



Universidad de Chile
Facultad de Ciencias
Escuela de pregrado



Universidad de Tarapacá
Instituto de Alta Investigación

“EFECTO DE LA CURCUMINA SOBRE LA ACTIVIDAD DEL RECEPTOR DE ESTRÓGENO ALFA Y LOS PROCESOS CELULARES ASOCIADOS A LA PROGRESIÓN DEL CÁNCER DE MAMA”

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los
requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular

LORENA MARIANA PALACIOS NAVARRO

Directora del Seminario de Título:

Dra. Gloria Monserrat Calaf Sarrat

Patrocinante:

Dra. María Rosa Bono

Junio 2022

Santiago - Chile



INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Chile que el Seminario de Título, presentado por el o (la) candidato (a):

LORENA MARIANA PALACIOS NAVARRO

“EFECTO DE LA CURCUMINA SOBRE LA ACTIVIDAD DEL RECEPTOR DE ESTRÓGENO ALFA Y LOS PROCESOS CELULARES ASOCIADOS A LA PROGRESIÓN DEL CÁNCER DE MAMA”

Ha sido aprobado por la Comisión de Evaluación, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular

Dra. Gloria Calaf Sarrat.

Directora Seminario de Título

Dra. María Rosa Bono Merino.

Profesora Patrocinante

COMISIÓN REVISORA Y EVALUADORA

Dra. Daniela Sauma Mahaluf.

Presidenta

Dr. Julio Tapia Pineda

Evaluador

Santiago de Chile, Octubre 2022

BIOGRAFÍA



Nací el 19 de octubre de 1998 en la ciudad de la eterna primavera, Arica. Mi primer paso por la educación fue cuando tenía 5 años, pues ingrese a kínder de la escuela Republica de Israel(D-4), Arica. Odiaba que cuando mi mamá o mi papá me iban a buscar a la hora de salida y me llamaran por mi primer nombre “Lorena”, pues pensaba que le estaba robando el nombre a mi mamá, ya que ella también se llama Lorena. En fin, no me gusta robar nombres. De pequeña he sido muy curiosa, no había día que no le preguntase a mi mama o mi papa el “por qué” de cualquier cosa que me llamase la atención; como insistía tanto y no siempre sentía satisfacción por las respuestas que me daban, me ponía a llorar (hay fotos como evidencia). Por esas y muchas más razones me gusta lo que estudié en la universidad. Mi enseñanza media fue en el liceo A-5 hasta salir de 4to medio. Ingresé a la universidad de Chile el 2017 a la carrera de Ingeniería en Biotecnología molecular, en Santiago. Fue difícil salir de esa zona de confort llamada independencia, sin embargo, el tiempo y el apoyo de mis amigos en la capital me sirvieron mucho para soportar y superar los obstáculos. Hoy en día, estoy trabajando en el Instituto de Alta Investigación de la Universidad de Tarapacá-Arica.

DEDICATORIA

*A todos y todas las personas que me han apoyado desde siempre, en los mejores y peores momentos de mi vida, pero se lo dedico en especial a mi madre, que en sus últimos días me decía **que iba a lograrlo**, palabras que me reconfortaron en ese momento, me reconfortan hoy y me reconformarán de aquí en adelante.*

También hago una especial dedicación a mi papá, mi héroe, mi mejor amigo, el patner que te apoya en todo, quien me ayudó a forjar mi carácter y el sentido de la responsabilidad y compromiso.

También a mi abuela Nelly, que siempre me regalonea cuando estoy triste. Hoy en día, es el reflejo de mi madre ante mis ojos. Sé eterna gueli

A mi hermano, que, aunque sea un desordenado lo quiero igual

A mi primo, que, aunque crea que estoy loca, pienso mucho en él.

A mi tía Ana y segunda madre, la quiero tía.

AGRADECIMIENTOS

A todos mis cercanos, mi familia, mi directora de seminario de título, a mis compañeros de laboratorio. Gracias por la paciencia y fe que tienen puesta en mí.

Agradezco también al financiamiento entregado por FONDECYT 1200656.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

PORTADA	i
BIOGRAFÍA	ii
DEDICATORIA	iii
AGRADECIMIENTOS	iv
ÍNDICE DE CONTENIDOS	vi
ÍNDICE DE TABLAS	vii
ÍNDICE DE FIGURAS	viii
LISTA DE ABREVIATURAS	ix
INTRODUCCION	1
Hipótesis	11
Objetivo general	12
Objetivos específicos	12
MATERIALES Y METODOS	13
Línea y cultivo celular	13
Ensayo de citotoxicidad celular	13
Ensayo de proliferación celular	13
Ensayo de crecimiento independiente de anclaje o soft agar	14
Western blot	15
PCR en tiempo real (RT-qPCR)	16
Inmunocitoquímica(ICC)	18
Análisis estadístico	18
RESULTADOS	19
DISCUSION	31
CONCLUSIONES	38

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Secuencia y temperatura de hibridación de los partidores usados en el RT-qPCR	17
---	----

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Regiones estructurales del ER α y ER β .	2
Figura 2: Representación esquemática de las vías de señalización del ER.	5
Figura 3: Mecanismos de acción de la Terapia Endocrina.	6
Figura 4: Curcumina.	9
Figura 5: Efecto dosis-respuesta de curcumina sobre la viabilidad celular.	19
Figura 6: Efecto de 17 β -estradiol sobre el crecimiento celular.	20
Figura 7: Efecto de curcumina sola y en presencia de 17 β -estradiol sobre los niveles proteicos de ER α .	21
Figura 8: Efecto de curcumina sola y en presencia de 17 β -estradiol sobre los niveles de expresión del gen ESR1.	22
Figura 9: Efecto de curcumina sola y en presencia de 17 β -estradiol sobre los niveles de mRNA de CTSD, EGFR, CCND1 y BCL2	23
Figura 10: Efecto de curcumina sola y en presencia de 17 β -estradiol sobre la viabilidad de células MCF-7	24
Figura 11: Efecto de curcumina sola y en presencia de 17 β -estradiol sobre el crecimiento libre de anclaje en células MCF-7	25
Figura 12: Efecto de curcumina sola y en presencia de 17 β -estradiol en la proliferación celular.	26
Figura 13: Efecto de curcumina sola y en presencia de 17 β -estradiol en la supervivencia celular	28
Figura 14: Efecto de curcumina sola y en presencia de 17 β -estradiol sobre la transición epitelial-mesenquimal.	30

LISTA DE ABREVIATURAS

Als: *Aromatase Inhibitors*, por sus siglas en inglés
BSA: Albumina de suero bovino
CUR: curcumina
CUR+E2: curcumina + 17 β -estradiol
DMEM: Medio de cultivo Eagle Modificado de Dulbecco
DNA: Ácido desoxirribonucleico
DTT: Ditioneitol
EDTA: Acido etilen-di-amino-tetra-acético
ER: Receptor de estrógeno
E2: 17 β -estradiol
FBS: Suero fetal bovino
HEPES: Acido 4-(2-hidroxietil) piperazin-1-iletanosulfónico
LS: Low salt
mRNA: ARN mensajero
PBS: Phosphate-Buffered Saline
PCR: Reacción en cadena de la polimerasa
PSA: Persulfato de amonio
PVDF: Fluoruro de polivinilideno
RIPA: Radio Inmuno Precipitation Assay Buffer
RNA: Ácido ribonucleico
RT-qPCR: PCR en tiempo real con transcriptasa inversa
SDS: Dodecil sulfato de sodio
SERMs: *Selective Estrogen Receptor Modulators*, por sus siglas en inglés
SERDs: *Selective Estrogen Receptor Degradars*, por sus siglas en inglés
TAE: Tris, Acetato de EDTA
TEMED: N, N, N', N'-terametil-etileno-diamina
TBS: Buffer Tris Salino con Tween
Tween 20: Polisorbato 20

RESUMEN

Se estima que el 80% de los cánceres de mama son positivos para receptores de estrógeno (ER+). Esto quiere decir que la mayoría de las células tumorales del cáncer de mama expresan el Receptor de Estrógeno (ER). El cáncer de mama ER+ se ve altamente potenciado por los niveles plasmáticos de estrógenos, pues estas hormonas se unen al ER, lo activan y desencadenan una serie de cascadas de señalización asociadas al crecimiento tumoral. En la terapia endocrina se encuentran los mejores tratamientos dirigidos contra la actividad del ER y los estrógenos, pues al ser un cáncer dependiente de hormonas, apuntar hacia estos principales agentes parece ser la mejor estrategia para combatir la enfermedad. Pese a las alternativas de tratamiento, no todas las mujeres responden de la misma manera a cualquier terapia endocrina, incluso si llegasen a responder bien los primeros años, la resistencia a cualquier terapia aparecerá en los siguientes años. Se ha visto que esta resistencia a la terapia endocrina está fuertemente asociada con la reactivación del Receptor de Estrógeno Alfa (ER α). Frente a este problema de la resistencia a la terapia endocrina, es que el presente trabajo demuestra que un compuesto natural, como la curcumina, disminuye los niveles de expresión del ER α a través de mecanismos dependientes de la transcripción génica, comportándose así como un potencial Degradador Selectivo del ER α o SERD (por sus siglas en inglés) y a la vez como un potencial tratamiento adyuvante en el cáncer de mama ER+ que supere o retarde la resistencia a la terapia endocrina. Además, se demostró que la curcumina disminuye el crecimiento celular a través de la inhibición de la proliferación celular, y se sugiere que también podría estar reprimiendo la supervivencia celular y regulando la transición epitelial-mesenquimal; ambos procesos característicos de la progresión del cáncer de mama

ABSTRACT

It is estimated that 80% of breast cancers are estrogen receptor positive (ER+). This means that the majority of breast cancer tumor cells express Estrogen Receptor (ER). ER+ breast cancer is highly potentiated by plasma estrogen levels, as these hormones bind to the ER, activate it and trigger a series of signaling cascades associated with tumor growth. Endocrine therapy offers the best treatments directed against ER activity and estrogens, since being a hormone-dependent cancer, targeting these main agents seems to be the best strategy to combat the disease. Despite the treatment alternatives, not all women respond in the same way to any endocrine therapy, even if they respond well in the first years, resistance to any therapy will appear in the following years. This resistance to endocrine therapy has been found to be strongly associated with Estrogen Receptor Alpha (ER α) reactivation. Faced with this problem of resistance to endocrine therapy, the present work demonstrates that a natural compound, such as curcumin, decreases ER α expression levels through gene transcription-dependent mechanisms, thus behaving as a potential Selective ER α Degradator or SERD and at the same time as a potential adjuvant treatment in ER+ breast cancer that overcomes or delays resistance to endocrine therapy. In addition, curcumin was shown to decrease cell growth through inhibition of cell proliferation, and it is suggested that it may also be suppressing cell survival and regulating epithelial-mesenchymal transition; both processes characteristic of breast cancer progression.

INTRODUCCIÓN

Cáncer de mama

El cáncer de mama es el tipo de cáncer más frecuente y con mayor tasa de mortalidad en mujeres de todo el mundo (Siegel y col., 2020). Según la OMS, esta enfermedad alcanzó cerca de 2,3 millones de casos el 2020. Alrededor del 80% de los cánceres de mama diagnosticados en mujeres son positivos para receptores de estrógeno (ER+), es decir, la mayoría de las células tumorales del cáncer de mama expresan el Receptor de Estrógeno (DeSantis y col., 2019). Estos receptores comprenden un blanco de estudio muy importante, pues a través de la modulación de su actividad se han podido desarrollar fármacos dirigidos contra el cáncer de mama ER+. Si bien la incidencia de cáncer de mama ER+ era alta hace algunos años atrás, el desarrollo de terapias con estos fármacos, que se han implementado exitosamente hasta la fecha (Aggelis & Johnston, 2019), han permitido que la mortalidad por cáncer de mama se mantenga proporcionalmente a la baja.

Son muchos los factores de riesgo que conducen al desarrollo de cáncer de mama ER+. Aquel más importante está relacionado con los niveles plasmáticos de estrógenos, puesto que éste está involucrado en la activación del receptor de estrógeno al ser su ligando endógeno. El estrógeno es una hormona sexual esteroidea de tipo femenina y es producida por los ovarios, la placenta durante el embarazo y por las glándulas adrenales (Delgado & Lopez, 2021). El 17β -estradiol es uno de los tipos de estrógenos más importantes de la mujer, pues ejerce múltiples efectos fisiológicos pleiotrópicos como el control del sistema reproductivo en las mujeres y el desarrollo de caracteres sexuales primarios y secundarios en hombres y en mujeres. El 17β -estradiol también

tiene efectos beneficiosos en los seres humanos, pues protegen contra la osteoporosis, las enfermedades cardiovasculares y la neurodegeneración. Sin embargo, como se mencionaba anteriormente, su aumento constituye uno de los más importantes factores de riesgo para desarrollar y/o potenciar el cáncer de mama ER+.

