



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

Evaluación de los efectos asociados a la proliferación celular y estrés oxidativo en células de cáncer de mama inducidos por nanopartículas de PLGA-LQM755

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

PRESENTA:
MVZ MARTÍNEZ ROSAS JOSELO RAMÓN

TUTOR PRINCIPAL

DRA. RAMÍREZ NOGUERA PATRICIA
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTILÁN

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

DRA. COBOS MARÍN LAURA
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
DRA. SALAZAR MARTÍNEZ ANA MARÍA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

Ciudad Universitaria, Cd. Mx.

Agosto 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DEDICATORIA

A Athela, Catrina, Chuca y Chuponcito

*“It is not about how much we lost,
it is about how much we have left”*
Russo Brothers

AGRADECIMIENTOS

Se agradece el financiamiento otorgado para la realización de este trabajo al proyecto PAPIIT *IN219715*

Se agradece el financiamiento otorgado para la realización de este trabajo al proyecto PAPIIME *PE102118*

Al Consejo nacional de ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo económico proporcionado durante la realización de estos estudios de posgrado bajo el número de Becario 829931

Agradezco el apoyo prestado por el staff de Vet & Med Care® para el entendimiento de las implicaciones clínicas y el alcance del proyecto, así como su apoyo logístico en tiempos de necesidad.

A la Dra. Patricia Ramírez Noguera, por permitirme trabajar en este proyecto de investigación y formar parte de su equipo de trabajo.

A los miembros del comité tutor, Dra. Laura Cobos Marín y Dra. Ana María Salazar, por sus observaciones y críticas constructivas que contribuyeron al avance del proyecto.

Al equipo de trabajo del laboratorio de Toxicología Celular, por su ayuda y enseñanzas durante estos dos años de posgrado.

A la Dra. Alma y al Dr. Abraham por su apoyo en el entendimiento de la caracterización de materiales por técnicas espectrofotométricas y en la caracterización de los sistemas que de este trabajo emanaron.

Al equipo del bioterio de los Laboratorios de Especialidades Inmunológicas, MVZ Adriana y a los Biólogos Oscar, Pedro y Juan por impulsarme a elegir este programa de maestría y estar al pendiente de mis avances.

A la M. en C. Denise Lobar (esperemos ya cDra. en C.) porque gran parte del éxito de este proyecto se deben a sus enseñanzas y supervisión hacia mi persona. #EquipoMCF7

A mi familia, por apoyarme incondicionalmente en cada una de los proyectos en los que me embarco.

RESUMEN

El cáncer es uno de los principales problemas de salud pública a nivel mundial. De acuerdo a datos de la Organización Mundial de la Salud, en 2018 se registraron 17 millones de nuevos casos y 9.6 millones de defunciones, con un costo total de 1.16 trillones de dólares; mientras que en México, se registraron 190 667 nuevos casos, de los cuales el 14.3% corresponden a cáncer de mama, padecimiento que afecta principalmente a la población femenina. En el ámbito de la medicina veterinaria, el cáncer de glándula mamaria es la principal neoplasia diagnosticada en pequeñas especies, con una incidencia anual del 16.8%, tan sólo en México.

En la actualidad, los protocolos de quimioterapia utilizados en el tratamiento contra el cáncer se encuentran asociados a la aparición de efectos adversos que ponen en riesgo la integridad del paciente; lo que hace imperativo el estudio de moléculas y sistemas de liberación novedosos, capaces de ejercer efectos terapéuticos que modifiquen, inhiban y/o reduzcan la actividad proliferativa en células cancerosas, y de reducir los efectos adversos asociados a la terapia convencional.

Por todo lo anterior, el principal objetivo de este trabajo es evaluar el efecto biológico asociado a la exposición de nanopartículas poliméricas conteniendo el compuesto derivado del ácido cinámico LQM755 sobre la línea celular MCF-7 como modelo *in vitro* de cáncer de mama. Nuestros resultados mostraron un efecto inhibitorio del metabolismo celular tras el uso de concentraciones iguales o mayores a 25µM de LQM755, lo cual se asocia a la presencia de la actividad transcripcional de PPARγ; además, se observó la disminución de los niveles basales del antígeno de proliferación celular Ki-67 sin la alteración del estado óxido-reducción celular. Lo anterior posiciona a este tipo de sistemas como una alternativa en el tratamiento del cáncer de mama y sienta las bases para la investigación del mecanismo de acción asociado a la modulación del metabolismo celular y su relación con otros eventos importantes en células transformadas.

Palabras Clave: Nanopartículas, LQM755, Cáncer de mama, MCF-7, PPAR gama, PLGA, Derivado del ácido cinámico

ABSTRACT

Cancer is one of the main public health issues worldwide. According to World Health Organization, in 2018 up to 17 million new cases and 9.6 million deaths were reported, with a total cost of 1.16 trillion US dollars; while in Mexico there were 190 667 new cases, of which 14.3% correspond to breast cancer, a condition that mainly affects the female population. In the field of Veterinary Medicine, the picture is not different; Mammary Gland Tumours are the main neoplasia diagnosed in small species, with an annual incidence of 16.8%, only in Mexico.

Currently, cancer chemotherapy has been associated with the appearance of adverse effects, risking patients integrity ; therefore, research of novel molecules and release systems capable of achieve therapeutic effect that modify, inhibit and/or reduce the proliferative activity in cancer cells and, at the same time, reduce adverse effects associated with conventional therapies is imperative.

The aim of this work is to evaluate the effect biological effect of LQM755 functionalization on polymeric nanoparticles over MCF-7 cell line, as an *in vitro* breast cancer model. Showing an inhibitory effect over cellular metabolism at equal or greater concentrations than 25 μ M of LQM755, which is associated with the PPAR γ transcriptional activity; in addition to the decrease on the proliferation antigen Ki -67 basal levels without effects on cellular redox balance. This results positions this kind of systems as an alternative on breast cancer treatment and lays out the foundations for research on the action mechanism associated to cellular metabolism modulation and its relationship with another hallmark on cancer cells.

Keywords: Nanoparticles, LQM755, Breast cancer, MCF-7, PPAR gamma, PLGA, Cinnamic acid derivative

CONTENIDO

LISTA DE CUADROS	VII
LISTA DE FIGURAS	VIII
ABREVIATURAS Y SIGLAS USADAS	IX
INTRODUCCIÓN	- 1 -
ANTECEDENTES	- 4 -
CÁNCER	- 4 -
PROLIFERACIÓN, CICLO CELULAR Y APOPTOSIS	- 5 -
METABOLISMO CELULAR Y BALANCE ÓXIDO-REDUCCIÓN	- 13 -
RECEPTORES ACTIVADORES DE PROLIFERACIÓN DE PEROXISOMAS	- 17 -
Regulación de la expresión de PPAR γ	- 18 -
Interacción entre PPAR γ y el cáncer	- 19 -
CÁNCER DE MAMA Y TUMORES DE GLÁNDULA MAMARIA	- 22 -
NUEVAS ESTRATEGIAS EN EL COMBATE CONTRA EL CÁNCER DE MAMA: NANOTECNOLOGÍA	- 24 -
DERIVADOS DEL ÁCIDO CINÁMICO COMO UNA NUEVA ESTRATEGIA CONTRA EL CÁNCER DE MAMA	- 28 -
JUSTIFICACIÓN	- 30 -
HIPÓTESIS	- 31 -
OBJETIVOS	- 31 -
OBJETIVO GENERAL	- 31 -
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	- 31 -
MATERIAL Y MÉTODOS	- 32 -
REACTIVOS	- 32 -
DERIVADO DEL ÁCIDO CINÁMICO: 3,4-DICLOROBENCILFENOXICILAMIDA (LQM755)	- 32 -
NANOPARTÍCULAS DE ÁCIDO POLILÁCTICO-GLICÓLICO – 3,4-DICLOROBENCILFENOXICILAMIDA (PLGA-LQM755 NPs)	- 32 -
ESTABLECIMIENTO Y MANTENIMIENTO DE LÍNEA CELULAR MCF-7	- 33 -
OBSERVACIÓN DE LA INTERNALIZACIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS DE PLGA-LQM755 EN LA LÍNEA MCF-7	- 33 -
EVALUACIÓN DEL EFECTO CITOTÓXICO DE LAS NANOPARTÍCULAS DE PLGA-LQM755 EN LA LÍNEA CELULAR DE CÁNCER DE MAMA MCF-7	- 34 -

DETERMINACIÓN DE LA INFLUENCIA DEL RECEPTOR NUCLEAR PPAR GAMA SOBRE EL EFECTO CITOTÓXICO DE LAS NANOPARTÍCULAS DE PLGA-LQM755 EN LA LÍNEA MCF-7	- 35 -
INFLUENCIA DE LAS NANOPARTÍCULAS DE PLGA-LQM755 SOBRE EL ESTADO ÓXIDO-REDUCCIÓN EN LA LÍNEA MCF-7: CONTENIDO DE GSH TOTAL, ENSAYO DE LIPOPEROXIDACIÓN Y GENERACIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO	- 35 -
EFECTOS DE LA EXPOSICIÓN A NANOPARTÍCULAS DE PLGA-LQM755 SOBRE LA PROLIFERACIÓN CELULAR EN LA LÍNEA MCF7: EVALUACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DEL ANTÍGENO DE PROLIFERACIÓN CELULAR KI-67	- 37 -
ESTIMACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA	- 37 -
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	- 37 -
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	- 38 -
CONCLUSIONES	- 61 -
PERSPECTIVAS	- 63 -
REFERENCIAS	- 66 -
ANEXOS	- 77 -
ANEXO 1: ESTÁNDAR ÁCIDO CINÁMICO (NIST, EUA). ESPECTRO FTIR	- 78 -
ANEXO 2: 3,4-DICLOROBENCIL-P-FENOXICILAMIDA (LQM755). ESPECTRO FTIR	- 79 -
ANEXO 3: DETERMINACIÓN ESPECTROFOTOMÉTRICA DE LA EFICIENCIA DE CAPTURA DE LQM755	- 80 -
DETERMINACIÓN DE LA LONGITUD DE ONDA DE LQM755	- 80 -
DETERMINACIÓN DE LA EFICIENCIA DE CAPTURA DE LQM755 EN ACETONITRILLO	- 80 -

LISTA DE CUADROS

CUADRO 1. TIPOS DE MUERTE CELULAR REGULADA.	- 10 -
CUADRO 2. PRINCIPALES TIPOS DE NANOPARTÍCULAS CON APLICACIONES CLÍNICAS.	- 26 -
CUADRO 3. BANDAS DE INTERFERENCIA ENCONTRADAS ENTRE EL ESTÁNDAR DE ÁCIDO CINÁMICO Y EL COMPUESTO LQM755	- 39 -
CUADRO 4. CARACTERÍSTICAS DE TAMAÑO, CONCENTRACIÓN Y EFICIENCIA DE CAPTURA DE LOS DIFERENTES SISTEMAS DE NANOPARTÍCULAS ANALIZADOS.	- 40 -
CUADRO 5. DETERMINACIÓN DE VALOR MÁXIMO DE ABSORBANCIA DEL COMPUESTO LQM755 POR ESPECTROFOTOMETRÍA UV-VIS	- 80 -
CUADRO 6. CURVA DE CONCENTRACIÓN DE LQM755 A λ 325NM.	- 81 -

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. EFECTO DE LOS NIVELES INTRACELULARES DE ROS EN CÁNCER.	- 15 -
FIGURA 2. ESTRUCTURA QUÍMICA DEL ÁCIDO POLI LÁCTICO-GLICÓLICO.	- 27 -
FIGURA 3. ESTRUCTURA QUÍMICA DEL ÁCIDO CINÁMICO (CA).	- 28 -
FIGURA 4. CONCENTRACIÓN (NP/ML) DE LOS DIFERENTES SISTEMAS ANALIZADOS.	- 41 -
FIGURA 5. DISPERSIÓN DE LAS DIFERENTES POBLACIONES DE NANOPARTÍCULAS PRESENTES EN CADA UNO DE LOS SISTEMAS ANALIZADOS POR NTS.	- 41 -
FIGURA 6. TAMAÑO DE NANOPARTÍCULA (NM) DE LOS DIFERENTES SISTEMAS ANALIZADOS.	- 42 -
FIGURA 7. PORCENTAJE DE EFICIENCIA DE CAPTURA DE LOS DIFERENTES SISTEMAS ANALIZADOS.	- 43 -
FIGURA 8. DISTRIBUCIÓN DE LA POBLACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DENTRO DEL SISTEMA PLGA – LQM755 – RHO 123 NPS, ANALIZADO MEDIANTE NTS.	- 44 -
FIGURA 9. INTERNALIZACIÓN DEL SISTEMA DE NANOPARTÍCULAS PLGA - LQM755 - RHO 123 EN LA LÍNEA CELULAR DE CÁNCER DE MAMA MCF-7.	- 45 -
FIGURA 10. INTENSIDAD DE FLUORESCENCIA DE LAS SEÑALES EMITIDAS POR EL NÚCLEO CELULAR (DAPI) Y PLGA – LQM755 NPS (RHO 123).	- 47 -
FIGURA 11. INTENSIDAD DE FLUORESCENCIA DE LA SEÑAL EMITIDA POR EL SISTEMA PLGA – LQM755 NPS MARCADO CON RHO123.	- 47 -
FIGURA 12. EVALUACIÓN DEL EFECTO CITOTÓXICO ASOCIADO A LA EXPOSICIÓN DURANTE 24H DEL SISTEMA PLGA – LQM755 NPS EN LA LÍNEA CELULAR MCF-7 POR EL ENSAYO DE REDUCCIÓN DE RESAZURINA	- 49 -
FIGURA 13. EVALUACIÓN DEL EFECTO CITOTÓXICO ASOCIADO A LA EXPOSICIÓN DURANTE 24H DEL SISTEMA PLGA NPS EN LA LÍNEA CELULAR MCF-7 POR EL ENSAYO DE REDUCCIÓN DE RESAZURINA.	- 50 -
FIGURA 14. EVALUACIÓN DEL EFECTO CITOTÓXICO ASOCIADO A LA EXPOSICIÓN DURANTE 24H DEL SISTEMA PLGA – LQM755 NPS EN LA LÍNEA CELULAR MCF-7 POR EL ENSAYO DE INCLUSIÓN DE CRISTAL VIOLETA.	- 51 -
FIGURA 15. EVALUACIÓN DE LA INHIBICIÓN DEL EFECTO CITOTÓXICO ASOCIADO A LA EXPOSICIÓN DURANTE 24H DEL SISTEMA PLGA – LQM755 NPS EN LA LÍNEA CELULAR MCF-7, MEDIADA POR EL BLOQUEO DE LA ACTIVIDAD TRANSCRIPCIONAL DEL RECEPTOR NUCLEAR PPAR γ , EVALUADO MEDIANTE EL ENSAYO DE REDUCCIÓN DE REZASURINA.	- 53 -
FIGURA 16. CONCENTRACIÓN DE GSH TOTAL (μ M/MG DE PROTEÍNA) DEBIDO A LA EXPOSICIÓN DURANTE 24 H DE LOS SISTEMAS DE NANOPARTÍCULAS PLGA-LQM755 NPS Y PLGA-NPS A CONCENTRACIONES DE 2×10^9 Y 2×10^{10} NP/ML.	- 55 -
FIGURA 17. CONCENTRACIÓN DE ESPECIES REACTIVAS AL ÁCIDO TIOBARBITÚRICO (TBARS) EXPRESADA COMO μ M DE MDA/MG DE PROTEÍNA ASOCIADA A LA EXPOSICIÓN DURANTE 24H DE LOS SISTEMAS DE NANOPARTÍCULAS PLGA – LQM755 NPS Y PLGA – NPS A CONCENTRACIONES DE 2×10^9 Y 2×10^{10} NP/ML.	- 56 -
FIGURA 18. NIVELES DE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO (ROS) DEBIDOS A LA EXPOSICIÓN DE LOS SISTEMAS DE NANOPARTÍCULAS PLGA-LQM755 NPS Y PLGA-NPS DURANTE 24H A CONCENTRACIONES DE 2×10^9 Y 2×10^{10} NP/ML.	- 57 -
FIGURA 19. PORCENTAJE DE CONCENTRACIÓN DEL ANTÍGENO DE PROLIFERACIÓN CELULAR KI-67DEBIDO A LA EXPOSICIÓN DE LOS SISTEMAS DE NANOPARTÍCULAS PLGA-LQM755 NPS Y PLGA-NPS DURANTE 24H A CONCENTRACIONES DE 2×10^9 Y 2×10^{10} NP/ML.	- 59 -
FIGURA 20. ESTÁNDAR NIST DE ÁCIDO CINÁMICO. ESPECTRO FTIR	- 78 -
FIGURA 21. 3, 4 - DICLOROBENCIL P FENOXILCINAMIDA (LQM755). ESPECTRO FTIR.	- 79 -
FIGURA 22. CURVA DE CONCENTRACIÓN DE LQM755 (μ G/ML) A λ 325NM.	- 81 -

ABREVIATURAS Y SIGLAS USADAS

6IL	6-IODOLACTONA
$^1\text{O}_2$	OXÍGENO SINGLETE
ADN	ÁCIDO DESOXIRIBONUCLEICO
AF2	DOMINIO ACTIVADOR DE FUNCIÓN 2
AIF	FACTOR INDUCTOR DE APOPTOSIS
Akt	PROTEÍNA CINASA B
AMPK	PROTEÍNA CINSASA ACTIVADA POR AMP
ARE	ELEMENTOS DE RESPUESTA A ANTIOXIDANTES
ARN	ÁCIDO RIBONUCLEICO
ATRA	ÁCIDO TRANSRETINÓICO
BADGE	BISFENOL A DIGLICIDIL ÉTER
CA	ÁCIDO CINÁMICO
CAD	DERIVADO DEL ÁCIDO CINÁMICO
CAT	CATALSA
CDK	CINASA DPENDIENTE DE CICLINA
C/EBP β	CCAAT/ PROTEÍNA <i>ENHANCER</i> DE UNIÓN β
CKII	CASEINA CINASA 2
CMC	CARCINOMA MAMARIO CANINO
CNA	ANORMALIDADES EN EL NÚMERO DE COPIAS
DAPI	4',6-DIAMIDINO-2-FENILINDOL
DCFH-DA	2,7-DICLOROFLUORESCÉINA DIACETATO
DISC	COMPLEJO SEÑALIZADOR INDUCTOR DE MUERTE
DMEM	MEDIO EAGLE MODIFICADO POR DULBECCO
DTNB	ÁCIDO 5,5'-DITIOBIS 2-NITROBENZOICO
EDTA	ÁCIDO ETILENDIAMINOTETRACÉTICO
ELISA	ENSAYO DE INMUNOADSORCIÓN LIGADO A ENZIMAS
EMT	TRANSICIÓN EPITELIO-MESOTELIAL
EpRE	ELEMENTOS DE RESPUESTA ELETROFÍLICA
ER	RECEPTOR DE ESTRÓGENOS
FADD	DOMINIO DE MUERTE ASOCIADO A Fas
FESC	FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
FTIR	INFRARROJO POR TRANSFORMADA DE FOURIER
G6P	GLUCOSA 6 FOSFATO
GCL	GLUTAMATO-CISTEÍNA LIGASA
GDL	GLUTAMATO-CISTEÍNA LIGASA
GOT	GLUTAMATO-OXALATO TRANSAMINASA

GPX	GLUTAMATO PEROXIDASA
GSH	GLUTATIÓN
GST	GLUTAMATO S TRANSFERASA
h	HORA
H ₂ O ₂	PERÓXIDO DE HIDRÓGENO
HOCl	ÁCIDO HIPOCLOROSO
IC ₅₀	CONCENTRACIÓN INHIBITORIA 50
JNK	CINASA TERMINAL c-JUN
KIP	PROTEÍNA INHIBIDORA DE CINASAS
LMP	PERMEABILIZACIÓN DE LA MEMBRANA LISISOMAL
LOX	LIPOXIGENASA
LQM755	3,4-DICLOROBENCIL- <i>P</i> -FENOXICILAMIDA
M	MOLAR
MAPK	PROTEÍNA CINASA ACTIVADA POR MITÓGENOS
MARE	ELEMENTOS DE RECONOCIMIENTO Maf
MDM2	PROTEÍNA <i>MURINE DOUBLE MINUTE 2</i>
mg	MILIGRAMO
MIF	FACTOR INHIBITORIO DE MIGRACIÓN
min	MINUTO
mL	MILILITRO
mM	MILIMOLAR
MOMP	PERMEABILIZACIÓN DE LA MEMBRANA EXTERNA MITOCONDRIAL
MPT	TRANSICIÓN DE PERMEABILIDAD MITOCONDRIAL
mTOR	PROTEÍNA 1 DE UNIÓN FK506 ASOCIADA A 12-RAMPAMICINA
N ₂ O ₂	DIÓXIDO DINITRÓGENO
NADPH	NICOTIAMIDA ADENINA DINUCLEÓTIDO FOSFATO
nm	NANOMETRO
NO	ÓXIDO NÍTRICO
NO ₂	ION NITRONIO
NP	NANOPARTÍCULA
NTS	SISTEMA DE SEGUIMIENTO DE NANOPARTÍCULAS
O ₂	SÚPER ÓXIDO
O ₂ NOCO ₂	ANIÓN NITROSOPERCABONATO
O ₃	OZONO O TRIOXÍGENO
OH	RADICAL HIDRÓXILO
ONO	PERÓXINITRITO
PAOP	PRODUCTOS AVANZADOS DE LA OXIDACIÓN DE PROTEÍNAS
PBMC	CÉLULA MONONUCLEAR DE SANGRE PERIFÉRICA

PDK	PIRUVATO DESHIDROGENAS CINASA
PI3K	FOSFATIDIL INOSITOL 3 CINASA
PIP2	FOSFATIDIL INOSITOL 2 FOSFATO
PIP3	FOSFATIDIL INOSITOL 3 FOSFATO
PKC	PROTEÍNA C CINASA
PLGA	ÁCIDO POLILÁCTICO-GLICÓLICO
PPAR	RECEPTOR ACTIVADOR DE LA PROLIFERACIÓN DE PEROXISOMAS
PPP	VÍA DE PENTOSA FOSFATO
PPRE	ELEMENTOS DE RESPUESTA A PPAR
PR	RECEPTOR DE PROGESTERONA
PTEN	FOSFATIDILINOSITOL-3,4,5-TRISFOSFATO 3-FOSFATASA
PVA	POLIVINIL ALCOHOL
R	RADICALES ORGÁNICOS
Rb	RETINOBLASTOMA
RCD	MUERTE CELULAR REGULADA
RHO 123	RODAMINA 123
RO	RADICALES ALCOXIL
ROO	RADICALES PERÓXIDO
ROOH	HIPERÓXIDOS ORGÁNICOS
ROS	ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO
rpm	REVOLUCIONES POR MINUTO
RS	RADICALES THYL
RSOO	RADICALES THYL PEROXIL
RSSR	RADICALES DISULFIDOS
RTK	RECEPTOR TIROSIN-CINSA
RXR	RECEPTOR DE ÁCIDO RETINÓICO
SDF	FACTOR DERIVADO DE CÉLULAS DEL ESTROMA
SOD	SÚPER ÓXIDO DISMUTASA
TBA	ÁCIDO TIOBARITÚRICO
TBARS	ESPECIES REACTIVAS AL ÁCIDO TIOBARBITÚRICO
TCA	CICLO DEL ÁCIDO TRICARBOXÍLICO
TNF	FACTOR DE NECROSIS TUMORAL
TRADD	DOMINIO DE MUERTE ASOCIADO A TNT
TRO	TIOGLINDAZOL
TZD	TIAZOLIDINEDIONAS
UI	UNIDADES INTERNACIONALES
UNAM	UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
UV-VIS	ESPECTRO DE LUZ ULTRAVIOLETA-VISIBLE

WHO	ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD
WS	SOLUCIÓN DE TRABAJO
μL	MICROLITRO
μM	MICROMOL

INTRODUCCIÓN

El cáncer de mama es un padecimiento caracterizado por el crecimiento incontrolado de células malignas en el tejido mamario. Existen dos tipos principales de cáncer de mama: adenocarcinoma ductal (el más frecuente, que comienza en los conductos que llevan la leche desde la mama hasta el pezón; y adenocarcinoma lobular que tiene como origen los lóbulos donde se producen la leche (American Cancer Society, 2017).

En México, el cáncer de mama es considerado la principal causa de muerte por cáncer en la población femenina (Secretaría de Salud, 2015), presentándose 2981 nuevos casos en mujeres y 60 en varones desde enero hasta abril de 2017, en donde la Ciudad de México obtiene el primer lugar con un reporte de 369 casos (Dirección General de Epidemiología, 2017); mientras que en medicina veterinaria el panorama nacional no dista demasiado, en pequeñas especies los tumores de la glándula mamaria se consideran una de las neoplasias más comúnmente presente en hembras enteras o esterilizadas después del segundo estro (De la Cruz Hernández et al., 2017; Fajardo, Alpízar, Pérez, Martínez, & Córdova, 2013; Salas, Márquez, Díaz, & Romero, 2015), con el 50% de los casos identificados como de carácter maligno (Gama & Schmitt, 2012; D. Liu et al., 2014) y una predisposición por origen epitelial o una combinación de tejidos epitelial y mesenquimal (Salas et al., 2015; Sleenckx, de Rooster, Veldhuis Kroeze, Van Ginneken, & Van Brantegem, 2011).

Debido a su cercanía como animal de compañía y a una exposición similar a la presente en humanos hacia agentes carcinogénicos, se han encontrado homologías importantes en este tipo de cáncer entre ambas especies, reportándose semejanzas de carácter histológico, genético e inclusive epigenético, como la expresión de E-Caderina (Gama & Schmitt, 2012; D. Liu et al., 2014), o la presencia de homólogos a ErbB-2; donde la sobre expresión de este último se encuentra directamente relacionada con el grado de malignidad del cáncer de mama (Singer et al., 2012), sugiriendo la utilización de un modelo canino para el estudio de éste tipo de cáncer (D. Liu et al., 2014; Rivera & von Euler, 2011; Singer et al., 2012).

En la actualidad, el principal tratamiento para este tipo de tumores es la escisión quirúrgica, la cual se encuentra limitada por el tamaño y localización del tumor, así como del estado de salud del paciente. Actualmente el uso de quimioterapéuticos en medicina veterinaria, como en humana, se ha reservado como un tratamiento adyuvante a la cirugía o de paliativo en casos de metástasis avanzada, con el riesgo de toxicidad asociado (Shapiro & Recht, 2001; Sleenckx et al., 2011); por lo que una de las nuevas propuestas para la administración de agentes antineoplásicos es el uso de medios de transporte selectivos de sustancias con actividad biológica, como las nanopartículas, que permitan la interacción del fármaco a nivel molecular, logrando un incremento en la eficacia del compuesto mientras protege al tejido sano de la exposición con el agente citotóxico (Brannon-Peppas & Blanchette, 2012; Yezhelyev et al., 2006).

Dentro de los compuestos utilizados para la construcción de nanopartículas, el ácido poliláctico-glicólico (PLGA) es ampliamente recomendado en el diseño de vehículos para la liberación continua de fármacos administrados por vía parenteral debido a sus características de alta biocompatibilidad y estabilidad; además, la degradación de las nanopartículas de PLGA es realizada a nivel celular por hidrólisis, generando monómeros de ácido láctico y ácido glicólico, los cuales son metabolizados vía ciclo de Krebs y desechados como agua y dióxido de carbono, lo que se traduce en una toxicidad sistémica mínima (Tabatabaei Mirakabad et al., 2014).

Diversos estudios han demostrado la capacidad de compuestos derivados del ácido cinámico de ejercer un efecto antitumoral. El ácido cinámico es un ácido graso aromático de baja toxicidad que actúa como ligando del receptor nuclear de activación de proliferación de peroxisomas – isoforma gama (PPAR γ), la más abundante en glándula mamaria. Este receptor nuclear juega un papel importante en el control de la diferenciación celular y desarrollo de cáncer mediante el control y mantenimiento de las señales proliferativas (Abduljabbar et al., 2015; Fröhlich & Wahl, 2015); mientras que su sobreexpresión debida a la acción de compuestos agonistas al receptor, como las tiazolidinedionas y derivados del ácido cinámico, induce un efecto supresor tumoral al

inhibir la angiogénesis e inducir la apoptosis; efectos usualmente asociados al incremento en las concentraciones de especies reactivas de oxígeno (Fröhlich & Wahl, 2015; Xu et al., 2016)

Si bien, el estrés oxidativo se encuentra ampliamente relacionado con el desarrollo del cáncer y su progresión, se ha encontrado que la desregulación del estado óxido-reducción en células transformadas mediante el uso de agentes pro-oxidantes provoca el colapso de los sistemas antioxidantes desencadenando la muerte celular (Rajendra Prasad, Karthikeyan, Karthikeyan, & Venkata Reddy, 2011).

