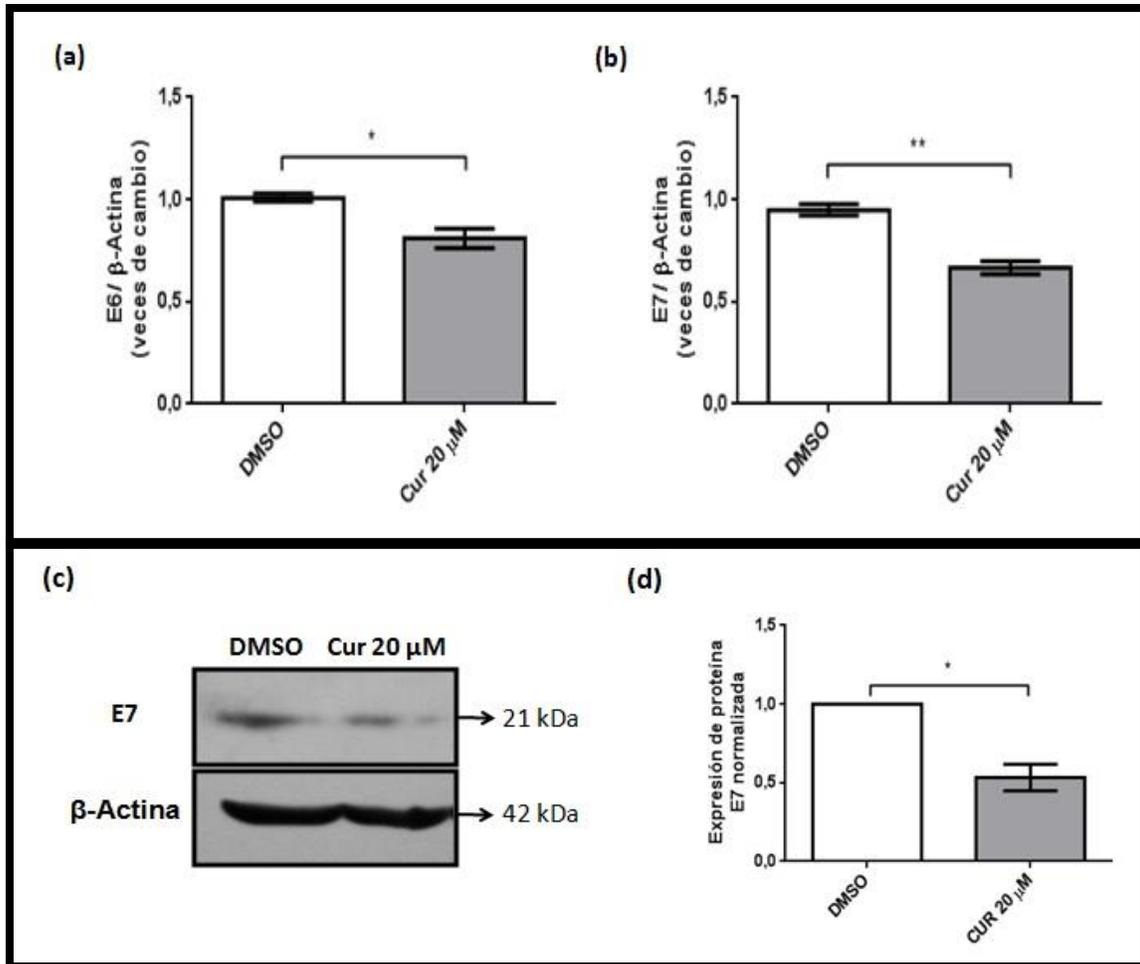


Figura 11. Efecto de curcumina en la expresión génica de E6 y E7, y niveles proteicos de E7. Las células *SiHa* fueron expuestas por 72 horas a un tratamiento con 20 μM de curcumina con DMSO como control. El ARN extraído se usó para RT-qPCR con partidores para transcritos de **(a)** E6 y **(b)** E7 normalizados con transcritos de β-actina. Los datos fueron expresados como promedios con error estándar de tres experimentos independientes * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ (Mann-Whitney test), **(c)** Las proteínas extraídas se usaron para *Western blotting* con anticuerpos para E7 y β-actina, **(d)** Análisis densitométrico de bandas de *Western Blot*. Los datos fueron expresados como promedios con error estándar de tres experimentos independientes * $p < 0,05$ (Mann-Whitney test).

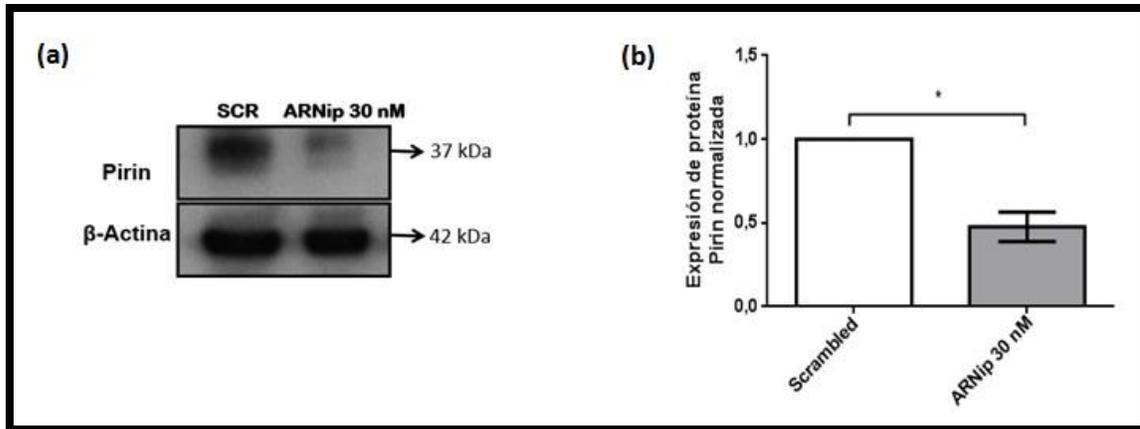


Figura 12. Efecto de un ARNip en el *knockdown* de Pirin. Las células *SiHa* se trataron con 30 nM de ARNip dirigido a Pirin y *Scrambled* durante 24 horas. (a) Las proteínas extraídas se usaron para *Western blotting* con anticuerpos para Pirin normalizado con β-actina, (b) Análisis densitométrico de bandas de *Western Blot*. Los datos fueron expresados como promedios con error estándar de tres experimentos independientes * $p < 0,05$ (Mann-Whitney test).

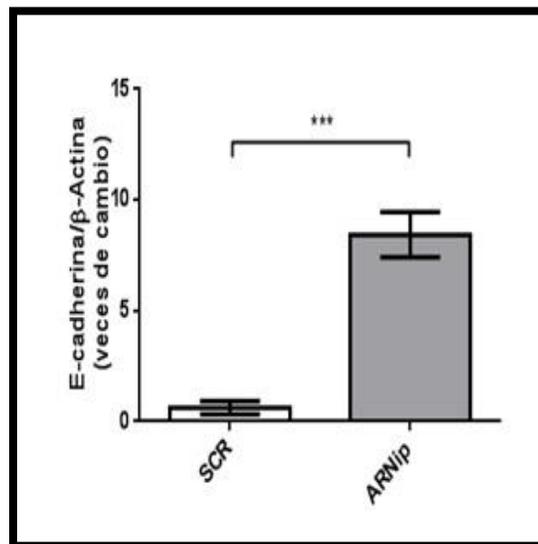


Figura 13. Efecto de Pirin en la transición epitelial-mesenquimal. Las células *SiHa* se trataron con 30 nM de ARNip dirigido a Pirin y *Scrambled* durante 24 horas. El ARN extraído se usó para RT-qPCR con partidores para transcritos de E-cadherina normalizado con transcritos de β-actina. Los datos fueron expresados como promedios con error estándar de tres experimentos independientes *** $p < 0,001$ (Mann-Whitney test).