Receptor de estrógeno (ER):

Se han identificado tres tipos de ERs: GPR30, ER α y ER β . El GPR30 se distingue de los dos últimos en que es una variante transmembranal del ER α , el cual actúa de manera independiente a como lo hacen ER α y ER β (Kuiper y col., 1996). ER α y ER β se agrupan en una superfamilia de receptores nucleares, los cuales son factores de transcripción que regulan la expresión génica de manera dependiente de su unión a ligando, y en respuesta específica a señales fisiológicas y patológicas (Couse & Korach, 1999). Ambos receptores están conformados por 5 dominios y/o regiones estructurales (**Figura 1**):

1. Dominio A/B: posee la función de transactivación independiente de ligando (AF-1) y está ubicado en el extremo N-terminal.
2. Dominio C o de unión al ADN: compuesto por dos dedos de zinc
3. Dominio D: contiene la señal de localización nuclear
4. Dominio E: contiene el dominio de unión a ligando y la función de transactivación dependiente de ligando (AF-2)
5. Dominio F: región variable situada en el extremo C-terminal, cuya función específica no se ha aclarado del todo (Tsai and O'Malley, 1994)

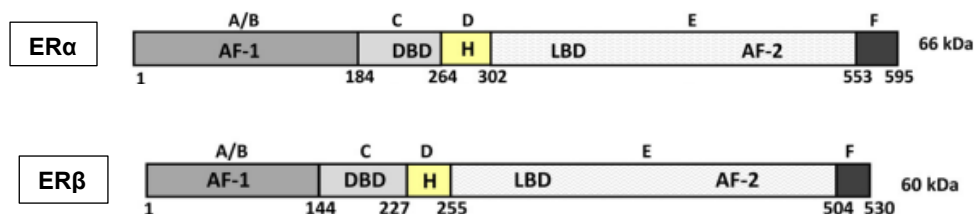


Figura 1: Dominios estructurales del ER α (panel superior) y ER β (panel inferior). El ER α está compuesto por 595 aminoácidos, y ER β por 530. AF-1, función de transactivación independiente de ligando; DBD, dominio de unión al ADN (por sus siglas en inglés, *DNA binding domain*); H, región bisagra o *hinge*; LBD, dominio de unión a ligando (por sus siglas en inglés, *ligand binding domain*); AF-2, función de transactivación dependiente de ligando. Adaptado de Le Romancer y col., 2011.

La expresión de estos receptores varía según el tipo de tejido: ER α se expresa predominantemente en órganos reproductivos como útero, mama y ovario (Nilson y col., 2001), mientras que ER β se expresa mayoritariamente en hueso, endotelio, pulmones, tracto urogenital, ovario y próstata (Palmieri y col., 2002).

Vías de señalización del ER

Actualmente se conocen cuatro vías de señalización del ER (Le Romancer y col., 2011), las cuales convergen en la supervivencia y proliferación celular en el cáncer de mama ER α -positivo (Hall y col., 2001). La primera se conoce como **vía genómica clásica**, en donde 17 β -estradiol se une al ER en el dominio de unión a ligando (o LBD en inglés). Este evento induce cambios conformacionales en el receptor, los cuales permiten que el ER se transloque al núcleo. Una vez en el núcleo, el ER interactúa con secuencias específicas del ADN ubicadas en las regiones reguladoras, denominadas “elementos de respuesta a estrógeno” o EREs (por sus siglas en inglés “estrogen response elements”). Esta interacción permite que se recluten coactivadores que regulan la transcripción de

genes blanco o “genes regulados directamente por el ER”. Toda la regulación transcripcional depende de la modulación de las funciones AF-1 y AF-2, pues en estas regiones del ER se unen los correguladores o proteínas correguladoras. Aquellas proteínas correguladoras que activan la transcripción génica se denominan coactivadores, mientras que aquellas que la reprimen se denominan correpresores. La segunda vía se conoce como la **genómica no clásica**, en donde el ER en lugar de interactuar directamente con las regiones EREs de genes blanco, lo hace de manera indirecta, por medio de otros factores de transcripción como AP-1. En este escenario, el ER utiliza los sitios de unión a ADN de AP-1 para interactuar con las regiones reguladoras de los genes blanco. A dichos genes blanco de esta vía de señalización se les dice que son regulados indirectamente por el ER. La tercera vía se conoce como la **independiente de ligando**, y como su nombre lo dice, la activación de este receptor se da en ausencia de 17β -estradiol, pues existen quinasas de otras redes de señalización (como las de los factores de crecimiento) que activan al ER por medio de fosforilaciones. La cuarta vía se conoce como la **vía no genómica**, la cual implica la activación de otras cascadas de transducción de señales. En esta vía solo participa la variante transmembranal del receptor de estrógeno alfa, es decir, GPR30. (**Figura 2**).

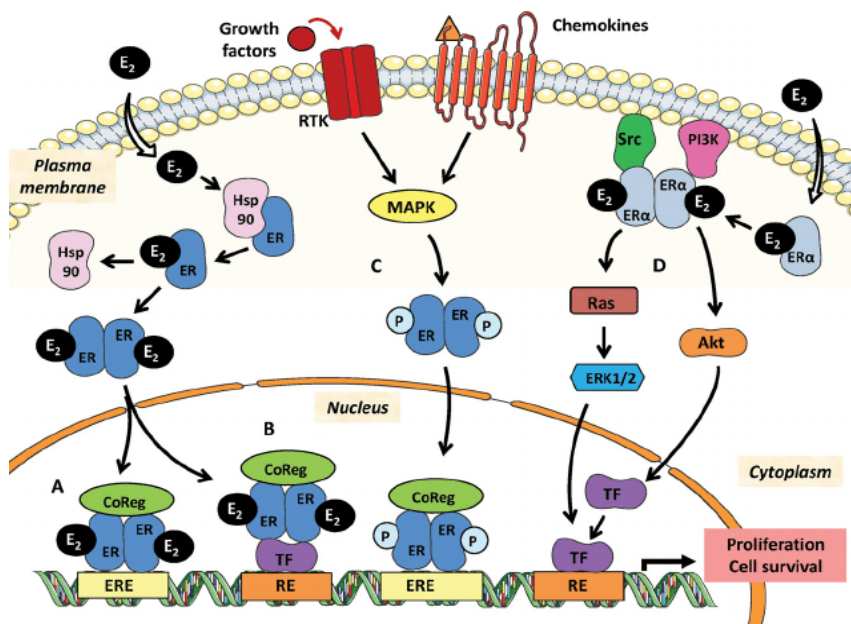


Figura 2: Representación esquemática de las vías de señalización del ER. La vía A se denomina Vía genómica clásica; La vía B, Vía genómica no clásica; La vía C, Vía independiente del ligando; La vía D, Vía no genómica. Todas estas vías convergen en la proliferación y supervivencia celular. ER: receptor de estrógeno alfa (ER α) o beta (ER β); ER α : variante transmembranaral del ER α o GPR30; E₂: 17 β -estradiol; ERE: elemento de respuesta a estrógeno; RE: elementos de respuesta a otros factores de transcripción; P: fosforilación; RTK: receptor tirosina quinasa; CoReg: correguladores; TF: factor de transcripción; HSP90: proteína de choque térmico 90. La figura fue sacada de Le Romancer y col., 2011.

Terapia Endocrina

Se han desarrollado terapias para tratar el cáncer de mama ER α -positivo, las cuales consisten en la administración de medicamentos que impiden que las hormonas, como el 17 β -estradiol, se unan a sus receptores (en este caso, ER α) y de esta forma no se potencie el crecimiento del tumor y/o el cáncer. A estos tratamientos dirigidos específicamente contra la actividad del ER α se les conoce como terapia endocrina (Sanchez y col., 2018). La terapia endocrina por lo general se administra al menos 5 a 10 años y se han convertido en los principales tratamientos adyuvantes para tratar el cáncer de mama ER α -positivo (Hanker y col., 2020). Sin embargo, a veces estas terapias se inician antes de la cirugía del tumor, como terapia neoadyuvante.

Actualmente se usan tres tipos de terapia endocrina. De estas tres, dos utilizan medicamentos que bloquean al ER α , y la restante utiliza medicamentos que reducen los niveles plasmáticos de estrógeno. Los que bloquean al ER α corresponden a los Moduladores Selectivos del ER α o **SERMs** (*Selective Estrogen Receptor Modulators*) y a los Degradadores Selectivos del ER α o **SERDs** (*Selective Estrogen Receptor Degraders*). Los que reducen los niveles de estrógeno corresponden a los Inhibidores de Aromatasa o **AIs** (Aromatase Inhibitors) (**Figura 3**).

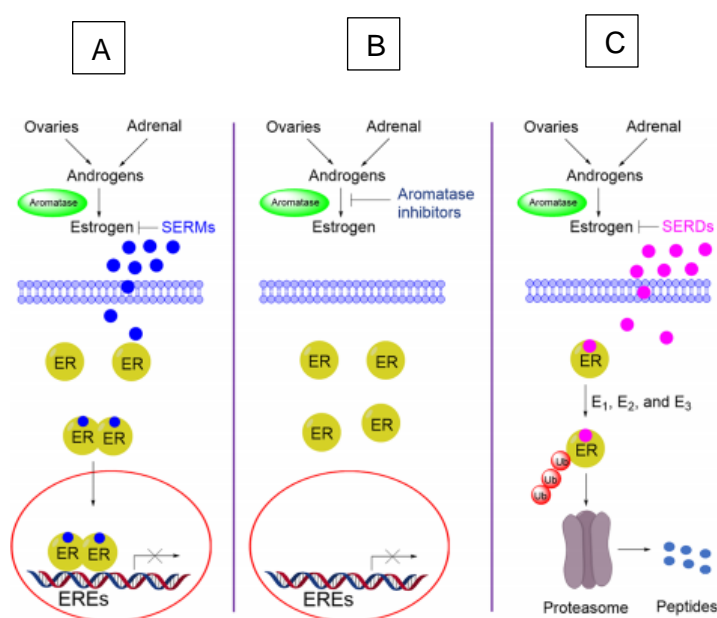


Figura 3: Mecanismos de acción de la Terapia Endocrina. A) Los SERMs (*Selective Estrogen Receptor Modulators*) compiten con 17 β -estradiol y se unen a ER α para reprimir/antagonizar la expresión génica. B) Los inhibidores de aromatasa o AIs inhiben la biosíntesis de 17 β -estradiol. C) Los SERDs (*Selective Estrogen Receptor Degraders*) compiten con el 17 β -estradiol y se une al ER α para iniciar su degradación. SERMs: moduladores selectivos de los receptores estrogénicos; SERDs, degradadores selectivos de los receptores estrogénicos; ERE, elementos de respuesta a estrógeno. Figura rescatada de Yunlong y Wukun, 2020.

El tamoxifeno es un tipo de SERM que se ha utilizado ampliamente para tratar todos los estadios de cáncer de mama ER α -positivo. Este fármaco compite con el 17 β -estradiol y modula la actividad del ER α al cambiar los correguladores de unión e inhibir la actividad

de los factores de transcripción dependientes del ER α . Esto inhibe las actividades transcripcionales en el tejido mamario. (**Figura 3A**).

EL fulvestrant es un tipo de SERD que está dirigido a mujeres posmenopáusicas con cáncer de mama ER α -positivo en estadios avanzados(metástasis) que dejan de responder a la terapia con SERMs, aunque hay casos que se recomienda usar como tratamiento de primera línea. Este fármaco se une al ER α con una afinidad 100 veces mayor que el tamoxifeno (Dowsett y col., 2005). Este SERD al unirse a ER α produce una reducción de la capacidad del ER α para trasladarse al núcleo, lo que inhibe la transcripción de genes regulados por este receptor, como por ejemplo el gen que codifica para Catepsina D (CTSD), el Receptor de crecimiento epidérmico (EGFR), Ciclina D1 (CCND1) y Bcl-2 (BCL2). El complejo SERD-ER α sufre degradación como consecuencia de la movilidad deteriorada, lo que provoca la regulación a la baja y degradación del ER α por el sistema ubiquitina-proteosoma. La degradación del ER α lleva a la suspensión completa de todas sus vías de señalización (**Figura 3C**), puesto que al degradarse el ER α , toda la actividad transcripcional rio abajo se suspende. De esta manera, fulvestrant inhibe la transcripción de genes regulados tanto directa como indirectamente por ER α . El Anastrozol y el Exemestano son Inhibidores de la Aromatasa. Estos últimos actúan bloqueando la enzima responsable de la producción de 17 β -estradiol en los distintos tejidos. De esta manera, su uso limita la activación del ER α al impedir que la aromatasa sintetice 17 β -estradiol (**Figura 3B**).

Pese a que inicialmente la mayoría de los pacientes responden favorablemente a la terapia endocrina basada en SERMs y Als, estos eventualmente adquieren resistencia a los fármacos y dejan de responder al tratamiento con estos. Estudios previos sugieren que la reactivación del ER α independiente del 17 β -estradiol (vía de señalización

independiente de ligando) es el principal mecanismo de resistencia a la terapia endocrina basada en SERMS y Als (Miller y col., 2011). Es aquí donde los SERDs toman valor frente al cáncer de mama ER α -positivo, puesto que su estrategia basada en la degradación del receptor promete superar la resistencia casi inevitable a la terapia endocrina.

Curcumina

En la búsqueda de una alternativa más natural para tratar diferentes enfermedades, como el cáncer, se ha visto el gran potencial de las plantas medicinales (Hoareau & DaSilva, 1999). Dentro de estas plantas tenemos a la *Cúrcuma longa*, originaria de la India. De esta planta se obtiene la cúrcuma, especia comúnmente utilizada en la preparación de currys en muchos países asiáticos por su color y sabor. La medicina ayurvédica ha utilizado la cúrcuma para diversos fines médicos, como la curación de heridas en la piel, problemas hepáticos y trastornos dermatológicos (Hussain y col, 2017).

