

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SINALOA**  
**Facultad de Ciencias de la Nutrición y Gastronomía**  
**Maestría en Ciencias de la Nutrición y Alimentos Medicinales**



**Título de la tesis**

**“Evaluación *in vitro* del efecto del hierro y de la curcumina en la proliferación celular en líneas celulares MCF-7 y 4T1 y evaluación del consumo de curcumina en un modelo murino de cáncer de mama”**

**Como requisito para obtener el grado de:**

**MAESTRA EN CIENCIAS DE LA NUTRICIÓN Y ALIMENTOS  
MEDICINALES**

**Presenta:**

**LN. Marce Yaneth Inzunza Soto**

**Directores de tesis:**

**Dr. Elí Terán Cabanillas**  
**Dra. Marcela de Jesús Vergara Jiménez**

# APROBACIÓN

## Título de la tesis

**“Evaluación *in vitro* del efecto del hierro y de la curcumina en la proliferación celular en líneas celulares MCF-7 y 4T1 y evaluación del consumo de curcumina en un modelo murino de cáncer de mama”**

**Autor:**

**L.N. Marce Yaneth Inzunza Soto**



Dr. Elí Terán Cabanillas  
Director de la tesis



Dra. Marcela de Jesus Vergara Jiménez  
Directora de la Tesis



Dr. Emir Adolfo Leal León  
Miembro del Comité de tesis

Evelia Milán N.

Dra. Evelia María Milán Noris  
Miembro del Comité de Tesis



# UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SINALOA

## CARTA CESION DE DERECHOS

En la Ciudad de Culiacán Sinaloa el día 29 del mes Junio  
del año 2020, el (la) que suscribe  
Marce Yaneth Inzunza Soto alumno (a) del Programa de  
Ciencias de la Nutrición y Alimentos Medicinales con número de cuenta 12699101, de  
la Unidad Académica Facultad de Ciencias de la Nutrición y Gastronomía,  
manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección  
de Dr. Elí Terán Cabanillas y la Dra. Marcela de Jesús Vergara Jiménez

y cede los derechos del trabajo titulado  
“ Evaluación *in vitro* del efecto del hierro y de la curcumina en la proliferación celular en  
líneas celulares MCF-7 y 4T1 y evaluación del consumo de curcumina en un modelo murino  
de cáncer de mama ”,

a la Universidad Autónoma de Sinaloa para su difusión, con fines académicos y de  
investigación por medios impresos y digitales.

La Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos  
(México) protege el contenido de la presente tesis. Los usuarios de la información  
contenida en ella deberán citar obligatoriamente la tesis como fuente, dónde la  
obtuvo y mencionar al autor intelectual. Cualquier uso distinto como el lucro,  
reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el  
respectivo titular de los Derechos de Autor.

Marce Yaneth Inzunza Soto

marcel

Nombre completo y firma

## AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a la Universidad Autónoma de Sinaloa y en especial a la Unidad Académica de Ciencias de la Nutrición y Gastronomía, ahora orgullosamente Facultad de Nutrición por brindarme las herramientas para formarme como Licenciada en Nutrición y ahora como Maestra en Ciencias, también al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por su financiamiento económico durante estos años y su excelente programa de estancias académicas en el extranjero.

A mis directores de tesis, el Dr. Elí Terán Cabanillas que siempre estuvo al cien por ciento involucrado en este proyecto, gracias por su apoyo, paciencia y sobre todo por impulsarme a dejar algunos miedos de lado y aventurarme a vivir nuevas experiencias fuera de mi ciudad e incluso fuera del país, experiencias que me hicieron crecer como estudiante, profesional y sobre todo como persona. A la Dra. Marcela de Jesús Vergara Jiménez por ser una pieza clave en mi educación a lo largo de todo este periodo y hacerse tiempo durante su larga jornada laboral para poder atender mis dudas e inquietudes, y sobre todo por la amistad que ambos me han brindado.

A la Facultad de Ciencias Químico Biológicas por permitirme realizar la mayor parte de mis experimentos, así como a mis asesores de tesis el Dr. Emir Leal León y la Dra. Evelia María Milán Noris por siempre estar al pendiente de mis avances y mi proyecto de investigación. Al Dr. Héctor Samuel López Moreno por abrirme las puertas de su Laboratorio de Biología Molecular y por sus hilarantes chistes, uno siempre regresa a donde fue feliz, ¿o como?