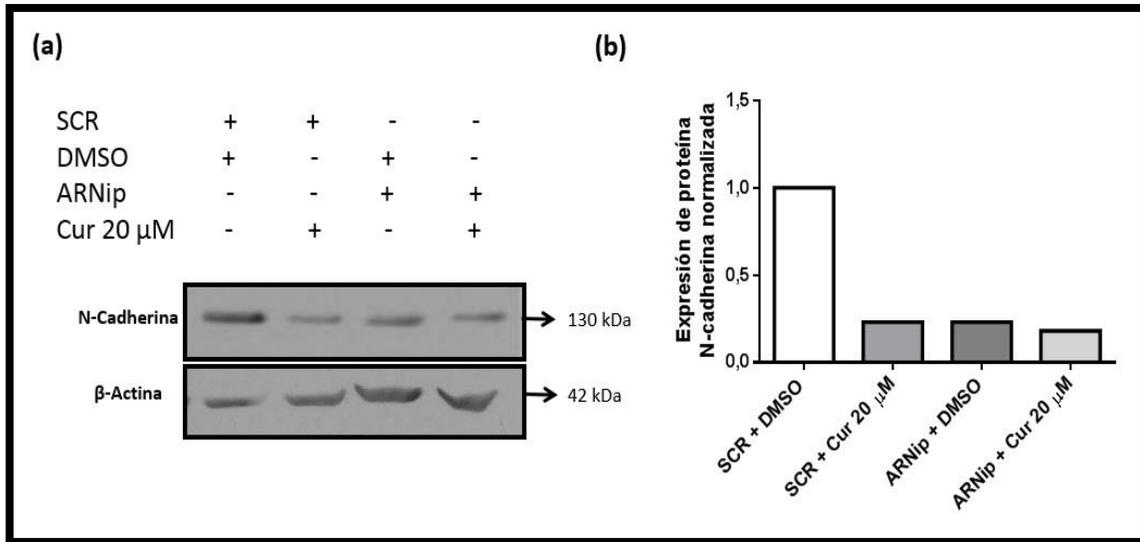


Figura 14. Efecto de Pirin y curcumina en la transición epitelial-mesenquimal. Las células *SiHa* se trataron con 30 nM de ARNip dirigido a Pirin y *Scrambled* durante 24 horas, luego fueron expuestas por 72 horas a un tratamiento con 20 μ M de curcumina y a otro con DMSO. **(a)** Las proteínas extraídas se usaron para *Western blotting* con anticuerpos para N-cadherina normalizado con β -actina, **(b)** Análisis densitométrico de bandas de *Western Blot*. Este resultado es representativo de un experimento independiente.

2.- NIVELES DE LA PROTEÍNA PIRIN EN CÉLULAS DE CÁNCER DE CUELLO UTERINO TRATADAS CON CURCUMINA

Las células *SiHa* fueron expuestas a curcumina para determinar su efecto en la proteína Pirin. Este efecto se evaluó a través de la expresión génica y los niveles proteicos por RT-qPCR y *Western Blotting* (**Fig. 15**), respectivamente. Se observó una disminución significativa tanto del ARNm como de la proteína. Por consiguiente, se concluye que curcumina disminuye los transcritos de *PIR* y los niveles de la proteína Pirin en este modelo experimental.

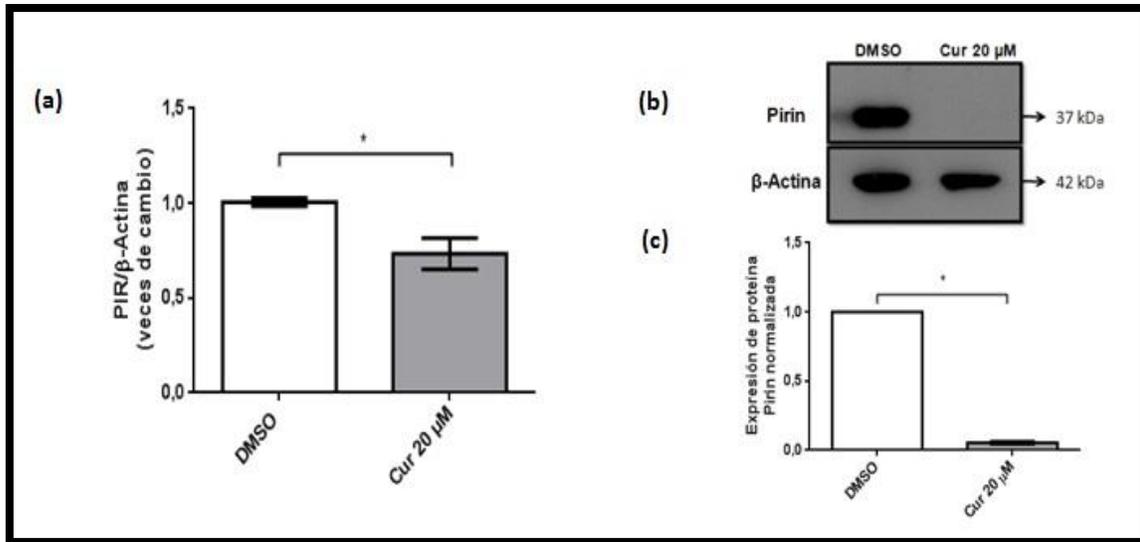


Figura 15. Efecto de curcumina en la expresión génica y los niveles proteicos de Pirin. Las células *SiHa* fueron expuestas por 72 horas a un tratamiento con 20 μ M de curcumina con DMSO como control. (a) El ARN extraído se usó para RT-qPCR con partidores para transcritos de Pirin normalizado con transcritos de β -actina. Los datos fueron expresados como promedios con error estándar de tres experimentos independientes * $p < 0,05$ (Mann-Whitney test), (b) Las proteínas extraídas se usaron para *Western blotting* con anticuerpos para Pirin normalizado con β -actina, (c) Análisis densitométrico de bandas de *Western Blot*. Los datos fueron expresados como promedios con error estándar de tres experimentos independientes * $p < 0,05$ (Mann-Whitney test).

3.- EFECTO DE CURCUMINA EN LA TRANSICIÓN EPITELIAL-MESENQUIMAL DE CÉLULAS TUMORALES DE CUELLO UTERINO

En el objetivo 3 de este proyecto, se evaluó el efecto de curcumina en la TEM comenzando con el marcador epitelial E-cadherina. La expresión génica aumentó significativamente, sin embargo, en los niveles proteicos no se observaron cambios en presencia de curcumina (20 μ M) (**fig. 16**). Luego, se evaluaron los marcadores mesenquimales determinando los niveles proteicos de N-cadherina y Vimentina (**Fig. 17**), observándose una disminución significativa, pero cabe destacar que no se encontraron transcritos (**datos no mostrados**) para ambos marcadores. Posteriormente, se evaluó la expresión génica y los niveles proteicos de Slug. Se observó un aumento significativo de los transcritos y una disminución de la proteína (**Fig. 18**) de este marcador. Finalmente, se determinaron los transcritos de Snail y Zeb1 (**Fig. 19**), observándose un aumento significativo para ambos casos. Se concluye de este objetivo que

disminuyen los niveles proteicos de tres marcadores mesenquimales importantes (N-cadherina, Vimentina y Slug), aunque se genera controversia según lo observado en los transcritos (E-cadherina, Snail y Zeb1) y niveles proteicos del marcador epitelial (E-cadherina). Por lo tanto, no se puede determinar con exactitud si la TEM se encuentra activa o no, ni tampoco como la célula resolverá fenotípicamente; por esta razón se planteó realizar ensayos fenotípicos en el objetivo cuarto, para respaldar los resultados obtenidos en este objetivo.

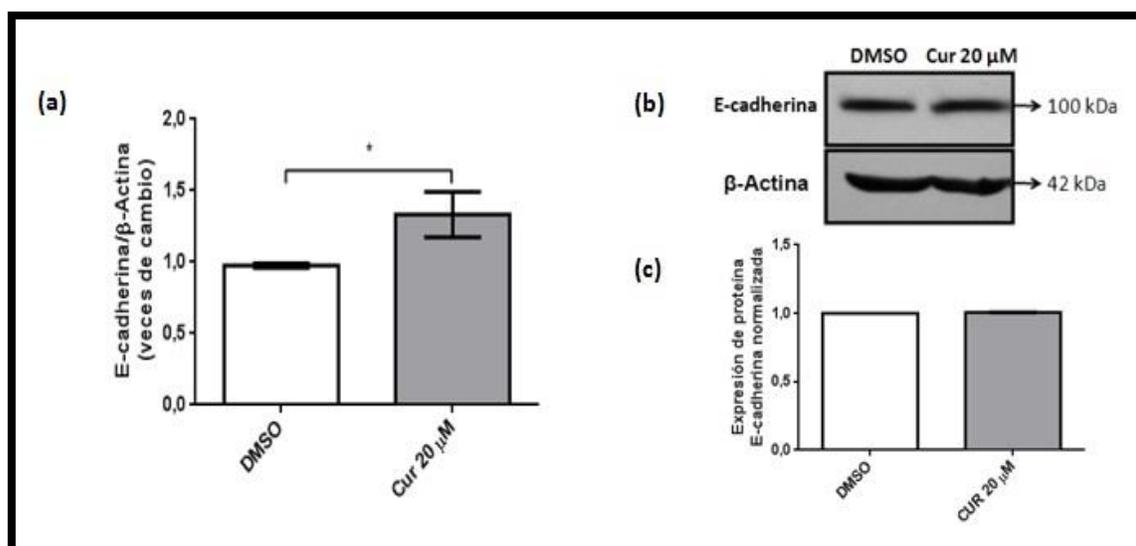


Figura 16. Efecto de curcumina en la expresión génica y los niveles proteicos de E-cadherina. Las células *SiHa* fueron expuestas por 72 horas a un tratamiento con 20 μ M de curcumina con DMSO como control. (a) El ARN extraído se usó para RT-qPCR con partidores para transcritos de E-cadherina normalizado con transcritos de β -actina, los datos fueron expresados como promedios con error estándar de tres experimentos independientes * $p < 0,05$ (Mann-Whitney test), (b) Las proteínas extraídas se usaron para *Western blotting* con anticuerpos para E-cadherina normalizado con β -actina, (c) Análisis densitométrico de bandas de *Western Blot*. Los datos fueron expresados como promedios con error estándar de tres experimentos independientes * $p < 0,05$ (Mann-Whitney test).