Por todo lo anterior, el objetivo general de este estudio es evaluar los efectos *in vitro* asociados a la exposición de nanopartículas de PLGA que contienen el compuesto LQM755, un compuesto derivado del ácido cinámico, en la línea celular MCF-7 de cáncer de mama estimando cambios en la proliferación celular y en la concentración de biomarcadores asociados al estado óxido – reducción celular, como un primer paso para su consideración como una alternativa en la propuesta de nuevas estrategias en el tratamiento contra el cáncer de glándula mamaria.

ANTECEDENTES

CÁNCER

El cáncer es definido por la Organización Mundial de la Salud (WHO) como un proceso de crecimiento y diseminación descontrolado de células que puede ocurrir en cualquier parte del cuerpo (World Health Organization, 2018); a nivel celular, se entiende como la disrupción en el comportamiento social de las células asociado a cambios dinámicos en el genoma (mutaciones), que generan la aparición de al menos tres propiedades heredables: i) la capacidad de reproducción en contra de los mecanismos normales de control del crecimiento y división celular, ii) la habilidad de invadir y colonizar sitios ajenos a su estirpe celular, iii) la evasión de los mecanismos de muerte celular regulada (RCD) (Alberts et al., 2015; Hanahan & Weinberg, 2000; Valdespino-Castillo et al., 2014).

Para el entendimiento de la alta diversidad de alteraciones en los mecanismos celulares involucrados en la aparición y desarrollo del cáncer, en un inicio se propuso la agrupación del conocimiento sobre este padecimiento en categorías capaces de describir la adquisición y permanencia de las características que permiten a las células cancerosas sobrevivir, proliferar y diseminarse; generando así seis ejes principales para el estudio del cáncer: i) evasión de los mecanismos de supresión del crecimiento, ii) activación de mecanismos de invasión y metástasis, iii) permisión de la replicación celular indefinida, iv) angiogénesis, v) mantenimiento de las señales de proliferación celular y vi) evasión de los mecanismos de muerte celular (Hanahan & Weinberg, 2000). Investigaciones posteriores han demostrado que no sólo la presencia de cambios en el genoma es necesaria para la progresión del padecimiento, sino que existe una compleja interacción entre las células circundantes y las células transformadas (cancerosas), conocida como microambiente tumoral (Alberts et al., 2015), por lo que a la luz de estos nuevos avances, se ha propuesto la adición de dos nuevas características que permiten la adquisición de las seis características anteriormente mencionadas: inestabilidad genética y mutación, e inflamación como factor promotor de tumorigénesis; y de dos nuevas características de importancia funcional para el desarrollo

del cáncer: Disrupción del metabolismo energético celular, y la evasión del sistema inmune (Hanahan & Weinberg, 2011). Siendo el avance en el conocimiento de estas características motor en la búsqueda de nuevas estrategias para predecir, diagnosticar y tratar este padecimiento; centrando la investigación en novedosas alternativas terapéuticas que tengan como blanco el balance entre los mecanismos celulares de proliferación, apoptosis y su interconexión con el metabolismo celular en células transformadas (Elstner et al., 2002; Vander Heiden & DeBerardinis, 2017).

Proliferación, Ciclo celular y Apoptosis

Dentro de la complejidad y singularidad de cada tipo de cáncer existe un limitado número de eventos críticos que impulsan la transformación de una célula y su progenie hacia la adquisición de las capacidades de crecimiento descontrolado e invasión; uno de estos eventos es la desregulación de la proliferación celular, que junto a la supresión de los mecanismos de apoptosis, fundamentan las bases necesarias para la progresión tumoral (Evan & Vousden, 2001; Hanahan & Weinberg, 2011).

Cada una de las vías que controlan la respuesta proliferativa en células normales, se encuentran perturbadas en la mayoría de las células transformadas, ya sea debido al mantenimiento de señalización proliferativa y/o por la supresión de señales anti proliferativas, conduciendo a la alteración en la expresión y/o actividad de proteínas relacionadas con el ciclo celular (Evan & Vousden, 2001; Feitelson et al., 2015; Hanahan & Weinberg, 2011).

El ciclo celular comprende una serie de eventos ordenados dentro de la célula necesarios para la duplicación de su contenido y división, comprendiendo dos fases: Fase M e Interfase (Alberts et al., 2015; Vermeulen, Bockstaele, & Berneman, 2003). En células eucariotas, el intervalo entre una mitosis y otra (interfase) es dividido en tres etapas: i) G1, periodo que comprende entre el final de una mitosis y el inicio de la síntesis de ADN, en donde existe crecimiento celular junto a la síntesis de proteínas y ARN necesarios para la posterior síntesis de ADN, ii) S, etapa en la que sucede la replicación del material genético y iii) G2,

última etapa de crecimiento celular previo a la mitosis (Alberts et al., 2015; Valdespino-Castillo et al., 2014; Vermeulen et al., 2003).

El paso de una etapa del ciclo celular a otra es controlado por una familia de proteínas serina/treonina cinasa conocida como cinasas dependientes de ciclina (CDKs), las cuales son moduladas por diversos activadores, ciclinas, e inhibidores como la proteína p21, proteínas inhibidoras de cinasas (KIPs) p27 y p57 y los inhibidores de CDK4 INK4s, p16, p15, p18 y p19 (Alberts et al., 2015; Feitelson et al., 2015; Malumbres & Barbacid, 2009; Vermeulen et al., 2003); siendo la fase G1, la única etapa del ciclo celular en el que la célula es sensible a señalización extracelular, y donde la progresión del ciclo celular depende del balance entre señales pro y antiproliferativas, entendiendo que en presencia de señales permisivas, la progresión hacia fase S se lleva a cabo; mientras que la respuesta a una señal represora, provoca el arresto de la célula en fase G1 (Feitelson et al., 2015).

De esta manera, el cáncer se puede interpretar como una alteración del ciclo celular en la que existe una disrupción en el seguimiento de estas señales debido a alteraciones genéticas y epigenéticas dentro de la célula, las cuales pueden ocurrir en dos clases de genes: protooncogenes y genes supresores de tumor. Dentro de los mecanismos genéticos responsables de estas alteraciones se encuentran la delección cromosomal, mutación e inactivación o pérdida de efectores *upstream* o *downstream*; mientras que los mecanismos epigenéticos incluyen metilación del ADN y metilación/acetilación de histonas (Alberts et al., 2015; Arbiser et al., 2015; Feitelson et al., 2015; Vermeulen et al., 2003).

Esta capacidad adquirida de mantener la señalización proliferativa y evadir la supresión del crecimiento celular puede ocurrir de diferentes maneras: mediante la producción de ligandos de factores de crecimiento, lo que resulta en una estimulación proliferativa autocrina; la afectación de moléculas intermediarias de la transducción de señal de un mitógeno a su blanco intracelular; estimulación de células del estroma tumoral para la liberación de factores de crecimiento; incremento de los niveles de receptores expuestos en la membrana celular, al volver las células híper-responsivas a factores de crecimiento, o alteración de la estructura de los receptores para que sean más sensibles a los ligandos y/o

permita la activación del receptor independiente al ligando; activación de componentes de las vías de señalización que operan cadena abajo de éstos receptores; y por defectos en puntos de control del ciclo celular (Evan & Vousden, 2001; Feitelson et al., 2015; Hanahan & Weinberg, 2011).

Dentro de las alteraciones más comúnmente presentes en los puntos de control del ciclo celular asociadas al mantenimiento de un estado proliferativo en células cancerosas se encuentran las asociadas a la mutación del gen CDKN2A y a la pérdida de la función de las proteínas codificadas por el mismo, las proteínas p16 y p14^{ARF}; así como las debidas a la inhibición de la función de p53 y de la actividad de PTEN (Arbiser et al., 2015). La ausencia de la función de p16 deriva en la activación sin restricciones de la cinasa dependiente de ciclinas CDK4/6 que al fosforilar a la proteína Rb, activa la transcripción de genes para el avance del ciclo celular mediada por E2F; mientras que la falta de p14^{ARF}, supone la activación sin interrupciones de MDM2, incrementando la ubiquitinización y degradación de p53, ejerciendo efectos similares a su pérdida (Arbiser et al., 2015; Feitelson et al., 2015; Hanahan & Weinberg, 2011).

La familia de supresores tumorales p53 consta de tres miembros, p53, p63 y p73, que comparten funciones anticrecimiento como arresto del ciclo celular, apoptosis y reparación del ADN, al recibir señales de sensores de estrés y anormalidades que actúan junto al sistema operativo intracelular; esta familia de proteínas puede inducir el arresto celular bajo condiciones subóptimas de nucleótidos, glucosa, oxígeno o señales promotoras del crecimiento, hasta su normalización, y activar los mecanismos de apoptosis en presencia de un daño irreparable o que supere la capacidad de los sistemas de reparación (Arbiser et al., 2015; Hanahan & Weinberg, 2011). Por lo que alteraciones en su función supone la pérdida de puntos de control del ciclo celular, de la capacidad de la célula de entrar en arresto celular y reparación de errores o daños en el ADN, la acumulación de mutaciones e inestabilidad genética y la sobrevivencia de células con mutaciones (Arbiser et al., 2015; Hanahan & Weinberg, 2011)

La vía de señalización PI3K/Akt/mTOR juega un papel central en los procesos de proliferación, diferenciación, migración, metabolismo, angiogénesis y supervivencia en células transformadas. Su activación es mediada por la fosforilación del dominio intracelular de un receptor tipo tirosina cinasa (RTK) y posterior reclutamiento y activación de PI3K, catalizando la fosforilación de PIP2 en PIP3, sirviendo como sitio de anclaje para dos serina/treonina cinasa con dominios PH (Alberts et al., 2015; Feitelson et al., 2015; Li et al., 2016).

PIP3 actúa como segundo mensajero reclutando Akt y PDK, produciendo la activación de AKT debido a su fosforilación en Thr308 y Ser473 por PDK y mTORC2, respectivamente; una vez activo, Akt fosforila varias proteínas blanco en la membrana plasmática, en el citosol y en el núcleo; tal es el caso de la respuesta *downstream* mediada por mTORC1 al inhibir la actividad de Tsc1/2, iniciando la vía de señalización mediada por mTORC1 que involucra la fosforilación de la proteína ribosomal S6 cinasa (pS6k), factor de iniciación eucariótico 4E (eIF4E) y proteína 1 de unión al factor de iniciación eucariótico (4EBp1), proteínas que participan en la translación de proteínas, biogénesis de ribosomas, así como en el crecimiento celular (Alberts et al., 2015; Hanahan & Weinberg, 2011; Li et al., 2016).

Dentro de la vía de señalización de PI3K, otra molécula importante es la PTEN fosfatasa que funciona como un regulador crítico de la señalización de la vía de PI3K/Akt/mTOR, al ejercer una regulación negativa debido a su acción de fosfatasa sobre el producto de la actividad de PI3K, PIP3; por lo que la pérdida o inactivación de PTEN, común en varios tumores sólidos, puede llevar a una continua activación de la vía de señalización de PI3K/Akt/mTOR, promoviendo la proliferación celular, la transición epitelio-mesotelial (EMT) y la resistencia terapéutica (Arbiser et al., 2015; Feitelson et al., 2015; Hanahan & Weinberg, 2011; Li et al., 2016).

Durante este proceso de proliferación y/o crecimiento desmedido, las células transformadas se exponen a una amplia variedad de condiciones hostiles, como suplementación insuficiente de factores de crecimiento, oxígeno y otros nutrientes;

situaciones en las que la célula generalmente activaría programas que inducen el arresto celular, la apoptosis y otros tipos de muerte celular regulada (Arbiser et al., 2015).

La muerte celular regulada (RCD) es un proceso ordenado y coordinado destinado a la eliminación de células irreversiblemente dañadas, potencialmente peligrosas o innecesarias; clasificado con base en sus características morfológicas, genéticas, bioquímicas y funcionales como: apoptosis extrínseca e intrínseca; necrosis debido a transición de la permeabilidad mitocondrial (MPT-driven necrosis); necroptosis; ferroptosis; piroptosis; partánatos; muerte celular entotica; muerte celular NETotica; muerte celular dependiente de lisosoma; muerte celular dependiente de autofagia; y muerte celular inmunogénica (Cuadro 1); siendo desencadenada en dos posibles escenarios: en ausencia de cualquier perturbación exógena ambiental, es decir, operando como un efector perteneciente a programas fisiológicos para el desarrollo o reemplazo de tejido; o debido a perturbaciones en el microambiente intra o extracelular tan intensas o prolongadas que la respuesta adaptativa de la célula es insuficiente para lidiar con el estrés generado y restaurar la homeostasis celular (Galluzzi et al., 2018).

En células tumorales, la alteración de la señalización del RCD de tipo apoptótico y, en particular, la activación de un sistema anti-apoptótico lo que les permite escapar a estos tipos de programación celular, permitiendo la proliferación descontrolada que conduce a la supervivencia del tumor (Hanahan & Weinberg, 2011; Mohammad et al., 2015; Wong, 2011).

Tipo RCD	Definición
Apoptosis extrínseca	Variante específica de RCD iniciada por perturbaciones en el microambiente extracelular detectado por receptores en la membrana plasmática, propagada a través de CASP8 y ejecutada por caspasas efectoras, principalmente CASP3.
Apoptosis intrínseca	Tipo de RCD iniciada por perturbaciones en el microambiente intra y extracelular, debido a la permeabilización de la membrana externa mitocondrial (MOMP) y ejecutada por caspasas efectoras, principalmente CASP3.
Necrosis debido a transición de la permeabilidad mitocondrial	Forma específica de RCD activada por perturbaciones en el microambiente intracelular, dependiente de CYPD.

(MPT – driven necrosis)	
Necroptosis	Modalidad de RCD activada por perturbaciones de la homeostasis extra e intercelular que depende críticamente de MLKL, RIPK3 y en la actividad de cinasa de RIPK1.
Ferroptosis	Forma de RCD iniciada por perturbaciones oxidativas del microambiente celular que se encuentra bajo control constitutivo de GPX4 y que puede ser inhibida por quelantes de hierro y antioxidantes lipofílicos.
Piroptosis	Tipo de RCD que depende críticamente de la formación de poros en la membrana plasmática por proteínas pertenecientes a la familia de la gasdermina, usualmente a consecuencia de activación inflamatoria de caspasas.
Partánatos	Modalidad de RCD iniciada por la hiperactivación de PARP1 y acelerada por la consecuente catástrofe bioenergética asociada a la degradación del ADN dependiente de AIF y MIF.
Muerte celular entotica	Tipo de RCD que se origina a partir de la internalización célula – célula (entosis) dependiente de actomiosina y llevada a cabo por lisosomas.
Muerte celular NETotica	Modalidad de RCD dependiente de ROS, restringida únicamente a células de la línea hematopoyética y asociada con la extrusión de NET.
Muerte celular dependiente de lisosoma	Tipo de RCD debido a la permeabilización de la membrana lisosomal (LMP) y ejecutada por catepsinas, con opcional involucramiento de MOMP y caspasas.
Muerte celular dependiente de Autofagia	Forma de RCD que mecánicamente depende de la maquinaria de autofagia o de sus componentes.
Muerte celular inmunogénica	Forma de RCD que es suficiente para activar una respuesta inmune adaptativa en un hospedador inmunocompetente.

Cuadro 1. Tipos de muerte celular regulada. Adaptado de Galluzzi, 2018. (Galluzzi et al., 2018)

La Apoptosis, es un tipo de muerte celular regulada que ocurre en respuesta a estímulos internos o externos debidos a perturbaciones en el microambiente celular que tiene efecto sobre receptores presentes en la membrana plasmática o a través de señalización mitocondrial (Galluzzi et al., 2018; Mohammad et al., 2015); caracterizada por la presencia de tres principales cambios bioquímicos: activación de caspasas; rompimiento de ADN y proteínas; y cambios en la membrana plasmática y en el reconocimiento por células fagocíticas (Abraha & Ketema, 2016; Wong, 2011).

El componente principal de los mecanismos de apoptosis son las caspasas, un grupo de enzimas ampliamente expresado en la mayoría de las células en forma de proenzima, que

una vez activas presentan actividad proteolítica sobre otras procaspasas iniciando una cascada proteolítica, amplificando la vía de señalización apoptótica y conduciendo a una muerte celular rápida (Elmore, 2007; Wong, 2011). De acuerdo a su función dentro de los mecanismos de apoptosis, se clasifica como caspasas iniciadoras a las caspasas 2, 8, 9 y 10, y como caspasas efectoras o ejecutoras a las caspasas 3, 6, 7 (Alberts et al., 2015; Elmore, 2007).

La activación de la cascada proteolítica de caspasas en la apoptosis puede ocurrir a través de dos circuitos principales: uno extrínseco (o receptor de muerte), que involucra interacciones mediadas con receptores transmembranales como la interacción Fas ligando/Fas receptor; y otro intrínseco (o mitocondrial), mediante el monitoreo e integración de varias señales de origen intracelular que causan cambios en la permeabilidad de la membrana mitocondrial; ambos circuitos eventualmente convergen en una vía en común en la activación de las caspasas efectoras para la ejecución de la última fase de la apoptosis (Abraha & Ketema, 2016; Elmore, 2007; Wong, 2011).

La vía extrínseca de la apoptosis inicia con la unión de ligandos de muerte a los receptores de muerte en la membrana celular como el receptor TNF de tipo 1 (TNFR1) y receptores relacionados con la familia de Fas (CD95). Estos receptores presentan un dominio de muerte intracelular, el cual se encarga de reclutar proteínas adaptadoras; un dominio de muerte asociado a TNT (TRADD) y un dominio de muerte asociado a Fas (FADD), que forma un complejo ligando-receptor-proteína adaptadora conocido como complejo señalizador inductor de muerte (DISC), responsable del ensamble y activación de procaspasa 8 que inicia el mecanismo de apoptosis mediante la activación de caspasas ejecutoras. Por otra parte, la vía intrínseca responde a estímulos internos como daño genético irreparable, hipoxia, concentraciones extremadamente altas de Ca^{2+} citosólico y estrés oxidativo severo; lo que ocasiona el incremento de la permeabilidad de la membrana mitocondrial y la liberación de moléculas proapoptóticas al citoplasma, como citocromo c, que activan a la caspasa 3 debido a la formación de un complejo constituido por citocromo c, Apaf - 1 y

caspasa 9, conocido como apoptosoma (Abraha & Ketema, 2016; Elmore, 2007; Galluzzi et al., 2018; Wong, 2011).

Tanto la vía intrínseca como extrínseca convergen en la fase ejecutora con la activación de caspasas efectoras, al desencadenar la activación de endonucleasas citoplasmáticas y proteasas que degradan proteínas nucleares y del citoesqueleto, causando los cambios bioquímicos y morfológicos observados en células apoptóticas (Elmore, 2007; Wong, 2011). La caspasa 3 es la más importante dentro de las caspasas ejecutoras, siendo responsable de la activación de la endonucleasa CAD, al liberarla del complejo formado con su inhibidor ICAD, provocando la degradación del ADN cromosomal y condensación de la cromatina; además, caspasa 3 induce la reorganización del citoesqueleto y desintegración para la formación de los cuerpos apoptóticos mediante el rompimiento de gelsolina, cuyos fragmentos cortan los ligamentos de actina provocando la disrupción del citoesqueleto, transporte intracelular, división celular y transducción de señales (Elmore, 2007; Galluzzi et al., 2018).

En células transformadas, la forma en que adquieren la capacidad de reducción o resistencia a los mecanismos de apoptosis puede deberse a un desbalance entre proteínas apoptóticas y proapoptóticas, reducida función de la actividad de caspasas, y débil señalización en receptores de muerte (Wong, 2011).

Se han reportado varias proteínas que ejercen una actividad pro o antiapoptótica en la que su baja o sobre expresión ha sido relacionada con el proceso de carcinogénesis mediante la reducción de la apoptosis, siendo una de las más importantes alteraciones la pérdida de la función del supresor tumoral p53, proteína que actúa como sensor de daño en el ADN mediante la sobrerregulación en la expresión de Noxa y Puma BH3, al eliminar su actividad del circuito inductor de apoptosis (Hanahan & Weinberg, 2011; Wong, 2011). Alternativamente, este tipo de células puede lograr el mismo objetivo mediante la disrupción en el balance de la expresión de proteínas pro – apoptóticas y anti – apoptóticas de la familia Bcl-2, encargados de la regulación de la vía intrínseca de la apoptosis, los cuales se localizan en la membrana externa de la mitocondria y son responsables de la

permeabilidad de la membrana, ya sea en la forma de canales de iones o a través de la creación de poros. Los miembros de la familia Bcl-2 se dividen en tres grupos de acuerdo a su función y a sus dominios BH, en donde el primer grupo contiene a las proteínas anti – apoptóticas que presentan cuatro dominios BH, como Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1, Bcl-w, A1/Bfl-1, y Bcl-B/Bcl2L10; el segundo grupo incluye a las proteínas BH3, como Bid, Bim, Puma, Noxa, Bad, Bmf, Hrk y Bik, que actúan como iniciadores de la apoptosis debido a estrés celular; mientras que el grupo tres cuatro dominios BH y que también presentan actividad proapoptótica, como Bax, Bak, y Bok/Mtd (Alberts et al., 2015; Wong, 2011).

El desbalance entre los miembros pro y antiapoptóticos de la familia Bcl-2, puede deberse a la sobre expresión de una o más proteínas anti – apoptóticas, como Bcl-2 en el caso de glioblastoma, neuroblastoma y cáncer de mama, en donde inhibe la apoptosis inducida por TRAIL, o Bcl-xL confiriendo el fenotipo de resistencia a medicamentos en células tumorales; o por la limitación en la expresión de proteínas pro – apoptóticas, como la mutación en el cuadro de lectura de Bax, contribuyendo a la resistencia a quimioterapéuticos en el cáncer colorectal (Abraha & Ketema, 2016; Wong, 2011).

Metabolismo celular y balance óxido-reducción

Para lograr y mantener la capacidad proliferativa que representa la esencia de un padecimiento neoplásico, las células transformadas no sólo deben desregular en control de la proliferación celular, también deben hacer ajustes en el metabolismo energético ya sea mediante la activación o incremento de rutas metabólicas con el objetivo de mantener el crecimiento y la división celular (Hanahan & Weinberg, 2011; Vazquez et al., 2016).

Una de las primeras alteraciones metabólicas reportadas en células de cáncer fue la reprogramación de su metabolismo de glucosa, en el que existe una gran demanda de glucosa debido a su metabolización en lactato, inclusive en presencia de oxígeno (fermentación láctica), fenómeno conocido como efecto Warburg (Warburg, 1924); este cambio en el metabolismo puede ser asociado a la actividad de oncogenes como MYC, el cual produce un factor de transcripción pleiotrópico que estimula la biogénesis de ribosomas, síntesis de nucleótidos, replicación del ADN y la importación de glucosa y

glutamina para el mantenimiento de las necesidades bioenergéticas del crecimiento celular (Dang, 2012; Hanahan & Weinberg, 2011; Vazquez et al., 2016).

La importación de glucosa y glutamina es esencial para el crecimiento celular debido al aporte de ATP y de esqueleto de carbono necesarios como bloques de construcción para ribosomas, membranas, organelos celulares y replicación del genoma. La glucosa es catabolizada en piruvato, que a su vez es transformado en acetil-CoA por oxidación mitocondrial, o en lactato bajo condiciones de hipoxia; el piruvato también participa en la síntesis de los aminoácidos no esenciales aspartato y asparagina, a través de la actividad de piruvato carboxilasa y glutamato y oxalato transaminasas (GOT1 y GOT2). Otros metabolitos intermediarios de la glicolisis sirven como precursores biosintéticos, como la glucosa 6 fosfato (G6P), que es el vínculo entre la glicolisis y la rama oxidativa de la vía de la pentosa fosfato (PPP), la cual genera los grupos ribosa necesarios para la síntesis de nucleótidos, y a su vez es la principal vía generadora de NADPH necesario para el balance óxido-reducción celular (Dang, 2012; Vazquez et al., 2016). Por su parte, la glutamina puede entrar al ciclo del ácido tricarboxílico (TCA) vía conversión a glutamato y α - cetoglutarato, el cual es catabolizado por el ciclo del TCA (Dang, 2012; Vazquez et al., 2016). Debido al catabolismo de la glucosa y glutamina se producen especies reactivas de oxígeno, las cuales son altamente genotóxicas por lo que la célula debe implementar mecanismos para prevenir la acumulación de estos metabolitos (Dang, 2012).

La regulación de la homeostasis óxido-reducción es fundamental para el mantenimiento de las funciones celulares y su supervivencia, por lo que en presencia de un incremento en las concentraciones basales de especies reactivas de oxígeno (ROS), la célula despliega una compleja red de antioxidantes para proteger a las macromoléculas del daño generado por los radicales libres, y así mantener su función (Chio & Tuveson, 2017; Gorrini, Harris, & Mak, 2013). Al desbalance entre la generación de ROS y los mecanismos para su eliminación se conoce como estrés oxidativo (Mandelker, 2008).

Como consecuencia de las modificaciones en el metabolismo de células transformadas, existe un incremento en las concentraciones intracelulares de ROS generadas durante el

metabolismo intracelular, las cuales son mantenidas por debajo del límite permisivo para el mantenimiento de las funciones celulares, generando un estado permanente de estrés oxidativo (Gorrini et al., 2013; Wu, 2006); en donde la persistencia del mismo puede llevar a la acumulación de daño oxidativo a biomoléculas importantes resultando en diversos efectos como alteraciones en las señales de transducción y expresión de genes, mitogénesis, transformación celular, mutagénesis y muerte celular (Figura 1) (Matés & Sánchez-Jiménez, 2000; Wu, 2006).

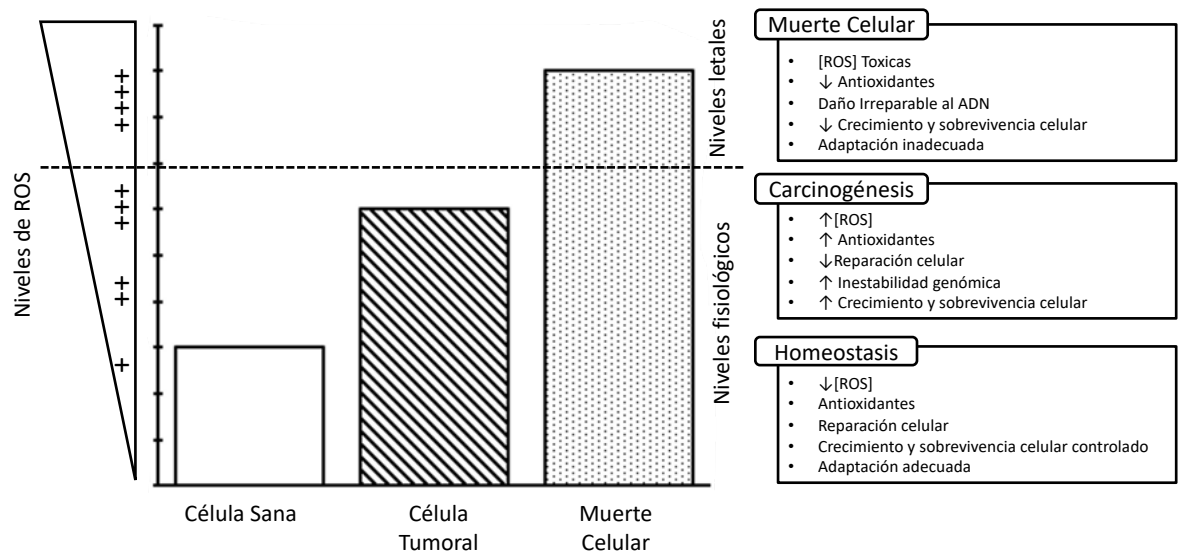


Figura 1. Efecto de los niveles intracelulares de ROS en el cáncer. Diferentes niveles de ROS determinan diferentes tipos de respuestas celulares: proliferación y diferenciación (+); senescencia/quiescencia (++); daño generalizado al ADN (+++); y muerte celular (++++). El balance entre la generación de ROS, la respuesta antioxidante y la reparación celular en células sanas resulta en una limitada proliferación y supervivencia celular; mientras que la actividad metabólica de las células cancerosas genera altas concentraciones de ROS, siendo controladas por un incremento en la respuesta celular antioxidante disminuyendo los niveles tóxicos de ROS mientras se mantiene la señalización pro tumoral. Adaptado de Moloney & Cotter (2018) y Sosa et al. (2013).