Al Dr. Roberto Avena, por la oportunidad de realizar mi estancia de investigación con su equipo de trabajo en USDA, sin duda fue una de las mejores experiencias en mi formación académica. Al Dr. Moisés Franco por recibirme con los brazos abiertos en la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, gracias por todo su apoyo y por la experiencia de trabajo con animales en el

laboratorio. Al Dr. Jesús Enrique Jiménez Ferrer y Mc. Jonathan Cortés Álvarez del Centro de Investigaciones Biomédicas del Sur – IMSS por su asesoría para mi ensayo *in vivo*.

A mi familia, a mis padres y hermanos que siempre me han apoyado en todo lo que he decidido hacer y se que lo seguirán haciendo siempre, gracias por exigirme tanto al inicio, es por ustedes que he podido hacer todo lo que me propongo, por los valores que me han enseñado y todo su cariño, los amo. A mi prometido, gracias por cada palabra de aliento, cuando te decía que ya estaba cansada y siempre llegabas con un café y algún detalle para animarme, eres el mejor, te amo.

Por último, pero no menos importante, a las cinco personas que me acompañaron en este barco por dos años, mis compañeros de maestría, y sobre todo a las tres mujeres que ahora son de mis mejores amigas y que quiero muchísimo, sin ustedes esto no hubiera sido tan divertido. ¡Hey! ¿Pero las risas no faltaron, no?

# ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS .....	vi
ÍNDICE DE TABLAS.....	viii
ANEXOS .....	ix
RESUMEN.....	10
INTRODUCCIÓN.....	11
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA .....	12
Clasificación y epidemiología del cáncer .....	12
Clasificación del cáncer por TNM.....	14
Tumor primario (T).....	14
Ganglios linfáticos regionales (N).....	15
Metástasis distante (M) .....	15
Clasificación y epidemiología del cáncer de mama.....	17
Fisiopatología del cáncer de mama .....	18
Subtipos histológicos y moleculares del cáncer mama.....	19
Luminal A.....	20
Luminal B.....	20
Triple negativo o basal.....	20
Receptor del crecimiento epidérmico humano 2 (HER2).....	20
Similar a la mama normal.....	20
Estadificación del cáncer de mama .....	21
Nutrición y cáncer de mama.....	23
Tratamiento para cáncer de mama .....	24
Metabolismo del hierro .....	25
Metabolismo del hierro en las células cancerosas .....	29
Características de la curcumina .....	31
Curcumina y cáncer.....	33
HIPÓTESIS.....	36
OBJETIVOS.....	37
Objetivo General.....	37
Objetivos Específicos .....	37
MATERIALES Y MÉTODOS .....	38
Materiales.....	38

Metodología .....	38
Diseño del experimento.....	38
Líneas celulares y condiciones de cultivo.....	39
Ensayo de crecimiento celular.....	39
Ensayo para la viabilidad celular MTT .....	41
Ensayo in vivo.....	43
Análisis Estadístico.....	46
RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	47
Confluencia de las células MCF-7 a las 24 y 48 horas .....	47
El hierro no aumenta la proliferación celular en las líneas celulares de cáncer de mama .....	51
La curcumina inhibe la proliferación celular en las líneas celulares de cáncer de mama .....	55
Los efectos antiproliferativos de la curcumina son dependientes del hierro .....	59
La curcumina administrada por vía oral inhibe el crecimiento tumoral in vivo .....	67
CONCLUSIONES.....	75
RECOMENDACIONES .....	76
REFERENCIAS .....	77