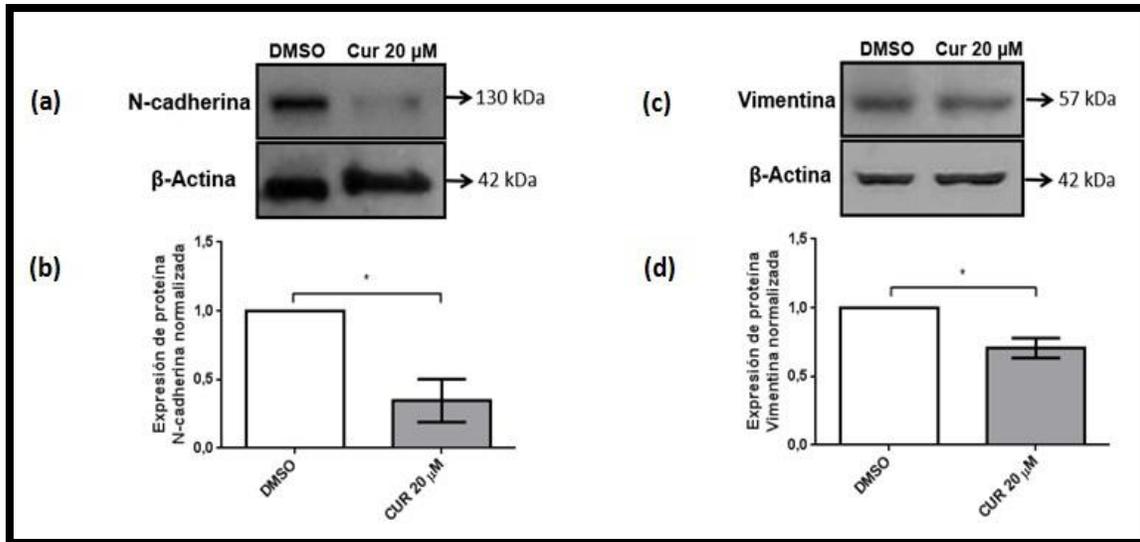


Figura 17. Efecto de curcumina en los niveles proteicos de N-cadherina y Vimentina. Las células *SiHa* fueron expuestas por 72 horas a un tratamiento con 20 μM de curcumina con DMSO como control. **(a)** Las proteínas extraídas se usaron para *Western blotting* con anticuerpos para N-cadherina normalizado con β-actina, **(b)** Análisis densitométrico de bandas de *Western Blot*, **(c)** Las proteínas extraídas se usaron para *Western blotting* con anticuerpos para Vimentina normalizado con β-actina, **(d)** Análisis densitométrico de bandas de *Western Blot*. Los datos fueron expresados como promedios con error estándar de tres experimentos independientes * $p < 0,05$ (Mann-Whitney test).



Figura 18. Efecto de curcumina en la expresión génica y los niveles proteicos de Slug. Las células *SiHa* fueron expuestas por 72 horas a un tratamiento con 20 μ M de curcumina con DMSO como control. (a) El ARN extraído se usó para RT-qPCR con partidores para transcritos de Slug normalizado con transcritos de β -actina, los datos fueron expresados como promedios con error estándar de tres experimentos independientes * $p < 0,05$ (Mann-Whitney test), (b) Las proteínas extraídas se usaron para *Western blotting* con anticuerpos para Slug normalizado con β -actina, (c) Análisis densitométrico de bandas de *Western Blot*. Los datos fueron expresados como promedios con error estándar de tres experimentos independientes * $p < 0,05$ (Mann-Whitney test).

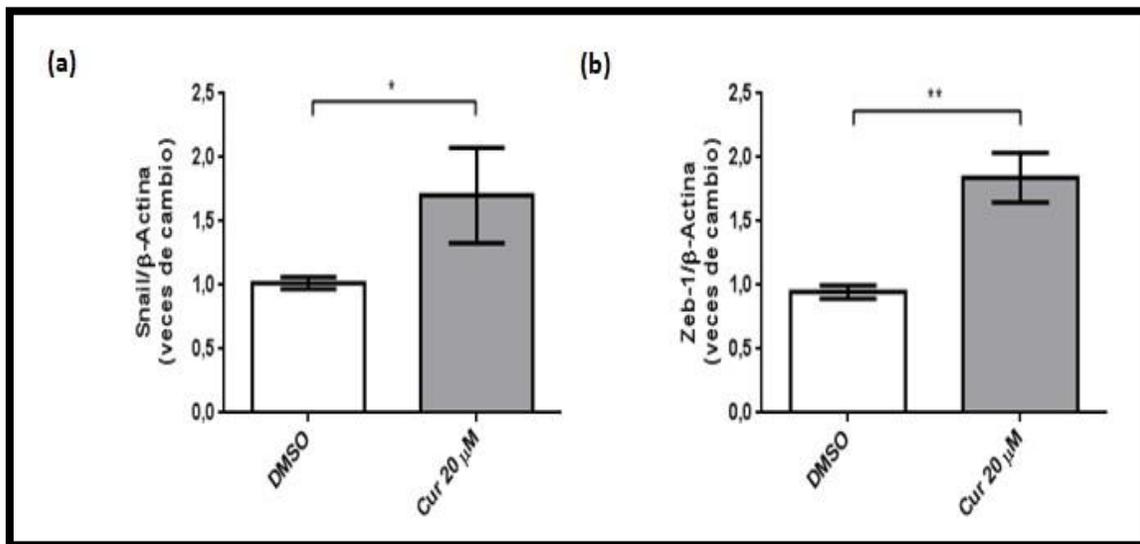


Figura 19. Efecto de curcumina en la expresión génica de Snail y Zeb1. Las células *SiHa* fueron expuestas por 72 horas a un tratamiento con 20 μ M de curcumina con DMSO como control. El ARN extraído se usó para RT-qPCR con partidores para transcritos de (a) Snail y (b) Zeb1 normalizado con transcritos de β -actina. Los datos fueron expresados como promedios con error estándar de tres experimentos independientes * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ (Mann-Whitney test).

4.- MIGRACIÓN EN CÉLULAS TUMORALES DE CUELLO UTERINO TRATADAS CON CURCUMINA

Las células *SiHa* fueron expuestas a 20 μ M curcumina, luego se evaluó la migración utilizando el ensayo de migración *transwell*. El objetivo de este experimento es observar la migración como cambio fenotípico en las células expuestas a curcumina, para complementar el primer objetivo de esta tesis. El resultado fue una disminución significativa de la migración celular (**Fig. 20**). Por consiguiente, se puede concluir que la exposición a curcumina disminuye la migración en esta línea celular tumoral.

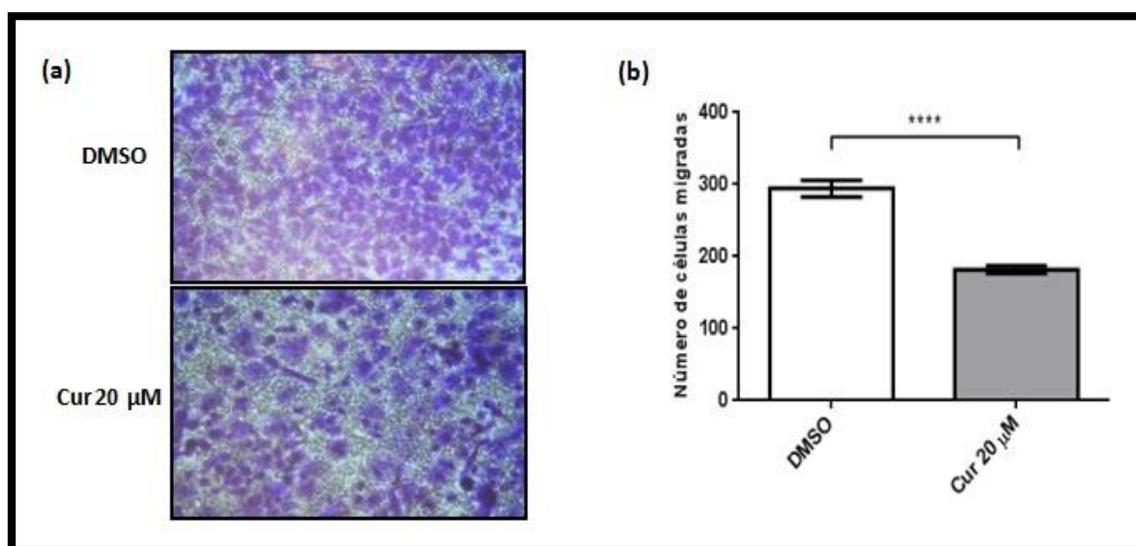


Figura 20. Efecto de curcumina en la migración celular. Las células *SiHa* fueron expuestas por 72 horas a un tratamiento con 20 μ M de curcumina y a otro con DMSO. La migración fue evaluada a través del ensayo *transwell*, (a) Imagen microscópica de células atravesando la membrana y (b) Conteo celular después de 7 horas de migración. Los datos fueron expresados como promedios con error estándar de tres experimentos independientes **** $p < 0,0001$ (Mann-Whitney test).