Las Especies Reactivas de Oxígeno son radicales, iones o moléculas derivadas del oxígeno, que contienen oxígeno parcialmente reducido o un electrón sin aparear en su última capa de valencia, lo que las hace especies altamente reactivas (Moloney & Cotter, 2018; Prasad, Gupta, & Tyagi, 2017). Los ROS pueden ser categorizados en dos grupos diferentes:

radicales libres de oxígeno y no radicales. Los radicales libres de oxígeno incluyen al súper óxido (O_2^-), el radical hidroxilo ($\cdot OH$), óxido nítrico (NO), radicales orgánicos (R), radicales peróxido (ROO), radicales alcoxil (RO), radicales thyl (RS), radicales silfonil (ROS), radicales thyl peroxil (RSOO) y disulfidos (RSSR); los no radicales incluyen al peróxido de hidrógeno (H_2O_2), oxígeno singlete (1O_2), ozono/trioxígeno (O_3), hidroperóxidos orgánicos (ROOH), ácido hipocloroso (HOCl), peróxinitrito (ONO^-), anión nitrosopercarbonato ($O_2NOCO_2^-$), dióxido dinitrógeno (N_2O_2), ion nitronio (NO_2^+) y lípidos altamente reactivos o compuestos carbonilo derivados de carbohidratos; generados por reacciones metabólicas ocurridas principalmente en la mitocondria, peroxisomas y retículo endoplásmico (Gorrini et al., 2013; Liou & Storz, 2010; Mandelker, 2008).

La presencia de estos radicales libres en las células transformadas pueden promover diversos aspectos en el desarrollo y progresión tumoral, debido a su interconexión con varias rutas bioquímicas que involucran proteínas claves en la señalización o promoviendo la mutación del ADN genómico. Así, la presencia de bajos a moderados niveles de ROS puede estimular la fosforilación de MAPK y ERK, la expresión de ciclina D1 y activación de JNK, moléculas relacionadas al crecimiento tumoral y la sobrevivencia; también se ha encontrado que pueden ejercer un efecto inactivador reversible sobre supresores tumorales como PTEN y PTP; así como la inducción de citocinas proinflamatorias, factor nuclear- κB y del factor nuclear eritroide Nrf2 (Chio & Tuveson, 2017; Sosa et al., 2013; Sullivan, Gui, & Heiden, 2016).

Dentro de todas las interacciones posibles de los ROS, su relación con Nrf2 es considerada una de las más importantes con relación a la regulación de la respuesta antioxidante celular (Sosa et al., 2013). Nrf2 es un factor de transcripción perteneciente a la familia CNC, presentando un único dominio CNC ligado a la región N-terminal de una región básica de ADN altamente conservado y a un motivo bZIP, necesarias para su dimerización con proteínas sMAF y el cumplimiento de su función de regulador transcripcional, uniéndose a secuencias de reconocimiento en el ADN conocidas como MARE (Elementos de reconocimiento Maf) y secuencias relacionadas a MARE, denominadas como elementos de

respuesta a antioxidantes (ARE) o elementos de respuesta electrofílica (EpRE) (Gorrini et al., 2013; Murakami & Motohashi, 2015).

La activación de Nrf2 por presencia de ROS se debe a la oxidación de la proteína Keap1 del complejo Keap1-Cul3, al evitar la degradación de Nrf2 por el mismo y favoreciendo su estabilización y translocación al núcleo para actuar como modulador de la producción de glutatión (GSH), el cofactor antioxidante más abundante dentro de la célula, mediante la expresión de las dos subunidades de la enzima glutamato-cisteína ligasa (GCL) y del control de los niveles de cisteína intracelular debido a la expresión del miembro 11 de la familia de acarreadores de soluto 7 (SLC7A11) que codifica para el transportador de cisteína/glutamato XCT. Además de favorecer la síntesis de GSH, Nrf2 también regula su utilización, mediante la expresión de enzimas detoxificantes como GPX2 y glutatión S-Tranferasas (GSTA1, GSAT2, GSTA3, GSTA5, GSTM1, GSTM2, GSTM3 y GSTP1) (Chio & Tuveson, 2017; Gorrini et al., 2013).

A la par de su efecto regulador del estado óxido-reducción, el incremento de la actividad de Nrf2 ha demostrado ser esencial en la proliferación celular, reprogramación metabólica y quimio resistencia en células transformadas (Gorrini et al., 2013); al presentar una acción regulatoria sobre genes relacionados con el control de la diferenciación y proliferación celular, entre los que destacan PPAR γ y CEBP β (Gorrini et al., 2013; Murakami & Motohashi, 2015).

Receptores Activadores de Proliferación de Peroxisomas

Los receptores activadores de proliferación de peroxisomas (PPAR), llamados así por la capacidad de inducir peroxisomas en roedores (Issemann, I. & Green, S., 1990), pertenecen a la superfamilia de receptores hormonales nucleares, que incluye tanto a los receptores de estrógeno (ER) como progesterona (PR); presentando tres isoformas: PPAR α (NR1C1), PPAR β/δ (NR1C2) y PPAR γ (NR1C3) (Abduljabbar et al., 2015; Berger & Moller, 2002; J.-H. Kim, Song, & Park, 2015), los cuales son ampliamente reconocidos por su papel modulador en la homeostasis de la glucosa y los lípidos, así como en la regulación de genes implicados en la diferenciación celular (Janani & Ranjitha Kumari, 2015).

Estas tres variedades difieren en distribución, función fisiológica, así como en la afinidad a sus ligandos; así el PPAR γ se encuentra ampliamente distribuido en tejido adiposo, intestino grueso y bazo (Janani & Ranjitha Kumari, 2015; Keshamouni et al., 2005), mientras que PPAR α se expresa en hígado, miocitos cardíacos, enterocitos y túbulo proximal del riñón y PPAR β/δ se presenta de manera ubicua (Houseknecht, Cole, & Steele, 2002). De las tres isoformas, la conformación PPAR γ es la más estudiada debido a sus implicaciones en procesos de diferenciación celular y metabolismos de la glucosa y los lípidos, haciendo a sus ligandos fuertes candidatos para nuevas terapias que tengan como blanco la reducción de la proliferación celular y promoción de la apoptosis en células transformadas (Eltner et al., 2002).

Regulación de la expresión de PPAR γ

Un gran número de factores de transcripción han sido reportados como reguladores de la expresión de PPAR γ , siendo el principal grupo el correspondiente a las proteínas *enhancer* de unión a CCAAT (C/EBPs) (J. Lee & Ge, 2014). Las C/EBPs son proteínas capaces de interactuar con motivos CCAAT presentes en varias secuencias promotoras (Ramji & Foka, 2002), cuya expresión es activada a nivel de ARNm por diferentes factores como citocinas (IL-1, IL-6), hormonas (hormona de crecimiento) y tiazolidinedionas (TZD) (Jimenez, Akerblad, Sigvardsson, & Rosen, 2007); estos elementos de reconocimiento a C/EBPs se encuentran a -340bp y -327bp, del inicio del sitio de transcripción del gen PPAR γ , siendo la unión de los C/EBP α , β y δ los que inician la expresión del PPAR γ 2, aunque tanto el C/EBP α y C/EBP β también pueden unirse a regiones *enhancer* en el extremo 3' del gen (Clarke, Robinson, & Gimble, 1997; J. Lee & Ge, 2014), en donde se requiere de la fosforilación en regiones consenso ERK/GSK3 de C/EBP β para la expresión de C/EBP α (Farmer, 2005). Si bien los principales factores de transcripción son los C/EBPs, también existe una interacción entre estos y los Factores tempranos de células B (EBFs) (Jimenez et al., 2007). Los EBFs son factores de transcripción que juegan un papel importante en los linfocitos B y el desarrollo neuronal, siendo los principales miembros de esta familia el EBF1, EBF2 y EBF3, de los cuales el EBF1 se cree puede interaccionar con C/EBP δ generando la transactivación del promotor

de C/EBP α propiciando un sistema de retroalimentación positiva entre ellos (C/EBP δ , EBF1, C/EBP α) (Jimenez et al., 2007).

Otros factores de transcripción que han demostrado tener influencia en la promoción de la transcripción de PPAR son los factores semejantes a los factores de Krüppel (KLFs), en donde el KLF5 y KLF9 muestran una actividad cooperadora con C/EBP al unirse en la región promotora de PPAR γ 2 (Oishi et al., 2005; Pei, Yao, Yang, Liao, & Wu, 2011).

Interacción entre PPAR γ y el cáncer

PPAR γ presenta tres dominios funcionales: la región N-terminal, en donde ocurre su fosforilación; el dominio de unión al ADN y el dominio de unión al ligando. Este tipo de receptores presenta tres zonas promotoras en su gen generando tres diferentes tipos de ARNm que dan lugar a las isoformas γ 1, γ 2 y γ 3; siendo el producto del ARNm para el PPAR γ 1 y PPAR γ 3 idénticos (Houseknecht et al., 2002), mientras que el del PPAR γ 2 se diferencia por la presencia de 30 aminoácidos extras en su porción amino terminal (Janani & Ranjitha Kumari, 2015).

La activación de éste tipo de receptores ocurre cuando el ligando se une al dominio de activación de función 2 (AF2) presente en el dominio de unión al ligando, haciendo que el nuevo complejo ligando-PPAR γ forme un heterodímero con otros factores de transcripción, como el receptor de ácido retinoico (RXR), siendo este complejo el factor de transcripción funcional que posteriormente se une a elementos de respuesta a PPAR (PPRE) en el ADN (Houseknecht et al., 2002; Wahli & Michalik, 2012).

Los PPRE son definidos como repeticiones directas de dos núcleos de motivos de reconocimiento AGGTCA separados por un nucleótido, también conocidos como DR1, presentando la siguiente secuencia: 5'-AACT AGGNCA A AGGTCA-3'. Esta secuencia es la que permite al heterodímero PPAR γ -RXR mostrar polaridad en su unión a DR1, diferenciándolo de otros heterodímeros de RXR, ya que mientras PPAR interactúa con la porción ascendente del DR1, RXR se ocupa el motivo descendente (Desvergne, 1999). Se ha demostrado que estos elementos de respuesta también pueden interactuar con el receptor de estrógeno α (ER α), formando un complejo ternario con PPAR γ y la subunidad reguladora

p85 del Fosfatidilinositol 3 cinasa (PI3K), inhibiendo la actividad de PPAR γ e incrementando la de PI3K conduciendo a una respuesta proliferativa y antiapoptótica en la línea MCF7 (Bonofiglio, 2005), de igual manera, pueden ser activados por la presencia de 6-iodolactona (6IL), induciendo la acumulación de gotas lipídicas intracitoplasmáticas (Nava-Villalba, Nuñez-Anita, Bontempo, & Aceves, 2015).

La activación de PPAR γ por sus agonistas es capaz de inducir apoptosis (Aires et al., 2014), o arresto en el ciclo celular, así como cambios en la morfología celular consistentes con un fenotipo diferenciado (Peters, Shah, & Gonzalez, 2012), habiendo identificado 178 genes, únicamente para el cáncer de mama, que contienen motivos PPRE los cuales pueden ser regulados por PPAR γ , en donde la mayoría de estos genes blanco están vinculados con procesos del ciclo celular, señalización intercelular y transducción de señales, e inclusive ser asociados a la actividad de factores de transcripción, cinasas y cinasas transmembranales (Shashni, Sakharkar, Nagasaki, & Sakharkar, 2013).

Se ha postulado que existe una relación entre las vías de señalización de retinoblastoma (Rb) y PPAR γ , encontrando que probablemente en ausencia de Rb, PPAR γ puede directamente estimular la expresión de genes pro apoptóticos como BAX o que esta inducción de la apoptosis puede ser mera consecuencia de un arresto en G2/M (Fajas et al., 2003). En un caso más particular, la activación por tioglidazol (TRO) ha demostrado tener un efecto inhibitor de la fosforilación de Rb en sus sitios Serina 807 y 811 debido a una regulación negativa de las ciclinas D1-CDK4, llevando a la célula a un arresto en G1 (Yin et al., 2001). También se ha observado que la hipofosforilación de Rb puede asociarse con un cambio metabólico en los niveles de oxidación del piruvato y reducción del glutatión, el primero debido al aumento en la expresión de la piruvato deshidrogenasa cinasa 4 (PDK4) que inhibe a la piruvato deshidrogenasa; mientras que la reducción del glutatión propicia un incremento en los niveles de especies reactivas de oxígeno activando la actividad catalítica de la enzima proteína fosfatasa 2A (PP2A), responsable de la defosforilación de Rb (Srivastava et al., 2014).

En cuanto a los mecanismos por los cuales puede inducir apoptosis, estos se pueden dividir en el tipo de vía de la apoptosis que desencadenan; así, como activador de la vía intrínseca de la apoptosis se han asociado el incremento en la actividad de las caspasas, debida a la activación del promotor del gen FasL (Bonofiglio et al., 2009), mientras que la activación de la vía extrínseca es asociada con la expresión de las proteínas pro-apoptóticas Bax y Bak, la inhibición de la función de Bcl-XL y Bcl-2 o la inhibición de la activación de la cinasa Jun N-terminal (Aires et al., 2014); de hecho, la regulación negativa en la expresión de Bcl-2 (Elstner et al., 2002) resulta en un colapso de la membrana mitocondrial lo que está correlacionado con un incremento en la muerte celular debido a la liberación de citocromo C (Chang et al., 2017), pudiendo ser relacionado a la inhibición en la actividad de la fosfatidilinositol-3 cinasa (Yan et al., 2009), ya que la actividad de éste ha demostrado inducir la expresión de Bcl-2 (Nyo et al., 2012). Otro mecanismo mediante el cual se activa la vía extrínseca de la apoptosis es mediante la interacción de 6IL con PPAR γ , la cual induce la activación de la proteína p53, lo que genera un incremento en la expresión de p21, induciendo el arresto celular y la expresión de Bax (Nava-Villalba et al., 2015).

En cuanto a la activación de la vía intrínseca, esta se debe a un incremento en la expresión de FasL debido a la activación de su promotor por efecto del receptor PPAR γ en su secuencia Sp1, induciendo la apoptosis mediante su unión con su receptor Fas, lo que resulta en el reclutamiento de los dominios de muerte asociados a Fas (FADD) y los zimógenos de caspasa 8 con lo que se activa la cascada de las caspasas (Bonofiglio et al., 2009).

Como una vía de acción conjunta, en donde exhibe su efecto anti proliferativo y pro apoptótico, PPAR γ llega a inducir la expresión de CYLD, mediante la transactivación de su promotor, la importancia de esta vía radica en el papel plenamente identificado del gen Cyld como supresor tumoral, en donde dependiendo del tipo celular y estímulo puede inhibir importantemente varias vías de señalización de anti apoptóticas y proliferativas como NF- $\kappa\beta$, JNK, p38, Wnt, Akt y Notch; siendo mediada por la desubiquitinación de moléculas señal importantes en las vías (Pseftogas, Gonidas, & Mosialos, 2017). Además de sus efectos en proliferación y apoptosis, se ha encontrado que puede inhibir la expresión

del receptor transmembranal CXCR4, cuya activación por su ligando CXCL12, mejor conocidos como factor 1-alfa derivado de células del estroma (SDF1 α), está asociada con procesos de metástasis y diseminación a partir del sitio del tumor primario en células de cáncer de mama; la inhibición de CXCR4 se ha asociado con la inhibición de su promotor debido a la presencia de regiones semejantes a PPRE entre los 1761 a 1748bp del codón de iniciación de la traducción (Rovito et al., 2016).

Anteriormente se mencionó que para su activación, estos receptores deben dímerizarse con los receptores retinoicos, pero su papel podría ir más allá; se ha encontrado que la activación de éstos por ácidos transretinoicos (ATRA) puede inducir la expresión de DOK1, cuya principal función es la de inhibir PI3K/Akt y la vía de Ras-Raf-MEK-ERK por su combinación con p120 rasGAP, pero también la de reducir la fosforilación de PPAR γ en su sitio Ser112, incrementando su actividad (Ding, Wang, Wang, Wu, & Yao, 2017).

CÁNCER DE MAMA Y TUMORES DE GLÁNDULA MAMARIA

El cáncer es considerado como uno de los principales problemas de salud pública a nivel mundial, registrándose en el año 2018, hasta 17 millones de nuevos casos y 9.6 millones de defunciones asociadas a éste padecimiento (Cancer Research UK, 2018; World Health Organization, 2018), con un costo de 1.16 trillones de dólares (World Health Organization, 2018), en donde los principales tipos de cáncer presentes en países con un alto índice de desarrollo fueron cáncer de mama (11.3%), colorectal (11.2%), pulmón (11%), próstata (10%) y vejiga (4.1%); mientras que en países en vías de desarrollo, los principales tipos presentes en la población son cáncer de pulmón (15%), colorectal (11.3%), mama (10.2%), estómago (8.7%) e hígado (7.2%) (The Global Cancer Observatory, 2018b, 2018c).

En México, según datos de la WHO, en 2018 la principal causa de cáncer entre la población humana fue el cáncer de mama (14.3%), seguido por el cáncer de próstata (13.1%) y colorectal (7.8%); siendo la población femenina la más afectada con este padecimiento, en donde el 26% de las mujeres con algún tipo de cáncer presentó cáncer de mama (The Global Cancer Observatory, 2018a).

A nivel de salud animal, el homólogo en salud humana al cáncer de mama es denominado en medicina de pequeñas especies como carcinoma mamario canino (CMC), siendo la primera razón de consulta por neoplasia en hembras enteras, con una incidencia anual promedio en México de 16.8%, semejante a la presentada por la población humana mexicana; en donde el 47.5% de estos casos es de carácter maligno, con un origen epitelial en el 69% de los casos (Salas et al., 2015); a la par de esta incidencia, se han encontrado otras similitudes en la presencia y desarrollo de este padecimiento entre humanos y caninos a nivel clínico, molecular y epidemiológico; compartiendo las características más comunes del cáncer de mama, como la predominancia de carcinoma, el patrón metastásico, dependencia hormonal y desarrollo de tumor (Visan, Balacescu, Berindan-Neagoe, & Catoi, 2015). Inclusive, en ambas especies, factores ambientales, reproductivos, sexo y edad ligados a la progresión y desarrollo del cáncer son idénticos (Nguyen et al., 2018; Visan et al., 2015).

Dentro de las homologías moleculares entre ambas especies se encuentra la sobreexpresión de receptores de estrógenos (ER) y progesterona (PR) asociada a la dependencia hormonal en el desarrollo del tumor, encontrada en aproximadamente el 70% de las neoplasias en caninos, así como en un 60% de las presentadas en humanos (Visan et al., 2015); y la sobreexpresión del antígeno nuclear de proliferación Ki-67, en donde altos índices de expresión de este antígeno se encuentran asociados neoplasias con un pronóstico reservado pero responsivas a quimioterapia (Kadthur, Rao, Sonnahallipura, Thimmanahalli, & Laxmikanth, 2011; Kaszak et al., 2018; Visan et al., 2015).

Además de las similitudes mencionadas, los carcinomas caninos presentan otras características moleculares clave presentadas en cáncer de mama, como: la presencia de extensas lesiones genéticas, entre las que destacan la presencia de numerosos anormalidades en el número de copias (CNA); presencia de genes fusión debido a translocación y tipos comparables de mutaciones de secuencias; la alteración de genes igualmente presentes en el cáncer de mama, como la amplificación y/o sobreexpresión de los oncogenes BRAF, MYC, PIK3CA, PIK3R1, CCND3 y TBX3, y la mutación de BRCA1, NF1,

MAP3K1 y RUNX1; y la alteración de vías de señalización de Wnt, PI3K y reparación de ADN (D. Liu et al., 2014; Rivera & von Euler, 2011; Singer et al., 2012; Visan et al., 2015).

Debido a estas homologías, los avances obtenidos en ambas especies son claves para el entendimiento de esta etiología desde un punto de vista alejado del especismo, reduciendo la brecha entre los estudios clínicos y la investigación en roedores, acelerando el desarrollo de nuevas estrategias contra el cáncer (D. Liu et al., 2014; Rivera & von Euler, 2011; Singer et al., 2012).

Nuevas estrategias en el combate contra el cáncer de mama: Nanotecnología

El actual modelo de terapia en cáncer involucra procedimientos intrusivos que van desde los relacionados con la administración de quimioterapia y radiación, hasta la escisión quirúrgica del tumor; siendo el propósito de las primeras la eliminación de las células tumorales debido a su susceptibilidad asociada a la alta tasa de proliferación presente en este tipo de células (Brannon-Peppas & Blanchette, 2012). Mientras que la cirugía y radioterapia son tratamientos que actúan de manera local en la terapia contra el cáncer, la quimioterapia con administración sistémica ayuda a reducir el tamaño del tumor, la recurrencia del padecimiento y la mortalidad asociada (MacDonald, 2009; Shapiro & Recht, 2001). Sin embargo, la administración sistémica de este tipo de fármacos se encuentra asociada al riesgo de aparición de efectos adversos, en donde cerca del 5% de estos efectos se encuentran asociados a complicaciones se ponen en riesgo la vida del paciente provocando la suspensión de la terapia mucho antes de que el fármaco tenga la oportunidad de erradicar el cáncer (Brannon-Peppas & Blanchette, 2012; MacDonald, 2009; Tajiri, Aonuma, & Sekine, 2017).

Dentro de los efectos adversos más comúnmente presentados se encuentran problemas gastrointestinales (náusea, vómito y diarrea), alopecia y supresión de la médula ósea, siendo el último el más común signo de toxicidad asociado a la quimioterapia, variando en varios grados dependiendo del tipo de estirpe celular; presentándose principalmente en forma de neutropenia. La neutropenia es el efecto adverso más serio y dosis limitante asociado a la administración de quimioterapéuticos, debido a que un bajo conteo de

neutrófilos puede asociarse a procesos febriles y de sepsis al no existir una respuesta adecuada hacia procesos de infección, poniendo en riesgo la vida del paciente (MacDonald, 2009).

En la búsqueda por reducir los efectos adversos de los quimioterapéuticos y alcanzar una distribución específica y dirigida, se ha optado por la inclusión de fármacos citotóxicos en vehículos nanoparticulados, confiriendo ventajas a las terapias convencionales como: proteger al fármaco de ser degradado antes de alcanzar su sitio blanco; incrementar la absorción del compuesto citotóxico dentro de células transformadas; mejor control sobre los patrones de distribución del fármaco en el tejido; y prevenir el contacto con células sanas, disminuyendo los eventos adversos asociados a la toxicidad del fármaco (Brannon-Peppas & Blanchette, 2012; Valdespino-Castillo et al., 2014).

Los sistemas nanoparticulados, definidos por ASTM, son partículas con un longitud que varía dentro de 1 a 1000 nanómetros en 2 o tres dimensiones (Aggarwal et al., 2011; ASTM International, 2012; Mohanraj & Chen, 2007), pudiendo ser usadas como dispositivos médicos, agentes de imagen y diagnóstico, y como vehículo de fármacos. Al funcionar como acarreadores, el agente citotóxico es selectivamente adsorbido o unido, de una manera covalente o no covalente, a la superficie de la nanopartícula o en el interior de la misma (Aggarwal et al., 2011).

Dentro de las principales clases de nanopartículas usadas para aplicaciones médicas nanotecnológicas, se encuentran: liposomas, nanoshells (incluyendo a los puntos cuánticos), metales y óxidos metálicos, partículas a base de carbono (nanotubos de carbono y fullerenos), nanoemulsiones, nanocristales y nanomateriales a base de polímeros (incluyendo dendrímeros) (Cuadro 2) (Aggarwal et al., 2011; Yezhelyev et al., 2006).

Tipo de nanopartícula	Indicaciones y Uso	Ejemplos
Liposomas	Proveen ambientes tanto hidrofílicos como hidrofóbicos, incrementando la solubilidad del fármaco Alta capacidad de acarreamiento	Doxil®
Nanoshells	Ablación laser	Puntos Cuánticos

		Puntos cuánticos como agentes de imagen con energía fluorescente proporcional a su tamaño Propiedades de semiconductor Imagen <i>In Vitro</i>	Nanospectra AuroShell®
Coloides y óxidos metálicos		Plataforma acarreadora biocompatible Ablación laser Propiedades de imagen Densidad electrónica	Coloide de oro Óxido de hierro Aurimune®
Estructuras de carbono	de	Conductor eficiente de calor; alta fuerza tensil y módulos elásticos	Nanotubos de carbono Fullerenos
Nanoemulsiones		Ambiente tanto hidrofílico, como hidrofóbico	Propofol/Diprivan®
Nanocristales		Propiedades térmicas y eléctricas dependiendo del tamaño	Rapamune®
Con base en polímeros o proteínas	en	Proveen un ambiente hidrofílico, como hidrofóbico Incrementan la solubilidad de fármacos	Abraxane®, Cycloset®, Avidimer®
Vector viral		Comúnmente usado como herramienta de biología molecular para acarrear material genético dentro de células	Rexin – G®

Cuadro 2. Principales tipos de nanopartículas con aplicaciones clínicas. adaptado de McNeil, 2011. (Aggarwal et al., 2011)

El principal objetivo en el diseño de nanopartículas como sistemas acarreadores de fármacos, es el control del tamaño de partícula, propiedades de superficie y de liberación del compuesto activo con el objetivo de mantener la acción sitio – específica del fármaco en un rango terapéutico óptimo y dentro de un régimen de dosificación; siendo el control de la liberación del fármaco dentro de la ventana terapéutica, una de las principales características a considerar en el diseño, permitiendo el mantenimiento de ciclos de tratamiento. Además de las características antes mencionadas, los componentes de la nanopartícula deben asegurar contar con propiedades de biocompatibilidad y compatibilidad con el fármaco a acarrear, además de adecuadas cinética de degradación y propiedades mecánicas; siendo el ácido poliláctico – glicólico (PLGA) uno de los polímeros más usados en el diseño de biomateriales debido a su excepcional biocompatibilidad y biodegradación (Tabatabaei Mirakabad et al., 2014).

El ácido poliláctico – glicólico (PLGA) (Figura 2), es uno de los polímeros más usados exitosamente en el desarrollo de biomateriales para aplicaciones en nanomedicina; es un copolímero sintético compuesto de monómeros de ácido láctico y ácido glicólico unidos por un enlace éster, en donde el rango molar de los componentes del polímero determina varias de las propiedades del PLGA, como el grado de cristalinidad, fuerza mecánica, y la capacidad de hidrolizarse. Una de las principales ventajas de su uso es la capacidad de biodegradarse en medios acuosos a través de la hidrólisis de los enlaces éster de una manera uniforme, generando dos monómeros biodegradables, que son metabolizados vía ciclo TCA y desechados como dióxido de carbono y agua (Locatelli & Comes Franchini, 2012; Tabatabaei Mirakabad et al., 2014).

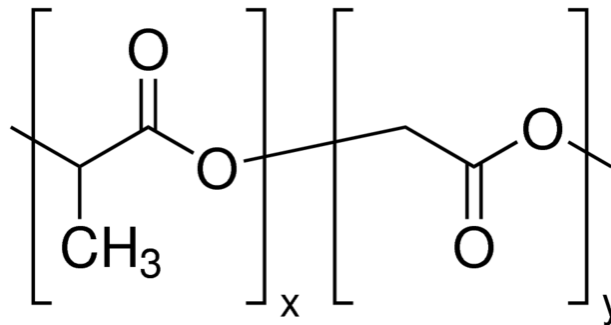


Figura 2. Estructura química del ácido poli láctico-glicólico. (x) corresponde a la aportación total de ácido láctico contenido en el polímero, (y) corresponde a la aportación total de ácido glicólico presente en el polímero.

Sin embargo, el principal beneficio de su uso en nanomedicina, es su habilidad de auto – ensamblarse en dispositivos poliméricos como microesferas, microcápsulas, nanopartículas, sistemas óptimos para la fabricación de sistemas de acarreamiento, porque son solubles en agua y pueden ser administrados por vía oral, parenteral o local; más aún, pueden ser cargados con una gran variedad de fármacos, proteínas y péptidos, que son liberados de manera tiempo dependiente debido a la degradación hidrolítica del PLGA (Locatelli & Comes Franchini, 2012; Mir, Ahmed, & Rehman, 2017).

Derivados del ácido cinámico como una nueva estrategia contra el cáncer de mama

Debido a la alarmante incidencia de mortalidad relacionada con cáncer, la investigación enfocada a la identificación y desarrollo de nuevas y efectivas estrategias terapéuticas ha incrementado; enfocando parte de la investigación hacia compuestos naturales bioactivos con capacidades anticancerígenas, siendo uno de estos compuestos los derivados del ácido cinámico (Beauregard et al., 2015).