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Metabolismo del hierro en el organismo. ....	28
<b>Figura 2.</b> Color y estructura química de la curcumina.....	32
<b>Figura 3.</b> Crecimiento de las células MCF-7 a las 0, 24 y 48 horas. ....	40
<b>Figura 4.</b> Concentraciones de los tratamientos utilizados en el ensayo para la viabilidad celular MTT en la línea celular de cáncer de mama MCF-7 y 4T1.....	42
<b>Figura 5.</b> Porcentaje de confluencia celular a las 24 h por los diferentes tratamientos: células sin tratamiento, FAC 100 $\mu$ M, Cur 10 $\mu$ M, Cur 50 $\mu$ M y la combinación FAC:CUR 1:1. ....	48
<b>Figura 6.</b> Porcentaje de confluencia celular a las 48 h por los diferentes tratamientos: células sin tratamiento, FAC 100 $\mu$ M, Cur 10 $\mu$ M, cur 50 $\mu$ m y la combinación FAC:CUR 1:1. ....	50
<b>Figura 7.</b> Porcentaje de proliferación celular mediante el ensayo MTT en células de cáncer de mama MCF-7 con los tratamientos: células sin tratamiento, FAC 10 $\mu$ M y FAC 100 $\mu$ M. ....	52
<b>Figura 8.</b> Porcentaje de proliferación celular mediante el ensayo MTT en células de cáncer de mama 4T1 con los tratamientos: células sin tratamiento, FAC 10 $\mu$ M y FAC 100 $\mu$ M. ....	54
<b>Figura 9.</b> Porcentaje de proliferación celular mediante el ensayo MTT en células de cáncer de mama MCF-7 con los tratamientos: células sin tratamiento, Curcumina 20 $\mu$ M y Curcumina 50 $\mu$ M.....	56
<b>Figura 10.</b> Porcentaje de proliferación celular mediante el ensayo MTT en células de cáncer de mama 4T1 con los tratamientos: células sin tratamiento, Curcumina 50 $\mu$ M y Curcumina 100 $\mu$ M.....	58
<b>Figura 11.</b> Porcentaje de proliferación celular mediante el ensayo MTT en células de cáncer de mama MCF-7 con los tratamientos: células sin tratamiento, FAC:CUR 1:1, FAC:CUR 1:2 y FAC:CUR 1:3.....	60



<b>Figura 12.</b> Porcentaje de proliferación celular mediante el ensayo MTT en células de cáncer de mama 4T1 con los tratamientos: células sin tratamiento, FAC:CUR 1:1, FAC:CUR 1:2 y FAC:CUR 1:3.....	62
<b>Figura 13.</b> Porcentaje de proliferación celular mediante el ensayo MTT en células de cáncer de mama MCF-7 con los tratamientos: células sin tratamiento, FAC:CUR 1:1, FAC:CUR 2:1 y FAC:CUR 3:1.....	64
<b>Figura 14.</b> Porcentaje de proliferación celular mediante el ensayo MTT en células de cáncer de mama 4T1 con los tratamientos: células sin tratamiento, FAC:CUR 1:1, FAC:CUR 2:1 y FAC:CUR 3:1.....	66
<b>Figura 15.</b> Control del peso (gr) de los ratones hembras BALB/c sometidos al ensayo <i>in vivo</i> durante 5 semanas. Grupo control, grupo curcumina, grupo OC y grupo quimioterapia.....	68
<b>Figura 16.</b> Crecimiento del volumen tumoral (mm <sup>3</sup> ) de los ratones hembras BALB/c sometidos al ensayo <i>in vivo</i> durante 5 semanas. Grupo control, grupo curcumina, grupo OC y grupo quimioterapia. ....	71
<b>Figura 17.</b> Peso total (gr) de los tumores extraídos de los ratones hembras BALB/c sometidos al ensayo <i>in vivo</i> durante 5 semanas. Grupo control, grupo curcumina, grupo OC y grupo quimioterapia. ....	74

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Estadios del cáncer por el sistema TNM. ....	16
<b>Tabla 2.</b> Diferenciación del CaMa por grado y puntuación por American Cancer Society.....	22
<b>Tabla 3.</b> Concentraciones, dosis administradas y periodo de administración de los tratamientos durante el ensayo <i>in vivo</i> .....	45