DISCUSIÓN

La curcumina ha sido descrita anteriormente como inhibidor de la carcinogénesis [98, 99] y como un regulador de la TEM [100]. Sin embargo, el mecanismo mediante el cual este compuesto polifenólico regula la TEM no ha sido establecido claramente. Entonces, en esta tesis se ha sugerido un posible mecanismo para explicar esta interrogante. Se hipotetiza que la exposición a curcumina se traduce en una disminución de la TEM de una manera dependiente de la proteína Pirin en un modelo de cáncer de cuello uterino, un tipo de cáncer que se caracteriza por presentar altas tasas de prevalencia y mortalidad en mujeres a nivel mundial [101]. Además, VPH16 es el genotipo más prevalente en este tipo de cáncer [102]. Por esta razón, se decidió trabajar con la línea celular *SiHa*, la cual contiene 1-2 copias integradas de VPH16 [103].

Las células de cáncer de cuello uterino fueron expuestas a 20 μM de curcumina durante 72 horas (**Fig. 8** y **Fig. 9**), lo cual es respaldado por otros reportes, en que se ha utilizado una concentración similar de este compuesto. En efecto, se han utilizado concentraciones que se encuentran en el rango de 0,5 y 100 μM de este compuesto, para la misma línea celular usada en esta tesis. Además, en esos estudios se evaluaron algunos de los marcadores de la TEM analizados en el presente estudio [90, 96, 97], en las mismas condiciones anteriormente señaladas. Se observó una marcada disminución en la viabilidad celular, situación similar a lo reportado en esta tesis (**Fig. 10**). En esos reportes se utilizaron variadas dosis de curcumina, de las cuales las más altas causaban una significativa muerte celular. A pesar de ello, los datos de esos estudios anteriormente mencionados fueron obtenidos usando dichas concentraciones de curcumina; puesto que se ha obtenido material celular (proteínas y ARN) proveniente de células viables y las diferencias generadas por la heterógena cantidad de células, fueron normalizadas mediante la carga inicial de dichas macromoléculas [91, 104, 105]. Por otro lado, la pérdida relativa de la viabilidad celular (**Fig. 10**) demuestra que la curcumina empleada posee actividad funcional, ya que la capacidad de inducir muerte celular de una manera dosis-dependiente, es una característica propia de este compuesto [90].

En un estudio previo realizado en el laboratorio, se trabajó con una línea celular oral que expresa ectópicamente las oncoproteínas virales. A través del *knockdown* de E6 y E7, se

concluyó que ambas, aunque fundamentalmente E7, regulan los niveles de Pirin [73]. Por otro lado, en un modelo de células *CaSki* (VPH16) [91], la cual posee 500 copias de VPH16 integradas en el genoma, se observó que curcumina disminuye los transcritos de E6 y E7, y también los niveles de la proteína E7, de una forma dosis-dependiente. Entonces, dada la importancia de estas proteínas virales como control y plataforma de sustentación de la hipótesis, fue importante en esta tesis confirmar tal disminución en un modelo de cáncer de cuello uterino. Al evaluar esto, se observó una disminución significativa en los niveles de E6 y E7 (**Fig. 11**) en las células *SiHa* expuestas a curcumina. En estas mismas células, fue evidenciada una disminución de estas proteínas virales de una manera dosis-dependiente. Sin embargo, fue considerado un tiempo de exposición menor a 24 horas [97]. En otro estudio se utilizaron las mismas células y la línea celular *HeLa* (VPH18), las cuales fueron expuestas a la misma concentración de curcumina utilizada en esta tesis. El tiempo de exposición a curcumina fue de 16, 24, 48 y 72 horas, observándose una disminución de los niveles de estas oncoproteínas en presencia de este compuesto natural [106]. En otra investigación se utilizó células *CaSki* inoculadas en ratones, los cuales fueron expuestos a 100 µg/ratón de curcumina, para luego extraer los tumores. Se observó mediante inmunohistoquímica una disminución de los niveles de ambas proteínas virales [105]. Los mismos resultados se obtuvieron en un estudio realizado en células *CaSki* y *HeLa*, mostrándose una disminución de la expresión génica de E6 y E7 en presencia de curcumina [101]. Los resultados obtenidos en esta tesis, confirman lo reportado en los modelos anteriormente señalados.

Los datos obtenidos en el primer objetivo permiten demostrar la participación de Pirin en la regulación de la TEM en células de CCU. Se utilizó un ARNip dirigido a *PIR* (**Fig. 12**), con el cual se observó un aumento de los transcritos de E-cadherina (**Fig. 13**), lo cual sugiere una posible regulación de la TEM mediada por Pirin. Esta observación es similar a lo reportado previamente [77] en células *HeLa*. Efectivamente, en esa investigación se reguló negativamente a Pirin para demostrar que esta proteína tiene la capacidad de regular la TEM. Además, los autores concluyeron que Pirin regula la TEM independiente de su capacidad de unión a BCL3-Slug, la cual es una vía ya documentada [77]. Además, en esta tesis se demostró que el *knockdown* de Pirin se asocia a una disminución de los niveles de N-cadherina (**Fig. 14**), lo cual sugiere que Pirin regula la TEM. Este resultado es similar a lo reportado por nuestro grupo, en células *CaSki*, en las cuales se observó un aumento de la

expresión génica de E-cadherina y la disminución de Slug. Estos hallazgos permiten confirmar que Pirin regula la TEM, complementando lo obtenido en esta tesis [73]. Además, un estudio realizado en melanoma, el cual usó un interferente para reducir los niveles de Pirin y un inhibidor farmacológico de esta proteína (TPhA), demostró una disminución de transcritos de Slug, lo cual también sugiere que la TEM depende de Pirin [80]. Por otra parte, con el objetivo de determinar un potencial efecto sinérgico entre el *knockdown* de Pirin y la exposición a curcumina, ambos tratamientos fueron evaluados. Se observó que dicha combinación disminuye los niveles de N-cadherina de manera similar respecto a cada condición independiente, descartando una sinergia entre el ARNip y curcumina (**Fig. 14**). Entonces, este último dato sugiere que no es posible descartar otro mecanismo, por el cual curcumina disminuye la TEM de forma independiente de Pirin.

En el segundo objetivo, se demostró que curcumina disminuye los niveles de Pirin y la expresión de *PIR* (**Fig. 15**). Estos datos confirman una parte trascendental de la hipótesis propuesta para esta investigación, lo cual es relevante en esta tesis porque no hay reportes previamente publicados. Los datos sugieren que curcumina regula negativamente los niveles de Pirin, la cual regula a su vez la expresión de N-cadherina y la TEM. Esta evidencia provee importante información para comprender el mecanismo por el cual curcumina disminuye la TEM.

En el tercer objetivo, los resultados indican que curcumina tiene una importante participación en la disminución de la TEM. En efecto, la disminución de los niveles de N-cadherina (**Fig. 17**), Vimentina (**Fig. 17**) y Slug (**Fig. 18**) respalda el rol de curcumina en la disminución de dicha transición. Además, estos datos son comparables a lo mostrado en el objetivo 1 (condición de SCR + curcumina 20 μ M) (**Fig. 14**), en el cual se observó que curcumina regula a N-cadherina. Sin embargo, no hubo cambios en los niveles de E-cadherina post-exposición a curcumina (**Fig. 16**). Dada la contradicción entre los transcritos y los niveles proteicos de Slug (**Fig. 18**), como también el aumento de la expresión de E-cadherina, pero la disminución de sus niveles de proteína (**Fig. 16**), se sugiere la participación de algún otro mecanismo mediado por curcumina, involucrado en la regulación de los niveles de estas proteínas. Esto se respalda con un reporte que señala la participación de miARNs, relacionado a cambios post-transcripcionales que regulan los marcadores de la TEM. Entre ellos destaca la familia de los

miARN-200 y el miARN-205, que al menos han sido identificados en la regulación de Zeb1 [107]. Esto fue evidenciado en un modelo de cáncer de ovario, en el cual se observó que la familia de los miARN-200 regula a Zeb1. Se realizó *knockdown* usando un interferente dirigido a cada uno de ellos (miARN-200a, 200b y 200c), concluyéndose que éstos disminuyen al marcador mesenquimal anteriormente señalado [108]. Además, se ha descrito la sobreexpresión de numerosos micro-ARNs en presencia de curcumina, con efecto desconocido en la TEM. En esta misma investigación se destaca la sobreexpresión del miARN-205, realizado en un modelo de melanoma, que también regula la expresión de Zeb1, como fue señalado anteriormente [109]. Por otro lado, en una publicación realizada en líneas celulares de cáncer de vesícula biliar, que fueron expuestas a 10 μ M de curcumina por 72 horas, se observó un aumento de los transcritos del miARN-203 [110]. Este último miARN obtenido de células de cáncer gástrico, fue secuenciado y se encontró un sitio de unión a Slug. Al sobreexpresar ese miARN, los niveles de la proteína de este marcador mesenquimal disminuyeron [111]. Por consiguiente, con estos datos se puede sugerir un mecanismo que podría explicar la controversia inicialmente descrita en la regulación de Slug. Además, estos mismos mecanismos de regulación post-transcripcionales, pueden ser atribuidos al aumento de la expresión génica de Snail y Zeb1 (RT-qPCR) (**Fig. 19**), aunque cabe destacar que para estos marcadores no se evaluaron los niveles de proteínas. Por lo tanto, estos resultados de transcritos también se contraponen a lo observado con los demás marcadores de este objetivo.