El ácido cinámico (CA) (Figura 3) posee una larga historia de uso como esencia y saborizante; pertenece a la clase de auxinas, que son reconocidas como hormonas de plantas que regulan el crecimiento y la diferenciación celular (De, Baltas, & Bedos-Belval, 2011). El primer reporte de ácido cinámico y sus derivados como tratamiento para el cáncer ocurrió en 1905, a cargo del Dr. Drage, al administrar sales de sodio de ácido cinámico y ácido ortocumarínico, presentando resultados favorables y exhortando a la investigación del mismo (Drage, 1905). Derivados sintéticos del ácido cinámico como el ácido ferúlico, cafeíco, sinapico, clorogénico e isoferúlico, han demostrado actividad antioxidante, antiinflamatoria y antitumoral; siendo los derivados con isoformas *cis* y *trans* de CA ha demostrado su efectividad en la inhibición de carcinomas invasivos, asociando este efecto a mecanismos relacionados con la inhibición de la síntesis de ADN, supresión de la activación de NF- κ B, producción de IL-8, inhibición de la deacetilación de histonas y efectos antioxidantes (Hunke et al., 2018).

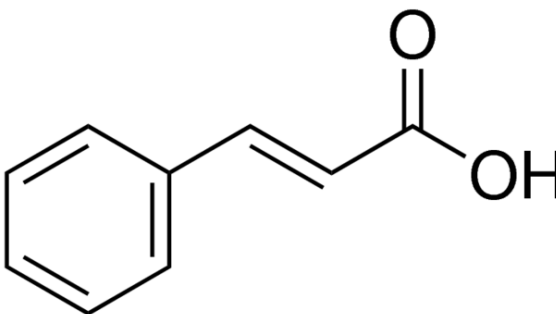


Figura 3. Estructura química del ácido cinámico (CA).

Recientes estudios en la capacidad citotóxica de derivados del ácido cinámico (CADs) han demostrado presentar una actividad inocua en cultivos de células mononucleares de sangre

periférica (PBMCs) (Priatelj et al., 2013) y la reducción de la viabilidad y actividad metabólica celular en células transformadas y la capacidad de inducir apoptosis mediante varios mecanismos, ya sea en una manera dependiente de caspasas; mediante la transactivación de p53, incrementando la sensibilidad de las células transformadas al proceso de apoptosis; la modulación del estado óxido-reducción y la producción de especies reactivas de oxígeno, activando el mecanismo de apoptosis por su vía extrínseca a través de la activación de JNK, o por daño directo al ADN; o por disrupción del citoesqueleto (Beauregard et al., 2015; Hunke et al., 2018).

Dentro de los mecanismos de citotoxicidad inducida por CADs, en compuestos que muestran una disminución de la actividad metabólica celular, se encuentra la disrupción del ciclo celular; evento que ha sido demostrado en las líneas celulares de cáncer K562, Hela, Fem-X y MCF-7, en donde se muestra un incremento significativo en el número de células viables en fase G0/G1, siendo mayor el efecto en la línea celular MCF-7; asociando los efectos de reducción en el crecimiento celular a una inducción selectiva de apoptosis y a la disrupción en el ciclo celular mediante su secuestro en fase G0/G1 (Beauregard et al., 2015; Hunke et al., 2018; Priatelj et al., 2013). Posicionando a los CADs como una nueva área de investigación, en la búsqueda de nuevas opciones en el tratamiento del cáncer.

JUSTIFICACIÓN

Debido a la alta incidencia de los tumores mamarios y el riesgo de toxicidad asociado al tratamiento convencional con agentes quimioterapéuticos, tanto en humanos como en pequeñas especies, es importante el estudio de nuevas moléculas y sistemas de liberación efectivos, inocuos y biocompatibles que ejerzan efectos biológicos terapéuticos capaces de modificar, inhibir o suprimir la actividad proliferativa de células transformadas, así como de modificar eventos celulares asociados, con el objetivo de dilucidar su mecanismo de acción. Existen evidencias asociadas a la capacidad biológica del compuesto derivado del ácido cinámico LQM755 como inhibidor de la viabilidad celular en células transformadas, sin embargo, una desafiante limitante en su uso es su baja solubilidad en medios acuosos, por lo que el diseño, optimización y caracterización de sistemas nanométricos efectivos desarrollados a base de PLGA que puedan mejorar la disponibilidad del compuesto en la célula blanco y su solubilidad en medios acuosos es trascendente.

Los resultados obtenidos de este trabajo en la línea celular MCF-7, permitirán considerar a este tipo de sistemas nanométricos y de nueva generación, como sistemas capaces de modificar la proliferación celular, inducir la apoptosis y modificar la expresión de biomarcadores tumorales de importancia clínica en la enfermedad. Sentando las bases de estudios posteriores enfocados a entender el significado biológico y su potencial en enfermedades multifactoriales como el cáncer en humanos y pequeñas especies.

HIPÓTESIS

La exposición de la línea celular de cáncer de mama MCF-7 a nanopartículas preparadas con PLGA y el compuesto LQM755 modificará la proliferación celular debido a su acción sobre el receptor nuclear PPAR γ y a la modificación del estado óxido-reducción celular.

OBJETIVOS

Objetivo General

Estudiar los efectos biológicos asociados a la inhibición de la proliferación celular, modificación en biomarcadores de estrés oxidativo y actividad de PPAR γ en células de cáncer de mama (MCF-7) expuestas a nanopartículas de PLGA-LQM755, mediante la evaluación de indicadores asociados, como un primer acercamiento al entendimiento de las interacciones de este tipo de sistemas en células de cáncer de mama.

Objetivos Específicos

- Producir y caracterizar sistemas óptimos de nanopartículas de PLGA-LQM755.
- Evidenciar la presencia de las nanopartículas en células MCF-7 mediante su observación por microscopía confocal.
- Conocer los efectos sobre la viabilidad de la línea celular MCF-7 al ser expuesta a nanopartículas de PLGA-LQM755, mediante los ensayos de reducción de resazurina e inclusión de cristal violeta.
- Determinar la relación de los efectos ejercidos por las nanopartículas en estudio asociados a la viabilidad celular con la actividad del receptor nuclear PPAR γ en células MCF7.
- Estimar los efectos moduladores asociados al estrés oxidativo inducidos en la línea celular MCF-7 por la exposición a nanopartículas de PLGA-LQM755 mediante la cuantificación de la lipoperoxidación, contenido de GSH total y presencia de especies reactivas de oxígeno.

- Evaluar el efecto de las nanopartículas de PLGA-LQM755 sobre la proliferación celular en la línea MCF-7, mediante la cuantificación del antígeno Ki-67.

MATERIAL Y MÉTODOS

El desarrollo del proyecto de investigación se realizó en las instalaciones del laboratorio de Toxicología celular de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán (FESC).

Reactivos

Ácido poliláctico-glicólico (PLGA) (Sigma-Aldrich, EUA); 3,4-diclorobencilfenoxicilamida (LQM755) (Laboratorio de Química Medicinal-UNAM, MEX); acetona; Polivinil alcohol (PVA) (Sigma-Aldrich, USA); Rodamina 123 (Sigma-Aldrich, EUA); DAPI (Sigma-Aldrich, EUA); Resazurina (Sigma-Aldrich, EUA); Cristal Violeta (Sigma-Aldrich, EUA); Metanol; Bisfenol A digicidil éter (BADGE) (Sigma-Aldrich, USA); Ácido Sulfosalicílico; DTNB; EDTA; Ácido perclórico; Ácido tiobarbitúrico; 2,7-diclorofluoresceína diacetato (DCFH-DA) (Sigma-Aldrich, EUA)

Derivado del ácido cinámico: 3,4-diclorobencilfenoxicilamida (LQM755)

Para la realización de este proyecto, se recibieron 0.2g del compuesto denominado LQM755 por parte del Dr. Ángeles Anguiano, responsable del Laboratorio de Química Medicinal de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) en la Facultad de estudios Superiores Cuautitlán. Para demostrar la identidad del compuesto proporcionado, 0.01g del mismo fueron caracterizados por espectroscopia de infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR) en el equipo FTIR Frontier SP8000 (Perkin-Elmer, EUA), realizando tres lecturas en el rango de los 400 a 4000 cm^{-1} , a una resolución de 1 cm^{-1} .

Nanopartículas de ácido poliláctico-glicólico – 3,4-diclorobencilfenoxicilamida (PLGA-LQM755 NPs)

Los sistemas nanoparticulados de PLGA-LQM755 fueron preparados por el método de emulsión-solvente descrito en el trabajo de García-Gutiérrez (García-Gutiérrez, 2017); para su preparación se tomaron 0.05603g de PLGA y la cantidad requerida de LQM755 (0.001g,

0.015g y 0.02g) dependiendo del sistema a preparar, disueltos en acetona, depositados por goteo en PVA 1% pH 7.1 – 7.4 en una relación 1:2 (solvente:PVA), manteniéndose en agitación durante 30 min con la posterior extracción del solvente del sistema mediante rotavapor a 50rpm por 10 min a 40°C y presión de 550 mmHg. La concentración de las nanopartículas se realizó por ultracentrifugación a 1500 rpm por una hora a 4°C en un gradiente de glicerol.

Para la preparación del sistema de nanopartículas marcado con rodamina 123 se utilizó el procedimiento descrito anteriormente con la adición de 1mL de rodamina 123 a una concentración de 1mg/mL, según lo descrito por Cartiera y col (Cartiera, Johnson, Rajendran, Caplan, & Saltzman, 2009) y mantenidas en agitación protegidas de la luz durante toda una noche.

La caracterización de los sistemas generados se realizó por NTS (Nanoparticle Tracking System) en el equipo NanoSight ns300 (Malver, RU), evaluando los parámetros de concentración, tamaño y distribución; y la determinación de la eficiencia de captura de las nanopartículas por espectroscopia UV-Vis a λ 325nm en el equipo Du-64 Spectrophotometer (Bekman, EUA).

Establecimiento y mantenimiento de línea celular MCF-7

La línea de cáncer de mama MCF-7 fue obtenida a través de la American Type Cell Culture Collection (ATCC, EUA) y cultivadas en medio Eagles modificado por Dulbecco 1x (DMEM) conteniendo 4.5g/L de glucosa, L-glutamina y piruvato de sodio (Corning, EUA), suplementado a 10% de suero fetal bovino (Corning, EUA) y 100UI/ μ L de penicilina-estreptomomicina. Los cultivos celulares fueron mantenidos con 5% de saturación de CO₂ y temperatura controlada de 37°C.

Observación de la internalización de las nanopartículas de PLGA-LQM755 en la línea MCF-7

Con el propósito de evaluar la presencia del sistema nanoparticulado dentro de la línea celular MCF-7 durante el periodo de exposición recomendado (24h) por García-Gutiérrez (García-Gutiérrez, 2017); se sembraron cubreobjetos circulares a una densidad de 5×10^2

células y fueron expuestas a una concentración de nanopartículas marcadas con rodamina 123 equivalente a 200 μ M de LQM755 encapsulado durante tres periodos de tiempo, teniendo en cuenta el tiempo inicial de exposición al sistema nanoparticulado (0h) y el periodo de exposición objetivo (24h), con un periodo intermedio de 3h, para evaluar el incremento de la señal emitida por el sistema nanoparticulado. Las células expuestas fueron fijadas con paraformaldehído 3.5% y teñidas con DAPI a una concentración de 0.1 μ g/mL durante 10 minutos. El montaje de las preparaciones se realizó con PVA-DABCO (Fluka, USA) y observadas por microscopía confocal en el equipo ZEISS LSM 800. Las muestras fueron excitadas a 480nm (rodamina 123) y 358nm (DAPI). El análisis de la intensidad de fluorescencia de los marcajes utilizados (DAPI y Rodamina 123) se realizó mediante el software de análisis de imagen FIJI, de acuerdo a la metodología presentada por Schindelin (Schindelin et al., 2012).

Evaluación del efecto citotóxico de las nanopartículas de PLGA-LQM755 en la línea celular de cáncer de mama MCF-7

Para evaluar el efecto citotóxico de las nanopartículas de PLGA-LQM755 sobre la línea de cáncer de mama MCF-7 se utilizó la técnica de reducción de resazurina descrita por Escobar y Aristizabal (Escobar M & Aristizabal G, 2010) y la técnica de inclusión de cristal violeta según lo descrito por Feoktistova y col (Feoktistova, Geserick, & Leverkus, 2016). Para ambos ensayos se sembraron placas de 96 pozos con una densidad celular de 10³ células por pozo, siendo expuestas a diferentes concentraciones de nanopartículas en relación a la concentración de LQM755 encapsulado, partiendo de una concentración equivalente a 0.0001 μ M hasta 200 μ M, durante un periodo de 24h.

Para la determinación del efecto citotóxico por reducción de resazurina, las placas, previamente expuestas a las nanopartículas, fueron expuestas a medio fresco conteniendo 0.001% de resazurina durante 1h a 37°C; una vez terminado el tiempo de exposición, el medio fue depositado en una placa de 96 pozos y leído por espectrofotometría UV-Vis a una longitud de onda de 595nm.

Para la evaluación del efecto citotóxico por inclusión de cristal violeta, las células previamente expuestas a las nanopartículas fueron teñidas con 50µL de cristal violeta al 0.5% conteniendo 20% de metanol durante 20 min a 20rpm, eliminado el exceso de tinción mediante lavados con PBS pH7.4 y secadas a temperatura ambiente por al menos 2h. La elución del colorante se realizó mediante la adición de 200µL de metanol, dejando actuar durante 20 min a 20rpm, transfiriendo el sobrenadante para su lectura por espectrofotometría UV-Vis a una longitud de onda de 595nm.

Determinación de la influencia del receptor nuclear PPAR gama sobre el efecto citotóxico de las nanopartículas de PLGA-LQM755 en la línea MCF-7

Para dilucidar el papel del receptor nuclear PPAR gama sobre el efecto citotóxico de las nanopartículas en la línea celular MCF-7, se sembraron placas de 96 pozos a una densidad de 10^3 células por pozo. Para la determinación de la dependencia de la actividad del receptor nuclear PPAR gama en el efecto citotóxico, un grupo de células fue tratado con 20µM de inhibidor de la actividad transcripcional de PPAR γ (BADGE) durante 1h, según lo reportado por Kim y col (K. Y. Kim, Kim, & Cheon, 2006); y expuestos durante 24h a concentraciones de 10µM, 100µM y 200µM de LQM755 encapsulado. El efecto citotóxico de las nanopartículas fue evaluado por el método de reducción de resazurina previamente descrito.

Influencia de las nanopartículas de PLGA-LQM755 sobre el estado óxido-reducción en la línea MCF-7: Contenido de GSH total, Ensayo de lipoperoxidación y generación de especies reactivas de oxígeno

Para determinar el papel del estrés oxidativo en el efecto citotóxico de las nanopartículas de PLGA-LQM755, se evaluó el contenido total de GSH intracelular, lipoperoxidación y la generación de especies reactivas de oxígeno. Para los ensayos de contenido de GSH y Lipoperoxidación, se sembraron placas de 6 pozos a una concentración de 10^5 células por pozo y expuestas a concentraciones de 10µM y 100µM de LQM755 encapsulado durante

24h, seguido de su cosecha en buffer de lisis (0.1% tritón 100x, 100mM PMSF, 5mM EDTA) y almacenado a -20°C hasta su uso.

Para la estimación del contenido de GSH total Intracelular, se utilizaron los métodos descritos por Siddiqui y col. y Hunke y col. (Hunke et al., 2018; Siddiqui et al., 2010), con ligeras modificaciones. La precipitación de la proteína celular fue realizada por la adición de ácido sulfosalicílico 5% (SSA) en una relación 100:5 (Muestra:SSA) a 4°C durante 15 minutos, seguido de su centrifugación a 12000 rpm durante 10 min a 4°C. Se realiza la dilución del sobrenadante (1:4) y es depositada en una placa de 96 pozos de fondo plano con solución de trabajo (WS) (0.52mM DTNB, 6mM EDTA) en una relación 1:3 (muestra:WS) durante 25 min a 37°C. La absorbancia de la reacción es leída a una longitud de onda de 450nm por espectrofotometría de UV-Vis.

Para la estimación de la lipoperoxidación, se utilizó la metodología descrita por Alarifi (Alarifi, 2011) para determinar la concentración de especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS). La proteína celular fue precipitada en ácido perclórico 2.5% durante 10 min a temperatura ambiente y centrifugadas a 15000rpm por 10 min a 4°C; 500µL de sobrenadante fueron puestos a reaccionar con 500µL de TBARS 0.67% durante 30 minutos a 90°C. La absorbancia de las muestras se midió a una longitud de onda de 532nm por espectrofotometría de UV-Vis.

La generación de especies reactivas de oxígeno fue determinada por el protocolo de Wang (Wang & Joseph, 1999) para la detección de oxidación de DCFH-DA. Placas de 96 posos fueron sembradas a una densidad celular de 10^3 células por pozo y expuestas durante 24h a concentraciones de 10µM y 100µM de LQM755 encapsulado, siendo posteriormente reemplazado con medio nuevo conteniendo 5µM de DCFH-DA e incubadas durante 30 min a 37°C. La intensidad de fluorescencia fue medida a 483nm de excitación y 530nm de emisión.

Efectos de la exposición a nanopartículas de PLGA-LQM755 sobre la proliferación celular en la línea MCF7: Evaluación de la concentración del antígeno de proliferación celular Ki-67

Para establecer el efecto de las nanopartículas sobre la proliferación celular, se realizó un ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA) para la cuantificación de la concentración del antígeno de proliferación celular Ki-67. Placas de 6 pozos fueron sembradas a una concentración celular de 10^5 células por pozo y expuestas a concentraciones de $10\mu\text{M}$ y $100\mu\text{M}$ de LQM755 encapsulado durante 24h; cosechadas en PBS para su lisis mecánica mediante dos ciclos de congelación-descongelación; obteniendo el extracto celular mediante centrifugación a 15000rpm durante 15 min. La determinación de la concentración intracelular del antígeno Ki-67 fue realizada mediante el kit comercial Human Antigen Ki-67 ELISA kit (CUSABIO, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Estimación de la concentración de proteína

Para normalizar los valores obtenidos en los ensayos de contenido de GSH total, lipoperoxidación y concentración de antígeno Ki-67, se realizó la cuantificación de proteína total de acuerdo a la metodología presentada por Bradford, usando albumina sérica bovina como estándar de referencia (Bradford, 1976).

Análisis estadístico

El análisis estadístico fue ejecutado en el software estadístico SPSS (IBM Corp., 2017). Cada prueba fue ejecutada tres veces con al menos tres replicas cada una. Los resultados son expresados como la media y error estándar de la media. Las diferencias entre grupos fueron detectadas mediante un análisis de ANOVA con prueba de Tukey; $p < 0.05$ fue considerada para determinar significancia estadística.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El objetivo principal de este proyecto es evaluar los efectos biológicos asociados a la exposición de nanopartículas del compuesto LQM755 sobre la línea celular de cáncer de mama MCF-7, para lo cual se evaluó la identidad del compuesto y su correspondencia con el ácido cinámico, se diseñaron tres sistemas nanoparticulados de PLGA para lograr una vectorización eficiente del compuesto dentro de la línea celular, además de la evidencia de la internalización de las nanopartículas en el mismo; se analizó el efecto citotóxico del sistema nanoparticulado PLGA-LQM755 sobre la línea MCF-7, así como la relación del mismo con la actividad del receptor nuclear PPAR gama, el contenido total de GSH, lipoperoxidación, presencia de especies reactivas de oxígeno y concentración del antígeno de proliferación celular Ki-67.

La evaluación de la identidad y relación del compuesto LQM755 como derivado del ácido cinámico se realizó mediante el análisis del patrón de interferencia del compuesto (Anexo 2) y del estándar de ácido cinámico (Anexo 1) proporcionado por el National Institute of Standards and Technology (NIST, 2018) obtenidos mediante espectrofotometría de FTIR; encontrando un total de 20 bandas de importancia en el espectro del compuesto LQM755, en donde existe una concordancia entre las 10 principales bandas presentes en el espectro estándar de ácido cinámico con el del compuesto LQM755 asociadas a la presencia del anillo aromático ($3051, 762, 708 \text{ cm}^{-1}$) y a la torsión ($1258, 1129, 1032, 973 \text{ cm}^{-1}$) y estiramiento ($1649, 1541 \text{ cm}^{-1}$) del grupo carbonilo presente en el ácido cinámico; mientras que las 10 restantes corresponden al grupo amino (3303 cm^{-1}), sustituciones en el carbono 3 (816 cm^{-1}) y 4 (795 cm^{-1}) de los anillos aromáticos del compuesto, presencia de grupo fenol (1217 cm^{-1}), torsión (1169 cm^{-1}) y estiramiento (1605 cm^{-1}) del grupo carbonilo y flexión (643 cm^{-1}) en el enlace NH presentes en el compuesto LQM755 (Cuadro 3). La concordancia entre las 10 bandas pertenecientes al estándar de ácido cinámico con el compuesto LQM755 demuestran la relación de éste con el ácido cinámico, posicionándolo como un derivado sintético de ácido cinámico con posibles interacciones biológicas semejantes a las

demostradas por el compuesto de origen como la interferencia en el ciclo celular o sus capacidades antioxidantes (De et al., 2011; Hunke et al., 2018; Prijatelj et al., 2013; Rajendra Prasad et al., 2011).

Banda	Estándar (cm ⁻¹)	LQM755 (cm ⁻¹)	Grupo Funcional	Observaciones
1		3303	R-NH-R	amina secundaria
2	3050	3051	Anillo aromático	
3	1650	1649	R-CO-R	Estiramiento grupo carbonilo
4		1605		
5	1540	1541		
6	1250	1258	R-CO-R	Torsión del carbonilo
7		1217	grupo fenol	
8		1169		
9	1190	1129	R-CO-R	Torsión del carbonilo
10	1000	1032		
11	960	973		
12		816		
13		795		sustitución C3
14	750	762	Anillo aromático	
15	700	708		Sin sustituciones
16		691		
17		643	Enlace NH	Flexión
18	580	586		
19		487	C-C, C-O, C-N	Flexión y estiramiento
20		444		

Cuadro 3. . Bandas de interferencia encontradas entre el estándar de ácido cinámico y el compuesto LQM755

Para lograr una inclusión eficiente del compuesto derivado del ácido cinámico, LQM755, dentro del sistema nanoparticulado de PLGA, se desarrollaron y caracterizaron tres sistemas con concentraciones variables del compuesto a encapsular (2.5mM, 37mM y 50mM) de acuerdo a la metodología previamente descrita.

Al evaluar las propiedades de los tres sistemas desarrollados (Cuadro 4), se apreció una mayor concentración en el sistema conteniendo 37mM de LQM755 (6.53×10^{12} NP/mL) en

comparación con los otros dos sistemas restantes de 2.5mM y 50mM (6.96×10^{11} NP/mL y 3.08×10^{11} NP/mL, respectivamente) (Figura 4), probablemente atribuyéndose esta situación a la presencia de una población y tamaño de nanopartícula (152nm) más homogéneo dentro del sistema con 37mM que en los sistemas restantes (Figura 5 y Figura 6); en donde además se advirtió un tamaño de nanopartícula semejante al igual que una concentración menor, lo que puede ser interpretado como la presencia de un fenómeno de aglomeración dentro de ambos sistemas, generando un menor conteo de nanopartículas y un aumento en el tamaño de las mismas en su evaluación por NTS.

		Media	Error Estándar
Concentración (NP/mL)	2.5mM	6.95×10^{11}	5.79×10^{10}
	37mM	6.53×10^{12}	2.91×10^{11}
	50mM	3.08×10^{11}	8.84×10^9
Tamaño (nm)	2.5mM	289.9333	44.36809
	37mM	151.6667	10.82856
	50mM	172.8333	28.93224
Eficiencia de captura (%)	2.5mM	50.9567	5.58595
	37mM	81.1808	0.41025
	50mM	78.0933	1.18606

Cuadro 4. Características de Tamaño, Concentración y Eficiencia de Captura de los diferentes sistemas de nanopartículas analizados. Datos presentados como la media \pm SE de tres experimentos independientes

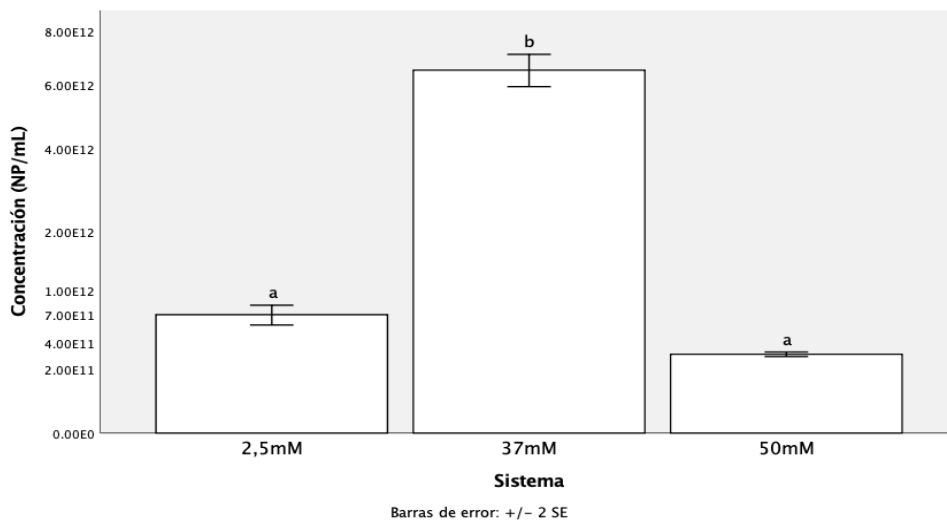


Figura 4. Concentración (NP/mL) de los diferentes sistemas analizados. Datos presentados como la media \pm SE de tres experimentos independientes. Letras iguales indica que no existen diferencias significativas entre los grupos analizados. $P < 0.05$.

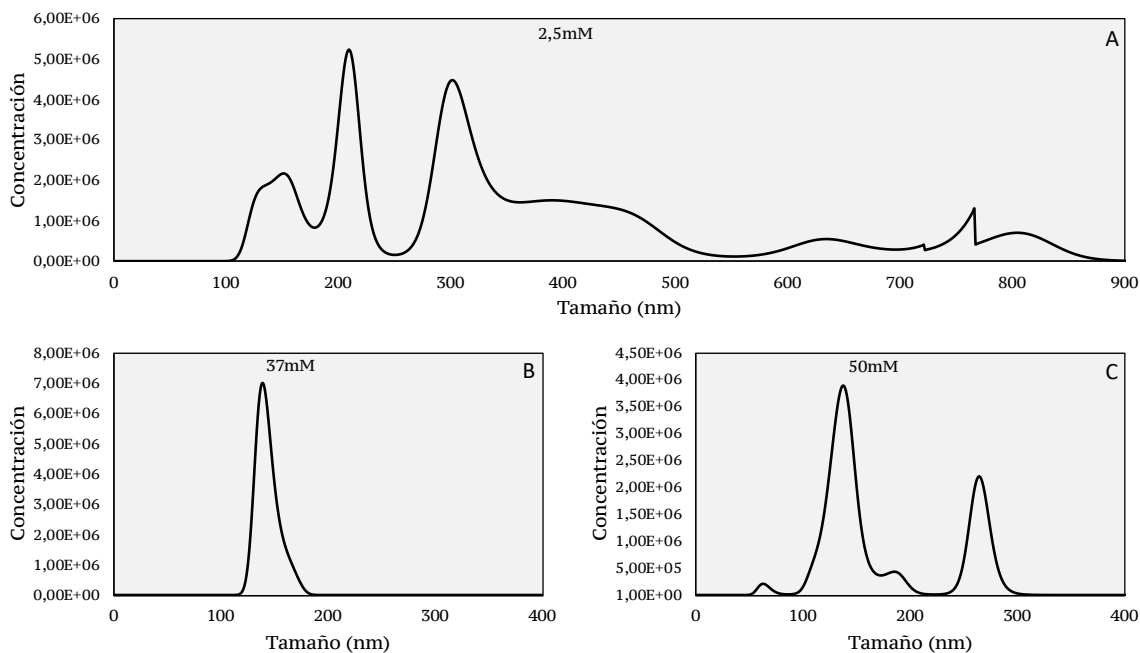


Figura 5. Dispersión de las diferentes poblaciones de nanopartículas presentes en cada uno de los sistemas analizados por NTS. A. Distribución de la población de nanopartículas conteniendo 2.5 mM de LQM755; B. Distribución de la población de nanopartículas conteniendo 37mM de LQM755; C. Distribución de la población de nanopartículas conteniendo 50 mM de LQM755. Cada una de las gráficas representa el promedio de tres experimentos independientes.