## ANEXOS

ANEXO 1 .....	85
ANEXO 2 .....	86
ANEXO 3 .....	87
ANEXO 4 .....	88
ANEXO 5 .....	89

## RESUMEN

Actualmente, el cáncer de mama es considerado como una de las patologías más comunes en la población femenina. Recientemente se ha asociado a la alteración del metabolismo intracelular del hierro como un importante factor en el desarrollo de cáncer. Así, es de suma importancia el estudio del metabolismo del hierro y el potencial uso de agentes quelantes, como la curcumina, para su tratamiento. **Objetivo.** Investigar el papel del hierro, y de su quelación con curcumina en la proliferación celular en líneas celulares de cáncer de mama y evaluar el efecto antitumoral *in vivo* de la curcumina en un modelo murino de cáncer de mama. **Metodología.** Se utilizaron las líneas celulares de cáncer de mama MCF-7 de humano y 4T1 de ratón. Se midió el porcentaje de confluencia como parámetro de crecimiento celular, así como la capacidad de proliferación utilizando el método del MTT, en presencia y ausencia de diferentes concentraciones de Citrato de amonio férrico (FAC), como fuente de hierro, y de curcumina, conocida por sus propiedades quelantes de hierro. Para los estudios *in vivo* se implantaron células de cáncer de mama murino en ratones BALB/c. Posteriormente se calculó el volumen del tumor en desarrollo y se asignó un tratamiento vía intragástrica en presencia y ausencia de curcumina o quimioterapia a cada grupo de ratones. Se evaluó el crecimiento o disminución del tumor respectivo al tipo de tratamiento. **Resultados.** La curcumina puede inhibir la proliferación celular en las líneas celulares MCF-7 y 4T1 y la adición de FAC en las células induce el aumento de la confluencia celular. La administración de curcumina por vía intragástrica disminuye el crecimiento tumoral *in vivo*.

**Palabras clave:** Cáncer, cáncer de mama, hierro, curcumina, MCF-7, 4T1, quelantes, metabolismo, proliferación celular.

## INTRODUCCIÓN

Actualmente, el cáncer de mama se considera una de las patologías más comunes en la población femenina (Todua, Gagua, Maglakelidze, & Maglakelidze, 2015) y la causa de un mayor número de muertes en México (Knaul et al., 2009). Aunque la mayoría de los factores de riesgo identificados pueden llegar a ser modificables, los sistemas de salud tienen como reto concentrarse en actividades que permitan fortalecer la prevención primaria como la investigación y desarrollo de nuevas tecnologías, y actividades de prevención secundaria y terciaria (Robles & Galanis, 2009). Recientemente, se ha asociado a la alteración del metabolismo intracelular del hierro como un factor clave en el desarrollo de cáncer (Torti, 2013), esto sugiere que la acumulación de hierro es una característica propia de las células cancerígenas involucradas en mecanismos asociados a tumorigénesis, como el metabolismo del hierro alterado en las células tumorales, disfunción mitocondrial asociada a sobrecarga de hierro y supresión del sistema inmune (Brown, Richardson, Kabir, & Trinder, 2020). La curcumina se considera un quelante natural de hierro, es decir que se une al hierro con una alta afinidad (Torti, 2013). El enfoque en estas moléculas puede ser un punto clave en la terapia contra el cáncer de mama, el uso de productos naturales es atractivo por que presentan un alto potencial terapéutico y al mismo tiempo pueden ser menos propensos a inducir efectos adversos (Song, Zhang, Dai, & Luo, 2019).

La incidencia del cáncer de mama va en aumento, y sin un mejor sistema de información no habrá condiciones para evaluar el impacto de la detección oportuna, es por ello la urgencia y pertinencia de investigar las características del cáncer de mama que puedan ayudar a determinar los pronósticos y tratamientos más certeros y eficientes para esta enfermedad. Por todo lo anterior, se propone investigar el efecto del hierro, y de su quelación con curcumina en la proliferación celular en líneas celulares de cáncer de mama MCF-7 y 4T1, así como la administración de forma intragástrica de la curcumina, como coadyuvante en el tratamiento del cáncer de mama.

# REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

## Clasificación y epidemiología del cáncer

El cáncer es una enfermedad que puede afectar a cualquier parte del organismo, se produce por la transformación de las células normales en células tumorales en diferentes etapas que pueden llevar a la progresión de una lesión precancerosa a un tumor maligno. Existen dos categorías para los tumores, benignos y malignos, los tumores benignos son masas que crecen lentamente, no invaden tejido circundante, son menos dañinos y pueden ser retirados fácilmente, los tumores malignos son invasivos y tienen el potencial de destruir tejidos adyacentes (Korgaonkar & Yadav, 2019). El cáncer no es una enfermedad estática, evoluciona con el tiempo acumulando nuevas mutaciones (Bidram et al., 2019), una característica que define al cáncer es la rápida multiplicación de las células anormales, estas se extienden más allá de los límites a los que están designadas y pueden invadir otras partes del cuerpo o propagarse a otros órganos, a este proceso se le conoce como metástasis (OMS, 2018).

El cáncer puede ser clasificado según el sitio primario de origen o por sus tipos histológicos o de tejidos. El sitio primario de origen se refiere a que el cáncer puede ser de un tipo específico como cáncer de próstata, cáncer oral, cáncer de pulmón, cáncer de riñón, cáncer de cerebro etc. Por otra parte, los tipos histológicos o de tejido se clasifican en seis categorías importantes: sarcoma, mieloma, carcinomas, linfoma, leucemia, y tipos mezclados (National Cancer Institute, 2020).

Los sarcomas son un tipo de cáncer que se originan en los tejidos de soporte y conectivos, como los huesos, tendones, cartílagos, músculo y grasas. Los tumores de sarcoma generalmente tienen similitud con el tejido en el que crecen y es normal que su aparición se de en adultos jóvenes, el sarcoma más común a menudo se desarrolla como una masa dolorosa en el hueso. Algunos ejemplos de sarcomas son

osteosarcoma o sarcoma osteogénico (hueso), liposarcoma (tejido adiposo), condrosarcoma (cartílago), fibrosarcoma (tejido fibroso), glioma o astrocitoma (tejido conectivo neurogénico que se encuentra en el cerebro), entre otros (National Cancer Institute, 2020). Por otra parte, los mielomas son un tipo de cáncer en la sangre. Este tipo de cáncer se origina en las células plasmáticas de la médula ósea que se encargan de producir diversos anticuerpos en respuesta a infecciones (National Cancer Institute, 2020). Los carcinomas son tumores malignos del tejido epitelial que representan del 80-90% de todos los casos de cáncer, son neoplasias de origen epitelial o cáncer del revestimiento interno o externo del cuerpo. El tejido epitelial está presente en todo el cuerpo, desde la piel hasta el revestimiento de los órganos y los conductos internos como el tracto gastrointestinal. Los carcinomas se dividen en dos subtipos principales: adenocarcinoma, que se desarrolla en un órgano o glándula, y carcinoma de células escamosas, que se origina en el epitelio escamoso. Gran parte de los carcinomas afectan órganos o glándulas capaces de secretar, como los senos que producen leche, los pulmones y colon que secretan moco, la próstata que produce semen y la vejiga donde se almacena la orina (National Cancer Institute, 2020). A su vez, el origen de los linfomas se da en las glándulas o ganglios del sistema linfático, una red de vasos, ganglios y órganos (bazo, amígdalas y el timo) que se encargan de purificar los fluidos corporales y producen glóbulos blancos y linfocitos que combaten infecciones. Los linfomas son cánceres sólidos y pueden aparecer en órganos específicos como estómago, cerebro o senos. Estos linfomas se denominan linfomas extranodales. Los linfomas se subclasifican en dos categorías: linfoma de Hodgkin y linfoma de no Hodgkin. La presencia de células de Reed-Sternberg en el linfoma de Hodgkin distingue diagnósticamente el linfoma de Hodgkin del linfoma no Hodgkin (National Cancer Institute, 2020). Las leucemias son cánceres de la médula ósea (sitio de producción de las células sanguíneas), también se conocen como cánceres líquidos o en la sangre. La enfermedad se asocia con la sobreproducción de glóbulos blancos inmaduros que no funcionan correctamente, por lo tanto, las personas pueden ser más propensas a una infección. La leucemia también afecta a los glóbulos rojos y puede ocasionar mala coagulación de la sangre y fatiga debido a la anemia. Los tipos de leucemia son la leucemia miélogena o granulocítica (neoplasia maligna de las series

de glóbulos blancos mieloides y granulocíticas), leucemia linfática, linfocítica o linfoblástica (malignidad de la serie de células sanguíneas linfoides y linfocíticas) y policitemia vera o eritremia (malignidad de varios productos de células sanguíneas, pero con predominio de glóbulos rojos) (National Cancer Institute, 2020). Por último, encontramos a los tipos mezclados, en donde los componentes de este tipo pueden estar dentro de una categoría o de diferentes categorías. Algunos ejemplos son: carcinoma adenoescamoso, tumor mesodérmico mixto, carcinosarcoma y teratocarcinoma (National Cancer Institute, 2020).