Los compuestos bioactivos polifenólicos identificados en la cúrcuma se denominan curcuminoides (Amalraj y col., 2017), y el más abundante de estos es la curcumina, la cual ha sido blanco de estudio durante las últimas décadas debido a su potencial terapéutico como agente antiinflamatorio, anti proliferativo, anti carcinogénico y quimiopreventivo (Prasad & Aggarwal, 2011). Se ha visto que por su complejidad molecular (**Figura 4**), la curcumina tiene la capacidad de modular múltiples vías de señalización, como la supervivencia celular, la supresión de tumores, la vía de las caspasas en la apoptosis y las vías de los receptores de muerte (Alves y col., 2019). Además, estudios recientes han asociado el potencial de este compuesto para modular múltiples vías de señalización en el cáncer de mama como lo es la vía PI3K/Akt, MAPK

y NF- κ B (Choi y col. 2008). La reactivación del ER α independiente de 17 β -estradiol, principal mecanismo de resistencia a la terapia endocrina, puede ocurrir a través de la interferencia del ER α con estas vías de señalización oncogénica. Es por esto último que resulta interesante analizar el efecto que tiene curcumina sobre la actividad del ER α .

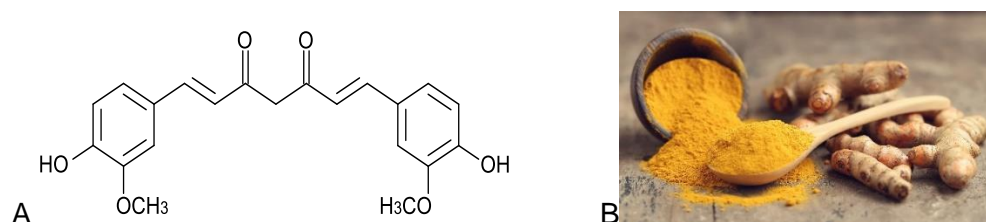


Figura 4: Curcumina. A: Estructura química de la Curcumina. B: rizoma de *Curcuma longa* y de donde se obtiene la cúrcuma.

Estudios realizados por la Dra. Calaf y colaboradores en líneas celulares MCF-7 positivas para el ER α , demuestran el potencial efecto de curcumina sobre la transición epitelial-mesenquimal, proceso biológico fuertemente asociado a la progresión maligna en el cáncer de mama (Gallardo & Calaf, 2016). En este proceso, las células que normalmente interactúan con su membrana basal comienzan a perder su organización y las uniones intercelulares. La expresión génica y una serie de otros eventos bioquímicos se ven afectados también, lo que finalmente se traduce en un fenotipo mesenquimal, en donde las células adquieren una capacidad migratoria e invasiva importante, y hasta una resistencia a la apoptosis. Todo esto lleva a la pérdida del fenotipo epitelial. Algunos de los protagonistas moleculares que regulan este proceso son las cateninas, como por ejemplo la β -catenina. Esta proteína juega un papel importante en la señalización y adhesión celular, pues es secuestrada por la E-cadherina

(cadherina esencial para la integridad y mantención del tejido epitelial) en las uniones adherentes y estrechas para mantener el fenotipo epitelial. Además de estas proteínas que participan de la regulación de la transición epitelial-mesenquimal, tenemos aquellas que potencian este proceso, como por ejemplo Vimentina, que es una proteína estructural codificada por el gen *Vimentin*. A nivel celular, esta proteína participa en la migración, diferenciación, proliferación, adhesión e invasión celular, lo que está estrechamente relacionada con la aparición y el desarrollo de tumores.

La apoptosis, o muerte celular programada, es el proceso celular que ocurre en respuesta a estímulos ambientales y una estrategia apropiada para la prevención y tratamiento del cáncer de mama ER α -positivo (Hengartner, 2000). En el 2016, Quispe y Calaf demostraron que en líneas celulares MCF-7 tratadas con curcumina disminuían los niveles de proteína Bcl-2 (antiapoptótica) y aumentaban los de Bax (proapoptótica). Ambas son importantes miembros de la familia Bcl-2 que juegan un fundamental rol en la determinación de la muerte o supervivencia celular (Miyashita y col., 1994). El equilibrio entre los niveles de proteína Bax y Bcl-2 es importante para regular la apoptosis.

Considerando su capacidad de modular las vías de señalización oncogénica y sus múltiples efectos supresivos sobre las líneas celulares de mama malignas ER α -positiva (Shao y col., 2002) es que resulta importante conocer el efecto de la curcumina sobre la actividad del ER α , pues este receptor no sólo está implicado en el crecimiento de tumores en mujeres con cáncer de mama ER α -positivo, sino que también se ha visto su actividad en la mayoría de las pacientes con cáncer de mama ER α -positivo resistentes a la terapia endocrina (Miller et al., 2011).

En el presente trabajo se evaluó el efecto que tiene curcumina sobre la actividad del ER α . Para esto se utilizó una línea celular de mama maligna y positiva para el ER α , conocida como MCF-7. Se caracteriza por ser una de las pocas líneas celulares que expresa niveles considerables del ER α , lo que la transforma en un valioso sistema modelo para el estudio del cáncer de mama ER+. El efecto de este compuesto se evaluó en presencia de 17 β -estradiol, para así mantener la actividad del receptor “ON” y de esta manera poder ver el efecto del compuesto sobre su normal actividad, como lo es en el cáncer de mama ER+ y en el que se adquiere resistencia a la terapia endocrina. Además, se evaluó el efecto de este compuesto sobre la proliferación celular, la supervivencia celular y la transición epitelial-mesenquimal. Para evaluar el efecto de este compuesto sobre la proliferación celular se midieron los niveles proteicos de un marcador molecular ampliamente descrito para dicho proceso, el antígeno nuclear de células en proliferación o PCNA (proliferating cell nuclear antigen, por sus siglas en inglés). Este marcador es una proteína nuclear que actúa como cofactor de la ADN polimerasa II y participa en la replicación y reparación del ADN. Para evaluar el efecto de este compuesto sobre la supervivencia celular se midieron los niveles proteicos de Bax y Bcl-2, mientras que para la transición epitelial-mesenquimal se medirán los niveles proteicos de β -catenina y Vimentina.

Hipótesis

- La curcumina en presencia de 17 β -estradiol altera la actividad del receptor estrogénico alfa (ER α), la proliferación celular, la supervivencia y la transición epitelial-mesenquimal, en células MCF-7 *in vitro*.

Objetivo general:

- Analizar el efecto de la curcumina en presencia de 17β -estradiol sobre los niveles de proteína tanto del receptor estrogénico alfa ($ER\alpha$) como de marcadores moleculares asociados a proliferación, supervivencia y transición epitelial-mesenquimal, en células MCF-7.

Objetivos específicos:

- Determinar toxicidad y concentración de trabajo de curcumina y de 17β -estradiol en células MCF-7.
- Determinar el efecto de curcumina sola y en presencia de 17β -estradiol sobre la expresión del $ER\alpha$ y los genes que regula tanto directa (CTSD) como indirectamente (EGFR, CCND1 y BCL2).
- Determinar el efecto de curcumina sola y en presencia de 17β -estradiol sobre la viabilidad celular y la capacidad de formación de colonias de las células MCF-7
- Determinar el efecto de curcumina sola y en presencia de 17β -estradiol sobre los niveles proteicos de aquellos marcadores moleculares asociados a la proliferación celular (PCNA), a la supervivencia celular (Bax y Bcl-2), y a la transición epitelial-mesenquimal (Vimentina y β -catenina).

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Línea y cultivo celular.

La línea celular de mama malignas MCF-7 (obtenidas de la American Type Collection, EE.UU.) se mantuvo en medio Dulbecco (DMEM; Gibco, EE.UU.) suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 5% (Hyclone, Fremont, CA, EE. UU), penicilina (100 U/ml), estreptomycin (100 µg/ml), 0,1 mM de aminoácidos no esenciales, 0,2 mM de glutamina y 1 mM de piruvato, y se incubó en una atmósfera humidificada con 5% de CO_2 a 37 °C. Para el subcultivo, las células fueron lavadas con tampón fosfato salino (PBS) y posteriormente incubadas con tripsina durante 5 min. Para inactivar la tripsina se utilizó medio DMEM suplementado con 5% SFB. Las células se analizaron periódicamente para detectar contaminación por micoplasma.

2. Ensayo de citotoxicidad celular.

La línea celular de mama maligna MCF-7 se cultivó en placas de 96 pocillos a una densidad de 5×10^3 células por pocillo. Después de 24 h, las células se dejaron incubando con diferentes concentraciones de curcumina (CUR) y 17β -estradiol (E2) por 48 h. Luego de las 48 h, se incubaron con reactivo MTT (dilución 1:10 en medio DMEM) durante 4 h a 37°C. Después de la incubación, las células se trataron con disolvente MTT (DMSO) durante 30 minutos a 37°C. La formación del producto formazán se midió espectrofotométricamente a 590 nm usando un lector Multi-Modal synergy HTX (Biotek, Vermont, EE. UU). Así, la absorbancia es proporcional al número de células vivas en cada pocillo.

3. Ensayo de proliferación celular.

La línea celular de mama maligna MCF-7 se cultivó en placas de 96 pocillos a una densidad de 5×10^3 células por pocillo. Después de 24 h, las células se trataron con

DMSO, E2(1×10^{-7} M), CUR (25 μ M) y CUR+E2, y se incubaron a 48 h. La viabilidad se midió de dos formas: con reactivo MTT y con tinción cristal violeta.

3.1. Viabilidad celular con reactivo MTT.

Luego de las 48 h de tratamiento, se incubaron con reactivo MTT (dilución 1:10 en medio DMEM) durante 4 h a 37°C. Después de la incubación, las células se trataron con disolvente MTT(DMSO) durante 30 minutos a 37°C. La formación del producto formazán se midió espectrofotométricamente a 590 nm usando un lector Multi-Modal synergy HTX (Biotek, Vermont, EE. UU).

3.2. Viabilidad celular con tinción cristal violeta.

Luego de las 48 h de tratamiento, se incubaron con solución de tinción de cristal violeta al 0,5% durante 20 min a temperatura ambiente en un agitador orbital. Se lavaron 4 veces cada pocillo de la placa con agua destilada y se dejó secar al aire sin su tapa por 2 h a temperatura ambiente. Después del secado, las células se trataron con metanol durante 20 min a temperatura ambiente sobre un agitador orbital. Se midió la absorbancia en cada pocillo con un lector Multi-Modal synergy HTX (Biotek, Vermont, EE. UU).

4. Ensayo de crecimiento independiente de anclaje o soft agar.

Para estudiar la pérdida de anoikis, 1×10^4 células fueron recolectadas y resuspendidas en Bacto-agar (BD, California, Estados Unidos) 0,33% disuelto en una mezcla de nutrientes compuesto por DMEM 2X, SFB 10 % y DMEM 1X, suplementado con los correspondientes tratamientos de DMSO, CUR, E2 y CUR+E2. La mezcla de células en agar al 0,33% fue sembrada sobre una base de Bacto-agar 0,5% siendo mantenidas a 37°C y suministrando medio completo de crecimiento con los distintos tratamientos dos veces por semana.

5. Western Blot.

La línea celular de mama malignas MCF-7 se cultivó en placas de 10 cm. Se dejaron crecer por 2-3 días hasta alcanzar un 80% de confluencia. Luego de alcanzar esta confluencia, se trataron con DMSO (control), E2(1×10^{-7} M), CUR (25 μ M) y CUR+E2 y se dejaron incubando por 48 h. Para determinar la expresión de ER α , PCNA, Bax, Bcl-2, β -catenina y Vimentina, las células MCF-7 fueron lisadas con tampón RIPA 1X, suplementado con Inhibidor de proteasa y fosfatasa 1X (Roche Diagnostics, Basilea, Suiza). Posteriormente, la concentración de proteína se determinó usando el reactivo Pierce BCA (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EE. UU) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. De estos, 20 μ g de proteína fueron denaturadas con tampón de carga 1X (National Diagnostics, Atlanta, EE.UU) a 95°C durante 5 min para luego ser cargadas en un gel de poliacrilamida suplementado con dodecilsulfato sódico al 1% (SDS-PAGE). El proceso de electroforesis se realizó a 100 Volts durante dos horas con una fuente de poder PowerPac (Bio-Rad, California, EE. UU). Posteriormente, las proteínas del gel fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa por medio del dispositivo Trans-Blot[®] SD *semi-dry* transfer a 20 volts durante 50 min de acuerdo con las recomendaciones del fabricante (Bio-Rad, California, EE. UU). La membrana se sometió después a bloqueo con una disolución de 5% de albúmina de suero bovino (BSA) y 0,1% de Tween 20 en tampón tris Salino (TBS-T20) durante 2 h a temperatura ambiente, para luego ser lavada tres veces con TBS-T20 durante 10 min cada lavado. La incubación con anticuerpo primario anti-ER α (D6R2W), anti-PCNA (sc-56), anti-Bax(sc-526), anti-Bcl-2(sc-492), anti- β -catenina(sc-1496), y anti-Vimentina(sc-7557) se realizó con una dilución de 1:1000 en TBS-T20 por toda la noche. Una vez realizada la incubación con anticuerpo primario, la membrana se lavó cuatro veces con TBS-T20 durante 10 min cada lavado y luego se incubó con anticuerpo secundario (BD

Pharmingen, San Diego, CA, EE. UU) diluido 1: 2000 en TBS-T20 por 2 h. A continuación, las membranas se lavaron tres veces en TBS-T20 por 10 min cada lavado, y finalmente, las señales de la reacción de peroxidasa se detectaron usando el sistema ECL (Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, Reino Unido) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La β -actina se usó como un control de carga interno para normalizar los niveles de todas las proteínas.