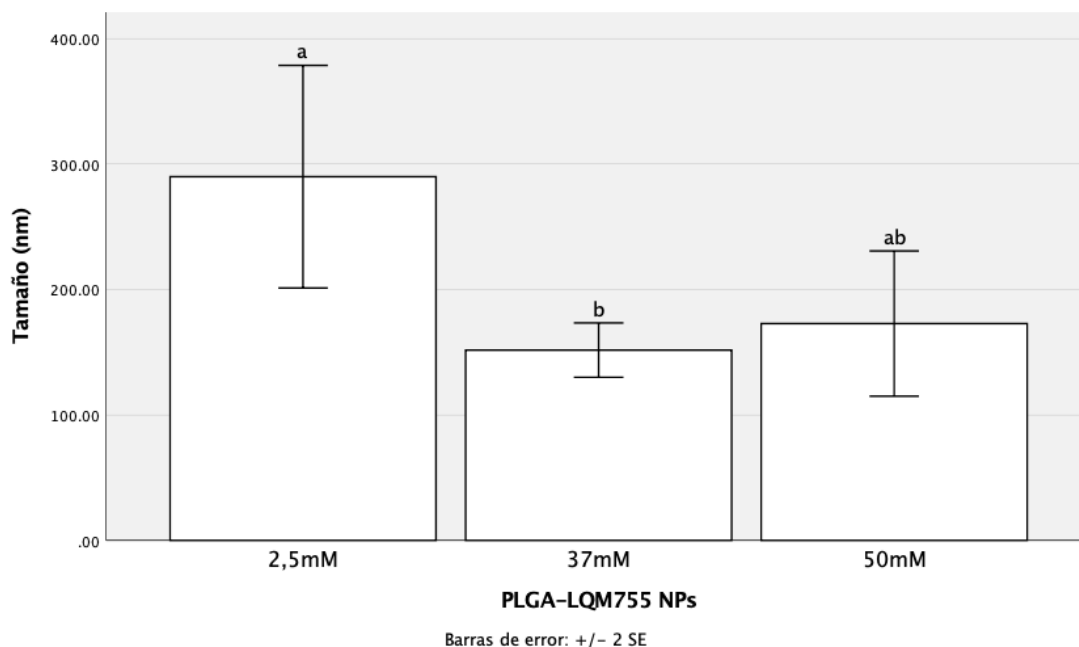


Figura 6. Tamaño de nanopartícula (nm) de los diferentes sistemas analizados. Los datos se presentan como la media \pm SE de tres experimentos independientes. Letras iguales indica que no existen diferencias significativas entre los grupos analizados. $P < 0.05$

El análisis de la eficiencia de captura del sistema de PLGA-LQM755 (Figura 7), demostró valores semejantes en los sistemas conteniendo 37mM y 50mM (81% y 78%, respectivamente), en contraste con una menor eficiencia de captura presente en el sistema de 2.5mM (51%).

En correspondencia con los resultados obtenidos, se optó por utilizar el sistema conteniendo 37mM para la realización de los experimentos subsecuentes, esto debido a la presencia de un sistema homogéneo en sus características de dispersión y tamaño de partícula (151nm); así como a una mayor concentración (6.5×10^{12} NP/mL) y eficiencia de captura (81%); mostrando tamaños de partícula dentro de rango a los presentados en otras publicaciones, así como una eficiencia cercana a lo demostrado por Barichello y colaboradores al determinar los diferentes tamaños y porcentajes de carga de diversos fármacos en sistemas nanoparticulados a base de PLGA, demostrando que este sistema es estable para su utilización como vehículo en compuestos cuya solubilidad en medios acuosos sea una limitante (Barichello, Morishita, Takayama, & Nagai, 1999)

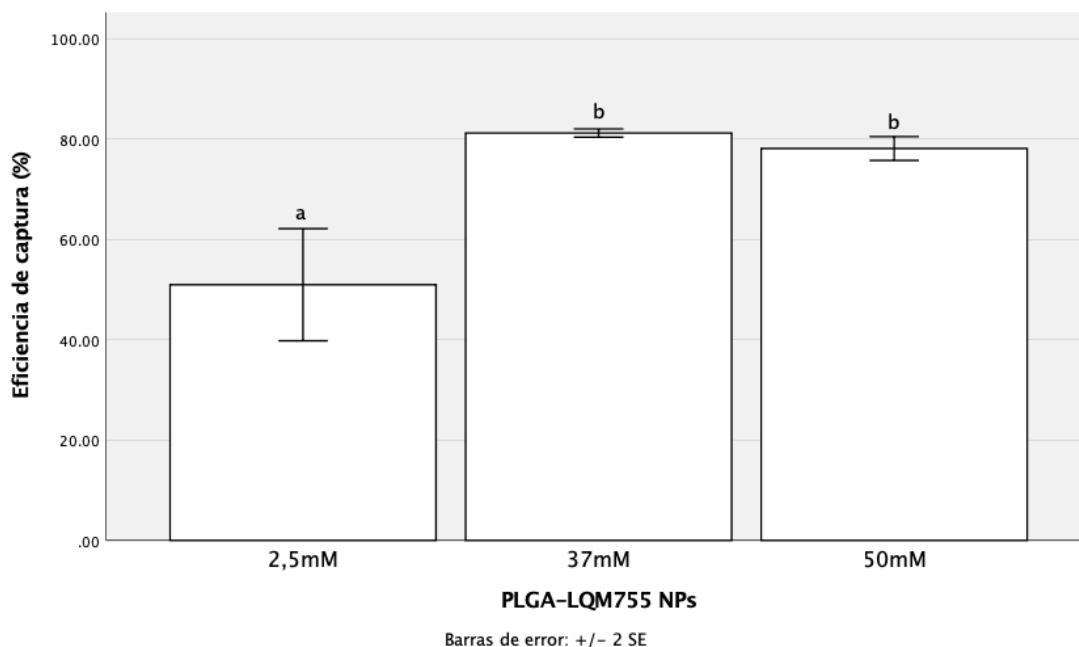


Figura 7. Porcentaje de eficiencia de captura de los diferentes sistemas analizados. Datos presentados como la media \pm SE de tres experimentos independientes. Letras iguales indica que no existen diferencias significativas entre los grupos analizados. $p < 0.05$.

Para la determinación de la presencia de las nanopartículas de PLGA-LQM755 dentro de la línea celular de cáncer de mama MCF-7 durante el periodo de exposición de los ensayos subsecuentes, se diseñó un sistema de nanopartículas marcado con rodamina 123 (PLGA-LQM755-Rho123 NPs) para realizar su seguimiento por microscopía confocal, utilizando como base el sistema conteniendo 37mM de LQM755 encapsulado. El sistema desarrollado presentó un tamaño de nanopartícula promedio de 151nm, con una concentración promedio de 1.35×10^{13} NP/mL, una distribución de nanopartículas homogénea (Figura 8) y una eficiencia de captura del 82%.

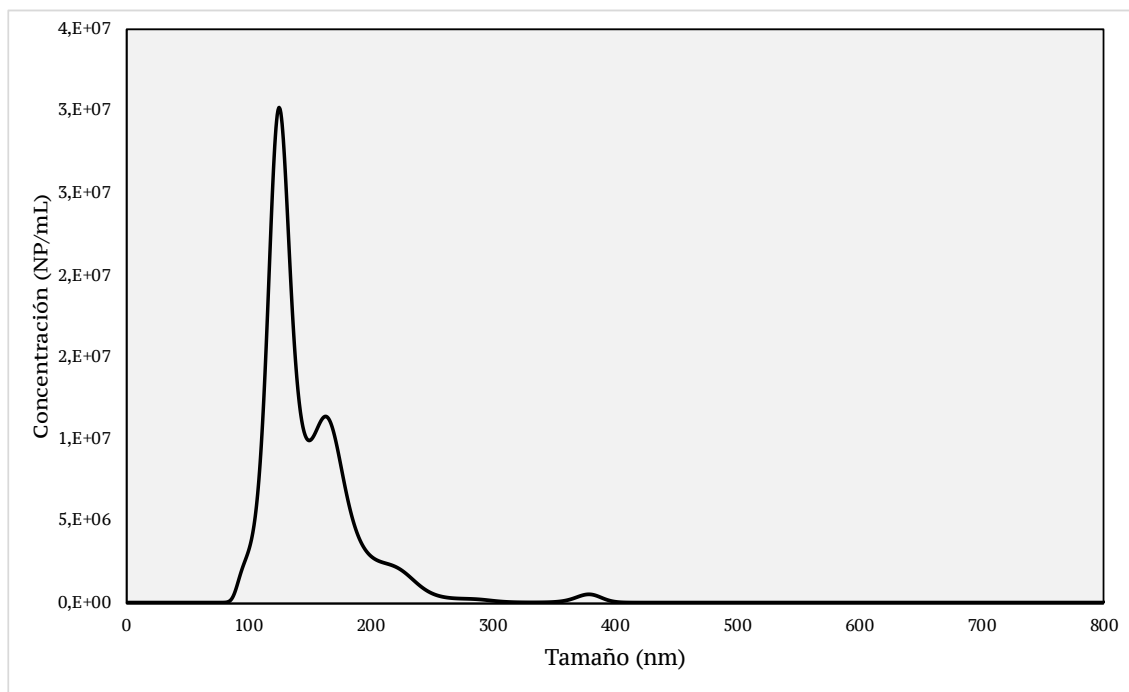


Figura 8. Distribución de la población de nanopartículas dentro del sistema PLGA – LQM755 – Rho 123 NPs, analizado mediante NTS. Datos presentados como el promedio de tres experimentos independientes.

La demostración de la presencia del sistema nanoparticulado dentro de la línea celular MCF-7 se realizó mediante el seguimiento de la señal emitida por las nanopartículas marcadas con rodamina a tiempos de exposición de 0h, 3h y 24h mediante microscopía confocal y el análisis de la intensidad de fluorescencia de la señal emitida por el sistema marcado por núcleo celular.

Al observar las imágenes del seguimiento de las nanopartículas dentro de la línea celular MCF-7 (Figura 9), se observa una aproximación al núcleo celular en el periodo que comprende 3h de exposición, mientras que a 24h de exposición, se observa una mayor intensidad de la señal correspondiente al marcaje del sistema nanoparticulado en ampliamente distribuido en la célula, probablemente asociado a la degradación del sistema nanoparticulado o a su interacción con sistemas de señalización extra nucleares (Cartiera et al., 2009).

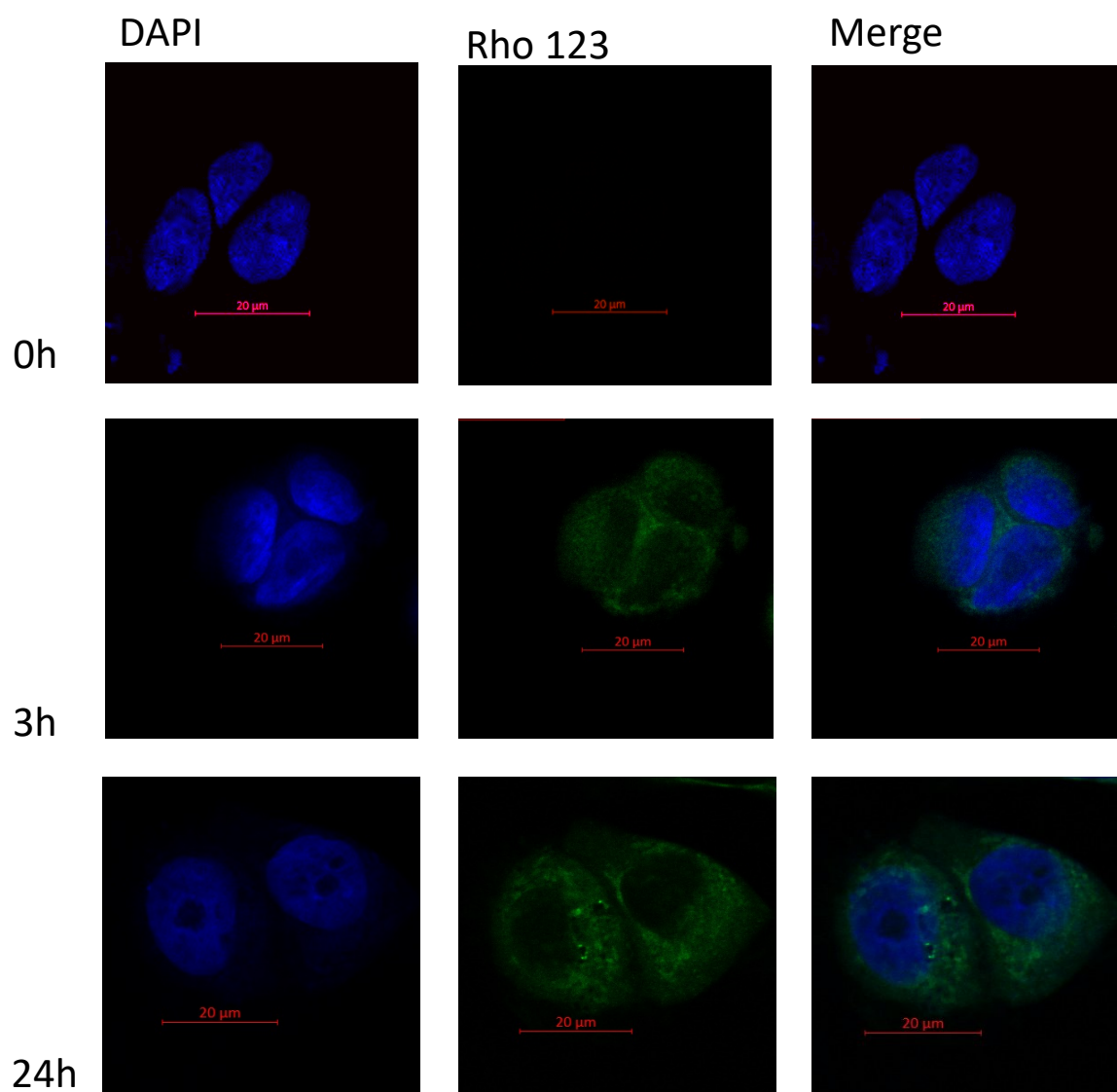


Figura 9. Internalización del sistema de nanopartículas PLGA - LQM755 - Rho 123 en la línea celular de cáncer de mama MCF-7. Evaluación de los tiempos de exposición 0h, 3h y 24h post exposición con nanopartículas de PLGA - LQM755 marcadas con el fluoróforo rodamina 123, se observa un incremento en la fluorescencia tiempo dependiente, presentando un mayor intensidad en el marcaje de rodamina 123 (verde) correspondiente a las nanopartículas 24h post exposición con una aproximación al núcleo celular. Núcleo celular marcado con DAPI (Sigma - Aldrich, USA). Sistema PLGA-LQM755-Rho 123 marcado con rodamina 123 (Sigma - Aldrich, USA). Imágenes tomadas en un aumento de 40x en microscopio confocal ZEISS LSM 800 a 358 (DAPI) y 480 nm (rodamina 123) de excitación.

Al realizar la evaluación de la intensidad de fluorescencia correspondiente a la señal del sistema nanoparticulado, se encontró la presencia de una débil señal enmascarada por la señal emitida asociada al marcaje del núcleo celular (DAPI) a 3h de exposición, situación que se repite al evaluar el periodo de exposición correspondiente a 24h, mostrando una señal a intensidades semejantes a las presentadas a las 3h (Figura 10); además de mostrar un incremento en la intensidad de fluorescencia asociado al sistema PLGA-LQM755-Rho123 NPs en el periodo de exposición de 24h (Figura 11), correspondiendo este aumento a lo observado en las imágenes de microscopía. La presencia de señal a Rho123 dentro del área correspondiente a la delimitada por la señal asociada al núcleo celular y su conservación a una intensidad semejante durante exposiciones de 24h, puede asociarse a una posible interacción de las nanopartículas marcadas con algún sistema saturable dentro de las inmediaciones del núcleo celular, lo que también podría considerarse como causa del incremento en la intensidad de fluorescencia emitida por las nanopartículas en el resto de la célula (Figura 11); una asociación previamente encontrada por Hunke y colaboradores, en donde derivados del ácido cinámico, como el compuesto LQM755, presentan una marcada afinidad hacia el núcleo celular e interacción con receptores presentes en la membrana del mismo (Hunke et al., 2018). Sin embargo, la marcada intensidad en la señal de las nanopartículas presenten en regiones ajenas al núcleo celular, también puede asociarse a su interacción con otros sistemas de señalización presentes en el citoplasma, como las interacciones encontradas por Pontiki y colaboradores, Hseu y colaboradores, y Mashima y Okuyama, en donde los derivados del ácido cinámico ejercen un efecto modulador del estado óxido-reducción y antiinflamatorio (Biller et al., 2016; Mashima & Okuyama, 2015; Pontiki & Hadjipavlou-Litina, 2018).

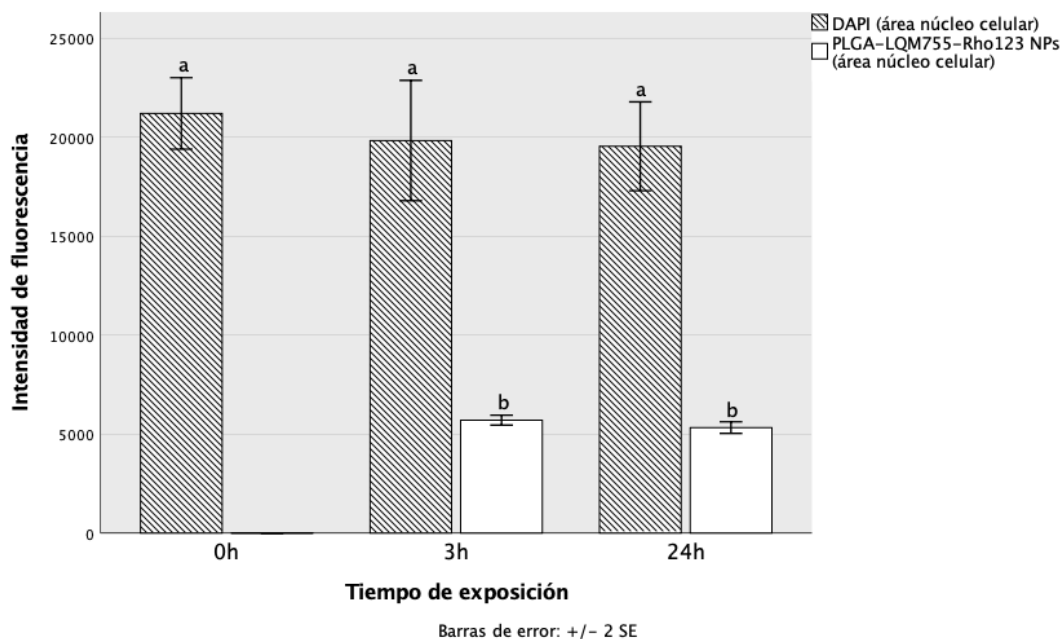


Figura 10. Intensidad de fluorescencia de las señales emitidas por el núcleo celular (DAPI) y PLGA – LQM755 NPs (Rho 123). Se observa la presencia de una señal semejante a las 3h y 24h de exposición al sistema de nanopartículas de PLGA – LQM755 dentro de la señal emitida por el núcleo celular (DAPI), Datos presentados como el promedio de tres experimentos independientes; $p < 0.05$.

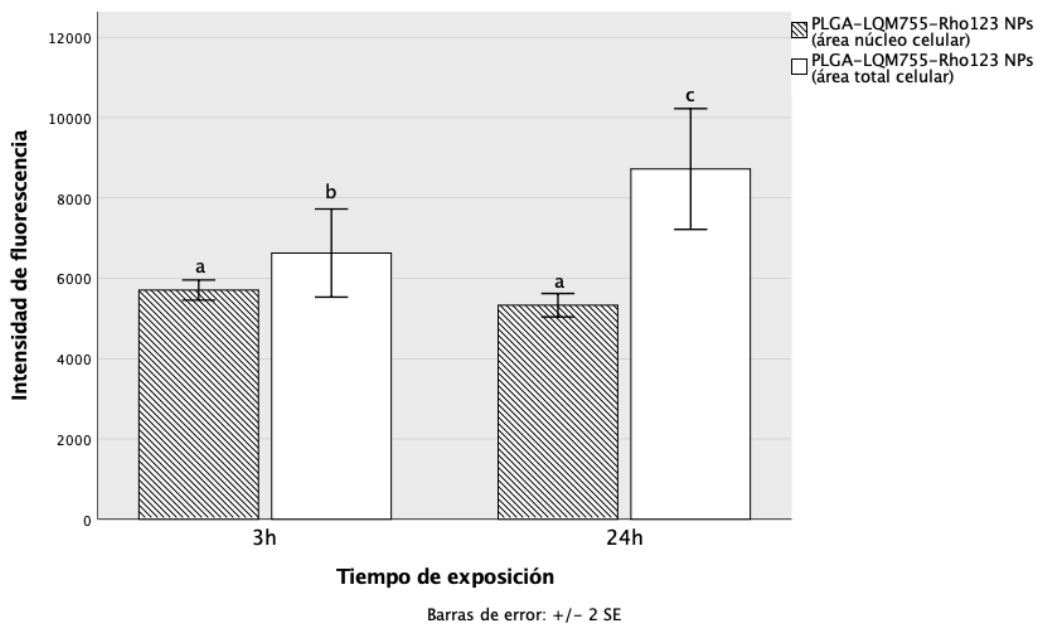


Figura 11. Intensidad de fluorescencia de la señal emitida por el sistema PLGA – LQM755 NPs marcado con Rho123. Datos presentados como el promedio de tres experimentos independientes; $p < 0.05$.

Para lograr un mejor entendimiento sobre el efecto citotóxico asociado a la exposición con PLGA-LQM755 NPs sobre la línea celular de cáncer de mama MCF-7, se realizaron dos tipos de ensayos de viabilidad, uno asociado con el nivel de metabolismo celular (ensayo de reducción de resazurina) y otro asociado a la densidad celular (ensayo de inclusión de cristal violeta). Para evaluar el efecto citotóxico de las nanopartículas se realizaron experimentos utilizando diferentes concentraciones de LQM755 encapsulado (0.001 – 200 μ M) y exponiendo a la línea celular MCF-7 a dichas concentraciones durante un periodo de 24h, teniendo como control positivo de disminución de la viabilidad por especies reactivas de oxígeno (ROS) la exposición a 1mM de H₂O₂.

Al ensayo de reducción de resazurina, utilizado para estimar la capacidad citotóxica de las nanopartículas en estudio, se observó una reducción significativa ($p < 0.05$) de la actividad metabólica a partir de concentraciones de 25 μ M de compuesto encapsulado, siendo equiparables a la presentada por el control positivo a concentraciones de 50 μ M y mayores, presentando una disminución de la viabilidad del 30% (Figura 12). Al estimar la concentración inhibitoria (IC₅₀) del sistema nanoparticulado PLGA-LQM755 se obtuvo una concentración de 404.4 μ M \pm 9.5, presentando una reducción de aproximadamente el 34% en correspondencia a la calculada por Hunke y colaboradores al analizar diferentes derivados sintéticos del ácido cinámico, quienes calcularon una IC₅₀ de 0.6 a 2.9mM en la línea MCF-7 (Hunke et al., 2018). Si asociamos la reducción en la IC₅₀ a la inclusión del compuesto dentro del sistema de nanopartículas de PLGA, esto representa una ventaja en la utilización de este tipo de derivados, al disminuir la concentración necesaria para la obtención de un efecto citotóxico en el sistema celular.

Por otra parte, la utilización de este tipo de sistemas en la vectorización de derivados del ácido cinámico es deficiente si se contrasta con otros sistemas en donde el propio vehículo nanoparticulado ejerce un efecto citotóxico en la línea celular expuesta, como la vectorización en nanopartículas de oro, en donde han demostrado reducir en mayor medida la cantidad utilizada de ácido cinámico para la generación del efecto citotóxico, esto debido a una interacción entre la citotoxicidad generada por las nanopartículas de oro y el

derivado del ácido cinámico (Subramanian & Ponnuchamy, 2018). Interacción que consideramos no contribuye o contribuye de manera no significativa en nuestro sistema, debido a la alta biocompatibilidad y baja toxicidad de las nanopartículas de PLGA; cualidad demostrada en la evaluación de la citotoxicidad del sistema nanoparticulado de PLGA (Figura 13), en donde concentraciones de hasta 4×10^{10} NP/mL no muestran diferencias significativas al compararse con el control negativo on respecto a la disminución de actividad metabólica detectada en el ensayo de resazurina (Tabatabaei Mirakabad et al., 2014).

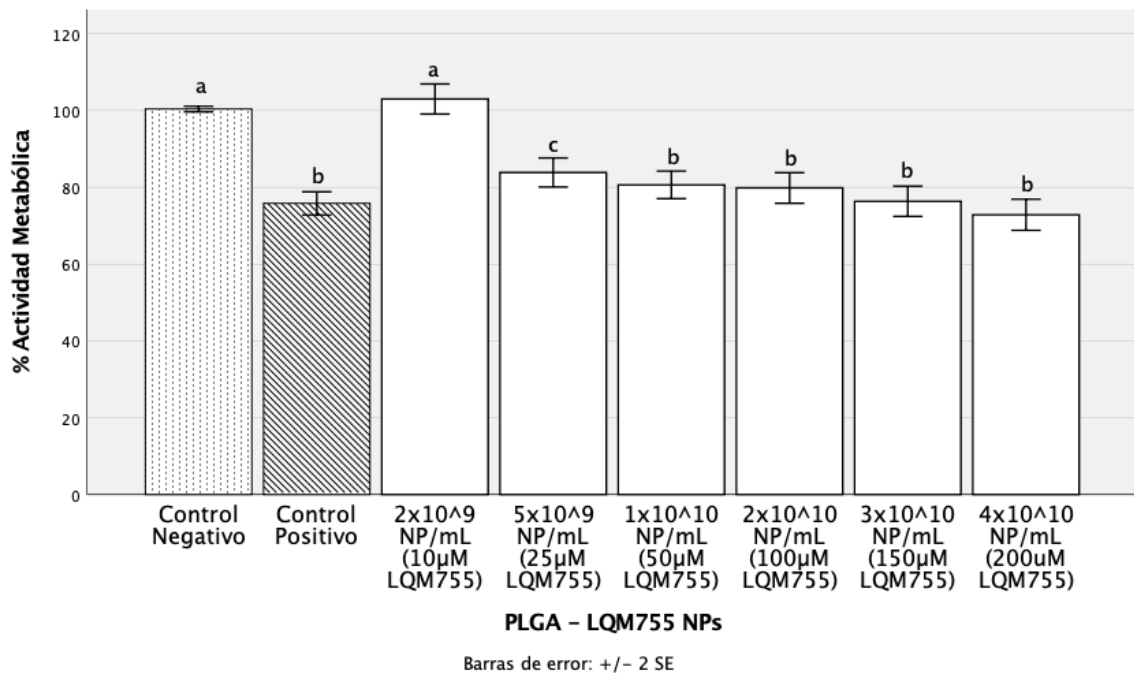


Figura 12. Evaluación del efecto citotóxico asociado a la exposición durante 24h del sistema PLGA – LQM755 NPs en la línea celular MCF-7 por el ensayo de reducción de resazurina. Se muestran los datos de las concentraciones de nanopartículas a partir de 2×10^9 NP/mL. Se observa una disminución de la actividad metabólica dosis dependiente a partir de concentraciones mayores o iguales a 5×10^9 NP/mL, siendo estadísticamente significativas a partir de concentraciones mayores o iguales a 1×10^{10} NP/mL en comparación con el control positivo de H_2O_2 . Datos mostrados como la media \pm SE de tres experimentos independientes. Letras iguales indica que no existen diferencias significativas entre los grupos analizados. $p < 0.05$.