Previamente se han reportado diferencias en la respuesta de los marcadores de la TEM en células *HeLa* expuestas a 25 μ M de curcumina durante 48 horas. Es importante destacar que, en ese estudio, las células *SiHa* no fueron utilizadas para la evaluación de la TEM. Los resultados que se obtuvieron en dicha investigación, involucraron una disminución de los niveles proteicos de Slug y Snail, pero un aumento de N-cadherina. Estos hallazgos, en parte, se asemejan a los obtenidos en esta tesis respecto de la disminución de Slug, pero son distintos respecto a la disminución de N-cadherina [96]. Por otro lado, la respuesta contradictoria de E-cadherina ha sido reportada en líneas celulares de cáncer de mama. Las células fueron expuestas a 30 μ M de curcumina y se evaluó la expresión génica de los marcadores de TEM mediante RT-qPCR. Se observó disminución de E-cadherina en dos líneas celulares, mientras que en otra no hubo cambios. Situaciones de aumentos y bajas ocurren con los demás marcadores evaluados, según sea la línea celular evaluada [98]. Es posible observar

variaciones entre los marcadores porque difícilmente se puede encontrar un fenotipo totalmente epitelial, refiriéndose a una recuperación completa de células que inicialmente son tumorales. Por lo tanto, se sugiere un estadio intermedio de la TEM, lo cual es observable según los datos obtenidos en esta tesis empleando este modelo experimental.

Finalmente, en el cuarto objetivo para analizar un cambio fenotípico asociado a esta disminución de la TEM por curcumina, se evaluó la migración celular a través del ensayo de migración *transwell*. En este experimento la migración disminuyó significativamente (**Fig. 20**), resultado que es similar a lo documentado por otros autores, también en el mismo modelo celular se utilizó una concentración de 15 μM de curcumina y se evaluó la migración mediante el ensayo “cierre de la herida”. Luego de 48 horas de migración se observó una disminución significativa en presencia de curcumina, lo cual es similar a lo obtenido en esta tesis [96]. Además, en este último trabajo un resultado similar se obtuvo en la línea celular *HeLa* (CCU con 50 copias de HPV18 integradas). Una disminución en la migración celular mediante el ensayo “cierre de la herida” se observó en células *CaSki*, las cuales fueron expuestas a 5 y 10 μM de curcumina y los resultados se observaron 6 horas después del corte [91]. En otro estudio se utilizaron células *CaSki* y *SiHa*, las cuales fueron expuestas a 10 μM de curcumina por 48 horas. En dichas líneas celulares se observó una disminución en la migración después de 6 horas [105]. En un modelo de cáncer de mama se obtuvo un resultado similar, tales células se incubaron con 30 μM de curcumina por 48 horas. Luego, se utilizó el ensayo de migración *transwell* y los resultados se obtuvieron posteriormente a las 12 horas de migración [98].

Las proyecciones de esta tesis se centran de demostrar con más experimentos, que la disminución de la TEM en presencia de curcumina depende de Pirin. Para lograr esto se sugiere sobreexpresar esta proteína, utilizando un vector plasmidial con el objetivo de incrementar su actividad funcional. Además, sería posible agregar otra condición para la concentración y tiempo de exposición a curcumina usada en esta tesis. Al contar con estas condiciones lo siguiente es observar los cambios en la TEM, esperándose ver un aumento de los marcadores mesenquimales para la condición del aumento funcional de Pirin. Inversamente, observar una disminución en presencia de curcumina como fue evidenciado en esta tesis. Otro punto importante a investigar es si existe una relación directa, en la

disminución de Pirin por parte de curcumina de forma independiente a E6 y E7. Por otro lado, para complementar sería interesante indagar en los miARNs que evidencian cambios en presencia de curcumina. Por consiguiente, evaluar el efecto de ellos en la TEM y la migración celular. Además, evaluar la invasión en este modelo sería un aporte importante para reforzar este mecanismo.

CONCLUSIÓN

La conclusión de esta tesis es que curcumina disminuye la TEM y la migración, en células de cáncer de cuello uterino. Además, curcumina disminuye la proteína Pirin, un importante sensor de stress oxidativo. Por lo tanto, estos resultados sugieren un nuevo mecanismo mediante el cual curcumina puede ejercer su efecto inhibitor de la TEM (**Fig. 21**). En dicho mecanismo Pirin tiene un rol fundamental. Sin embargo, con los datos obtenidos no es posible descartar mecanismos alternativos mediante los cuales curcumina ejerce su efecto, como ha sido previamente reportado en otros modelos celulares.

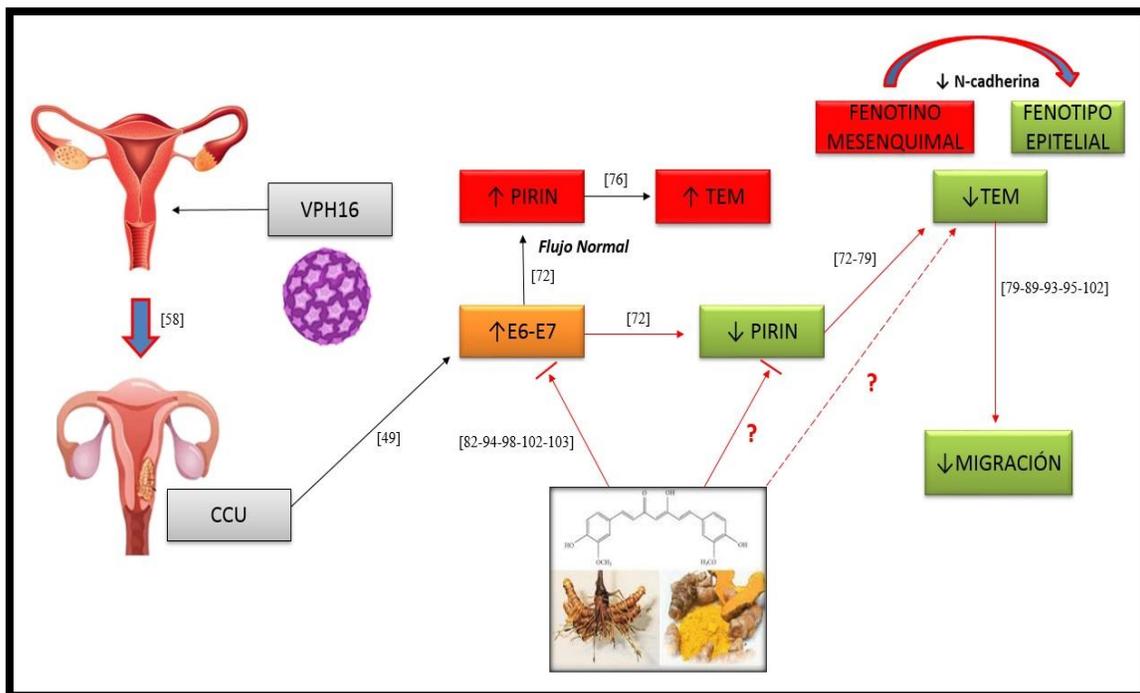


Figura 21. Modelo final. Se observa el efecto de la exposición a curcumina en CCU en la disminución de la TEM y la migración celular, proceso que en parte es regulado por Pirin. Además, se muestra la interrogante de si existe otro mecanismo independiente a E6 y E7, por el cual curcumina regula a Pirin y la TEM.

BIBLIOGRAFÍA

1. OMS. *Cáncer*. [Nota Descriptiva] 2017; Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/>.
2. De Freitas, A.C., Gurgel, A. P., De Lima, E. G., *Human papillomavirus and lung carcinogenesis: an overview*. Res Clin Oncol, 2016. **142**(12): p. 2415-2427.
3. Fica, A., *Prevención del cáncer cérvico-uterino en Chile. Mucha vacuna y poco Papanicolau*. Rev Chilena Infectol., 2014. **31**(2): p. 196-203.
4. Concha-Benavente, F., Ferris, R. L., *Oncogenic growth factor signaling mediating tumor escape from cellular immunity*. Current Opinion in Immunology, 2017. **45**: p. 52–59.
5. Adjiri, A., *Identifying and Targeting the Cause of Cancer is Needed to Cure Cancer*. Oncologytherapy, 2016. **4**: p. 17-33.
6. Larsson, L.-G., *Oncogene- and tumor suppressor gene-mediated suppression of cellular senescence*. Seminars in Cancer Biology, 2011. **21**: p. 367-376.
7. Hanahan, D., Weinberg, R. A. , *Hallmarks of Cancer: The Next Generation*. Cell., 2011. **144**(5): p. 646-674.
8. Wong, R.S., *Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment*. Journal of Experimental & Clinical Cancer Research, 2011. **30**(1): p. 87.
9. Adams, J., Cory, S., *The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy*. Oncogene, 2007. **26**: p. 1324–1337.
10. Li, K., Wang, L., Xua, X., Jiang, W. , *Label-free molecular beacons-based cascade amplification DNA machine for sensitive detection of telomerase activity*. Journal Elsevier, 2017. **167**: p. 645-650.
11. Hanahan, D., Weinberg, R. A., *The hallmarks of cancer*. Cell, 2000. **100**: p. 57-70.
12. Ciombor, K.K., Goldberg, R. M., *Update on Anti-Angiogenesis Therapy in Colorectal Cancer*. Curr Colorectal Cancer Rep., 2015. **11**(6): p. 378-387.
13. De Groot, J.F., Mandel, J. J., *Update on Anti-angiogenic Treatment for Malignant Gliomas*. Curr Oncol Rep, 2014. **16**: p. 380-386.