6. PCR en tiempo real (RT-qPCR).

Se cultivaron células MCF-7 en placas de 10 cm. Se dejaron crecer por 2-3 días hasta alcanzar un 80% de confluencia. Luego de alcanzar esta confluencia, se trataron con DMSO (control), E2(1×10^{-7} M), CUR (25 μ M) y CUR+E2 y se dejaron incubando por 48 h. Después de este tiempo, las células se homogeneizaron con 1 mL de reactivo TRIzol (Invitrogen; Thermo Fisher Scientific, Inc.). Retirado el lisado celular, se mezcló con 0.2 mL de cloroformo (Merck, Burlington, Massachusetts) para luego ser centrifugado a 12.000 x g por 15 min a 4°C. Se recuperó la fase acuosa y el RNA fue precipitado adicionando 0,5 mL de alcohol isopropílico (Merck, Burlington, Massachusetts) y se dejó incubando por 10 min a 4°C. Luego, las muestras se centrifugaron a 12.000 x g por 10 min a 4°C, se lavó el precipitado de cada una con 1 mL de alcohol etílico (Merck, Burlington, Massachusetts) al 75% v/v en agua libre de nucleasas (Winkler, Lampa, Chile), se separó mediante centrifugación a 7.500 x g por 5 min a 4°C, se descartó el sobrenadante y se realizó un air dry, o secado al aire, por 10 min. Finalmente, el pellet fue disuelto en 30 μ L de agua libre de nucleasas y se incubó en un termoblock a 55°C por 10 min. El RNA obtenido fue cuantificado con el kit Qubit™ RNA Broad Range, según las instrucciones del fabricante, en el fluorómetro Qubit 4.0(Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EE.UU.). El cDNA se preparó utilizando el kit AffinityScript (Agilent Technologies, Massachusetts, EE.UU.) según las instrucciones del

fabricante. Este cDNA se sometió a cuantificación por PCR en tiempo real (qPCR) en el sistema de detección CFX 96 Touch (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) con partidores específicos. Cada mezcla de amplificación se preparó con 12,5 μ L de SYBR Green Mastermix 2X (Promega, Madison, WI, EE. UU), 0,4 μ M de partidores específicos y 1 μ L de cDNA en un volumen final de 25 μ L. Las condiciones de termociclado para qPCR contra los genes ESR1, CTSD, EGFR, CCND1, BCL2, ACTB (β -actina) fueron las siguientes: 94 ° C durante 30 s, 55 ° C durante 20 y 72 ° C durante 20 s, para un total de 40 ciclos. Los partidores para cada gen seleccionado se presentan en la **Tabla 1**. Las reacciones se realizaron por duplicado y el umbral del ciclo se obtuvo utilizando el software BIO RAD CFX Manager 2.1. La expresión génica relativa se calculó usando el método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ tomando como referencia los niveles de β -actina.

Tabla 1: Secuencia y temperatura de hibridación de los partidores usados en el RT-qPCR

Nombre del gen	Secuencia del partidor	Temperatura de hibridación[°C]
ESR1	F:CCACCAACCAGTGACCATT	58,5
	R:GTCTTTCCGTATCCCACCTTT	55,4
CTSD	F:GCTACAAGCTGTCCCCAGAG	63,9
	R:CTCTACCCCCACCAAACAGA	63,8
EGFR	F:GCGTCTCTTGCCGGAATGT	58,2
	R:GGCTCACCTCCAGAAGGTT	59,3
CCND1	F:AATGACCCCGCACGATTTCA	57,3
	R:TGAGGCGGTAGTAGGACAGG	58,1
BCL2	F:TACCTGAACCGGCACCTG	57,2
	R:GCCGTACAGTTCCACAAAGG:	56,2
ACTB	F:TGCCGACAGGATGCAGAAG	57,7
	R:GCCGATCCACCGGAGTACT	59,1

7. Inmunocitoquímica

Para visualizar los niveles proteicos y localización de ER α , PCNA, Bax, Bcl-2, β -catenina y Vimentina, la inmunocitoquímica se realizó según el protocolo descrito previamente por Calaf et al. con algunas modificaciones. En resumen: Se sembraron 1×10^4 células en un portaobjetos de vidrio (Nunc Inc., Naperville, IL, USA) y se dejaron crecer hasta un 80% de confluencia. Las células fueron tratadas durante 48 h con DMSO (control), E2(1×10^{-7} M), CUR (25 μ M) y CUR+E2, y luego se fijaron con paraformaldehído tamponado a temperatura ambiente.

Posteriormente, las células fijadas se incubaron con H_2O_2 al 1% en metanol para bloquear la peroxidasa endógena y se lavaron de nuevo dos veces con PBS. Después, los cultivos celulares se cubrieron con suero de caballo normal durante 30 minutos a temperatura ambiente y se incubaron con anticuerpos anti-ER α (D6R2W), anti-PCNA (sc-56), anti-Bax(sc-526), anti-Bcl-2(sc-492), anti- β -catenina(sc-1496), y anti-Vimentina(sc-7557) todos ellos de Santa Cruz Biotechnology, Inc. Estos anticuerpos primarios se utilizaron a una dilución de 1:500 y se incubaron durante la noche a 4°C. Las células se lavaron dos veces con PBS y, posteriormente, se incubaron durante 45 minutos con una solución de anticuerpos secundarios biotinilados diluidos (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA) y el reactivo Vectastin Elite ABC (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, EE.UU.).

8. Análisis estadístico.

Los datos se analizaron con el software Graphpad Prism v8 (La Jolla, CA, EE.UU). Los resultados se expresaron como los promedios \pm desviaciones estándar de replicas o triplicado. La significancia de las diferencias entre las muestras se analizó utilizando la prueba t de Student, y un valor de $p < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo.

RESULTADOS

1. Citotoxicidad y concentración de trabajo de curcumina y 17 β -estradiol en células MCF-7.

Para evaluar los niveles de curcumina no tóxicos para las células y determinar la concentración de trabajo, expusimos a las células MCF-7 a diferentes concentraciones de curcumina durante 48 h. En la **Figura 5** se observa que a una dosis de 25 μ M hay una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$) de la viabilidad celular con respecto al control, y el IC₅₀, parámetro que indica la cantidad de fármaco necesaria para inhibir un proceso biológico a la mitad, fue de 25,7 μ M. Por lo tanto, una dosis que no supere los 25,75 μ M se considera no tóxica para las células. Siguiendo esta línea, 25 μ M fue la concentración máxima no tóxica y la que se eligió para los experimentos posteriores.

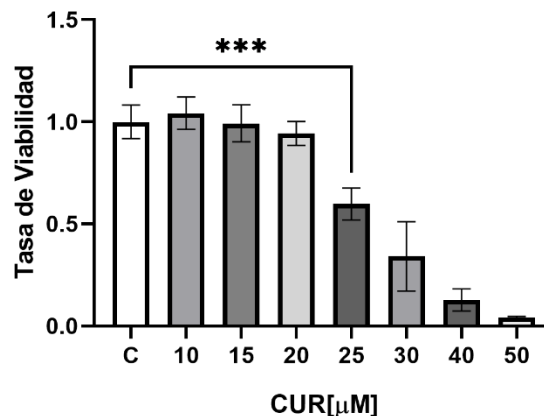


Figura 5: Efecto dosis-respuesta de curcumina (CUR) sobre la viabilidad celular. Células MCF-7 fueron tratadas con distintas concentraciones de CUR (10-50 μ M). La viabilidad celular fue medida con el ensayo de MTT a las 48 h de incubación con CUR. C: control con DMSO. Los datos fueron expresados como promedios con desviaciones estándar de 2 experimentos independientes. *** $p < 0,05$.

Para determinar la concentración a la cual 17 β -estradiol produce el máximo efecto estimulante sobre el crecimiento de las células MCF-7, y de esta manera simular la máxima actividad del receptor de estrógeno alfa (ER α), se expusieron a las células MCF-

7 a diferentes concentraciones de 17β -estradiol durante 48 h. En la **Figura 6** se observa que una dosis de 1×10^{-7} M fue la concentración máxima estimulante del crecimiento celular, pues se observa una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$) del crecimiento celular con respecto a la condición control. A concentraciones superiores a esta no se observan cambios en el crecimiento celular, por lo tanto, 1×10^{-7} M fue la concentración máxima estimulante y la que se eligió para los experimentos posteriores.

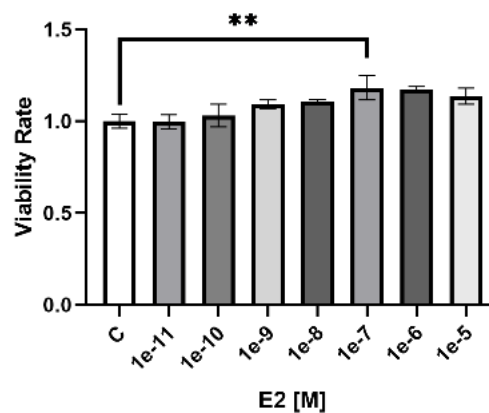


Figura 6: Efecto del 17β -estradiol (E2) sobre el crecimiento celular. Células MCF-7 fueron tratadas con distintas concentraciones (1×10^{-11} - 1×10^{-5} M) de E2. El crecimiento celular fue medido con el ensayo de MTT a las 48 h de incubación con E2. C: control con etanol. Los datos fueron expresados como promedios con desviaciones estándar de 2 experimentos independientes. ** $p < 0.05$.

2. La curcumina disminuye los niveles de expresión del Receptor de Estrógeno Alfa a través de mecanismos dependientes de la transcripción génica.

Se ha visto el potencial impacto farmacológico que presenta curcumina para tratar algunas enfermedades como el Alzheimer, la diabetes, la artritis y hasta algunos tipos de cánceres (Huminięcki y col., 2017). Para analizar el efecto de esta sustancia sobre el cáncer de mama ER+, cáncer que depende en gran parte de la regulación de la actividad de receptores hormonales como el ER α , evaluamos el efecto de la curcumina

en presencia de 17β -estradiol sobre los niveles proteicos del ER α . Como se muestra en la **Figura 7A**, la curcumina en presencia de 17β -estradiol (CUR+E2) disminuye significativamente los niveles de la proteína ER α a las 48 h de tratamiento cuando se compara con la condición control con DMSO. Se observa también una disminución en los niveles del ER α cuando las células son tratadas solo con curcumina. El tratamiento con 17β -estradiol muestra una leve disminución en los niveles del ER α cuando se compara con la condición control; este tratamiento con 17β -estradiol es importante a la hora de compararlo con la mezcla CUR+E2, debido a que 17β -estradiol solo estaría activando al ER α y de esta forma estimulando la proliferación y supervivencia celular.

La **Figura 7B** muestra el resultado de una inmunocitoquímica contra ER α . Esto reafirma el efecto que tiene curcumina sobre el ER α , pues se observa una disminución en los niveles de ER α a las 48h de tratamiento cuando se compara con la condición control.

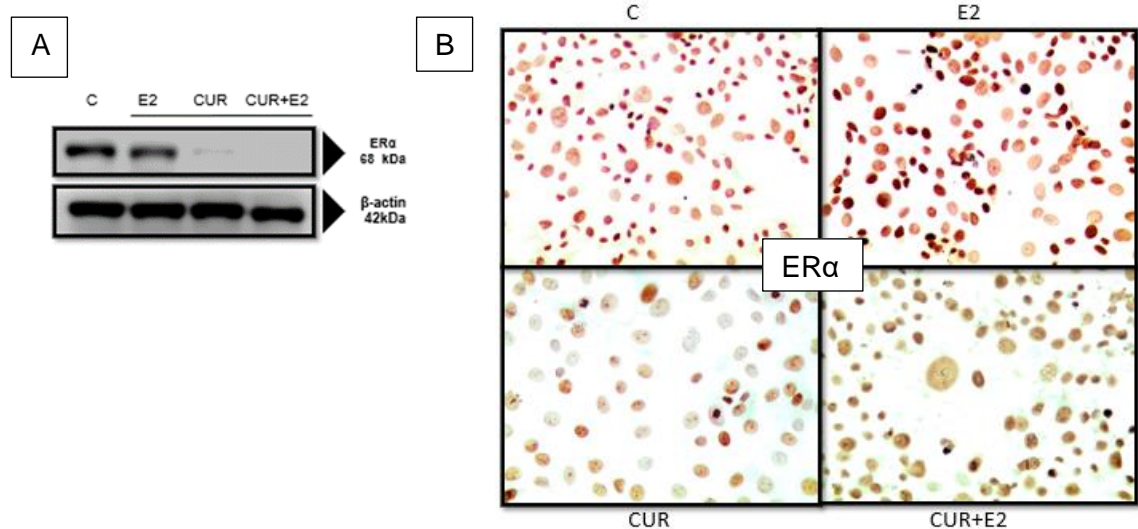


Figura 7: Efecto de curcumina sola y en presencia de 17β -estradiol (CUR+E2) sobre los niveles proteicos de ER α . Western blot (A) e inmunocitoquímica (B) contra ER α en células MCF-7 tratadas por 48 h con DMSO(C), 17β -estradiol 1×10^{-7} M(E2), curcumina 25 μ M(CUR) y curcumina 25 μ M + 17β -estradiol 1×10^{-7} M(CUR+E2). Se usó β -actina como control de carga. Los datos fueron expresados como la imagen más representativa de 3 experimentos independientes.