## **Clasificación del cáncer por TNM**

El sistema de clasificación TNM se usa para describir el tamaño del tumor primario y la diseminación del cáncer a los ganglios linfáticos cercanos o a otras partes del cuerpo. Mediante este sistema se utiliza la “T” para referirse al tamaño y la ubicación del tumor, “N” tamaño y ubicación de los ganglios linfáticos donde se diseminó el cáncer y “M” para la diseminación del cáncer a otras partes del cuerpo, metástasis. Cuando el cáncer es descrito por el sistema TNM, se pueden agregar más detalles acerca del cáncer por ejemplo (Instituto Nacional del Cancer, 2015)(Cserni, Chmielik, Cserni, & Tot, 2018)(Hortobagyi, Edge, & Giuliano, 2019).

### **Tumor primario (T)**

- TX: No puede medirse un tumor primario
- T0: No puede encontrarse un tumor primario
- T1, T2, T3, T4: Se refiere al tamaño y/o extensión del tumor principal. En cuanto más grande es el número después de la T, mayor es el tumor o tanto más ha crecido en los tejidos cercanos. Las T pueden dividirse todavía más para proveer más detalle, como T3a y T3b.



### **Ganglios linfáticos regionales (N)**

- NX: No puede medirse el cáncer en los ganglios linfáticos cercanos
- N0: No hay cáncer en los ganglios linfáticos cercanos
- N1, N2, N3: Se refiere al número y ubicación de los ganglios linfáticos que tienen cáncer. En cuanto más grande es el número después de la N, más son los ganglios linfáticos que tienen cáncer.

### **Metástasis distante (M)**

- MX: No puede medirse la metástasis
- M0: El cáncer no se ha diseminado a otras partes del cuerpo
- M1: El cáncer se ha diseminado a otras partes del cuerpo

También puede utilizarse una forma más simple donde las combinaciones TNM se agrupan en cinco estadios menos detallados (Tabla 1) (Instituto Nacional del Cancer, 2015).

**Tabla 1.** Estadios del Cáncer por el sistema TNM (Instituto Nacional del Cancer, 2015).

Estadios	Descripción
Estadio 0	Presencia de células anormales, pero no se han diseminado al tejido cercano. Se llama también carcinoma in situ, o CIS. El CIS no es cáncer, pero puede convertirse en cáncer.
Estadio I Estadio II Estadio III	Presencia de células anormales. En cuanto más grande es el número, mayor es el tumor y existe mayor probabilidad de que se extienda a tejidos cercanos.
Estadio IV	El cáncer se ha diseminado a partes distantes del cuerpo (metástasis).

Según las estimaciones de la OMS el cáncer es la principal causa de muerte en todo el mundo (Todua et al., 2015). Según GLOBOCAN en el 2018 se presentaron 18.1 millones de nuevos casos y 9.6 millones de muertes por cáncer en todo el mundo (Korgaonkar & Yadav, 2019). En México, el cáncer es la tercera causa de muerte después de las enfermedades cardiovasculares y la diabetes. Según estimaciones de la Union for International Cancer Control cada año se suman alrededor de 128,000 casos de mexicanos, aunque la Agencia Internacional de Investigación para el Cáncer considera elevar esta cifra hasta 140,000 casos (Sociedad Mexicana de Oncología, 2016). El cáncer de pulmón es el cáncer mayormente diagnosticado en hombres, seguido por el cáncer de próstata, el cáncer colorrectal y cáncer de hígado. El cáncer de mama es el cáncer diagnosticado con mayor frecuencia en mujeres (24.2%, es decir, aproximadamente uno de cada 4 casos de cáncer diagnosticado en mujeres en todo el mundo es cáncer de mama) (International Agency for Research on Cancer, 2018).