14. Markiewicz, A., Ahrends, T., Welnicka-Jaśkiewicz, M., Seroczyńska, B., Skokowski, J., Jaśkiewicz, J., Szade, J., Biernat, W., Żaczek, A. J. , *Expression of epithelial to mesenchymal transition-related markers in lymph node metastases as a surrogate for primary tumor metastatic potential in breast cancer*. Journal of Translational Medicine, 2012. **10**: p. 226.
15. Vannier, C., Mock, K., Brabletz, T., Driever W., *Zeb1 Regulates E-cadherin and Epcam (Epithelial Cell Adhesion Molecule) Expression to Control Cell Behavior in Early Zebrafish Development*. J Biol Chem, 2013. **288**(26): p. 18643-18659.
16. Derycke, L., Bracke, M., *N-cadherin in the spotlight of cell-cell adhesion, differentiation, embryogenesis, invasion and signalling*. Int. J. Dev. Biol., 2004. **48**: p. 463-476.
17. Satelli, A.a.L., S., *Vimentin in cancer and its potential as a molecular target for cancer therapy*. Cellular and Molecular Life Sciences, 2011. **68**: p. 3033–3046.
18. Adhikary, A., Chakraborty, S., Mazumdar, M., Ghosh, S., Mukherjee, S., Manna, A., S., Mohanty, S., Nakka, K., Joshi, S., De, A., Chattopadhyay, S., Sa, G. and Tanya Das†1, *Inhibition of Epithelial to Mesenchymal Transition by E-cadherin Up-regulation via Repression of Slug Transcription and inhibition of E-cadherin degradation*. THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, 2014. **289**(37): p. 25431–25444.
19. Thiery, J., Acloque, H., Huang, R. and Nieto, M., *Epithelial-Mesenchymal Transitions in Development and Disease*. Cell, 2009. **139**: p. 871-890.
20. Hu, Y., Xie, H., Liu, Y., Liu, W., Liu, M., Tang, H., *miR-484 suppresses proliferation and epithelial–mesenchymal transition by targeting ZEB1 and SMAD2 in cervical cancer cells*. Cancer Cell Int, 2017. **17**(36): p. 1-17.
21. Kalluri, R., Weinberg, R., *The basics of epithelial-mesenchymal transition*. J Clin Invest., 2009. **119**(6): p. 1420-1428.
22. Curtin, N.J., *DNA repair dysregulation from cancer driver to therapeutic target*. Nature Reviews | Cancer, 2012. **12**: p. 801-817.
23. Landskron, G., De la Fuente, M., Thuwajit, P., Thuwajit, C., Hermoso, M. A., *Chronic Inflammation and Cytokines in the Tumor Microenvironment*. Journal of Immunology Research, 2014. **2014**.

24. Shrihari, T.G., *Dual role of inflammatory mediators in cancer*. *Ecancer*, 2017. **11**: p. 721.
25. Koppenol, W.H., Bounds, P. L., Dang, C. V. , *Otto Warburg's contributions to current concepts of cancer metabolism*. *Nature Reviews | Cancer*, 2011. **11**: p. 325-337.
26. Harada, H., *How Can We Overcome Tumor Hypoxia in Radiation Therapy?* *J. Radiat. Res.*, 2011. **53**: p. 545-556.
27. Grivennikov, S.I., Greten, F. R., Karin, M. , *Immunity, Inflammation, and Cancer*. *Cell.*, 2010. **140**(6): p. 883-899.
28. OMS. *Human papillomavirus (HPV) and cervical cancer*. 2016; Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs380/en/>.
29. OMS, *Cervical Cancer Estimated Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012*. 2012.
30. Tuna, M., Amos, C. I., *Next generation sequencing and its applications in HPV associated cancers*. *Oncotarget*, 2016. **8**(5): p. 8877-8889.
31. Senapati, R., Senapati, N. N., Dwibedi, B. , *Molecular mechanisms of HPV mediated neoplastic progression*. *Infectious Agents and Cancer*, 2016. **11**: p. 59.
32. Das Ghosh, D., Mukhopadhyay, I., Bhattacharya, A., Roy C., R., Ranjan M., N., Roy, S., Sengupta, S. , *Impact of genetic variations and transcriptional alterations of HLA class I genes on cervical cancer pathogenesis*. *International Journal of Cancer*, 2017. **140**(11): p. 2498-2508.
33. Ferreccio, C., Prado, R. B., Luzoro, A. V., Ampuero, L. S., Snijders, P. J. F., Meijer, C. J.L.M., Vaccarella, S. V., Jara, A. T., Puschel, K. I., Robles, S. C., Herrero, R., Franceschi, S. F., Ojeda, J. M. , *Population-Based Prevalence and Age Distribution of Human Papillomavirus Among Women in Santiago, Chile*. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 2004. **13**(12): p. 2271-2276.
34. Barra, F., Lorusso, D., Roberti, M., Umberto, L., Ditto, A., Bogani, G., Raspagliesi, F., Ferrero, S. , *Investigational drugs for the treatment of cervical cancer*. *Expert Opinion On Investigational Drugs*, 2017. **26**(4): p. 389-402.
35. OMS. *Control integral del cáncer cervicouterino: Guía de prácticas esenciales*. 2015; Disponible en: <http://www.who.int/reproductivehealth/publications/cancers/cervical-cancer-guide/es/>.

36. Egawa-Takata, T., Ueda, Y., Tanaka, Y., Morimoto, A., Kubota, S., Yagi, A., Terai, Y., Ohmichi, M., Ichimura, T., Sumi, T., Murata, H., Okada, H., Nakai, H., Mandai, M., Yoshino, K., Kimura, T., Saito, J., Kudo, R., Sekine, M., Enomoto, T., Horikoshi, Y., Takagi, T., Shimura, K., *Mothers' attitudes in Japan regarding cervical cancer screening correlates with intention to recommend cervical cancer screening for daughters*. Int J Clin Oncol, 2016. **21**: p. 962–968.
37. Khan H., M.R., Gabbidon, K., Saxena, A., Abdool-Ghany, F., Dodge III, J. M., Lenzmeie, T., *Disparities in Cervical Cancer Characteristics and Survival Between White Hispanics and White Non-Hispanic Women*. Journal Of Women's Health, 2016. **00**(00).
38. Urrutia, M.T., *Cáncer cérvicouterino en Chile: análisis de un nuevo paradigma preventivo*. Centro De Políticas Públicas UC, 2015. **10**(78).
39. Chavarro V., N., Arroyo H., G., Felipe L., A., Maruchi G., G. W., Pérez Z., I., *Cáncer cérvicouterino*. Anales de radiología México, 2009. **1**: p. 61-79.
40. Monk, B.J., Sill, M. W., McMeekin, D. S., Cohn, D. E., Ramondetta, L. M., Boardman, C. H., Benda, J., Cella, D., *Phase III Trial of Four Cisplatin-Containing Doublet Combinations in Stage IVB, Recurrent, or Persistent Cervical Carcinoma: A Gynecologic Oncology Group Study*. Journal Of Clinical Oncology, 2009. **27**: p. 4649-4655.
41. Kurmyshkina, O.V., Kovchur, P. I., Volkova, T. O., *'Drawing' a Molecular Portrait of CIN and Cervical Cancer: a Review of Genome-Wide Molecular Profiling Data*. Asian Pacific Journal of Cancer Prevention, 2015. **16**(11): p. 4477-4487.
42. Thomas, L.K., Bermejo, J. L., Vinokurova, S., Jensen, K., Bierkens, M., Steenbergen, R., Bergmann, M., Von Knebel D., M., Reuschenbach, M., *Chromosomal gains and losses in human papillomavirus-associated neoplasia of the lower genital tract – A systematic review and meta-analysis*. European Journal of Cancer, 2014. **50**: p. 85-98.
43. Warowicka, A., Kwasniewska, A., Gozdicka-Jozefia, A., *Alterations in mtDNA: A qualitative and quantitative study associated with cervical cancer development*. Gynecologic Oncology, 2013. **129**: p. 193–198.
44. Wright, A.A., Howitt, B. E., Myers, A. P., Dahlberg, S. E., Palescandolo, E., Van Hummelen, P., MacConaill, L. E., Shoni, M., Wagle, N., Jones, R. T., Quick, C. M.,