Para determinar si esta disminución que provoca curcumina en los niveles del ER α se debe a mecanismos dependientes de la transcripción génica, se evaluó la expresión del gen que codifica para ER α , ESR1. Esto se realizó a través de la medición de los niveles de mRNA de ESR1, por RT-qPCR a 48 h de exposición a curcumina sola y en presencia de 17 β -estradiol. Como se muestra en el gráfico de la **Figura 8**, curcumina sola (CUR) y en presencia de 17 β -estradiol (CUR+E2) promovieron una disminución significativa de los niveles de expresión del gen ESR1 en células MCF-7, cuando se comparan con la condición control con DMSO.

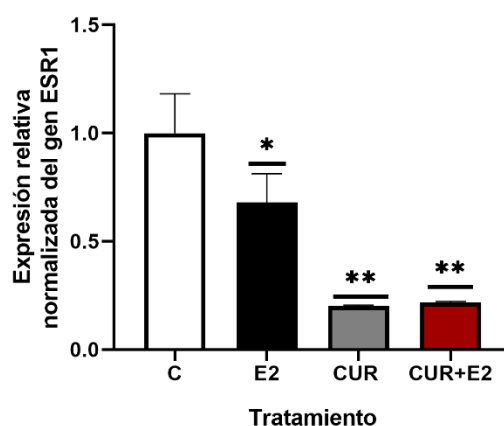


Figura 8: Efecto de curcumina sola y en presencia de 17 β -estradiol (CUR+E2) sobre los niveles de expresión del gen ESR1. Las células MCF-7 fueron tratadas por 48 h con DMSO(C), β -estradiol 1×10^{-7} M (E2), curcumina 25 μ M (CUR) y curcumina 25 μ M + β -estradiol 1×10^{-7} M(CUR+E2). Se usó ACTB (β -actina) como gen normalizador. Los datos fueron expresados como promedios con desviaciones estándar de 2 experimentos independientes. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,05$

Como el fin de este trabajo es evaluar el efecto de esta sustancia sobre la actividad del ER α , se analizaron los niveles de expresión de genes que son regulados por este receptor, a las 48 h de tratamiento. En el gráfico de la **Figura 9** se observa que tanto CUR como CUR+E2 disminuyen los niveles de mRNA de los genes regulados por ER α ,

es decir, de CTSD, EGFR, CCND1 y BCL2. Se observa que en la condición con 17β -estradiol (E2) hubo un aumento estadísticamente significativo ($p < 0,01$) de los niveles de mRNA de genes regulados indirectamente por $ER\alpha$, como es el caso de EGFR, CCND1 y BCL2, mientras que hubo una disminución de los niveles de mRNA del gen CTSD, gen regulado directamente por $ER\alpha$.

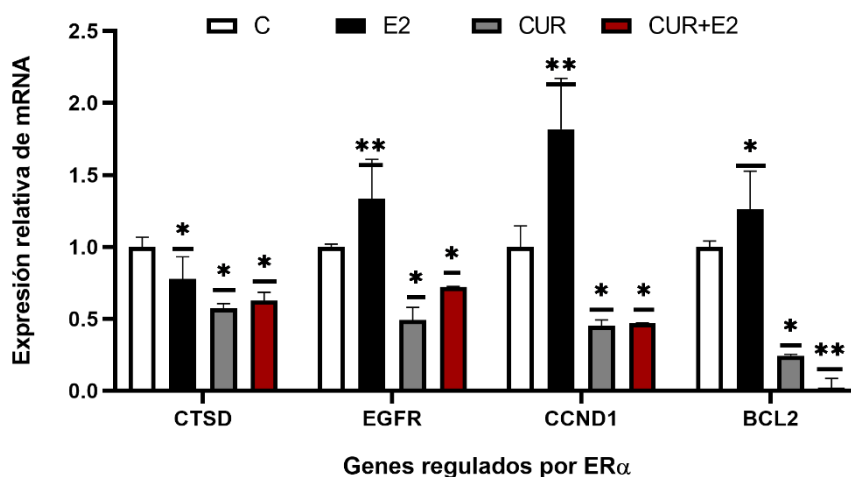


Figura 9: Efecto de curcumina sola y en presencia de 17β -estradiol (CUR+E2) sobre los niveles de mRNA de CTSD, EGFR, CCND1 y BCL2 en células MCF-7 tratadas por 48 h con DMSO(C), β -estradiol 1×10^{-7} M(E2), curcumina $25 \mu\text{M}$ (CUR) y curcumina $25 \mu\text{M}$ + β -estradiol 1×10^{-7} M(CUR+E2). Se usó ACTB (gen que codifica para β -actina) como gen normalizador. Los datos fueron expresados como promedios con desviaciones estándar de 5 réplicas diferentes *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$.

3. La curcumina sola y en presencia de 17β -estradiol disminuye el crecimiento de células MCF-7 *in vitro*.

Para demostrar que la disminución de los niveles de expresión del $ER\alpha$ repercute también en el crecimiento celular, se realizaron ensayos de viabilidad celular frente a la exposición a los distintos tratamientos. Estos fueron medidos a través de la tinción de células viables con cristales violeta y la formación de producto formazan (ensayo MTT).

Como se muestra en los gráficos de la **Figura 10A** y **10B**, la viabilidad celular disminuyó significativamente cuando las células fueron expuestas por 48 h a curcumina sola (CUR) y en presencia de 17β -estradiol (CUR+E2). Esto último si lo comparamos con la condición control con DMSO.

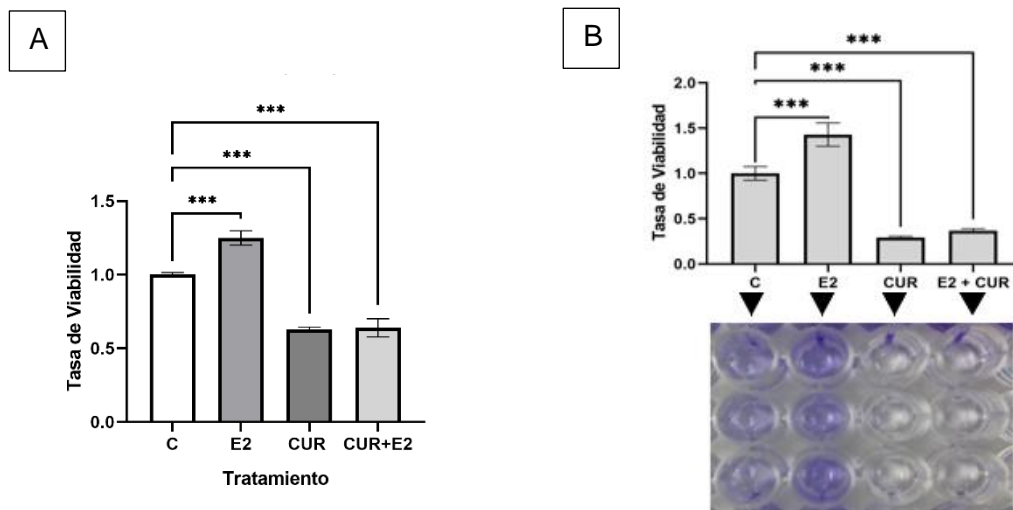


Figura 10: Efecto de curcumina sola y en presencia de 17β -estradiol (CUR+E2) sobre la viabilidad de células MCF-7. La viabilidad celular fue medida a través del ensayo de MTT(A) y de la tinción con cristal violeta(B) a las 48 h de incubación con DMSO(C), β -estradiol 1×10^{-7} M(E2), curcumina $25 \mu\text{M}$ (CUR) y curcumina $25 \mu\text{M}$ + β -estradiol 1×10^{-7} M(CUR+E2). C: control con DMSO. Los datos fueron expresados como promedios con desviaciones estándar de 2 experimentos independientes ***: $p < 0,05$.

Además de observar que esta disminución de los niveles de expresión del ER α repercute en el crecimiento celular, se observó un efecto parecido sobre el crecimiento libre de anclaje. Para analizar esto, se realizaron ensayos de formación de colonias en agar semisólido (ensayo soft-agar) como se describe en **Materiales y métodos**. En la **Figura 11** se observa que la capacidad de formar colonias se redujo en las células tratadas con CUR y CUR+E2, pues el tamaño de estas es mucho menor en comparación con la condición control con DMSO y 17β -estradiol. Los resultados de este ensayo sugieren

que la curcumina sola y en presencia de 17β -estradiol, inhibe el crecimiento libre de anclaje o “perdida de anoikis” en las células MCF-7.

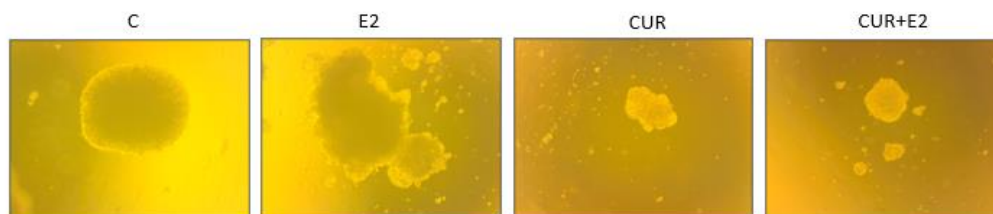


Figura 11: Efecto de curcumina sola y en presencia de 17β -estradiol (CUR+E2) sobre el crecimiento libre de anclaje. El crecimiento fue medido a través de ensayos de formación de colonias en agar semisólido. Las células MCF-7 fueron tratadas con DMSO(C), β -estradiol 1×10^{-7} M(E2), curcumina $25\mu\text{M}$ (CUR) y curcumina $25\mu\text{M}$ + β -estradiol 1×10^{-7} M(CUR+E2) 2 veces por semana durante 31 días. C: control con DMSO.

4. La curcumina sola y en presencia de estrógenos afecta los niveles de proteínas asociadas a la proliferación celular, la supervivencia celular y la transición epitelial-mesenquimal.

Hipotetizamos que esta disminución en la viabilidad celular se podría relacionar a una disminución en la proliferación celular. Para corroborar esto, se evaluaron los niveles proteicos del antígeno nuclear de células en proliferación, PCNA. Como se muestra en la **Figura 12A**, hay una disminución de los niveles de la proteína PCNA en las condiciones con CUR y CUR+E2($p < 0,05$), mientras que en la condición con 17β -estradiol se observa un leve aumento de los niveles de PCNA cuando se compara con la condición control con DMSO, sin embargo, este aumento no es estadísticamente significativo. Para reafirmar esta disminución en los niveles de PCNA en las células expuestas a CUR y CUR+E2, se realizó una inmunocitoquímica contra PCNA (**Figura 12B**), método que no sólo permite determinar la expresión de un antígeno específico en la célula a partir de la

intensidad de la tinción, sino que también ver el contexto celular y su localización en la célula. Los resultados muestran que hay una disminución de la tinción en las células tratadas con curcumina sola (CUR) y en presencia de 17β -estradiol (CUR+E2), lo que reafirma el resultado del western blot, es decir, se observa que hay una disminución de los niveles proteicos de PCNA en la condición con CUR y CUR+E2. De este modo, la disminución que provoca curcumina sobre los niveles de proteína ER α , en células MCF-7, repercute también en la proliferación celular. Los resultados de la inmunocitoquímica también indican que hay un aumento de los niveles de PCNA en las células tratadas con 17β -estradiol(E2), pues se puede apreciar un considerable aumento de tinción de estas células con respecto a la condición control(C).