### **Clasificación y epidemiología del cáncer de mama**

El cáncer de mama es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en todo el mundo. De todos los tipos de cáncer, éste es el segundo más común en el mundo y el más frecuente en mujeres (Limon-Miro, Lopez-Teros, & Astiazaran-Garcia, 2017), representa alrededor del 25% de todos los canceres (Naja et al., 2019). El cáncer de mama es causante, en general, de un mayor número de muertes en México. En la actualidad es la principal causa de muerte entre las mujeres mexicanas adultas de entre 30 a 54 años. (Knaul et al., 2009). Sinaloa se encuentra entre las primeras 10 entidades con más personas con cáncer, en primer lugar se encuentra el cáncer de mama en mujeres (Secretaría de Salud, 2017). El aumento de morbilidad o mortalidad del cáncer de mama en diferentes países se ven agravados aún más por factores culturales, factores de estilo de vida y campañas nacionales de concientización (Harbeck et al., 2019).

## Fisiopatología del cáncer de mama

La fisiopatología del cáncer de mama aun no esta completamente descrita, pero se conoce como multidimensional y se puede asociar a diferentes factores de riesgo (Imagen). El ser mujer y el avance de la edad son dos de los más importantes. Las mutaciones genéticas, específicamente BCRA1 y BCRA2, representan alrededor del 5-10% de los cánceres de mama. Otros factores relacionados incluyen antecedentes de carcinoma ductal *in situ*, obesidad, menarca temprana (antes de los 13 años), primer nacimiento a partir de los 30 años o nulidad, antecedentes familiares de cáncer de mama u ovario, menopausia tardía y el uso de terapia hormonal posmenopáusica (Watkins, 2019), así como la inflamación crónica a nivel local y sistémico (Deshmukh et al., 2019). En este sentido, la nutrición juega un papel protagónico ya que la obesidad se define como un estado de inflamación crónica asociado al aumento de tejido graso (Engin, 2017) y juega un papel importante en desarrollo y evolución del cáncer de mama (Fortner, Katzke, Kühn, & Kaaks, 2016). Aunque solo el 5% de los factores genéticos contribuyen a la aparición de la enfermedad, el 95% se debe a factores ambientales como el alcohol, tabaco, actividad física e hiperinsulinemia (Merino Bonilla, Torres Tabanera, & Ros Mendoza, 2017); la dieta representa del 30-35% de estos factores, también es importante considerar estímulos externos como la radiación, contaminación e infecciones (Baena Ruiz & Salinas Hernández, 2014).

Aunque la mayoría de los factores de riesgo identificados pueden llegar a ser modificables, los sistemas de salud tienen como reto concentrarse en actividades que permitan fortalecer principalmente la prevención primaria como la investigación y desarrollo de nuevas tecnologías, y actividades de prevención secundaria y terciaria (Robles & Galanis, 2009). El cáncer de mama se describe como una enfermedad heterogénea por su histología, epidemiología y propiedades moleculares (Testa, Castelli, & Pelosi, 2020). La enfermedad puede diferir mucho a nivel histológico y molecular entre los individuos portadores del cáncer y también dentro de un solo tumor (Deshmukh et al., 2019).

## Subtipos histológicos y moleculares del cáncer mama

Los tumores mamarios se dividen en gran medida en dos subtipos: el carcinoma de mama pre-invasivo o *in situ* y el carcinoma de mama invasivo. El carcinoma de mama pre-invasivo o *in situ* hace referencia al cáncer de mama localizado que aun no se ha diseminado más allá del sitio primario de la enfermedad. Se subclasifica además como carcinoma ductal *in situ* (DCIS) o carcinoma lobular *in situ* (LCIS). Su principal característica es que las células cancerígenas están restringidas al revestimiento de los conductos de la leche en el seno y no han invadido el tejido mamario circundante o cualquier otra parte del cuerpo. Si este tipo de cáncer no es tratado puede propagarse al tejido cercano con el tiempo y convertirse en un cáncer de mama invasivo. El carcinoma de mama invasivo ha invadido los tejidos mamarios circundantes en el momento del diagnóstico. Al igual que el carcinoma *in situ*, los carcinomas invasivos son un grupo de tumores que puede clasificarse en diferentes tipos histológicos, como carcinomas ductales/lobulares, ductales infiltrados, lobulares invasivos, tubulares, medulares, mucinoso (coloideo) y papilares. El más común es el carcinoma ductal invasivo (IDC), representa alrededor del 70-80% de todas las lesiones invasivas, se desarrolla en los conductos de la leche y se propaga al tejido graso de la mama fuera del conducto (Deshmukh et al., 2019).