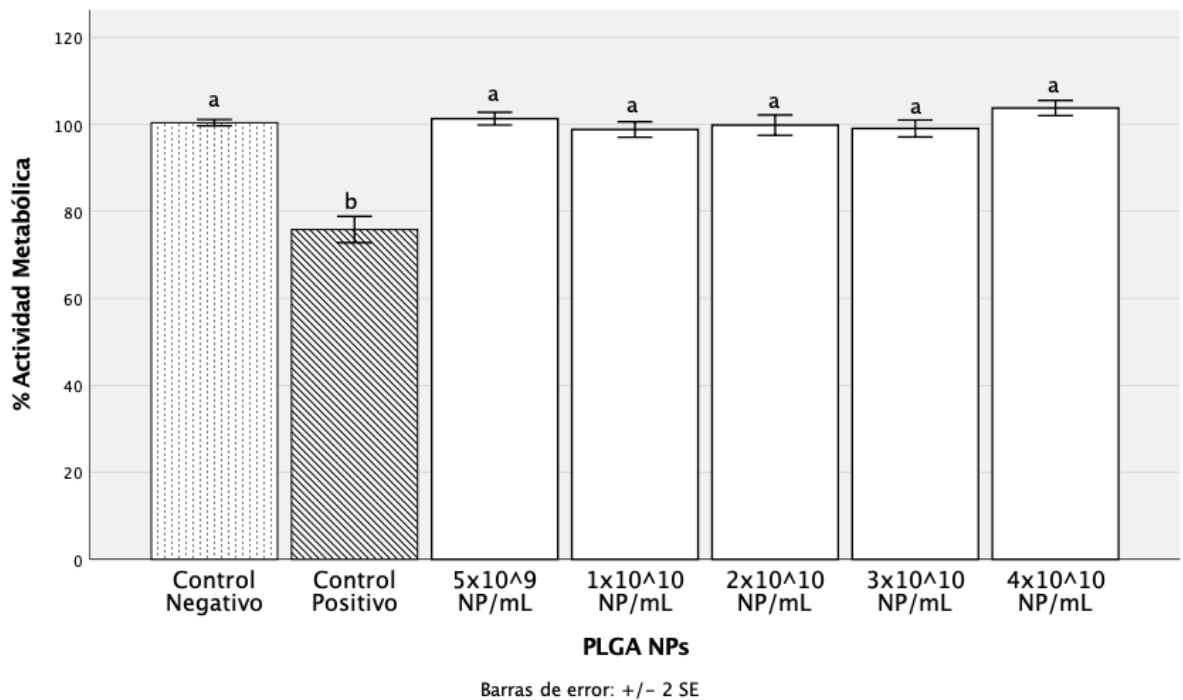


Figura 13. Evaluación del efecto citotóxico asociado a la exposición durante 24h del sistema PLGA NPs en la línea celular MCF-7 por el ensayo de reducción de resazurina. Se muestran los datos de las concentraciones de nanopartículas a partir de 5×10^9 NP/mL. No se muestra reducción estadísticamente significativa asociada a la exposición de nanopartículas al compararse con el control positivo de H_2O_2 . Datos mostrados como la media \pm SE de tres experimentos independientes. Letras iguales indica que no existen diferencias significativas entre los grupos analizados. $p < 0.05$.

En contraste con los resultados obtenidos por el ensayo de reducción de resazurina, el ensayo de inclusión de cristal violeta evidenció una inexistente reducción en la densidad celular al compararse con el control positivo a concentraciones en las cuales se aprecia una reducción de la viabilidad por el ensayo de resazurina, concentraciones mayores o iguales a $25 \mu M$ (Figura 14), por lo que el efecto citotóxico asociado a la exposición con nanopartículas cargadas con LQM755 puede deberse más a un fenómeno de disrupción del metabolismo celular, que a la disminución de la densidad celular en los ensayos realizados.

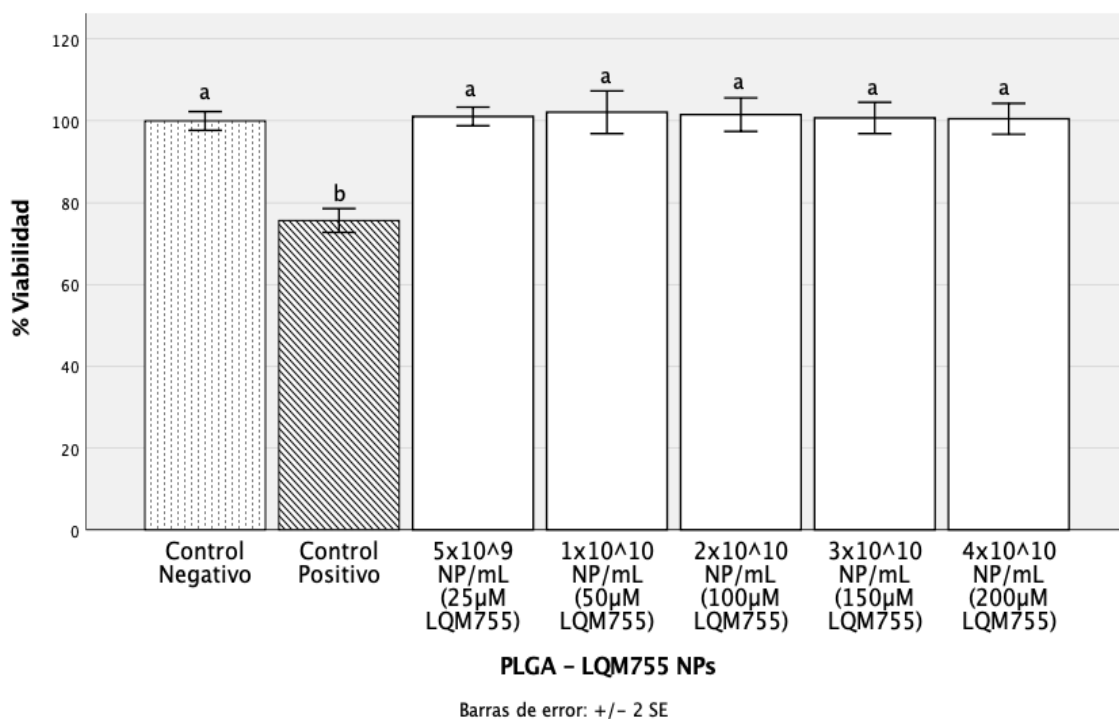


Figura 14. Evaluación del efecto citotóxico asociado a la exposición durante 24h del sistema PLGA – LQM755 NPs en la línea celular MCF-7 por el ensayo de inclusión de cristal violeta. Se muestran los datos de las concentraciones de nanopartículas a partir de 5×10^9 NP/mL. No se muestra reducción estadísticamente significativa asociada a la exposición de nanopartículas al compararse con el control positivo de H_2O_2 . Datos mostrados como la media \pm SE de tres experimentos independientes. Letras iguales indica que no existen diferencias significativas entre los grupos analizados. $p < 0.05$.

Estos resultados se pueden asociar a los demostrados por Hunke y colaboradores (2018), en donde la exposición a diversos dímeros de ácido cinámico logró una reducción del metabolismo celular en varias líneas de células transformadas, donde únicamente en la línea MCF-7, al análisis de progresión del ciclo celular las células pertenecientes a esta línea permanecían en interfase (G0/G1)(Hunke et al., 2018). La pérdida de viabilidad celular que observamos, a diferencia de lo demostrado en otros tipos celulares por otros autores, puede asociarse con la disrupción del ciclo celular y posiblemente al inicio de los mecanismos de apoptosis de una manera dependiente de caspasas (Hunke et al., 2018; Prijatelj et al., 2013).

Para conocer la relación entre las alteraciones inducidas por las nanopartículas con el ensayo de resazurina por las nanopartículas de PLGA-LQM755 con la actividad del receptor nuclear PPAR γ , se inhibió su actividad en la línea celular MCF-7 mediante su exposición al compuesto Bisfenol A diglicidil éter (BADGE), un compuesto agonista a dicho receptor nuclear que ha demostrado actuar mediante la inhibición de la función transcripcional del mismo, sin afectar la viabilidad celular (K. Y. Kim et al., 2006; Kota, Huang, & Roufogalis, 2005; Wright et al., 2000). Para este ensayo se realizó la exposición celular a nanopartículas en concentraciones equivalentes a 10 μ M, 100 μ M y 200 μ M de LQM755 encapsulado (2×10^9 , 2×10^{10} y 4×10^{10} NP/mL, respectivamente) divididos en dos grupos, uno previamente expuesto a 20 μ M de BADGE durante 1h y otro expuesto únicamente al sistema nanoparticulado.

Al ensayo de inhibición de actividad del receptor nuclear PPAR γ (Figura 15), los grupos previamente expuestos al compuesto BADGE no presentaron cambios estadísticamente significativos ($p < 0.05$) en el porcentaje de actividad metabólica mostrada al contrastarse con el grupo no expuesto al sistema nanoparticulado, así como al únicamente expuesto al compuesto BADGE; en contraparte, los grupos cuya exposición fue únicamente al sistema nanoparticulado, a concentraciones de 2×10^{10} y 4×10^{10} NP/mL presentaron una actividad semejante a la presentada por el control de daño por ROS ($p < 0.05$).

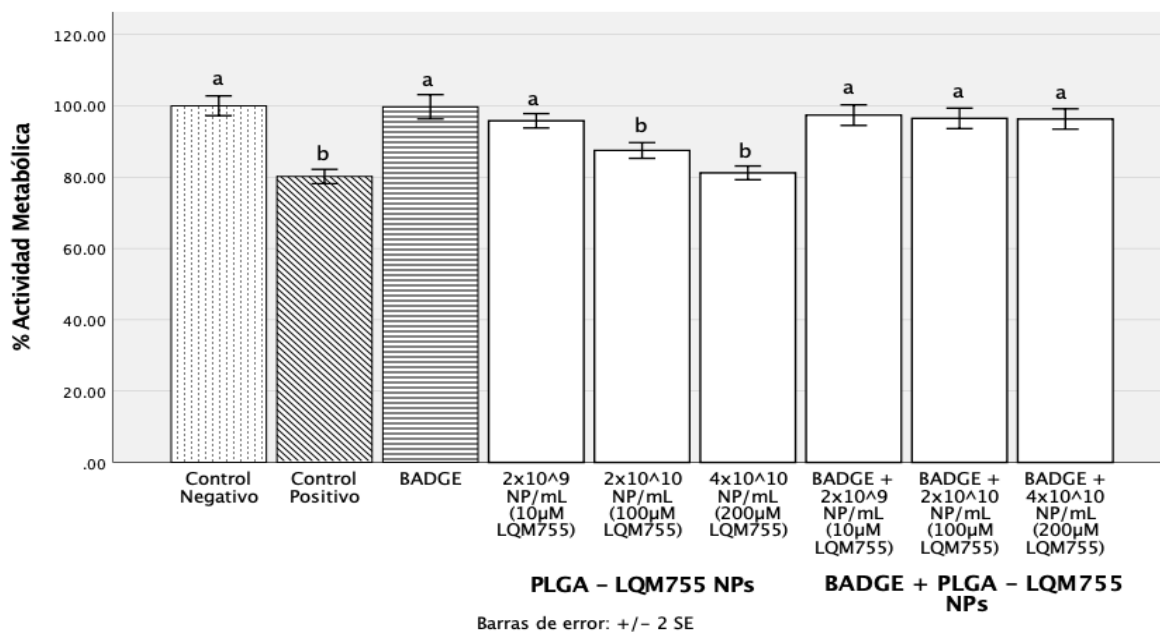


Figura 15. Evaluación de la inhibición del efecto citotóxico asociado a la exposición durante 24h del sistema PLGA – LQM755 NPs en la línea celular MCF-7, mediada por el bloqueo de la actividad transcripcional del receptor nuclear PPAR γ , evaluado mediante el ensayo de reducción de rezasurina. Se muestran los datos de las concentraciones de nanopartículas a partir de 2×10^9 NP/mL. Se muestra una reducción de la actividad metabólica estadísticamente significativa asociada a la exposición de nanopartículas al compararse con el control positivo de H₂O₂, a partir de concentraciones de 2×10^{10} NP/mL, efecto que se ve inhibido a concentraciones similares en células previamente tratadas con el inhibidor de PPAR γ , BADGE (20µM). Datos mostrados como la media \pm SE de tres experimentos independientes. Letras iguales indica que no existen diferencias significativas entre los grupos analizados. $p < 0.05$.

Estos resultados demuestran una dependencia de la actividad transcripcional del receptor nuclear PPAR γ , para la presencia del efecto citotóxico ejercido por el sistema PLGA-LQM755 NPs; propiedad previamente demostrada únicamente por compuestos comúnmente conocidos como agonistas a PPAR γ (Pseftogas et al., 2017; Wright et al., 2000; Yan et al., 2009), y rara vez asociados a derivados del ácido cinámico (Houpis et al., 2005). Postulando al sistema de nanopartículas PLGA-LQM755 NPs como un posible agonista hacia la actividad transcripcional de PPAR γ o como un participante en la activación del mismo mediante la modulación del equilibrio óxido-reducción (Cho et al., 2010; Murakami & Motohashi, 2015).

Para determinar si el efecto citotóxico presente en el ensayo de reducción de resazurina asociado a la exposición de nanopartículas se encuentra relacionado a fenómenos relacionados a un estado óxido-reducción alterado, se evaluaron la concentración de GSH total intracelular, contenido de lipoperoxidación y la presencia de ROS como indicadores del estado óxido-reducción intracelular. Para la realización de estos ensayos, la línea MCF-7 fue expuesta a dos concentraciones de nanopartículas con un incremento logarítmico entre ellas (2×10^9 y 2×10^{10} NP/mL) con el propósito de evidenciar una relación dosis dependiente en el efecto a evaluar; no encontrando cambios estadísticamente significativos ($p < 0,05$) entre las dos concentraciones al contrastarlas con el grupo sin exposición en los niveles de GSH, así como de lipoperoxidación y de ROS. Encontrando el mantenimiento de los niveles basales de GSH (Figura 16), especies reactivas a TBARS (Figura 17) y ROS reactivos a diclorofluoresceína (Figura 18), en los grupos expuestos al vehículo nanoparticulado de PLGA; al igual que en aquellos expuestos al sistema conteniendo LQM755, al ser comparados con el control negativo de células sin exposición a los sistemas nanoparticulados; a excepción de los niveles expresados a exposiciones de 2×10^{10} NP/mL del sistema PLGA-LQM755, en donde se muestra un ligero incremento en la concentración de GSH y especies reactivas de oxígeno, así como una disminución en las especies reactivas a TBARS, aunque ninguno de estos cambios son estadísticamente significativos ($p < 0,05$).

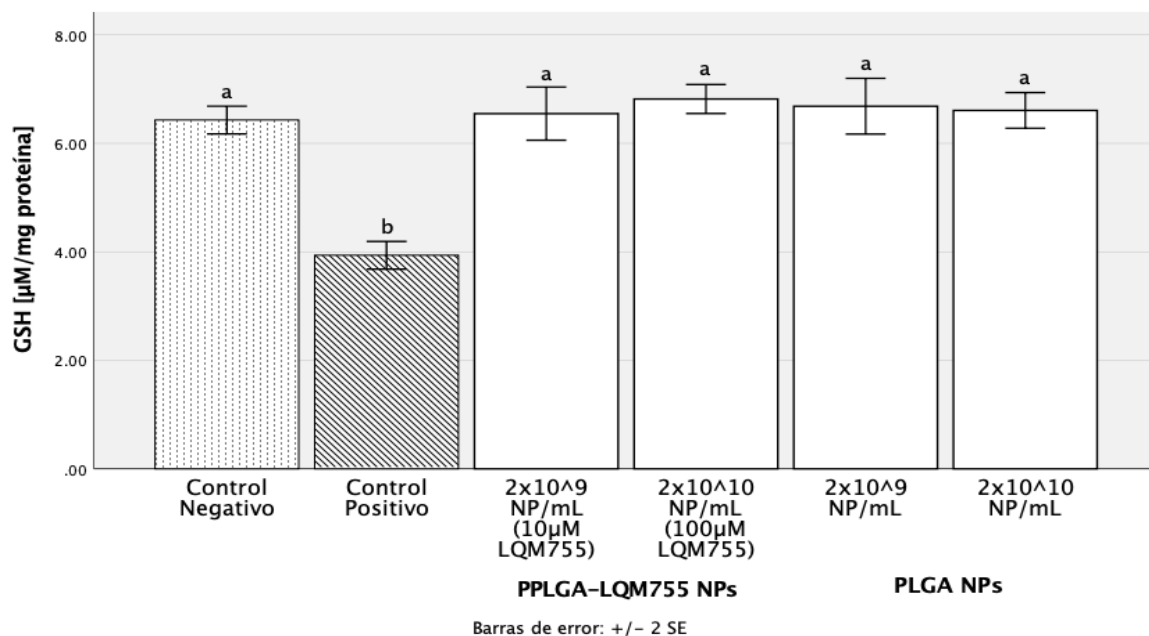


Figura 16. Concentración de GSH total ($\mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína) debido a la exposición durante 24 h de los sistemas de nanopartículas PLGA-LQM755 NPs y PLGA-NPs a concentraciones de 2×10^9 y 2×10^{10} NP/mL. No se observan diferencias significativas en los niveles de GSH en relación a la exposición en los dos sistemas de nanopartículas y entre ellos con el control negativo correspondiente a células MCF-7 sin tratamiento. Datos mostrados como la media \pm SE de tres experimentos independientes. Letras iguales indica que no existen diferencias significativas entre los grupos analizados. $p < 0.05$.

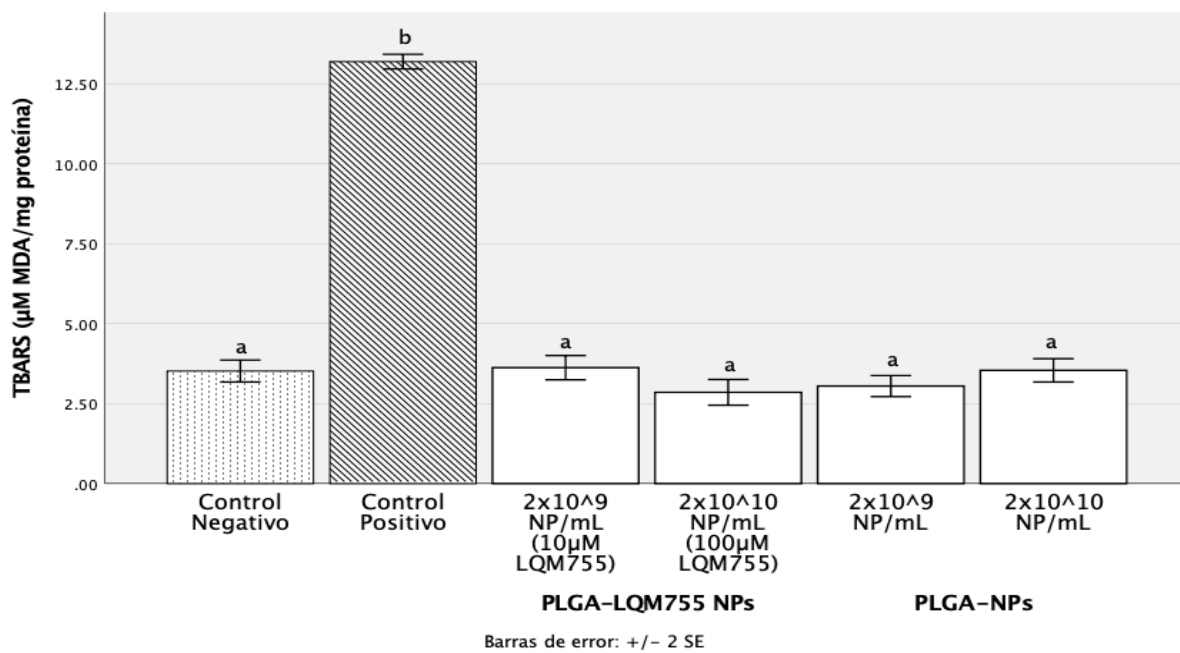


Figura 17. Concentración de especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) expresada como μM de MDA/mg de proteína asociada a la exposición durante 24h de los sistemas de nanopartículas PLGA – LQM755 NPs y PLGA – NPs a concentraciones de 2×10^9 y 2×10^{10} NP/mL. No se observan diferencias significativas en los niveles de MDA asociados a TBARS en relación a la exposición en los dos sistemas de nanopartículas y entre ellos con el control negativo correspondiente a células MCF-7 sin tratamiento. Datos mostrados como la media \pm SE de tres experimentos independientes. Letras iguales indica que no existen diferencias significativas entre los grupos analizados. $p < 0.05$.

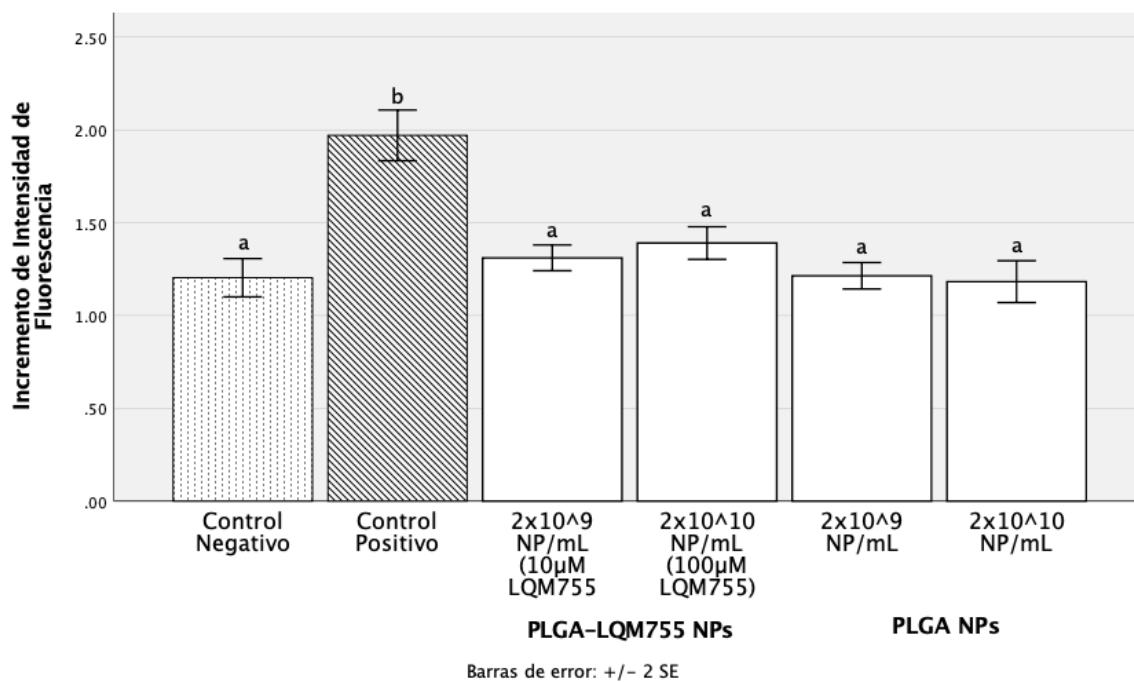


Figura 18. Niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS) debidos a la exposición de los sistemas de nanopartículas PLGA-LQM755 NPs y PLGA-NPs durante 24h a concentraciones de 2×10^9 y 2×10^{10} NP/mL. No se observan diferencias significativas en los niveles de intensidad de fluorescencia asociados a la oxidación de la DCFH – DA debido a la presencia de ROS, en relación a la exposición en los dos sistemas de nanopartículas y entre ellos con el control negativo correspondiente a células MCF-7 sin tratamiento. Datos mostrados como la media \pm SE de tres experimentos independientes. Letras iguales indica que no existen diferencias significativas entre los grupos analizados. $p < 0.05$.

Los hallazgos encontrados en la estimación de biomarcadores asociados a la modulación del estado óxido-reducción debidos a la exposición con el sistema PLGA – LQM755 NPs se contraponen a lo descrito por De, Rajendra Prasad y Xu, sobre el efecto modulador del estado óxido – reducción celular de los derivados del ácido cinámico; quienes asociaron la reducción de la viabilidad celular debida a la exposición a derivados del ácido cinámico a un efecto disruptor del estado redox celular, por un incremento en las concentraciones de ROS y especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS), así como a la disminución en la actividad de enzimas antioxidantes, como superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa (GPx), y de los niveles intracelulares de GSH; provocando daño irreparable al ADN y la inducción de la apoptosis debido a la pérdida de la homeostasis redox celular (De

et al., 2011; Rajendra Prasad et al., 2011; Xu et al., 2016). Si bien se puede inferir un efecto citotóxico asociado al sistema nanoparticulado PLGA-LQM755 debido a fenómenos celulares ajenos a la alteración de las concentraciones de GSH y ROS intracelulares, no es posible descartar del todo la participación de elementos moduladores del estado óxido-reducción celular dentro del mecanismo de acción del compuesto LQM755, debido a que trabajos anteriores han demostrado la interacción de derivados del ácido cinámico con elementos de moduladores de la respuesta a un estado de estrés oxidativo como el factor de transcripción Nrf2 (Hseu et al., 2018).

La relación entre el efecto citotóxico presentado por las nanopartículas sobre la línea celular MCF-7 y la proliferación celular fue determinada mediante la cuantificación de la concentración del antígeno de Ki-67, una proteína nuclear únicamente detectada en el núcleo celular cuya máxima expresión ocurre durante la fase M, disminuyendo abruptamente después de la mitosis (Kaszak et al., 2018; Russo, 2016); la cual ha adquirido importancia debido a su alta correlación con el grado de malignidad y el pronóstico clínico tanto en casos de cáncer de mama como de tumores de glándula mamaria en pequeñas especies (Kadthur et al., 2011; Kaszak et al., 2018).

Para la determinación de la asociación del efecto citotóxico demostrado por el sistema nanoparticulado PLGA-LQM755 con la actividad proliferativa celular, la línea celular MCF-7 fue expuesta a concentraciones de 2×10^9 y 2×10^{10} NP/mL por un periodo de 24h; observando una reducción marcada de la concentración del antígeno de proliferación celular Ki-67 de aproximadamente el 60% en el grupo expuesto a nanopartículas conteniendo el compuesto LQM755 a una concentración de 2×10^{10} NP/mL; mientras que a una concentración de 2×10^9 NP/mL no se observan cambios en los niveles de antígeno de proliferación celular, al igual que en aquellos grupos expuestos a nanopartículas de PLGA, (Figura 19) atribuyendo esta disminución en la concentración del antígeno Ki-67 a un aumento en la concentración del compuesto LQM755 encapsulado.

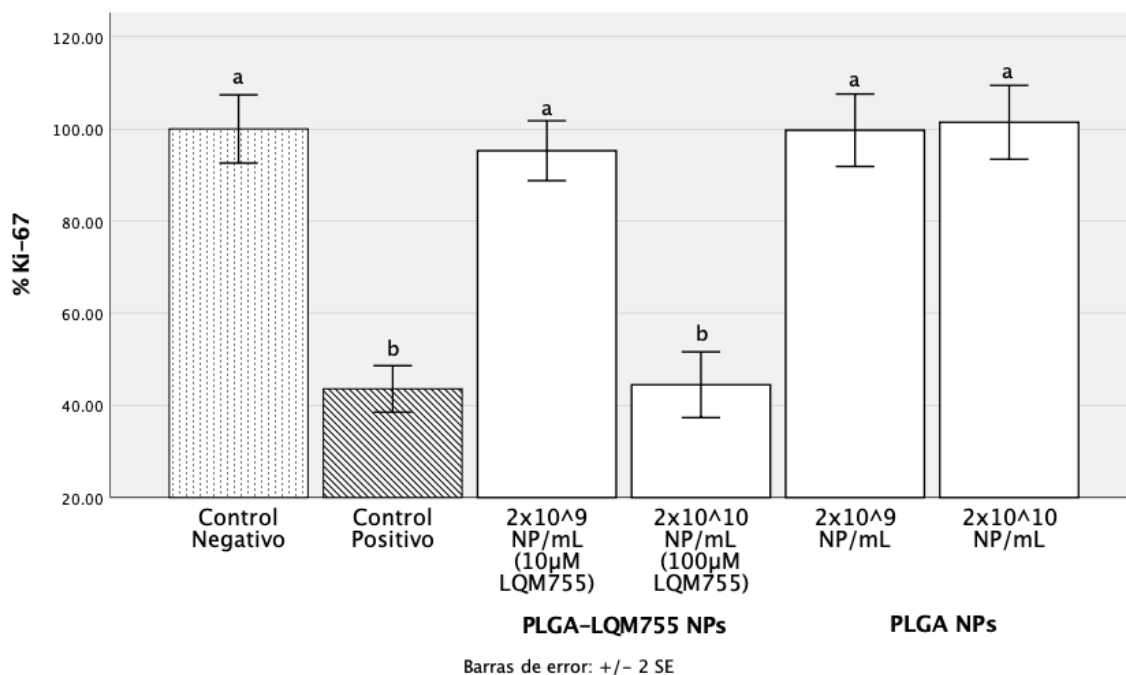


Figura 19. Porcentaje de concentración del antígeno de proliferación celular Ki-67 debido a la exposición de los sistemas de nanopartículas PLGA-LQM755 NPs y PLGA-NPs durante 24h a concentraciones de 2×10^9 y 2×10^{10} NP/mL. Se observa una reducción significativa en el porcentaje del antígeno Ki-67 a concentraciones de 2×10^{10} NP/mL del sistema PLGA-LQM755 NPs a niveles semejantes al control positivo de H_2O_2 ; mientras que a semejante concentración del sistema PLGA-NPs, los niveles de Ki-67 son semejantes a los presentados por el control negativo de células MCF-7 sin tratamiento. Datos mostrados como la media \pm SE de tres experimentos independientes. Letras iguales indica que no existen diferencias significativas entre los grupos analizados. $p < 0.05$.