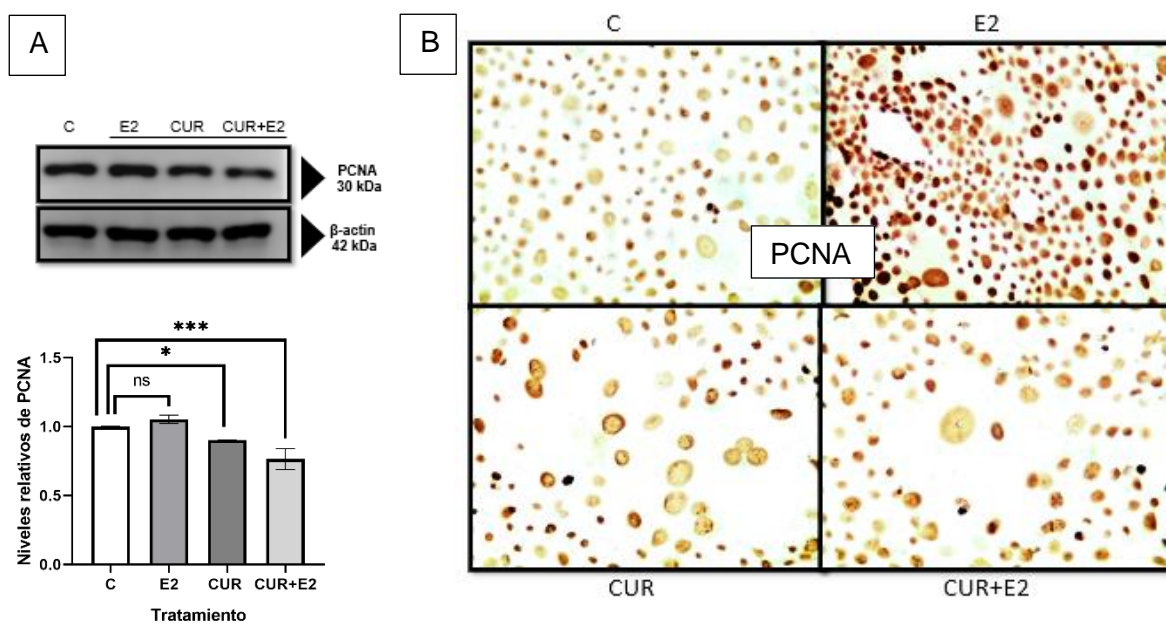


Figura 12: Efecto de curcumina sola y en presencia de 17β -estradiol (CUR+E2) en la proliferación celular. Western blot (A) e Inmunocitoquímica (B) contra PCNA en células MCF-7 tratadas por 48 h con DMSO(C), 17β -estradiol 1×10^{-7} M(E2), curcumina $25\mu\text{M}$ (CUR) y curcumina $25\mu\text{M}$ + 17β -estradiol 1×10^{-7} M(CUR+E2). Se usó β -actina como control de carga. Los resultados fueron expresados como la imagen más representativa de 2 experimentos independientes. El grafico en (A) expresa los datos del western blot como promedios con desviación estándar de 2 experimentos independientes. *: $p < 0,05$; ns: no significativo.

Debido a que la disminución del crecimiento celular se asoció fuertemente con una disminución en la proliferación celular, también se evaluó si el efecto de esta sustancia repercute también sobre la supervivencia celular y la transición epitelial-mesenquimal. Esto se realizó midiendo los niveles proteicos de marcadores moleculares asociados a cada proceso celular mencionado anteriormente. Para supervivencia celular se utilizaron marcadores de señales de supervivencia o anti-apoptóticos, como Bcl-2, y marcadores pro-apoptóticos, como Bax. Para la transición epitelial-mesenquimal se utilizaron marcadores asociados a este proceso, como Vimentina, y marcadores que regulan este proceso, como β -catenina. Como se muestra en la **Figura 13A**, disminuyen los niveles de la proteína Bcl-2 en las células expuestas a curcumina sola (CUR) y en las expuestas a curcumina en presencia de 17β -estradiol (CUR+E2). Esto último si lo comparamos con la condición control con DMSO. Para los niveles de Bax no se observaron diferencias significativas con respecto a la condición control para estas mismas dos últimas condiciones. Los resultados fueron respaldados con su respectiva inmunocitoquímica, pues en la **Figura 13B** se observa el mismo resultado para Bcl-2.

Los resultados apuntan a que el efecto que tiene curcumina sobre las células MCF-7 estaría repercutiendo significativamente en la supervivencia celular y no así en la apoptosis, pues no se observaron cambios significativos en los niveles proteicos de marcadores apoptóticos, como Bax. Sin embargo, al observar la inmunocitoquímica contra Bax en la **Figura 13D**, se puede ver que en la condición CUR y CUR+E2 hay células presentes que están entrando en procesos de muerte celular (flechas negras), pues la morfología que presentan es característica de apoptosis.

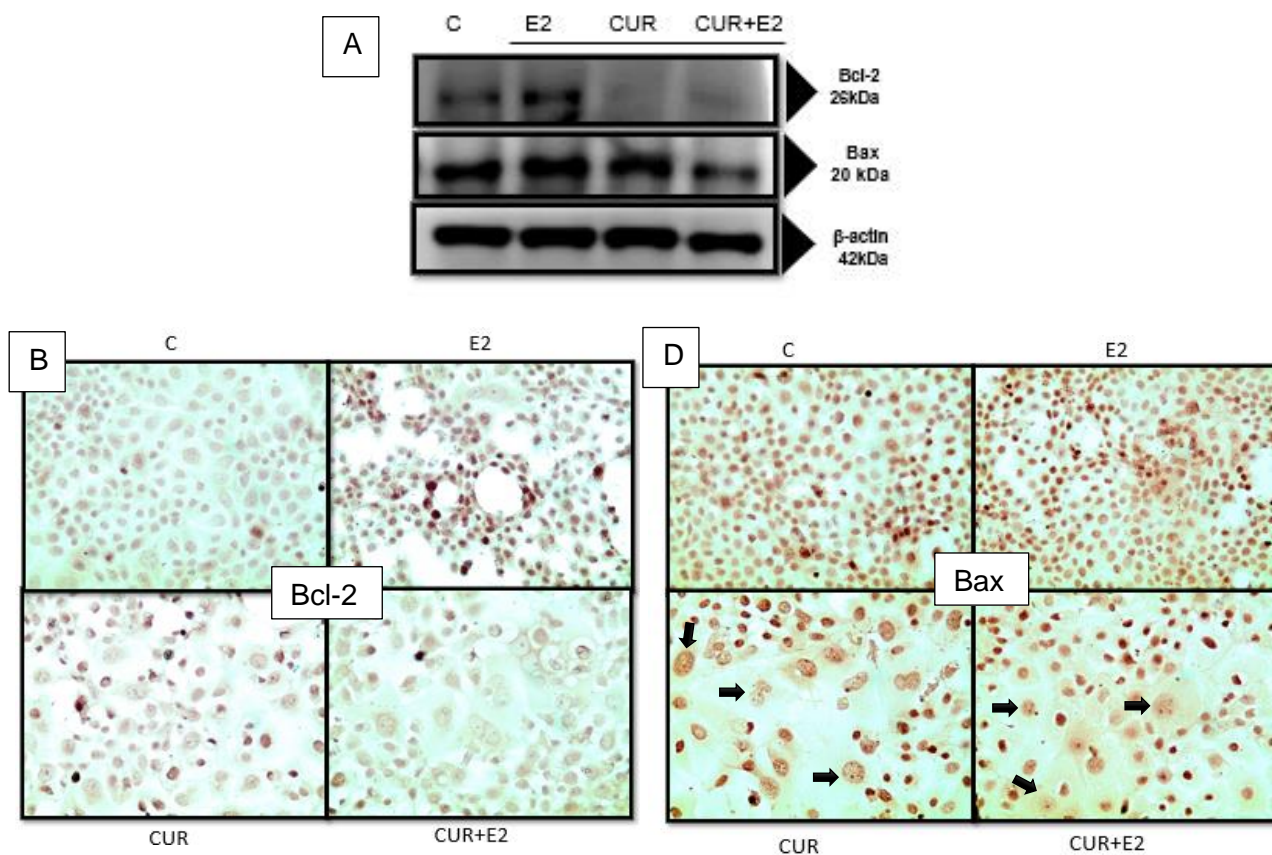


Figura 13: Efecto de curcumina sola y en presencia de 17β-estradiol (CUR+E2) sobre la supervivencia celular. Western blot (A) e inmunocitoquímica contra Bcl-2(B) y Bax(D) en células MCF-7 tratadas por 48 h con DMSO(C), β-estradiol 1×10^{-7} M(E2), curcumina 25μM(CUR) y curcumina 25μM + β-estradiol 1×10^{-7} M(CUR+E2). Se usó β-actina como control de carga en el western blot. Los resultados fueron expresados como la imagen más representativa de 2 experimentos independientes.

Los resultados de la **Figura 14A** muestran que, por un lado, hay un aumento en los niveles de β-catenina cuando las células son expuestas a curcumina sola (CUR) y en presencia de 17β-estradiol (CUR+E2). Por otro lado, los niveles de Vimentina no cambian con respecto al control con DMSO, sin embargo, aumentan en la condición con 17β-estradiol. Esto último sugiere que curcumina también está alterando la transición epitelial-mesenquimal al aumentar los niveles de proteínas que regulan este proceso,

como la β -catenina, marcador que suele expresarse en células epiteliales. De esta forma, curcumina estaría reprimiendo en las células MCF-7 el desarrollo de propiedades migratorias e invasivas, debido a que regula la transición epitelial-mesenquimal, proceso morfogénico esencial en la metástasis celular (Heerboth y col., 2015).

La inmunocitoquímica contra Vimentina (**Figura 14D**) muestra una pronunciada tinción para las células tratadas con E2 y no para las condiciones con DMSO (control), CUR y CUR+E2. Esto último corrobora que curcumina no altera a este marcador. Para la inmunocitoquímica contra β -catenina (**Figura 14B**) se observa una tinción en las membranas de las células tratadas con curcumina sola (CUR) y en presencia de 17β -estradiol (CUR+E2) (flechas verdes), puesto que es ahí donde esta proteína ejerce su función, la cual consiste en favorecer la adhesión celular. De esta manera, curcumina estaría regulando la transición epitelial-mesenquimal al promover la función de β -catenina.

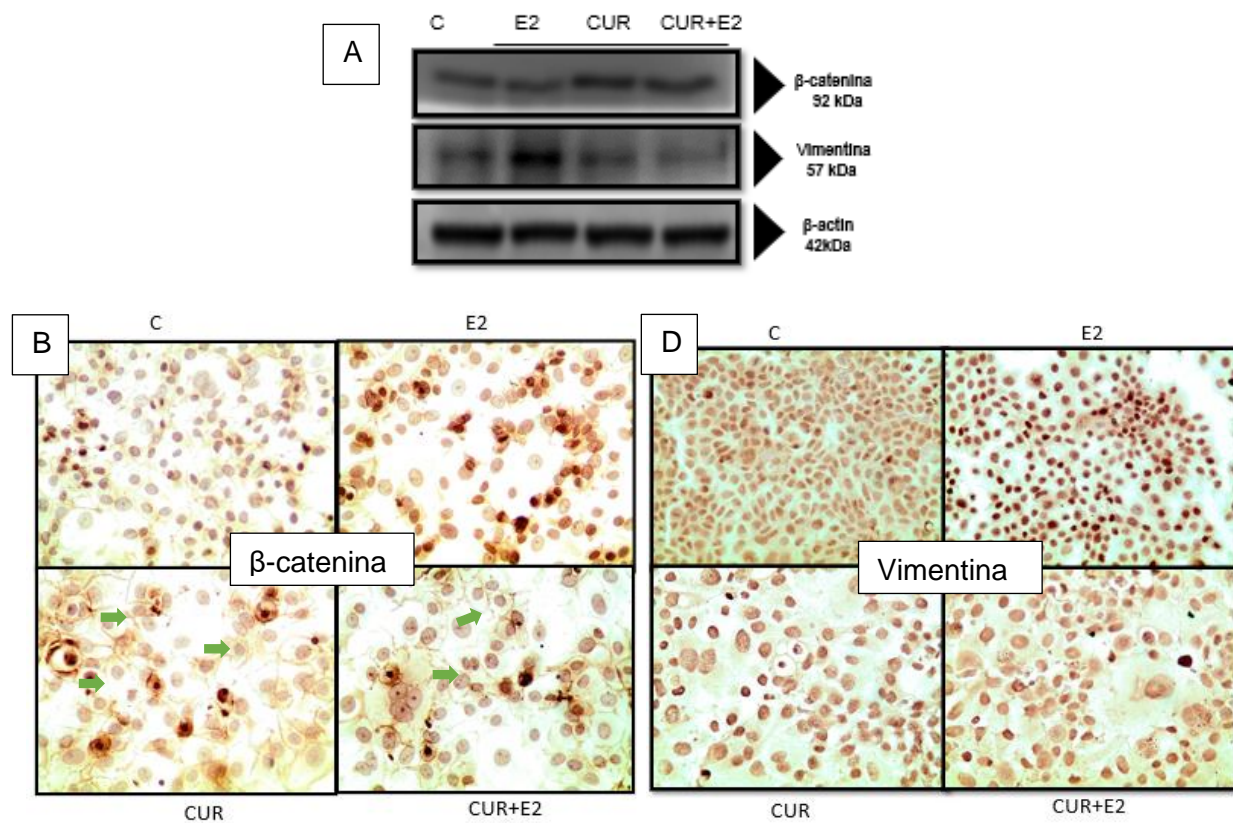


Figura 14: Efecto de curcumina sola y en presencia de 17β-estradiol (CUR+E2) sobre la transición epitelial-mesenquimal. Western blot (A) e inmunocytoquímica contra β-catenina(B) y Vimentina(D) en células MCF-7 tratadas 48 h con DMSO(C), β-estradiol 1×10^{-7} M(E2), curcumina 25μM(CUR) y curcumina 25μM + β-estradiol 1×10^{-7} M(CUR+E2). Se usó β-actina como control de carga. Los resultados fueron expresados como la imagen más representativa de 2 experimentos independientes.