- Laury, A., Katz, I. T., Hahn, W. C., Matulonis, U. A., Hirsch, M. S., *Oncogenic mutations in cervical cancer: genomic differences between adenocarcinomas and squamous cell carcinomas of the cervix*. *Cancer*, 2013. **119**(21): p. 3776–3783.
45. Durst, M., Gissmann, L., Ikenberg, H., Zur Hausen, H. , *A papillomavirus, DNA-from a cervical carcinoma and its prevalence in cancer biopsy samples from different geographic regions*. *Proc. NatL Acad. Sci USA*, 1983. **80**: p. 3812-3815.
46. Boshart, M., Gissmann, L., Ikenberg, H., Kleinheinz, A., Scheurlen, W., zur Hausen, H., *A new type of papillomavirus DNA, its presence in genital cancer biopsies and in cell lines derived from cervical cancer*. *The EMBO Journal* 1984. **3**(5): p. 1151-1157.
47. Doorbar, J., Egawa, N., Griffin, H., Kranjec, C., Murakami, I., *Human papillomavirus molecular biology and disease association*. *Rev. Med. Virol.*, 2015. **25**: p. 2-23.
48. Gao, G., Smith, D. I. , *Role of the Common Fragile Sites in Cancers with a Human Papillomavirus Etiology*. *Cytogenet Genome Res*, 2017. **150**(3-4): p. 217-226.
49. Doorbar, J., *Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer*. *Clinical Science*, 2006. **110**: p. 525-541.
50. Mishra, A., Das, B. C. , *Curcumin as an anti-human papillomavirus and anti-cancer compound*. *Future Oncol.*, 2015. **11**(18): p. 2487–2490.
51. Herrero, R., González, P., Markowitz, L. E. , *Present status of human papillomavirus vaccine development and implementation*. *Lancet Oncol.*, 2015. **16**: p. e206-16.
52. Sanabria N., J.G., *Virus del Papiloma humano*. *Rev. Ciencias Médicas*, 2009. **13**(4): p. 168-187.
53. Munger, K., Baldwin, A., Edwards, K. M., Hayakawa, H., Nguyen, C. L., Owens, M., Grace, M., Huh, K. , *Mechanisms of Human Papillomavirus-Induced Oncogenesis*. *Journal Of Virology*, 2014. **78**(21): p. 11451–11460.
54. Peña, N., Carrillo, D., Muñoz, J. P., Chnaiderman, J., Urzúa, U., León, O., Tornesello, M. L., Corvalán, A. H., Soto-Rifo, R., Aguayo, F. , *Tobacco Smoke Activates Human Papillomavirus 16 p97 Promoter and Cooperates with High-Risk E6/E7 for Oxidative DNA Damage in Lung Cells*. *Plos One*, 2015. **10**(4): p. e0123029.
55. Concha R., M., *Diagnóstico y terapia del virus papiloma humano*. *Rev Chil Infect*, 2007. **24**(3): p. 209-214.

56. Niu, G., Wang, D., Pei, Y., Sun, L. , *Systematic identification of key genes and pathways in the development of invasive cervical cancer*. Gene, 2017. **618**: p. 28-41.
57. Xu, Q., Wang, S., Xi, L., Wu, S., Chen, G., Zhao, Y., Wu, Y., Ma, D., *Effects of human papillomavirus type 16 E7 protein on the growth of cervical carcinoma cells and immuno-escape through the TGF- β 1 signaling pathway*. Gynecologic Oncology, 2006. **101**: p. 132–139.
58. Reina, J.C., Muñoz, N., Sánchez, G. I. , *El estado del arte en las infecciones producidas por el virus del papiloma humano*. Colombia Médica, 2008. **39**(2): p. 189-95.
59. Zur Hausen, H., *Papillomaviruses Causing Cancer: Evasion From Host-Cell Control in Early Events in Carcinogenesis*. Journal of the National Cancer Institute, 2000. **92**(9): p. 690-698.
60. McLaughlin-Drubin, M., Münger, K., *The human papillomavirus E7 oncoprotein*. Virology, 2009. **384**: p. 335-344.
61. Ghittoni, R., Accardi, R., Hasan, U., Gheit, T., Sylla, B., Tommasino, M., *The biological properties of E6 and E7 oncoproteins from human papillomaviruses*. Virus Genes, 2010. **40**: p. 1-13.
62. Bulut, G., Fallen, S., Beauchamp, E. M., Drebing, L. E., Sun, J., Berry, D. L., Kallakury, B., Crum, C. P., Toretsky, J. A., Schlegel, R., Uren, A., *Beta-Catenin Accelerates Human Papilloma Virus Type-16 Mediated Cervical Carcinogenesis in Transgenic Mice*. PLoS ONE, 2011. **6**(11): p. e27243.
63. Shukla, S., Mahata, S., Shishodia, G., Pandey, A., Tyagy, A., Vishnoi, K., Basir, S., Das, B., Bharti, A., *Functional Regulatory Role of STAT3 in HPV16-Mediated Cervical Carcinogenesis*. Plos One, 2013. **8**(7): p. e67849.
64. Eldakhakhny, S., Zhou, Q., Crosbie, E., Sayan, B., *Human papillomavirus E7 induces p63 expression to modulate DNA damage response*. Cell Death and Disease, 2018. **9**(127): p. 1-11.
65. Martinez-Zapien, D., Ruiz, F., Poirson, J., Mitschler, A., Ramirez, J., Forster, A., Cousido-Siah, A., Masson, M., Vande Pol, S., Podjarny, A., Travé, G., Zanier, K., *Structure of the E6/E6AP/p53 complex required for HPV-mediated degradation of p53*. Nature, 2016. **529**: p. 541-556.

66. Liu, Y., Baleja, J., *Structure and function of the papillomavirus E6 protein and its interacting proteins*. *Frontiers in Bioscience*, 2008. **13**: p. 121-134.
67. Teymouri, M., Pirro, M., Johnston, T. P., Sahebkar, A., *Curcumin as a multifaceted compound against human papilloma virus infection and cervical cancers: A review of chemistry, cellular, molecular, and preclinical features*. *BioFactors*, 2016. **00**(00): p. 00-00.
68. Wallace, N.A., Galloway, D. A. , *Novel Functions of the Human Papillomavirus E6 Oncoproteins*. *Annu. Rev. Virol.*, 2015. **2**(21): p. 1-21.
69. León C., G., Faxas, M. E. , *Cáncer de cuello uterino: aspectos inmunológicos y genéticos de mayor relevancia*. *Rev Cubana Med*, 2004. **43**(1).
70. Mason, D., Zhang, X., Monteiro, T., Rose, B., Khoury, S., Hill, M., Deutsch, F., Lyons, J., Gama-carvalho, M., Tran, N., *Human papillomavirus 16 E6 modulates the expression of miR-496 in oropharyngeal cancer*. *Virology*, 2018. **521**: p. 149–157.
71. Kumar, A., Khun, L., Balbach, J., *A Cu²⁺ complex induces the aggregation of human papillomavirus oncoprotein E6 and stabilizes p53*. *FEBS J*, 2018.
72. Bourguignon, L., Earle, C., Shiina, M., *Hyaluronan-CD44 interaction promotes HPV 16 E6 oncogenemediated oropharyngeal cell carcinoma survival and chemoresistance*. *Matbio*, 2018.
73. Carrillo, D., Muñoz, J., Huerta, H., Leal, G., Corvalán, A., León, O., Urzúa, U., Boccardo, E., Tapia, J., Aguayo, F., *Upregulation of PIR gene expression induced by human papillomavirus E6 and E7 in epithelial oral and cervical cells*. *Open biology*, 2017. **7**: p. 170111.
74. Brzóska, K., Stepkowski, T. M., Kruszewski, M. , *Basal PIR expression in HeLa cells is driven by NRF2 via evolutionary conserved antioxidant response element*. *Mol Cell Biochem*, 2014. **389**(1-2): p. 99-111.
75. Pang, H., Bartlam, M., Zeng, Q., Miyatake, H., Hisano, T., Miki, K., Wong, L.-L., Gao, G. F., Rao, Z. , *Crystal Structure of Human Pirin*. *The Journal Of Biological Chemistry*, 2003. **279**(2): p. 1491–1498.
76. Wendler W., M.F., Kremmer, E., Foster, R., Winnacker, E-L. , *Identification of Pirin, a Novel Highly Conserved Nuclear Protein*. *The Journal Of Biological Chemistry*, 1997. **272**(13): p. 8482–8489.