Efectos similares de reducción del antígeno de proliferación Ki-67 se han encontrado en diversos compuestos antagonistas específicos a PPAR γ pertenecientes a la familia de los tiazodilinedionas (TZD), como el rosiglitazon, en donde la exposición de células transformadas a este tipo de productos induce una reducción en la concentración del antígeno Ki-67 del 77 al 96%, asociando esta reducción al arresto celular en G0/G1 (S. W. Kim et al., 2018; Nojima et al., 2016), situación igualmente presentada por derivados del ácido cinámico en la línea celular MCF-7, en donde ocurre la permanencia en estado G0/G1, pero sin afectación de la viabilidad celular (Hunke et al., 2018).

Siendo un posible mecanismo de acción del sistema nanoparticulado de PLGA-LQM755, la activación del receptor nuclear PPAR γ , mecanismo antes demostrado por derivados del ácido cinámico (L. Liu, Hudgins, Shack, Yin, & Samid, 1995); generando el arresto celular en interfase y la disminución de la concentración de Ki-67; una de las maneras por las que se ha demostrado la inhibición de la proliferación celular mediada por PPAR γ es mediante la reducción de la fosforilación de Rb, llevando una disminución en la actividad e CDK 2/4 o mediante el incremento en los niveles de p27 (J.-H. Kim et al., 2015). Otra posibilidad es la presencia de un efecto antioxidante, igualmente mostrado por derivados del ácido cinámico (Pontiki & Hadjipavlou-Litina, 2018; Pontiki, Hadjipavlou-Litina, Litinas, & Geromichalos, 2014), en el que el LQM755 induzca la activación de Nrf2 mediante la señalización de PKC, AMPK, CKII o ROS (Hseu et al., 2018; Ma, 2013), que a su vez induciría la expresión de PPAR γ y su efecto anti proliferativo (Cho et al., 2010; C. Lee, 2017) e inclusive mediar la disminución de señales de crecimiento mediante la inhibición de lipoxigenasas, como 5-LOX (Mashima & Okuyama, 2015; Tong, Ding, & Adrian, 2002; Wahli & Michalik, 2012), efecto presentado igualmente por derivados del ácido cinámico que presentan actividad antioxidante (Pontiki & Hadjipavlou-Litina, 2018; Pontiki et al., 2014); el incremento de PTEN (J.-H. Kim et al., 2015; Suzuki et al., 2006) o la mediación de la apoptosis mediante la inhibición de la vía de NF - κ B (J.-H. Kim et al., 2015; Wahli & Michalik, 2012).

CONCLUSIONES

La vectorización del compuesto derivado del ácido cinámico LQM755 en un sistema nanoparticulado de PLGA, permite su inclusión en la línea celular de cáncer de mama MCF-7, en donde ejerce un efecto inhibitor del metabolismo celular dosis dependiente, que puede ser asociado a la presencia y actividad transcripcional del receptor nuclear PPAR γ .

A diferencia de lo encontrado en otro tipo de derivados del ácido cinámico, en donde la disrupción del balance óxido-reducción celular es el principal mecanismo de acción; el efecto inhibitor demostrado por las nanopartículas cargadas con LQM755 no se encuentra relacionado con un cambio significativo sobre biomarcadores del estado redox celular, como lo son niveles de GSH, lipoperoxidación y de ROS intracelulares. Por otra parte, el efecto reductor de la viabilidad celular observado en las células expuestas al sistema de nanopartículas cargadas con el derivado del ácido cinámico puede ser relacionado a una disminución de la concentración del antígeno de proliferación celular Ki-67, lo que podría asociarse a una disminución en el número de células en estado de mitosis y a un posible secuestro celular en interfase, efecto previamente demostrado por agonistas específicos a PPAR γ .

Los resultados encontrados sobre la exposición con nanopartículas de PLGA-LQM755 en la línea celular de cáncer de mama MCF-7 muestran una posible relación entre la actividad transcripcional de PPAR γ y la inhibición del fenómeno de proliferación celular, la cual podría estar relacionada con proteínas asociadas al control del balance óxido-reducción celular (Nrf2), mediada por la actividad antioxidante del LQM755, y no por la inducción de estrés oxidativo; aunque también podría deberse a la participación de otras vías que promuevan una señalización anti proliferativa relacionada con la actividad de PPAR γ en la línea MCF-7, como lo serían la vía de Rb, PI3K y CXCR4, o inclusive que modulen el inicio de una señalización proapoptótica.

Sin embargo, para la demostración del efecto anti proliferativo del sistema PLGA-LQM755, su asociación a la actividad de PPAR γ y su relación con Nrf2, así como la relación existente

con otros eventos importantes en el control de las señales de proliferación y crecimiento celular, hace falta la realización de estudios sobre la expresión de éstos genes y de la síntesis de proteínas que codifican, así como el ahondar en la investigaciones sobre las implicaciones metabólicas de las nanopartículas sobre las células transformadas, siendo que al tener como posible eje central de su mecanismo de acción a tal receptor nuclear, la posibilidad de que los resultados obtenidos tengan relación con otros mecanismos necesarios para el mantenimiento de la proliferación celular es alta, sin poder descartar el efecto apoptótico previamente presentado por derivados del ácido cinámico y por agonistas al PPAR γ .

PERSPECTIVAS

En este trabajo se demostró la internalización y el efecto citotóxico del sistema de nanopartículas PLGA-LQM755 sobre la línea celular de cáncer de mama MCF-7, su posible relación con PPAR γ y la modulación del estado óxido-reducción celular, así como la reducción del antígeno de proliferación celular Ki-67; sin embargo, es necesario continuar la investigación para esclarecer el mecanismo de acción sobre el que median su efecto este sistema nanoparticulado. Para el cumplimiento de este objetivo, proponemos un seguimiento del proyecto en tres rubros: i) sistema nanoparticulado, ii) eventos relacionados con el surgimiento y progresión del cáncer y iii) evaluación de los efectos generados en un modelo *in vivo*.

En relación al sistema nanoparticulado, si bien se consiguieron poblaciones mono dispersas de nanopartículas con una eficiencia de captura de aproximadamente 80% al utilizar concentraciones de 37mM de LQM755 para su síntesis; aún hace falta la realización de pruebas de estabilidad del sistema mediante la evaluación de su potencial Z ; completar su caracterización por microscopía electrónica de transmisión y mejorar la eficiencia de captura de compuesto mediante la manipulación de la concentración de LQM755 a utilizar. Por otra parte, la demostración de la presencia del sistema PLGA-LQM755-Rho123, a periodos de exposición de 24h, dentro de la línea MCF-7 por microscopía confocal es importante como indicio para conocer el mecanismo por el cual nuestro sistema nanoparticulado logra su internalización y su destino final en la línea celular; de tal manera que se propone completar el seguimiento de la internalización del sistema PLGA-LQM755-Rho123 mediante el señalamiento de sistemas de transporte intracelular, como clatrin, y la determinación de su destino intracelular mediante el marcaje y observación de los diferentes compartimentos celulares.

Para evaluar la interacción del sistema PLGA-LQM755 dentro del complejo fenómeno que es el cáncer, sugerimos el seguimiento de la evaluación del efecto encontrado no sólo en MCF-7, sino también en las líneas celulares MDA-MB-231 y MCF-10, lo que daría un panorama más amplio sobre el comportamiento de las nanopartículas dentro de los dos

panoramas más comunes en el cáncer de mama (ER+ y triple negativo), así como su comportamiento en tejido sano. A la par se propone la realización de ensayos de expresión de genes y síntesis de proteínas, enfocando el análisis en PPAR γ y proteínas que han demostrado interacción documentada con él, como Nrf2, Rb, PI3K y CxCR4, mediante técnicas de biología molecular como PCR y Western Blot, y continuar con la evaluación de la modulación del estado óxido-reducción celular mediante la determinación de actividad de las enzimas catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GPx) y superóxido dismutasa (SOD) e inclusive el análisis de la presencia de otros marcadores asociados a la exposición de xenobióticos o a condiciones de estrés celular como isoprostanos, 4-hidroxinonenal y productos avanzados de la oxidación de proteínas (PAOP), para así obtener un marco de lectura más amplio sobre la posible actividad moduladora del estado redox celular asociada a éste sistema nanoparticulado.

Continuando con los hallazgos generados por el presente trabajo, uno de los más importantes es el relacionado al estado proliferativo de la línea celular, demostrando una reducción en la concentración del antígeno de proliferación celular Ki-67, lo que nos hace teorizar sobre un posible arresto celular; para comprobar este punto, es necesario realizar la evaluación de la progresión del ciclo celular en líneas celulares de cáncer de mama expuestas al sistema nanoparticulado, además de la evaluación en la actividad y expresión de proteínas reguladoras del ciclo celular; llegando a la evaluación de los eventos de apoptosis, metástasis y control del microambiente tumoral mediante la evaluación de la actividad de caspasas, E-Caderina, el fenómeno de transición epitelio-mesotelial y citosinas, para lograr obtener la información suficiente para escalar la investigación a un modelo *in vivo* de cáncer de mama.

Para la evaluación del efecto de las nanopartículas sobre un modelo *in vivo*, recomendamos la utilización del modelo murino Balb/c transfectado con la línea celular de cáncer de mama 4T1, y así obtener un modelo animal que pueda emular las condiciones de un estadio avanzado de este padecimiento; además de ser un modelo más adaptable y con mínimos requerimientos en instalaciones en comparación con aquellos en los que es requerimiento

la realización de un xenotransplante. En este tipo de modelo se podrían evaluar cuestiones de biodisponibilidad y afinidad del sistema nanoparticulado hacia órganos diana, así como el efecto de la aplicación sistémica de este tipo de sistemas y sus efectos sobre tamaño de tumor, presencia de metástasis y parámetros hematológicos que puedan ser asociados a la presencia de efectos adversos.

REFERENCIAS

- Abduljabbar, R., Al-Kaabi, M. M., Negm, O. H., Jerjees, D., Muftah, A. A., Mukherjee, A., ... Rakha, E. (2015). Prognostic and biological significance of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma in luminal breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, *150*(3), 511–522. <https://doi.org/10.1007/s10549-015-3348-9>
- Abraha, A. M., & Ketema, E. B. (2016). Apoptotic pathways as a therapeutic target for colorectal cancer treatment. *World Journal of Gastrointestinal Oncology*, *8*(8), 583. <https://doi.org/10.4251/wjgo.v8.i8.583>
- Aggarwal, P., Chan, K. C., Clogston, J. D., Cook, R. F., De La Cruz, J., DelRio, F. W., ... Zheng, J. (2011). *Characterization of Nanoparticles Intended for Drug Delivery*. (S. E. McNeil, Ed.), *Methods in Molecular Biology* (First Edit, Vol. 697). Totowa, NJ: Humana Press. <https://doi.org/10.1007/978-1-60327-198-1>
- Aires, V., Brassart, B., Carlier, A., Scagliarini, A., Mandard, S., Limagne, E., ... Delmas, D. (2014). A role for peroxisome proliferator-activated receptor gamma in resveratrol-induced colon cancer cell apoptosis. *Molecular Nutrition & Food Research*, *58*(9), 1785–1794. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201300962>
- Alarifi, S. (2011). Assessment of MCF-7 cells as an in vitro model system for evaluation of chemical oxidative stressors. *African Journal of Biotechnology*, *10*(19), 3872–3879. <https://doi.org/10.5897/AJB10.2080>
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Morgan, D., Raff, M., Roberts, K., ... Hunt, T. (2015). *Molecular Biology of the Cell*. (B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, D. Morgan, M. Raff, K. Roberts, & P. Walter, Eds.) (6th ed.). New York and Abingdon: Garland Science, Taylor & Francis Group, LLC. Retrieved from <http://www.garlandscience.com>
- American Cancer Society. (2017). What is Breast Cancer? Retrieved May 11, 2017, from <https://www.cancer.org/cancer/breast-cancer/about/what-is-breast-cancer.html>
- Arbiser, J., Shin, D. M., Carey, T. E., Ashraf, S. S., Bilsland, A., Halicka, D., ... Amin, A. (2015). Evasion of anti-growth signaling: A key step in tumorigenesis and potential target for treatment and prophylaxis by natural compounds. *Seminars in Cancer Biology*, *35*, S55–S77. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2015.02.005>
- ASTM International. (2012). ASTM E2456-06(2012), Standard Terminology Relating to Nanotechnology. West Conshohocken, PA, USA. <https://doi.org/10.1520/E2456-06R12>
- Barichello, J. M., Morishita, M., Takayama, K., & Nagai, T. (1999). Encapsulation of Hydrophilic and Lipophilic Drugs in PLGA Nanoparticles by the Nanoprecipitation Method. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, *25*(4), 471–476. <https://doi.org/10.1081/DDC-100102197>
- Beauregard, A.-P., Harquail, J., Lassalle-Claux, G., Belbraouet, M., Jean-Francois, J., Touaibia, M., & Robichaud, G. (2015). CAPE Analogs Induce Growth Arrest and Apoptosis in Breast Cancer Cells. *Molecules*, *20*(7), 12576–12589. <https://doi.org/10.3390/molecules200712576>
- Berger, J., & Moller, D. E. (2002). The Mechanisms of Action of PPARs. *Annual Review of*

- Medicine*, 53(1), 409–435. <https://doi.org/10.1146/annurev.med.53.082901.104018>
- Billar, B., Berg, J., Garrett, L., Ruslander, D., Wearing, R., Abbott, B., ... Bryan, C. (2016). 2016 AAHA Oncology Guidelines for Dogs and Cats. *Journal of the American Animal Hospital Association*, 52(4), 181–204. <https://doi.org/10.5326/JAAHA-MS-6570>
- Bonofiglio, D. (2005). Estrogen Receptor Binds to Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Response Element and Negatively Interferes with Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Signaling in Breast Cancer Cells. *Clinical Cancer Research*, 11(17), 6139–6147. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-04-2453>
- Bonofiglio, D., Gabriele, S., Aquila, S., Qi, H., Belmonte, M., Catalano, S., & Andò, S. (2009). Peroxisome proliferator-activated receptor gamma activates fas ligand gene promoter inducing apoptosis in human breast cancer cells. *Breast Cancer Research and Treatment*, 113(3), 423–434. <https://doi.org/10.1007/s10549-008-9944-1>
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1–2), 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Brannon-Peppas, L., & Blanchette, J. O. (2012). Nanoparticle and targeted systems for cancer therapy. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64(SUPPL.), 206–212. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.09.033>
- Cancer Research UK. (2018). Worldwide cancer statistics. Retrieved February 4, 2019, from <https://www.cancerresearchuk.org/health-professional/cancer-statistics/worldwide-cancer>
- Cartiera, M. S., Johnson, K. M., Rajendran, V., Caplan, M. J., & Saltzman, W. M. (2009). The uptake and intracellular fate of PLGA nanoparticles in epithelial cells. *Biomaterials*, 30(14), 2790–2798. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.01.057>
- Chang, H. K., Kim, D. S., Chae, J. J., Kim, M., Myong, J.-P., Lee, K. H., ... Park, T. C. (2017). Inhibition of ERK activity enhances the cytotoxic effect of peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) agonists in HeLa cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 482(4), 843–848. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.11.122>
- Chio, I. I. C., & Tuveson, D. A. (2017). ROS in Cancer: The Burning Question. *Trends in Molecular Medicine*, 23(5), 411–429. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2017.03.004>
- Cho, H.-Y., Gladwell, W., Wang, X., Chorley, B., Bell, D., Reddy, S. P., & Kleeberger, S. R. (2010). Nrf2-regulated PPAR γ Expression Is Critical to Protection against Acute Lung Injury in Mice. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 182(2), 170–182. <https://doi.org/10.1164/rccm.200907-1047OC>
- Clarke, S. L., Robinson, C. E., & Gimble, J. M. (1997). CAAT/Enhancer Binding Proteins Directly Modulate Transcription from the Peroxisome Proliferator- Activated Receptor γ 2 Promoter. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 240(1), 99–103. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1997.7627>
- Dang, C. V. (2012). Cancer cell metabolism: There is no ROS for the weary. *Cancer Discovery*, 2(4), 304–307. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-12-0069>
- De la Cruz Hernández, N. I., Monreal García, A. E., Carvajal de la Fuente, V., Barrón Vargas,

- C. A., Martínez Burnes, J., Zarate Terán, A., ... Rangel Lucio, J. A. (2017). Frecuencia y caracterización de las principales neoplasias presentes en el perro doméstico en Tamaulipas (México). *Revista de Medicina Veterinaria*, (35), 53–71. <https://doi.org/10.19052/mv.4389>
- De, P., Baltas, M., & Bedos-Belval, F. (2011). Cinnamic Acid Derivatives as Anticancer Agents-A Review. *Current Medicinal Chemistry*, 18(11), 1672–1703. <https://doi.org/10.2174/092986711795471347>
- Desvergne, B. (1999). Peroxisome Proliferator-Activated Receptors: Nuclear Control of Metabolism. *Endocrine Reviews*, 20(5), 649–688. <https://doi.org/10.1210/er.20.5.649>
- Ding, X., Wang, W., Wang, M., Wu, J., & Yao, F. (2017). DOK1/PPARgamma pathway mediates anti-tumor ability of all-trans retinoic acid in breast cancer MCF-7 cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 487(2), 189–193. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.04.018>
- Dirección General de Epidemiología. (2017). Casos por entidad federativa: Displasias y neoplasias. *Boletín Epidemiológico-Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica*, 34(51), 60–61.
- Drage, L. (1905). Cinnamic Salts in the Treatment of Cancer. *Br. Med. J.*, 1(2313), 927–928.
- Elmore, S. (2007). Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicologic Pathology*, 35(4), 495–516. <https://doi.org/10.1080/01926230701320337>
- Elstner, E., Williamson, E. A., Zang, C., Fritz, J., Heber, D., Fenner, M., ... Koeffler, H. P. (2002). Novel Therapeutic Approach: Ligands for PPAR γ and Retinoid Receptors Induce Apoptosis in bcl-2-positive Human Breast Cancer Cells. *Breast Cancer Research and Treatment*, 74(2), 155–165. <https://doi.org/10.1023/A:1016114026769>
- Escobar M, L., & Aristizábal G, F. A. (2010). Aplicación de un método fluorométrico para evaluar la proliferación celular en líneas celulares tumorales. *Vitae*, 17(2), 173–180.
- Evan, G. I., & Vousden, K. H. (2001). Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature*, 411(6835), 342–348. <https://doi.org/10.1038/35077213>
- Fajardo, R., Alpízar, A., Pérez, L., Martínez, J., & Córdova, E. (2013). Prevalence of tumors in dogs from the municipality of Toluca, México, from 2002 to 2008. *Archivos de Medicina Veterinaria*, 45(3), 305–309. <https://doi.org/10.4067/S0301-732X2013000300011>
- Fajas, L., Egler, V., Reiter, R., Miard, S., Lefebvre, A.-M., & Auwerx, J. (2003). PPAR γ controls cell proliferation and apoptosis in an RB-dependent manner. *Oncogene*, 22(27), 4186–4193. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206530>
- Farmer, S. R. (2005). Regulation of PPAR γ activity during adipogenesis. *International Journal of Obesity*, 29(S1), S13–S16. <https://doi.org/10.1038/sj.ijo.0802907>
- Feitelson, M. A., Arzumanyan, A., Kulathinal, R. J., Blain, S. W., Holcombe, R. F., Mahajna, J., ... Nowsheen, S. (2015). Sustained proliferation in cancer: Mechanisms and novel therapeutic targets. *Seminars in Cancer Biology*, 35, S25–S54. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2015.02.006>
- Feoktistova, M., Geserick, P., & Leverkus, M. (2016). Crystal violet assay for determining viability of cultured cells. *Cold Spring Harbor Protocols*, 343–346.

- <https://doi.org/10.1101/pdb.prot087379>
- Fröhlich, E., & Wahl, R. (2015). Chemotherapy and Chemoprevention by Thiazolidinediones. *BioMed Research International*, 2015, 1–14. <https://doi.org/10.1155/2015/845340>
- Galluzzi, L., Vitale, I., Aaronson, S. A., Abrams, J. M., Adam, D., Agostinis, P., ... Kroemer, G. (2018). Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death and Differentiation*, 25(3), 486–541. <https://doi.org/10.1038/s41418-017-0012-4>
- Gama, A., & Schmitt, F. (2012). Cadherin Cell Adhesion System in Canine Mammary Cancer: A Review. *Veterinary Medicine International*, 2012, 1–8. <https://doi.org/10.1155/2012/357187>
- García-Gutiérrez, L. (2017). *Evaluación in vitro de la citotoxicidad de sistemas nanoparticulados de PLGA que contienen análogos y/o derivados del ácido cinámico en línea celular de cáncer de próstata*. Universidad Nacional Autónoma de México. Retrieved from http://oreon.dgbiblio.unam.mx/F/7S2DUTMTTBMSV6TEMLI9YE4S8HY3KQIVAVGYLP UAQ2CP2P6L5A-44122?func=full-set-set&set_number=004872&set_entry=000015&format=999
- Gorrini, C., Harris, I. S., & Mak, T. W. (2013). Modulation of oxidative stress as an anticancer strategy. *Nature Reviews Drug Discovery*, 12(12), 931–947. <https://doi.org/10.1038/nrd4002>
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2000). The Hallmarks of Cancer. *Cell*, 100(1), 57–70. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81683-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81683-9)
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5), 646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- Houpis, I. N., Patterson, L. E., Alt, C. A., Rizzo, J. R., Zhang, T. Y., & Haurez, M. (2005). Synthesis of PPAR Agonist via Asymmetric Hydrogenation of a Cinnamic Acid Derivative and Stereospecific Displacement of (S)-2-Chloropropionic Acid. *Organic Letters*, 7(10), 1947–1950. <https://doi.org/10.1021/ol050367e>
- Houseknecht, K. L., Cole, B. M., & Steele, P. J. (2002). Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR gamma) and its ligands: A review [Review]. *Domestic Animal Endocrinology*, 22(1), 1–23.
- Hseu, Y. C., Korivi, M., Lin, F. Y., Li, M. L., Lin, R. W., Wu, J. J., & Yang, H. L. (2018). Trans-cinnamic acid attenuates UVA-induced photoaging through inhibition of AP-1 activation and induction of Nrf2-mediated antioxidant genes in human skin fibroblasts. *Journal of Dermatological Science*, 90(2), 123–134. <https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2018.01.004>
- Hunke, M., Martinez, W., Kashyap, A., Bokoskie, T., Pattabiraman, M., & Chandra, S. (2018). Antineoplastic Actions of Cinnamic Acids and Their Dimers in Breast Cancer Cells: A Comparative Study. *Anticancer Research*, 38(8), 4469–4474. <https://doi.org/10.21873/anticancer.12749>
- IBM Corp. (2017). IBM SPSS Statistics for Macintosh. Armonk, NY: IBM Corp.

- Janani, C., & Ranjitha Kumari, B. D. (2015). PPAR gamma gene – A review. *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews*, 9(1), 46–50.
<https://doi.org/10.1016/j.dsx.2014.09.015>
- Jimenez, M. A., Akerblad, P., Sigvardsson, M., & Rosen, E. D. (2007). Critical Role for Ebf1 and Ebf2 in the Adipogenic Transcriptional Cascade. *Molecular and Cellular Biology*, 27(2), 743–757. <https://doi.org/10.1128/MCB.01557-06>
- Kadthur, J. C., Rao, S., Sonnahallipura, B. M., Thimmanahalli, D. S., & Laxmikanth, S. M. (2011). Prognostic Value of Ki 67 Proliferation Antigen in Canine Malignant Mammary Gland Tumours. *Brazilian Journal of Veterinary Pathology*, 4(1), 36–40.
- Kaszak, I., Ruszczak, A., Kanafa, S., Kacprzak, K., Król, M., & Jurka, P. (2018). Current biomarkers of canine mammary tumors. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 60(1), 66.
<https://doi.org/10.1186/s13028-018-0417-1>
- Keshamouni, V. G., Arenberg, D. A., Reddy, R. C., Newstead, M. J., Anthwal, S., & Standiford, T. J. (2005). PPAR- γ Activation Inhibits Angiogenesis by Blocking ELR+CXC Chemokine Production in Non-small Cell Lung Cancer. *Neoplasia*, 7(3), 294–301.
<https://doi.org/10.1593/neo.04601>
- Kim, J.-H., Song, J., & Park, K. W. (2015). The multifaceted factor peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) in metabolism, immunity, and cancer. *Archives of Pharmacal Research*, 38(3), 302–312. <https://doi.org/10.1007/s12272-015-0559-x>
- Kim, K. Y., Kim, S. S., & Cheon, H. G. (2006). Differential anti-proliferative actions of peroxisome proliferator-activated receptor- γ agonists in MCF-7 breast cancer cells. *Biochemical Pharmacology*, 72(5), 530–540.
<https://doi.org/10.1016/j.bcp.2006.05.009>
- Kim, S. W., Xie, Y., Nguyen, P. Q., Bui, V. T., Huynh, K., Kang, J. S., ... Jester, J. V. (2018). PPAR γ regulates meibocyte differentiation and lipid synthesis of cultured human meibomian gland epithelial cells (hMGEC). *The Ocular Surface*, 16(4), 463–469.
<https://doi.org/10.1016/j.jtos.2018.07.004>
- Kota, B. P., Huang, T. H.-W., & Roufogalis, B. D. (2005). An overview on biological mechanisms of PPARs. *Pharmacological Research*, 51(2), 85–94.
<https://doi.org/10.1016/j.phrs.2004.07.012>
- Lee, C. (2017). Collaborative Power of Nrf2 and PPAR γ Activators against Metabolic and Drug-Induced Oxidative Injury. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017, 1–14. <https://doi.org/10.1155/2017/1378175>
- Lee, J., & Ge, K. (2014). Transcriptional and epigenetic regulation of PPAR γ expression during adipogenesis. *Cell & Bioscience*, 4(1), 29. <https://doi.org/10.1186/2045-3701-4-29>
- Li, X., Wu, C., Chen, N., Gu, H., Yen, A., Cao, L., ... Wang, L. (2016). PI3K/Akt/mTOR signaling pathway and targeted therapy for glioblastoma. *Oncotarget*, 7(22), 33440–33450. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.7961>
- Liou, G.-Y., & Storz, P. (2010). Reactive oxygen species in cancer. *Free Radical Research*, 44(5), 479–496. <https://doi.org/10.3109/10715761003667554>
- Liu, D., Xiong, H., Ellis, A. E., Northrup, N. C., Rodriguez, C. O., O'Regan, R. M., ... Zhao, S.