DISCUSIÓN

Se estima que el 80% de los cánceres de mama son positivos para receptores de estrógeno (ER+) (DeSantis y col., 2019). Estos receptores son indispensables para el crecimiento de las células tumores en el cáncer de mama ER+, pues se ha visto que su actividad está mayormente asociada a los procesos de proliferación y supervivencia celular (Helguero y col., 2005). Los tumores en el cáncer de mama ER+ requieren de las hormonas, como los estrógenos, para poder crecer, por lo tanto, el cáncer de mama ER+ es un cáncer dependiente de hormonas. El 17β -estradiol es el estrógeno predominante en la mujer, pues supera a los demás durante los años reproductivos tanto en los niveles séricos absolutos como también en la actividad estrogénica. El 17β -estradiol fue identificado como carcinógeno por la IARC el año 2016 (Smith y col., 2016) y es considerado como uno de los factores de riesgo que más contribuye al desarrollo de cáncer de mama ER+. Sin embargo, este estrógeno posee propiedades beneficiosas sobre otros órganos del cuerpo humano (Travis y col., 2003). Es por esto último que el estado menopáusico de la mujer es uno de los factores más importante a considerar al momento de evaluar la mejor terapia para pacientes con cáncer de mama ER+, pues, si bien el uso de terapias endocrinas dirigidas hacia la actividad del Receptor de Estrógeno Alfa (ER α) son y han sido las más exitosas para tratar este tipo de cáncer de mama, si no se toman en cuenta los factores de riesgo pueden ocasionar efectos secundarios indeseables muy graves, como lo es aumentar el riesgo a desarrollar cáncer de endometrio o a desarrollar trombosis profunda; lo que se ha visto con Tamoxifeno, un tipo de terapia endocrina conocida por ser Moduladores Selectivos del ER α o SERMs (selective estrogen receptor modulator, por sus siglas en inglés) y la más usada (Perez-Zuñiga y col., 2014). Si bien las terapias endocrinas son la opción de tratamiento

pre o postcirugía del tumor en pacientes con cáncer de mama ER+, estas dejarán de hacer efecto en algún momento del tratamiento, pues se ha visto en muchos estudios clínicos que los pacientes suelen tener una recidiva después de los 5 años de terapia con SERMs, generándose una resistencia a la terapia endocrina (Ali y col., 2002). Esta resistencia también se ha observado con los Inhibidores de Aromatasa o AIs (Aromatase Inhibitors, por sus siglas en inglés), otro tipo de terapia endocrina. De esta forma, la resistencia a la terapia endocrina es inevitable. Frente a esto, diversos estudios han demostrado que el principal mecanismo por el que se adquiere esta resistencia tiene que ver con la reactivación del Receptor de estrógeno Alfa (ER α). Esta reactivación ocurre de forma independiente de su ligando endógeno 17 β -estradiol, a través de interferencias del ER α con diferentes vías de señalización oncogénica, como las vías MAPK o PI3k/Akt/mTOR (Steelman y col., 2011). Estudios previos han sugerido que esta reactivación puede ocurrir cuando hay una alteración en los factores de transcripción y coactivadores asociados al ER α , como lo es NF-kB (Yde y col., 2012) y AP-1 (Schiff, 2000), o cuando hay una alteración del control de la señalización río abajo del ER α . Gracias a los hallazgos de estos estudios se han podido desarrollar nuevas estrategias de tratamiento que combinan SERMs (como Tamoxifeno) con inhibidores dirigidos a estos mecanismos moleculares que confieren resistencia en el cáncer de mama ER α -positivo. Pese a la existencia de estas nuevas estrategias, son muchas las posibilidades por donde se pueda adquirir resistencia a la terapia endocrina, pues una sola molécula no puede suprimir la comunicación cruzada y los bucles de retroalimentación negativa en las complejas redes celulares.

Considerando este problema de la resistencia a los SERMs y AIs en el cáncer de mama ER+, es que se desarrollaron los Degradadores selectivos del ER α o SERDs (Selective estrogen receptor degraders, por sus siglas en inglés). Los SERDs se consideran un

enfoque terapéutico importante para tratar el cáncer de mama ER+, tanto en casos de resistencia a los medicamentos en etapa temprana como más avanzadas, pues poseen una estrategia de vanguardia que ha permitido mejorar tanto la supervivencia como los tiempos de recaída de los pacientes con cáncer de mama ER+.

Considerando los antecedentes anteriormente mencionados es que resulta interesante ver el efecto que tiene la curcumina, compuesto bioactivo de la hierba *Curcuma Longa*, sobre la actividad del ER α , pues Calaf y colaboradores han desarrollado una ardua línea de investigación con respecto a esta sustancia y su potencial efecto anticancerígeno en líneas celulares de mama malignas. La gran complejidad molecular que posee curcumina le ha permitido desarrollar la capacidad de modular múltiples vías de señalización, como la supervivencia celular, la supresión de tumores, la vía de las caspasas en la apoptosis y las vías de los receptores de muerte (Kunnumakkara y col., 2016). La pleiotropía que tiene curcumina la convierte en un potencial fármaco multiobjetivo en el cáncer de mama, y más aún en el cáncer de mama ER+ (Calaf y col., 2012), puesto que se ha visto que la sustancia también modula las vías de señalización oncogénica que podrían estar reactivando al ER α , a través de un mecanismo independiente de su unión a ligando.

Considerando la interferencia de esta sustancia con las vías de señalización oncogénica que reactivan al ER α es que resulta interesante ver el efecto de esta sustancia sobre la actividad del ER α para así potenciar su uso terapéutico.

El presente trabajo analiza el efecto de curcumina sobre el ER α en células que expresan niveles considerables de este receptor, las células MCF-7. El objetivo se basa en evaluar el efecto bajo la estimulación de su ligando endógeno 17 β -estradiol, pues se busca mantener activado al ER α y así ver el efecto de esta sustancia sobre la actividad del receptor. Los resultados indicaron que curcumina disminuye los niveles del ER α a través de un mecanismo dependiente de la transcripción génica, pues tanto los niveles de

proteína como de mRNA disminuyeron cuando las células MCF-7 fueron tratadas con curcumina sola y en presencia de 17β -estradiol.

Con respecto a los niveles proteicos de ER α en las células tratadas con 17β -estradiol, se observó que estos eran menores con respecto al control (condición con DMSO). Esto último corresponde con la literatura, pues se han visto mecanismos de degradación del ER α cuando las células se exponen por largos periodos de tiempo a 17β -estradiol (Nawaz y col., 1999). En este trabajo el tiempo de exposición con 17β -estradiol fue de 48 h, lo que explicaría por qué los niveles de expresión del ER α disminuyen en comparación con la condición control. Se podría pensar que el mismo 17β -estradiol estaría contribuyendo en la degradación del ER α cuando las células son tratadas con curcumina sola y en presencia de 17β -estradiol, sin embargo, esto no es comparable, puesto que, aun así, las células tratadas con 17β -estradiol siguen expresando al ER α , mientras que en aquellas tratadas con curcumina sola la disminución de los niveles de ER α es casi total. Esto último sugiere que pese a la estimulación con 17β -estradiol, curcumina es capaz de disminuir los niveles de expresión del ER α .

De forma complementaria, se analizaron los niveles de expresión de genes regulados por el ER α . Por un lado tenemos aquellos genes que en sus secuencias regulatorias poseen sitios EREs (estrogen response element, por sus siglas en inglés), sitios en donde se une directamente el ER α tras su activación (genes regulados directamente), como por ejemplo el gen que codifica para Catepsina D (CTSD); por otro lado, tenemos aquellos genes que no presentan estos sitios EREs (genes regulados indirectamente), como por ejemplo el gen que codifica para el Receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), Ciclina D1 (CCND1) y/o Bcl-2 (BCL-2). Se espera que los niveles de mRNA de los genes regulados por ER α aumenten en las células expuestas a 17β -estradiol y que disminuyan en aquellas expuestas a curcumina sola y en presencia de

17 β -estradiol, pues los resultados previamente obtenidos en este trabajo apuntan a que curcumina al disminuir los niveles de expresión del ER α deberían también disminuir los de sus genes blanco (O'Lone y col., 2004). Analizando los niveles de mRNA de estos genes, se observó un patrón de expresión muy similar entre ellos: todos disminuyeron en aquellas células expuestas a curcumina sola y en presencia de 17 β -estradiol, mientras que en aquellas expuestas a 17 β -estradiol, los niveles de EGFR, CCND1 y BCL2 aumentaron significativamente, no así con los de CTSD. Este último gen es regulado directamente por el receptor, lo que se esperaría que sus niveles aumentaran frente a la exposición a 17 β -estradiol. Esta diferencia se podría explicar debido a que los efectos de CTSD sobre las células estarían siendo de respuesta temprana y que la misma degradación del ER α , producto de su ligando endógeno, estaría interfiriendo en su efecto sobre las células. Los aumentos significativos en los niveles de mRNA de los genes EGFR, CCND1 y BCL2 se explica porque sus efectos en la célula son de respuesta larga y/o que otras vías de señalización estarían potenciando su expresión (Kocanova y col., 2010). Pese a estas diferencias, los niveles de expresión de todos los genes analizados fueron similares bajo la condición con curcumina, por tanto, curcumina altera la actividad del ER α , pues disminuye los niveles de expresión tanto del receptor como los de sus genes, que regula río abajo.

Estos resultados demuestran que el efecto de curcumina sobre las células MCF-7 es muy similar al de un Degradador Selectivo del ER α o SERD (selective estrogen receptor degrader, por sus siglas en inglés). Estos son la tercera opción de terapia endocrina disponible que está dirigida contra la actividad del ER α en el cáncer de mama ER+. A diferencia de los SERMs (como el Tamoxifeno) o AIs, que se unen al ER α como agonistas parciales, los SERDs como el Fulvestrant se unen, bloquean y degradan al ER α a través de la vía proteosómica, lo que lleva a la inhibición completa de sus vías de señalización

que dependen de la unión del 17β -estradiol al ER α (Wei-Lan Yeh y col., 2013). Teniendo en cuenta este mecanismo de acción de los SERDs y los resultados obtenidos en este trabajo de la curcumina es que resultan comparable los efectos de esta sustancia con los de los SERDs. Si bien los resultados no demuestran que existe una degradación tal del ER α cuando se tratan a las células con curcumina, sugieren la inhibición de sus vías de señalización río abajo, lo que hace suponer que curcumina tiene efectos tan terapéuticos como los tienen los SERDS. Esto posiciona a curcumina como potencial tratamiento adyuvante natural para pacientes con cáncer de mama ER+ y, en especial, para aquellos que presenten resistencia o una mala respuesta a la terapia endocrina, pues la reactivación del ER α es inevitable.

Con los análisis de expresión de marcadores moleculares asociados a proliferación, supervivencia y transición epitelial-mesenquimal, se puede sugerir que la inhibición, inducida por curcumina en el crecimiento celular y en la capacidad de formar colonias, era resultado de una inhibición en la proliferación celular y de una posible regulación a la baja de moléculas involucradas en señales de supervivencia celular, pues los niveles del antígeno nuclear de células en proliferación (PCNA) y de Bcl-2 disminuyeron con curcumina.

Los marcadores asociados a apoptosis no presentaron diferencias en los niveles proteicos entre cada condición. Esto hace suponer que la inhibición del crecimiento celular inducido por curcumina no es resultado de mecanismos asociados a la apoptosis, puesto que no hubo diferencias significativas en los niveles de expresión de marcadores apoptóticos, como Bax. Sin embargo, los resultados de la inmunocitoquímica contra Bax demuestran que las células tratadas con curcumina sola y en presencia de 17β -estradiol están entrando en procesos de muerte celular dada la morfología característica que se observa. De este modo, no hay que descartar la posibilidad que las células expuestas a

curcumina entran en muerte celular a través de la acción de otros participantes de las vías apoptóticas o de muerte celular (T y col., 2013).

Paralelamente, los resultados sugieren que curcumina estaría regulando la transición epitelial-mesenquimal al promover la función de cateninas, pues en las células tratadas con curcumina sola y en presencia de 17β -estradiol, los niveles proteicos de β -catenina aumentaron (marcador asociado a adhesión celular), mientras que los de Vimentina (marcador de células mesenquimales o con capacidades invasivas) no cambiaron con respecto al control. En la inmunocitoquímica contra β -catenina se pudo observar la tinción de membranas de las células MCF-7 tratadas con curcumina, lo que permite apoyar la idea de que curcumina regula la transición epitelial-mesenquimal, pues potencia la adhesión celular al aumentar los niveles de expresión y actividad de las cateninas.

Los resultados de este trabajo apuntan a que el efecto que tiene curcumina sobre el ER α simula los efectos de las terapias endocrinas, en especial de los SERDS, pues estos fármacos degradan al ER α por mecanismos de la vía proteasómica, lo que podría estar sucediendo en las células tratadas con esta sustancia. Sin embargo, este trabajo solo propone analizar el efecto y no mecanismos. Describir los mecanismos por los que podría estar degradándose el ER α es algo que complementaría satisfactoriamente este trabajo. Además, este trabajo y los descritos en la literatura sobre el gran potencial de la curcumina proporcionan una justificación convincente para diseñar ensayos clínicos de curcumina sola y en combinación con fármacos de la terapia endocrina, como Tamoxifeno.