77. Komai, K., Niwa, Y., Sasazawa, Y., Simizu, S. , *Pirin regulates epithelial to mesenchymal transition independently of Bcl3-Slug signaling*. FEBS Letters, 2015. **589**: p. 738–743.
78. Zeng, Q., Li, X., Bartlam, M., Wang, G., Pang, H., Rao, Z. , *Purification, crystallization and preliminary X-ray analysis of human pirin*. Acta Cryst., 2003. **D59**: p. 1496-1498.
79. Licciulli, S., Cambiaghi, V., Scafetta, G., Gruszka, AM. and Alcalay, M., *Pirin downregulation is a feature of AML and leads to impairment of terminal myeloid differentiation*. Leukemia, 2009. **24**: p. 429-437.
80. Miyazaki, I., Simizu, S., Okumura, H., Takagi, S., Osada, H. , *A small-molecule inhibitor shows that pirin regulates migration of melanoma cells*. Nature Chemical Biology, 2010. **6**: p. 667-673.
81. Licciulli, S., Luise, C., Zanardi, A., Giorgetti, L., Viale, G., Lanfranccone, L., Carbone, R., Alcalay, M. , *Pirin delocalization in melanoma progression identified by high content immuno-detection based approaches*. BMC Cell Biology, 2010. **11**: p. 5.
82. Xu, F., Mu, X., Zhao, J., *Effects of Curcumin on Invasion and Metastasis in the Human Cervical Cancer Cells Caski*. Chin. J. Cancer Res., 2009. **21**(2): p. 159-62.
83. Priyadarsini, K., *The Chemistry of Curcumin: From Extraction to Therapeutic Agent*. Molecules 2014. **19**: p. 20091-20112.
84. Kumar, P., Sulakhiya, K., Barua, C. C., Mundhe, N. , *TNF- α , IL-6 and IL-10 expressions, responsible for disparity in action of curcumin against cisplatin-induced nephrotoxicity in rats*. Mol Cell Biochem, 2017. **431**(1-2): p. 113-122.
85. Baghbani, F., Chegeni, M., Moztarzadeh, F., Hadian-Ghazvini, S., Raz, M., *Novel ultrasound-responsive chitosan/perfluorohexane nanodroplets for image-guided smart delivery of an anticancer agent: Curcumin*. Materials Science and Engineering, 2017. **C 74**: p. 186–193.
86. Cheng, A.-L., Hsu, C.-H., Lin J.-K., Hsu, M.-M., Ho, Y.-F., Shen, T.-S., Ko J.-Y., Lin, J.-T., Lin, B.-R., Wu, M.-S., Yu, H.-S., Jee, S.-H., Chen, G.-S., Chen, T.r-M., Chen, C.-A., Lai, M.-K., Pu, Y.-S., Pan, M.-H., Wang, Y.-J., Tsai, C.-C., Hsieh, C.-Y., *Phase I clinical trial of curcumin, a chemopreventive agent, in patients with high-risk or pre-malignant lesions*. Anticancer Research, 2001. **21**: p. 2895-2900.

87. Maheshwari, R.K., Singh, A. K., Gaddipati, J., Srimal, R. C., *Multiple biological activities of curcumin: A short review*. Life Sciences, 2006. **78**: p. 2081–2087.
88. Liu, Z., Liu, J., Zhao, L., Geng, H., Ma, J., Zhang, Z., Yu, D., Zhong, C. , *Curcumin reverses benzidine-induced epithelial-mesenchymal transition via suppression of ERK5/AP-1 in SV-40 immortalized human urothelial cells*. International Journal Of Oncology, 2016. **50**(4): p. 1321-1329.
89. Manson, M., *Inhibition of survival signalling by dietary polyphenols and indole-3-carbinol*. European Journal of Cancer, 2005. **41**: p. 1842-1853.
90. Singh, M., Singh N., *Molecular mechanism of curcumin induced cytotoxicity in human cervical carcinoma cells*. Mol Cell Biochem, 2009. **325**: p. 107–119.
91. Maher, D.M., Bell, M. C., O'Donnell, E. A., Gupta, B. K., Jaggi, M., Chauhan, S. C. , *Curcumin Suppresses Human Papillomavirus Oncoproteins, Restores p53, Rb, and PTPN13 Proteins and Inhibits Benzo[a]pyrene-Induced Upregulation of HPV E7*. Molecular Carcinogenesis, 2011. **50**: p. 47-57.
92. Park, W., Amin, R., Chen, Z., Shin, D. , *New perspectives of curcumin in cancer prevention*. Cancer Prev Res (Phila), 2014. **6**(5): p. 387-400.
93. Kumar, P., Sulakhiya, K., Barua, C. C., Mundhe, N. , *TNF- α , IL-6 and IL-10 expressions, responsible for disparity in action of curcumin against cisplatin-induced nephrotoxicity in rats*. Mol Cell Biochem, 2017. **431**(1-2): p. 113-122.
94. Wright, J.S., *Predicting the antioxidant activity of curcumin and curcuminoids*. Journal of Molecular Structure, 2002. **591**: p. 207–217.
95. Scharstuhl, A., Mutsaers, H.A.M., Pennings, S.W.C., Szarek, W.A., Russel, F.G.M., Wagener, F.A.D.T.G. , *Curcumin-induced fibroblast apoptosis and in vitro wound contraction are regulated by antioxidants and heme oxygenase: implications for scar formation*. J. Cell. Mol. Med., 2009. **13**(4): p. 712-725.
96. Chandrakant, P., Karunakaran, D., *Curcumin and Emodin Down-Regulate TGF- β Signaling Pathway in Human Cervical Cancer Cells*. Plos One, 2015. **10**(3): p. e0120045.
97. Roy, M.y.M., S., *Reversal of Resistance towards Cisplatin by Curcumin in Cervical Cancer Cells*. Asian Pac J Cancer Prev, 2014. **15**(3): p. 1403-1410.

98. Gallardo, M., Calaf G. M. , *Curcumin inhibits invasive capabilities through epithelial mesenchymal transition in breast cancer cell lines*. International Journal Of Oncology, 2016. **49**: p. 1019-1027.
99. Shao, Z.-M., Shen, Z.-Z., Liu, C.-H., Sartippour, M. R., Go, V. L., Heber, D., Nguyen, M. , *Curcumin Exerts Multiple Suppressive Effects On Human Breast Carcinoma Cells*. Int. J. Cancer, 2002. **98**: p. 234–240.
100. Calaf, G.M., Echiburú-Chau, C., Wen, G., Balajee, A. S., Roy, D., *Effect of curcumin on irradiated and estrogen-transformed human breast cell lines*. International Journal Of Oncology, 2011. **40**: p. 436-442.
101. Paulraj, F., Abas, F., Lajis, N., Othman, I., Hassan, S. y Naidu, R., *The Curcumin Analogue 1,5-Bis(2-hydroxyphenyl)-1,4-pentadiene-3-one Induces Apoptosis and Downregulates E6 and E7 Oncogene Expression in HPV16 and HPV18-Infected Cervical Cancer Cells*. Molecules, 2015. **20**: p. 11830-11860.
102. Walboomers, J., Jacobs, M., Manos, M., Bosch, F., Kummer, J., Shah, K., Snijders, F., Peto, J., Meijer, C. y Muñoz N., *Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide*. Journal of Pathology, 1999. **189**: p. 12-19.
103. Meissner, J., *Nucleotide sequences and further characterization of human papillomavirus DNA present in the CaSki, SiHa and HeLa cervical carcinoma cell lines*. Journal of General Virology, 1999. **80**: p. 1725-1733.
104. Uddin, S., Hussain, A., Manogaran, P., Al-Hussein, K., Plataniias, L., Gutierrez, M. y Bathia, K., *Curcumin suppresses growth and induces apoptosis in primary effusion lymphoma*. Oncogene, 2015. **24**: p. 7022–7030.
105. Zaman, M., Chauhan, N., Yallupu, M., Gara, R., Maher, D., Kumari, S., Sikander, M., Khan, S., Zafar, N., Jaggi, M., Chauhan, S., *Curcumin Nanof ormulation for Cervical Cancer Treatment*. Scientific Reports, 2015. **6**: p. 20051.
106. Divya, C., Pillai, M., *Antitumor Action of Curcumin in Human Papillomavirus Associated Cells Involves Downregulation of Viral Oncogenes, Prevention of NFkB and AP-1 Translocation, and Modulation of Apoptosis*. Molecular Carcinogenesis, 2006. **45**: p. 320-332.
107. Nieto, M., Huang, R., Jackson, R., Thiery, J.P. , *EMT:2016*. Cell., 2016. **166**: p. 21-45.

108. Sun, N., Zhang, Q., Xu, C., Zhao, Q., Ma, Y., Lu, X., Wang, L., Li, W., *Molecular regulation of ovarian cancer cell invasion*. *Tumor Biol.*, 2014.
109. Dahmke, I., Backes, C., Rudzitis-Auth, J., Laschke, M., Leidinger, P., Menger, M., Meese, E., Mahlknecht, U., *Curcumin Intake Affects miRNA Signature in Murine Melanoma with mmu-miR-205-5p Most Significantly Altered*. *Plos One*, 2013. **8**(12): p. e81122.
110. Saini, S., Arora, S., Majid, S., Shahryari, V., Chen, Y., Deng, G., Yamamura, S., Ueno, K., Dahiya, R., *Curcumin modulates micrRNA-203 mediated regulation of the Src-Akt axis in bladder cancer*. *Cancer Prev Res (Phila)*, 2011. **4**(10): p. 1698–1709.
111. Yang, L., Liang, H., Wang, Y., Gao, S., Yin, K., Liu, Z., Zheng, X., Lv, Y., Wang, L., Zhang, C., Xu, G., Zhang, W., Zou, X., *MiRNA-203 suppresses tumor cell proliferation, migration and invasion by targeting Slug in gastric cancer*. *Protein Cell*, 2016. **7**(5): p. 383-387.