- (2014). Molecular Homology and Difference between Spontaneous Canine Mammary Cancer and Human Breast Cancer. *Cancer Research*, 74(18), 5045–5056. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-0392>
- Liu, L., Hudgins, W. R., Shack, S., Yin, M. Q., & Samid, D. (1995). Cinnamic acid: A natural product with potential use in cancer intervention. *International Journal of Cancer*, 62(3), 345–350. <https://doi.org/10.1002/ijc.2910620319>
- Locatelli, E., & Comes Franchini, M. (2012). Biodegradable PLGA-b-PEG polymeric nanoparticles: synthesis, properties, and nanomedical applications as drug delivery system. *Journal of Nanoparticle Research*, 14(12), 1316. <https://doi.org/10.1007/s11051-012-1316-4>
- Ma, Q. (2013). Role of Nrf2 in Oxidative Stress and Toxicity. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-011112-140320>
- MacDonald, V. (2009). Chemotherapy: managing side effects and safe handling. *The Canadian Veterinary Journal = La Revue Veterinaire Canadienne*, 50(6), 665–668. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19721789>
- Malumbres, M., & Barbacid, M. (2009). Cell cycle, CDKs and cancer: A changing paradigm. *Nature Reviews Cancer*, 9(3), 153–166. <https://doi.org/10.1038/nrc2602>
- Mandelker, L. (2008). Introduction to Oxidative Stress and Mitochondrial Dysfunction. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 38(1), 1–30. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2007.10.005>
- Mashima, R., & Okuyama, T. (2015). The role of lipoxygenases in pathophysiology; new insights and future perspectives. *Redox Biology*, 6, 297–310. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2015.08.006>
- Matés, J. M., & Sánchez-Jiménez, F. M. (2000). Role of reactive oxygen species in apoptosis: implications for cancer therapy. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 32, 157–170. Retrieved from www.elsevier.com/locate/ijbcb
- Mir, M., Ahmed, N., & Rehman, A. ur. (2017). Recent applications of PLGA based nanostructures in drug delivery. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2017.07.038>
- Mohammad, R. M., Muqbil, I., Lowe, L., Yedjou, C., Hsu, H.-Y., Lin, L.-T., ... Azmi, A. S. (2015). Broad targeting of resistance to apoptosis in cancer. *Seminars in Cancer Biology*, 35, S78–S103. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2015.03.001>
- Mohanraj, V. J., & Chen, Y. (2007). Nanoparticles - A review. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 5(1), 561–573. <https://doi.org/10.4314/tjpr.v5i1.14634>
- Moloney, J. N., & Cotter, T. G. (2018). ROS signalling in the biology of cancer. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 80, 50–64. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2017.05.023>
- Murakami, S., & Motohashi, H. (2015). Roles of Nrf2 in cell proliferation and differentiation. *Free Radical Biology and Medicine*, 88(Part B), 168–178. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.06.030>
- Nava-Villalba, M., Nuñez-Anita, R. E., Bontempo, A., & Aceves, C. (2015). Activation of

- peroxisome proliferator-activated receptor gamma is crucial for antitumoral effects of 6-iodolactone. *Molecular Cancer*, 14(1), 168. <https://doi.org/10.1186/s12943-015-0436-8>
- Nguyen, F., Peña, L., Ibsch, C., Loussouarn, D., Gama, A., Rieder, N., ... Abadie, J. (2018). Canine invasive mammary carcinomas as models of human breast cancer. Part 1: Natural history and prognostic factors. *Breast Cancer Research and Treatment*, 167(3), 635–648. <https://doi.org/10.1007/s10549-017-4548-2>
- NIST. (2018). 2-Propenoic acid, 3-phenyl-. Retrieved February 23, 2019, from <https://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=C621829&Mask=80>
- Nojima, H., Kuboki, S., Shinoda, K., Shimizu, H., Ohtsuka, M., Kato, A., ... Miyazaki, M. (2016). Activation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma inhibits tumor growth by negatively regulating nuclear factor- κ B activation in patients with hepatocellular carcinoma. *Journal of Hepato-Biliary-Pancreatic Sciences*, 23(9), 574–584. <https://doi.org/doi:10.1002/jhbp.378>
- Nyo, Y. S., Kim, K. S., Cho, J. H., Ma, W., Choi, H.-J., Kwon, S.-J., & Han, J.-S. (2012). Phospholipase D1 mediates bFGF-induced Bcl-2 expression leading to neurite outgrowth in H19-7 cells. *Biochemical Journal*, 441(1), 407–416. <https://doi.org/10.1042/BJ20110302>
- Oishi, Y., Manabe, I., Tobe, K., Tsushima, K., Shindo, T., Fujiu, K., ... Nagai, R. (2005). Krüppel-like transcription factor KLF5 is a key regulator of adipocyte differentiation. *Cell Metabolism*, 1(1), 27–39. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2004.11.005>
- Pei, H., Yao, Y., Yang, Y., Liao, K., & Wu, J.-R. (2011). Krüppel-like factor KLF9 regulates PPAR γ transactivation at the middle stage of adipogenesis. *Cell Death & Differentiation*, 18(2), 315–327. <https://doi.org/10.1038/cdd.2010.100>
- Peters, J. M., Shah, Y. M., & Gonzalez, F. J. (2012). The role of peroxisome proliferator-activated receptors in carcinogenesis and chemoprevention. *Nature Reviews Cancer*, 12(3), 181–195. <https://doi.org/10.1038/nrc3214>
- Pontiki, E., & Hadjipavlou-Litina, D. (2018). Multi-Target Cinnamic Acids for Oxidative Stress and Inflammation: Design, Synthesis, Biological Evaluation and Modeling Studies. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 24(1), 12. <https://doi.org/10.3390/molecules24010012>
- Pontiki, E., Hadjipavlou-Litina, D., Litinas, K., & Geromichalos, G. (2014). Novel Cinnamic Acid Derivatives as Antioxidant and Anticancer Agents: Design, Synthesis and Modeling Studies. *Molecules*, 19(7), 9655–9674. <https://doi.org/10.3390/molecules19079655>
- Prasad, S., Gupta, S. C., & Tyagi, A. K. (2017). Reactive oxygen species (ROS) and cancer: Role of antioxidative nutraceuticals. *Cancer Letters*. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2016.03.042>
- Prijatelj, M., Turk, S., Zizak, Z., Mlinaric-Rascan, I., Sova, M., Gobec, S., ... Stankovic, J. (2013). Cinnamic Acid Derivatives Induce Cell Cycle Arrest in Carcinoma Cell Lines. *Medicinal Chemistry*, 9(5), 633–641. <https://doi.org/10.2174/1573406411309050002>
- Pseftogas, A., Gonidas, C., & Mosialos, G. (2017). Activation of peroxisome proliferator-

- activated receptor gamma in mammary epithelial cells upregulates the expression of tumor suppressor Cyld to mediate growth inhibition and anti-inflammatory effects. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 82, 49–56.
<https://doi.org/10.1016/j.biocel.2016.11.011>
- Rajendra Prasad, N., Karthikeyan, A., Karthikeyan, S., & Venkata Reddy, B. (2011). Inhibitory effect of caffeic acid on cancer cell proliferation by oxidative mechanism in human HT-1080 fibrosarcoma cell line. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 349(1–2), 11–19. <https://doi.org/10.1007/s11010-010-0655-7>
- Ramji, D. P., & Foka, P. (2002). CCAAT/enhancer-binding proteins: structure, function and regulation. *The Biochemical Journal*, 365(Pt 3), 561–575.
<https://doi.org/10.1042/BJ20020508>
- Rivera, P., & von Euler, H. (2011). Molecular Biological Aspects on Canine and Human Mammary Tumors. *Veterinary Pathology*, 48(1), 132–146.
<https://doi.org/10.1177/0300985810387939>
- Rovito, D., Gionfriddo, G., Barone, I., Giordano, C., Grande, F., De Amicis, F., ... Bonofiglio, D. (2016). Ligand-activated PPAR α downregulates CXCR4 gene expression through a novel identified PPAR response element and inhibits breast cancer progression. *Oncotarget*, 7(40), 65109–65124.
<https://doi.org/10.18632/oncotarget.11371>
- Russo, J. (2016). *The Pathobiology of Breast Cancer* (First Edit). Cham: Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-40815-6>
- Salas, Y., Márquez, A., Diaz, D., & Romero, L. (2015). Epidemiological Study of Mammary Tumors in Female Dogs Diagnosed during the Period 2002-2012: A Growing Animal Health Problem. *PLOS ONE*, 10(5), e0127381.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0127381>
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., ... Cardona, A. (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods*, 9(7), 676–682. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>
- Secretaria de Salud. (2015). *Estadísticas de Cáncer de Mama y Cáncer Cérvico Uterino*. Retrieved from <http://www.gob.mx/salud/acciones-y-programas/informacion-estadistica>
- Shapiro, C. L., & Recht, A. (2001). Side Effects of Adjuvant Treatment of Breast Cancer. *New England Journal of Medicine*, 344(26), 1997–2008.
<https://doi.org/10.1056/NEJM200106283442607>
- Shashni, B., Sakharkar, K. R., Nagasaki, Y., & Sakharkar, M. K. (2013). Glycolytic enzymes PGK1 and PKM2 as novel transcriptional targets of PPAR γ in breast cancer pathophysiology. *Journal of Drug Targeting*, 21(2), 161–174.
<https://doi.org/10.3109/1061186X.2012.736998>
- Siddiqui, M. A., Kashyap, M. P., Kumar, V., Al-Khedhairi, A. A., Musarrat, J., & Pant, A. B. (2010). Protective potential of trans-resveratrol against 4-hydroxynonenal induced damage in PC12 cells. *Toxicology in Vitro*. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2010.06.008>
- Singer, J., Weichselbaumer, M., Stockner, T., Mechtcheriakova, D., Sobanov, Y., Bajna, E.,

- ... Jensen-Jarolim, E. (2012). Comparative oncology: ErbB-1 and ErbB-2 homologues in canine cancer are susceptible to cetuximab and trastuzumab targeting. *Molecular Immunology*, 50(4), 200–209. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2012.01.002>
- Sleeckx, N., de Rooster, H., Veldhuis Kroeze, E., Van Ginneken, C., & Van Brantegem, L. (2011). Canine Mammary Tumours, an Overview. *Reproduction in Domestic Animals*, 46(6), 1112–1131. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2011.01816.x>
- Sosa, V., Moliné, T., Somoza, R., Paciucci, R., Kondoh, H., & LLeonart, M. E. (2013). Oxidative stress and cancer: An overview. *Ageing Research Reviews*, 12(1), 376–390. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2012.10.004>
- Srivastava, N., Kollipara, R. K., Singh, D. K., Sudderth, J., Hu, Z., Nguyen, H., ... Kittler, R. (2014). Inhibition of Cancer Cell Proliferation by PPAR γ Is Mediated by a Metabolic Switch that Increases Reactive Oxygen Species Levels. *Cell Metabolism*, 20(4), 650–661. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2014.08.003>
- Subramanian, K., & Ponnuchamy, K. (2018). Gold nanoparticles tethered cinnamic acid: preparation, characterization, and cytotoxic effects on MCF-7 breast cancer cell lines. *Applied Nanoscience*, 8(5), 1133–1138. <https://doi.org/10.1007/s13204-018-0764-2>
- Sullivan, L. B., Gui, D. Y., & Heiden, M. G. Vander. (2016). Altered metabolite levels in cancer: implications for tumour biology and cancer therapy. *Nature Reviews Cancer*, 16(11), 680–693. <https://doi.org/10.1038/nrc.2016.85>
- Suzuki, T., Hayashi, S., Miki, Y., Nakamura, Y., Moriya, T., Sugawara, A., ... Sasano, H. (2006). Peroxisome proliferator-activated receptor γ in human breast carcinoma: a modulator of estrogenic actions. *Endocrine-Related Cancer*, 13(1), 233–250. <https://doi.org/10.1677/erc.1.01075>
- Tabatabaei Mirakabad, F. S., Nejati-Koshki, K., Akbarzadeh, A., Yamchi, M. R., Milani, M., Zarghami, N., ... Joo, S. W. (2014). PLGA-Based Nanoparticles as Cancer Drug Delivery Systems. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 15(2), 517–535. <https://doi.org/10.7314/APJCP.2014.15.2.517>
- Tajiri, K., Aonuma, K., & Sekine, I. (2017). Cardiovascular toxic effects of targeted cancer therapy. *Japanese Journal of Clinical Oncology*, 47(9), 779–785. <https://doi.org/10.1093/jjco/hyx071>
- The Global Cancer Observatory. (2018a). *Population Fact Sheets by Country: Mexico* (Vol. 484).
- The Global Cancer Observatory. (2018b). *Population Fact Sheets by Human Development Index: High HDI* (Vol. 982).
- The Global Cancer Observatory. (2018c). *Population Fact sheets by Human Development index: Very High HDI* (Vol. 981).
- Tong, W. G., Ding, X. Z., & Adrian, T. E. (2002). The mechanisms of lipooxygenase inhibitor-induced apoptosis in human breast cancer cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 296(4), 942–948. [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(02\)02014-4](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(02)02014-4)
- Valdespino-Castillo, V. E., Mantilla-Morales, A., Damián-Matsumura, P., González-Núñez, L., Valdespino-Gómez, V. M., Alejandre-Cruz, J. E., ... López-López, M. (2014). *Biología*

- celular-molecular del cáncer*. (V. M. Valdespino-Gómez, Ed.) (First Edit). Ciudad de México: Universidad Autónoma Metropolitana.
- Vander Heiden, M. G., & DeBerardinis, R. J. (2017). Understanding the Intersections between Metabolism and Cancer Biology. *Cell*, *168*(4), 657–669. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.12.039>
- Vazquez, A., Kamphorst, J. J., Markert, E. K., Schug, Z. T., Tardito, S., & Gottlieb, E. (2016). Cancer metabolism at a glance. *Journal of Cell Science*. <https://doi.org/10.1242/jcs.181016>
- Vermeulen, K., Bockstaele, D. R. Van, & Berneman, Z. N. (2003). The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Proliferation*, *36*(3), 131–149. <https://doi.org/10.1306/74D715D2-2B21-11D7-8648000102C1865D>
- Visan, S., Balacescu, O., Berindan-Neagoe, I., & Catoi, C. (2015). In vitro comparative models for canine and human breast cancers. *Medicine and Pharmacy Reports*, *89*(1), 38–49. <https://doi.org/10.15386/cjmed-519>
- Wahli, W., & Michalik, L. (2012). PPARs at the crossroads of lipid signaling and inflammation. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, *23*(7), 351–363. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2012.05.001>
- Wang, H., & Joseph, J. A. (1999). Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader. *Free Radical Biology and Medicine*, *27*(5–6), 612–616. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(99\)00107-0](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(99)00107-0)
- Warburg, O. (1924). Über den Stoffwechsel der Carcinomzelle. *Die Naturwissenschaften*, *12*(50), 1131–1137. <https://doi.org/10.1007/BF01504608>
- Wong, R. S. (2011). Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, *30*(1), 87. <https://doi.org/10.1186/1756-9966-30-87>
- World Health Organization. (2018). Cancer. Retrieved June 8, 2018, from <http://www.who.int/topics/cancer/en/>
- Wright, H. M., Clish, C. B., Mikami, T., Hauser, S., Yanagi, K., Hiramatsu, R., ... Spiegelman, B. M. (2000). A Synthetic Antagonist for the Peroxisome Proliferator-activated Receptor γ Inhibits Adipocyte Differentiation. *Journal of Biological Chemistry*, *275*(3), 1873–1877. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.3.1873>
- Wu, W. S. (2006). The signaling mechanism of ROS in tumor progression. *Cancer and Metastasis Reviews*, *25*(4), 695–705. <https://doi.org/10.1007/s10555-006-9037-8>
- Xu, C.-C., Deng, T., Fan, M.-L., Lv, W.-B., Liu, J.-H., & Yu, B.-Y. (2016). Synthesis and in vitro antitumor evaluation of dihydroartemisinin-cinnamic acid ester derivatives. *European Journal of Medicinal Chemistry*, *107*, 192–203. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.11.003>
- Yan, K.-H., Yao, C.-J., Chang, H.-Y., Lai, G.-M., Cheng, A.-L., & Chuang, S.-E. (2009). The synergistic anticancer effect of troglitazone combined with aspirin causes cell cycle arrest and apoptosis in human lung cancer cells. *Molecular Carcinogenesis*, *49*(3), n/a-n/a. <https://doi.org/10.1002/mc.20593>
- Yezhelyev, M. V., Gao, X., Xing, Y., Al-Hajj, A., Nie, S., & O'Regan, R. M. (2006). Emerging

use of nanoparticles in diagnosis and treatment of breast cancer. *Lancet Oncology*, 7(8), 657–667. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(06\)70793-8](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(06)70793-8)

Yin, F., Wakino, S., Liu, Z., Kim, S., Hsueh, W. A., Collins, A. R., ... Law, R. E. (2001). Troglitazone Inhibits Growth of MCF-7 Breast Carcinoma Cells by Targeting G1 Cell Cycle Regulators. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 286(5), 916–922. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2001.5491>

ANEXOS

ANEXO 1: Estándar ácido cinámico (NIST, EUA). Espectro FTIR

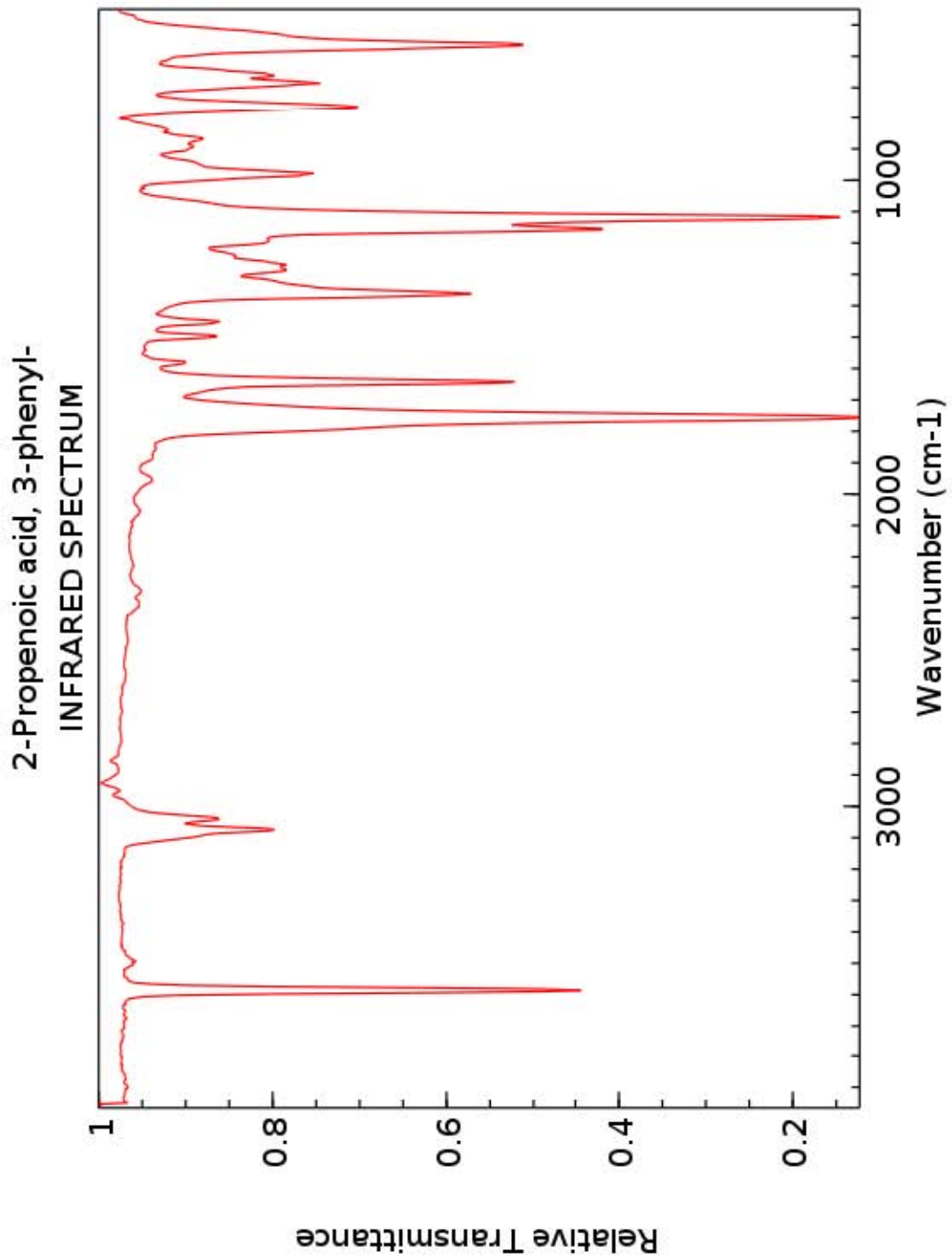


Figura 20. Estándar NIST de ácido cinámico. espectro FTIR

ANEXO 2: 3,4-Diclorobencil-p-fenoxicilamida (LQM755). Espectro FTIR

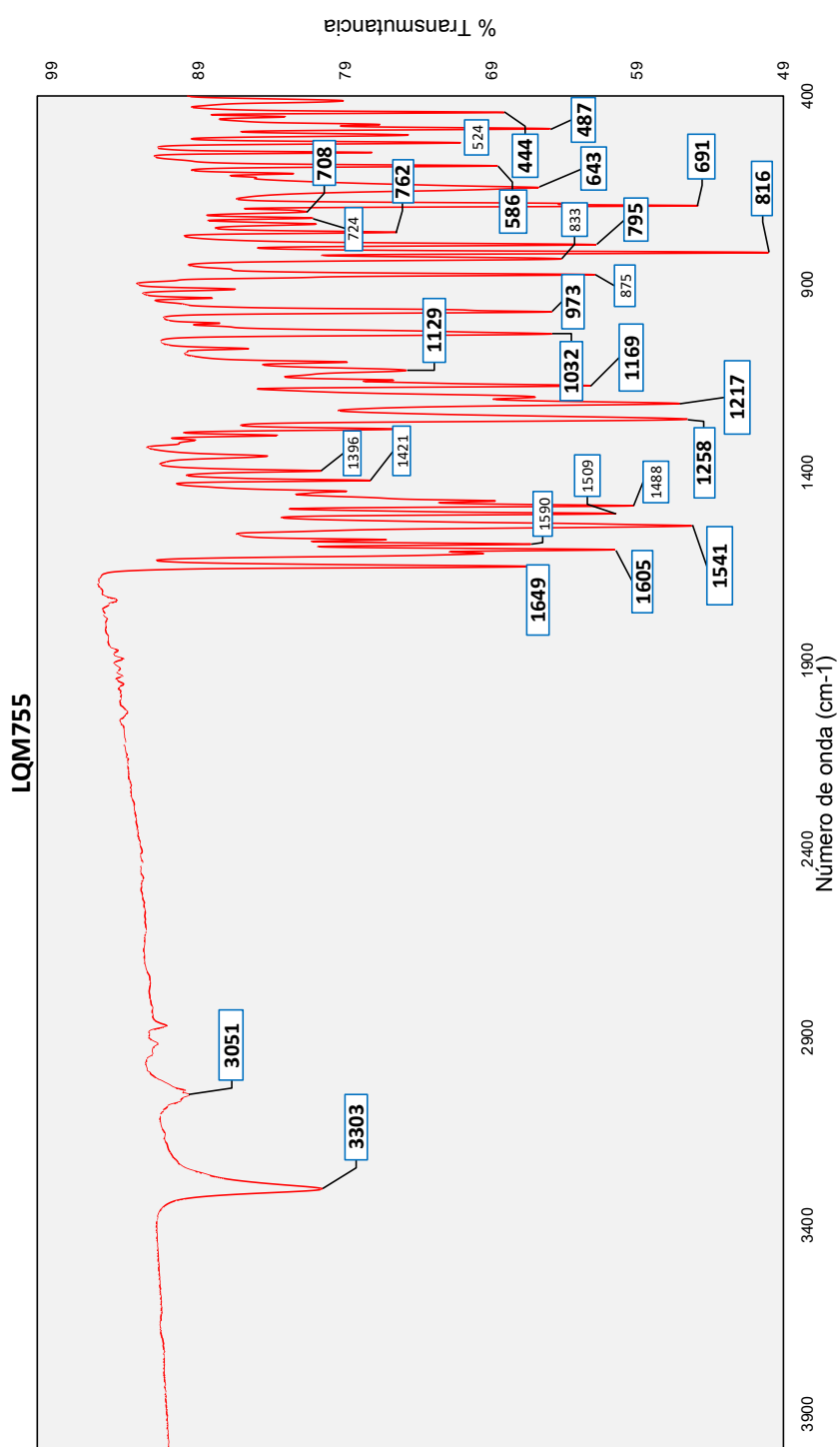


Figura 21. 3, 4 - diclorobencil p fenoxicilnamida (LQM755). Espectro FTIR. Se muestran los valores de las bandas presentes en el espectro; resaltadas en negro se muestran las bandas utilizadas para la caracterización del compuesto.

ANEXO 3: Determinación espectrofotométrica de la eficiencia de captura de LQM755

Determinación de la longitud de onda de LQM755

Para la determinación espectrofotométrica de la eficiencia de captura del compuesto LQM755 por parte del sistema nanoparticulado de PLGA, en primer lugar se determinó la longitud de onda adecuada mediante la determinación de la absorbancia máxima en el equipo Du-64 Spectrophotometer (Beckman, USA) en longitudes en el rango de λ 240nm a 556nm a una concentración de 40 μ g/mL de LQM755 en acetonitrilo (Cuadro 5).

λ (nm)	Absorbancia			
	Replica 1	Replica 2	Replica 3	Promedio
556	0.003	0.005	0.003	0.0037
415	0.007	0.008	0.010	0.0083
355	0.012	0.014	0.016	0.0140
325	0.457	0.464	0.451	0.4573
251	0.675	0.778	0.746	0.7330
240	0.000	0.000	0.000	0.0000

Cuadro 5. Determinación de valor máximo de absorbancia del compuesto LQM755 por espectrofotometría UV-Vis

Si bien la máxima absorbancia obtenida se encuentra a una longitud de onda de λ 251nm, al momento de realizar la determinación de la absorbancia a concentraciones superiores a 40 μ g/mL se alcanzaron los límites de detección del equipo en uso, por lo que se optó por utilizar la longitud de λ 325nm, longitud a la cual se detecta una señal aceptable del compuesto y se encuentra dentro de los límites de detección del equipo en cuestión.

Determinación de la eficiencia de captura de LQM755 en acetonitrilo

La determinación de la eficiencia de captura del compuesto LQM755, se realizó mediante la detección del compuesto presente en el sobrenadante obtenido después de la concentración de las nanopartículas de PLGA-LQM755 por ultra centrifugación, dejándolo desecar a 65°C por al menos 48h para permitir la evaporación total del medio en el que se encuentra suspendido el compuesto a detectar. Posteriormente se realiza la suspensión del

LQM755 en acetonitrilo grado HPLC y es mantenido en agitación orbital a 175rpm durante 4h. La lectura de la absorbancia del LQM755 en suspensión se realiza por triplicado a $\lambda 325\text{nm}$ en el equipo Du-64 Spectrophotometer (Beckman, USA). Se calcula la concentración de LQM755 presente en la muestra con ayuda de una curva de LQM755 a $\lambda 325\text{nm}$ (Cuadro 6 y Figura 22) y es ajustada por la cantidad de mL total del sobrenadante y restadas a la concentración utilizada para la preparación de las nanopartículas.

Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	Absorbancia ($\lambda 325\text{nm}$)			
	Replica 1	Replica 2	Replica 3	Promedio
0	0.000	0.000	0.000	0.0000
20	0.253	0.256	0.267	0.2587
40	0.45	0.446	0.455	0.4503
80	1.219	1.225	1.233	1.2257
160	2.901	2.684	2.791	2.7920
Pendiente	0.0178			
Ordenada	-0.1210			
Coefficiente de Correlación (R^2)	0.9911			

Cuadro 6. Curva de concentración de LQM755 ($\mu\text{g/mL}$) a $\lambda 325\text{nm}$.

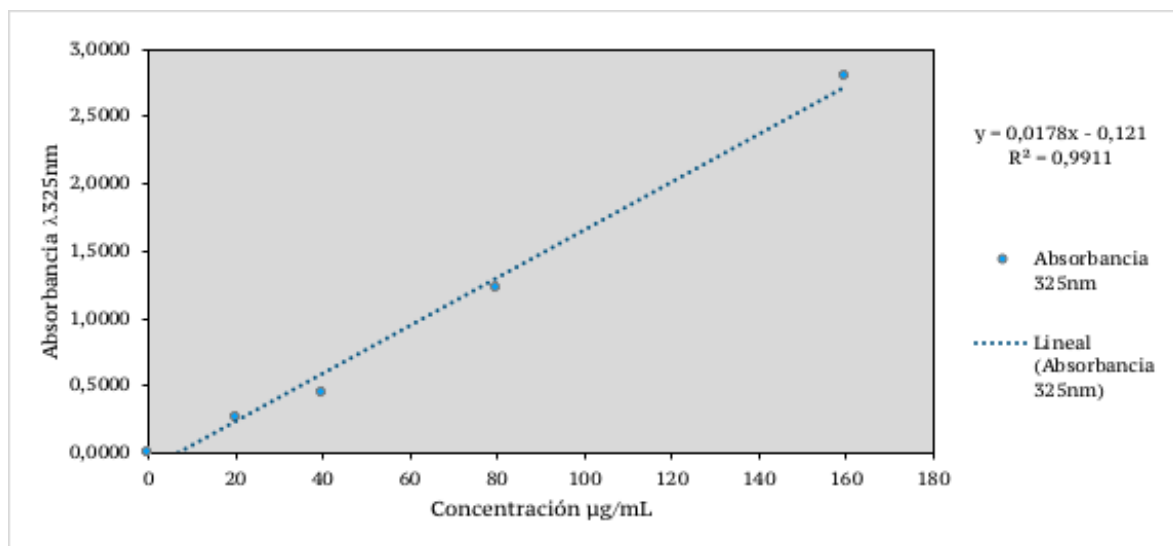


Figura 22. Curva de concentración de LQM755 ($\mu\text{g/mL}$) a $\lambda 325\text{nm}$.