CONCLUSIONES

Así como este trabajo lo ha demostrado, curcumina altera la actividad del ER α , pues disminuye los niveles de expresión tanto del receptor como los de sus genes que regula rio abajo. Paralelamente, los resultados de este trabajo sugieren que el efecto inhibitorio que posee esta sustancia sobre el crecimiento celular y la capacidad de formación de colonias, de células MCF-7, sería a través de la inhibición de la proliferación celular. Además, el trabajo sugiere que los procesos de supervivencia celular y la transición epitelial-mesenquimal también se vieron afectados con curcumina. Pese a que el potencial anti apoptótico de esta sustancia no pudo ser comprobado en este trabajo, no se descarta la idea de que esta sustancia promueva la muerte celular programada a través de la activación de otras vías apoptóticas que no fueron evaluadas en este trabajo. Finalmente, considerando los resultados obtenidos en el presente trabajo, se puede postular que el efecto que posee la curcumina sobre el ER α imita al de la terapia endocrina con SERDs. Esto potencia su uso terapéutico como adyuvante en el cáncer de mama ER+ y más aún, en el resistente a la terapia endocrina, por reactivación del ER α .

BIBLIOGRAFÍA

Hengartner MO: The biochemistry of apoptosis. *Nature* 407: 770-776, 2000.

Miyashita T, Krajewski S, Krajewska M, Wang HG, Lin HK, Liebermann DA, Hoffman B and Reed JC: Tumor suppressor p53 is a regulator of bcl-2 and bax gene expression in vitro and in vivo. *Oncogene* 9: 1799-1805, 1994.

Aggelis, V. y Johnston, S.R.D., 2019. Advances in Endocrine-Based Therapies for Estrogen Receptor-Positive Metastatic Breast Cancer. *Drugs* 79, 1849-1866.

Ali, S., & Coombes, R. C. (2002). Endocrine-responsive breast cancer and strategies for combating resistance. *Nature Reviews Cancer*, 2(2), 101–112. <https://doi.org/10.1038/nrc721>

Calaf, G. (2011). Effect of curcumin on irradiated and estrogen-transformed human breast cell lines. *International Journal of Oncology*. <https://doi.org/10.3892/ijo.2011.1228>

Choi, B. H., Kim, C. G., Lim, Y., Shin, S. Y., & Lee, Y. H. (2008). Curcumin down-regulates the multidrug-resistance *mdr1b* gene by inhibiting the PI3K/Akt/NFκB pathway. *Cancer Letters*, 259(1), 111–118. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2007.10.003>

Creighton, C. J., Casa, A., Lazard, Z., Huang, S., Tsimelzon, A., Hilsenbeck, S. G., Osborne, C. K., & Lee, A. V. (2008). Insulin-Like Growth Factor-I Activates Gene Transcription Programs Strongly Associated With Poor Breast Cancer Prognosis. *Journal of Clinical Oncology*, 26(25), 4078–4085. <https://doi.org/10.1200/jco.2007.13.4429>.

Delgado BJ, Lopez-Ojeda W., 2021. Estrogen. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan–. PMID: 30855848.

DeSantis y col., 2019. Breast cancer statistics, 2019. *CA. Cancer J. Clin.* 69, 438-451. DOI:10.3322/caac.21583.

DeSantis, C. E., Ma, J., Gaudet, M. M., Newman, L. A., Miller, K. D., Goding Sauer, A., Jemal, A., & Siegel, R. L. (2019). Breast cancer statistics, 2019. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 69(6), 438–451. <https://doi.org/10.3322/caac.21583>.

Dowsett M, Nicholson RI, Pietras RJ, 2005. Biological characteristics of the pure antiestrogen fulvestrant: overcoming endocrine resistance. *Breast Cancer Res Treat* 93.

Dowsett, M., Nicholson, R. I., & Pietras, R. J. (2005). Biological characteristics of the pure antiestrogen fulvestrant: overcoming endocrine resistance. *Breast Cancer Research and Treatment*, 93(S1), 11–18. <https://doi.org/10.1007/s10549-005-9037-3>.

Gallardo, M., & Calaf, G. M. (2016). Curcumin inhibits invasive capabilities through epithelial mesenchymal transition in breast cancer cell lines. *International Journal of Oncology*, 49(3), 1019–1027. <https://doi.org/10.3892/ijo.2016.3598>.

Gallardo, M., Kemmerling, U., Aguayo, F., Bleak, T., Mu Oz, J., & Calaf, G. (2019). Curcumin rescues breast cells from epithelial-mesenchymal transition and invasion induced by anti-miR-34a. *International Journal of Oncology*. <https://doi.org/10.3892/ijo.2019.4939>.

Hanker, A.B y col., 2020. Overcoming Endocrine Resistance in Breast Cancer. *Cancer* 37, 496-513. DOI: 10.1016/j.ccell.2020.03.009.

Helguero, L. A., Faulds, M. H., Gustafsson, J. K., & Haldosén, L. A. (2005). Estrogen receptors alfa (ER α) and beta (ER β) differentially regulate proliferation and apoptosis of the normal murine mammary epithelial cell line HC11. *Oncogene*, 24(44), 6605–6616. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1208807>.

Huminiecki, L., Horbańczuk, J., & Atanasov, A. G. (2017). The functional genomic studies of curcumin. *Seminars in Cancer Biology*, 46, 107–118. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2017.04.002>.

Jiang, M., Huang, O., Zhang, X., Xie, Z., Shen, A., Liu, H., Geng, M., & Shen, K. (2013). Curcumin Induces Cell Death and Restores Tamoxifen Sensitivity in the Antiestrogen-Resistant Breast Cancer Cell Lines MCF-7/LCC2 and MCF-7/LCC9. *Molecules*, 18(1), 701–720. <https://doi.org/10.3390/molecules18010701>.

Kocanova, S., Mazaheri, M., Caze-Subra, S., & Bystricky, K. (2010). Ligands specify estrogen receptor alpha nuclear localization and degradation. *BMC Cell Biology*, 11(1). <https://doi.org/10.1186/1471-2121-11-98>.

Kunnumakkara, A. B., Bordoloi, D., Padmavathi, G., Monisha, J., Roy, N. K., Prasad, S., & Aggarwal, B. B. (2016). Curcumin, the golden nutraceutical: multitargeting for multiple chronic diseases. *British Journal of Pharmacology*, 174(11), 1325–1348. <https://doi.org/10.1111/bph.13621>.

L. Hoareau, E.J. DaSilva, Medicinal plants: a re-emerging health aid, *Electronic Journal of biotechnology* 2 (2) (1999) 3–4.

Lazennec, G., Bresson, D., Lucas, A., Chauveau, C., & Vignon, F. (2001). ER β Inhibits Proliferation and Invasion of Breast Cancer Cells. *Endocrinology*, 142(9), 4120–4130. <https://doi.org/10.1210/endo.142.9.8395>.

Le Romancer, M., Poulard, C., Cohen, P., Sentis, S., Renoir, J. M., & Corbo, L. (2011). Cracking the Estrogen Receptor's Posttranslational Code in Breast Tumors. *Endocrine Reviews*, 32(5), 597–622. <https://doi.org/10.1210/er.2010-0016>.

Lin, UN. y Winer, E.P., 2008). Advances in adjuvant endocrine therapy for postmenopausal woman. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 26, 798-805

Ma, C. X., Reinert, T., Chmielewska, I., & Ellis, M. J. (2015). Mechanisms of aromatase inhibitor resistance. *Nature Reviews Cancer*, 15(5), 261–275. <https://doi.org/10.1038/nrc3920>.

Mauri D, Pavlidis N, Polyzos NP, Ioannidis JPA. Survival With Aromatase Inhibitors and Inactivators Versus. *J Natl Cancer Inst* 2017;98:1285-91.

Miller, T. W., Balko, J. M., Fox, E. M., Ghazoui, Z., Dunbier, A., Anderson, H., Dowsett, M., Jiang, A., Smith, R. A., Maira, S. M., Manning, H. C., González-Angulo, A. M., Mills, G. B., Higham, C., Chanthaphaychith, S., Kuba, M. G., Miller, W. R., Shyr, Y., & Arteaga, C. L. (2011). ER α -Dependent E2F Transcription Can Mediate Resistance to Estrogen Deprivation in Human Breast Cancer. *Cancer Discovery*, 1(4), 338–351. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.cd-11-0101>.

Nawaz, Z., Lonard, D. M., Dennis, A. P., Smith, C. L., & O'Malley, B. W. (1999). Proteasome-dependent degradation of the human estrogen receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(5), 1858–1862. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.5.1858>.

O'Lone, R., Frith, M. C., Karlsson, E. K., & Hansen, U. (2004). Genomic Targets of Nuclear Estrogen Receptors. *Molecular Endocrinology*, 18(8), 1859–1875. <https://doi.org/10.1210/me.2003-0044>.

Pérez-Zúñiga, I., Cruz-Morales, R. A., Pacheco-Bravo, I., & Villaseñor-Navarro, Y. (2014). Cambios endometriales en pacientes con cáncer de mama tratadas con tamoxifeno. Rol del ultrasonido en sus diferentes modalidades. Experiencia en el Instituto Nacional de Cancerología, México. *Gaceta Mexicana de Oncología*, 13(6), 361–369. <https://www.elsevier.es/es-revista-gaceta-mexicana-oncologia-305-articulo-cambios-endometriales-pacientes-con-cancer-X1665920114807543>.

Robertson JFR, Bondarenko IM, Trishkina E, Dvorkin M, Panasci L, Manikhas A, et al. Fulvestrant 500 mg versus anastrozole 1 mg for hormone receptor-positive advanced breast cancer (FALCON): an international, randomised, double-blind, phase 3 trial. *Lancet* 2017; 388:2997-3005.

Sánchez R., C., Valenzuela V., Y., Pérez-Sepúlveda, A., Villarroel P., A., Medina A., L., Camus A., M., & Acevedo C., F. (2018). Cáncer de mama avanzado receptor de estrógeno positivo: Manejo sistémico actual. *Revista chilena de cirugía*, 70(5), 464–473. <https://doi.org/10.4067/s0718-40262018000500463>.

Schiff, R. (2000). Oxidative Stress and AP-1 Activity in Tamoxifen-Resistant Breast Tumors In Vivo. *Journal of the National Cancer Institute*, 92(23), 1926–1934. <https://doi.org/10.1093/jnci/92.23.1926>.

Shao, Z. M., Shen, Z. Z., Liu, C. H., Sartippour, M. R., Go, V. L., Heber, D., & Nguyen, M. (2002). Curcumin exerts multiple suppressive effects on human breast carcinoma cells. *International Journal of Cancer*, 98(2), 234–240. <https://doi.org/10.1002/ijc.10183>

Shi, Y. E., Chen, Y., Dackour, R., Potters, L., Wang, S., Ding, Q., Wang, Z., & Liu, Y. E. (2010). Synuclein γ Stimulates Membrane-Initiated Estrogen Signaling by Chaperoning Estrogen Receptor (ER)- α 36, a Variant of ER- α . *The American Journal of Pathology*, 177(2), 964–973. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2010.100061>.

Siegel y col., 2020. Cancer statistics, 2020. *CA. Cancer J. Clin.* 70, 7-30. DOI:10.3322/caac.21590.

Smith, M. T., Guyton, K. Z., Gibbons, C. F., Fritz, J. M., Portier, C. J., Rusyn, I., DeMarini, D. M., Caldwell, J. C., Kavlock, R. J., Lambert, P. F., Hecht, S. S., Bucher, J. R., Stewart, B. W., Baan, R. A., Coglianò, V. J., & Straif, K. (2016). Key Characteristics of Carcinogens as a Basis for Organizing Data on Mechanisms of Carcinogenesis. *Environmental Health Perspectives*, 124(6), 713–721. <https://doi.org/10.1289/ehp.1509912>

Steelman, L. S., Navolanic, P., Chappell, W. H., Abrams, S. L., Wong, E. W., Martelli, A. M., Cocco, L., Stivala, F., Libra, M., Nicoletti, F., Drobot, L. B., Franklin, R. A., & McCubrey, J. A. (2011). Involvement of Akt and mTOR in chemotherapeutic- and hormonal-based drug resistance and response to radiation in breast cancer cells. *Cell Cycle*, 10(17), 3003–3015. <https://doi.org/10.4161/cc.10.17.17119>.

T., R., W., B., F., N., & Xu, L. (2013). Drug Resistance and Molecular Cancer Therapy: Apoptosis Versus Autophagy. *Apoptosis*. <https://doi.org/10.5772/55415>.

Thorat, M. A., & Cuzick, J. (2017). Preventing invasive breast cancer using endocrine therapy. *The Breast*, 34, S47-S54. <https://doi.org/10.1016/j.breast.2017.06.027>.

Travis, R. C., & Key, T. J. (2003). Oestrogen exposure and breast cancer risk. *Breast Cancer Research*, 5(5). <https://doi.org/10.1186/bcr628>.

Van't Veer y col., 2002. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature* 415, 530-536. DOI:10.1038/415530a.

Yde, C. W., Emdal, K. B., Guerra, B., & Lykkesfeldt, A. E. (2012). NF κ B signaling is important for growth of antiestrogen resistant breast cancer cells. *Breast Cancer Research and Treatment*, 135(1), 67–78. <https://doi.org/10.1007/s10549-012-2053-1>.

Yeh, W. L., Shioda, K., Coser, K. R., Rivizzigno, D., McSweeney, K. R., & Shioda, T. (2013). Fulvestrant-Induced Cell Death and Proteasomal Degradation of Estrogen Receptor α Protein in MCF-7 Cells Require the CSK c-Src Tyrosine Kinase. *PLoS ONE*, 8(4), e60889. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.00608>