Hasta la fecha se han identificado cinco subtipos moleculares de cáncer de mama de acuerdo con sus perfiles de expresión génica y progresión tumoral, estos se clasifican en luminal A, luminal B, triple negativo o basal, receptor del crecimiento epidérmico humano 2 (HER2) y similar a la mama normal (Shea, Koh, & Tan, 2020) (Testa et al., 2020). Dos subtipos adicionales que son menos comunes y de los que se sabe poco son carcinoma claudin-low, que presenta una expresión baja o ausente de marcadores luminales y una expresión elevada de marcadores de transición epitelial mesenquimal (EMT) y el carcinoma apocrino molecular mamario se caracteriza por tener un fenotipo positivo del receptor ER negativo/andrógeno (Deshmukh et al., 2019).

### **Luminal A**

Se considera un subtipo hormona-receptor positivo (ER+ y/o PR+) y HER2 negativo. Los tumores de este tipo son considerados de bajo riesgo, crecen lentamente y al ser tratados correctamente tienen los mejores resultados entre los demás subtipos moleculares (Deshmukh et al., 2019).

### **Luminal B**

Es un subtipo hormona-receptor positivo (ER+ y/o PR+), pero puede ser HER2 positivo o negativo. Los tumores de este tipo crecen más rápido, presentan un grado tumoral más pobre y un pronóstico más pobre comparado con el subtipo luminal A (Deshmukh et al., 2019).

### **Triple negativo o basal**

Como su nombre lo indica todos los receptores de hormonas permanecen negativos (ER-, PR- y HER2-). Es considerado el subtipo más agresivo (Deshmukh et al., 2019) (18) y es más propenso a ser diagnosticado cuando pasa a un estadio III o IV (Watkins, 2019).

### **Receptor del crecimiento epidérmico humano 2 (HER2)**

Este subtipo es hormona-receptor negativo (ER- y PR-), pero es positivo para HER2. Los tumores de este subtipo molecular crecen más rápido que los subtipos luminales A y B, sin embargo, se pueden tratar con fármacos anti-HER2 (Deshmukh et al., 2019).

### **Similar a la mama normal**

Es un subtipo hormona-receptor positivo (ER+ y PR+) y HER2 negativo. Su pronóstico generalmente es bueno, pero ligeramente peor que el subtipo luminal A (Deshmukh et al., 2019).

## **Estadificación del cáncer de mama**

El proceso que se usa para determinar si el cáncer se diseminó dentro de la mama o a otras partes del cuerpo se llama estadificación. Es de suma importancia conocer el grado o estadio del cáncer de mama para conocer mejor el curso, pronóstico y tratamientos de la enfermedad. El estadio del cáncer de mama se determina según el tamaño y la ubicación del tumor primario, la diseminación del cáncer a los ganglios linfáticos cercanos o a otras partes del cuerpo, el grado del tumor y la presencia de ciertos biomarcadores. Se estudian tres características de las células cancerosas y a cada una se le asigna una puntuación. Luego se agregan las puntuaciones para obtener un número entre 3 y 9 que se utiliza para obtener un grado de 1, 2 o 3, que se indica en su informe de patología. En lugar de números, a veces se emplean los términos bien diferenciados, moderadamente diferenciados y pobremente diferenciados para describir el grado (Tabla 2), también se necesita tomar en cuenta la presencia de necrosis (áreas de células cancerosas muertas o en proceso de morir), si hay necrosis significa que el tumor está creciendo rápidamente (American Cancer Society, 2019).

**Tabla 2.** Diferenciación del CaMa por grado y puntuación (American Cancer Society, 2019).

Grado	Diferenciación	Puntuación	Descripción
1	Bien diferenciado	3,4,5	Crecimiento celular más lento y presenta un aspecto como el tejido mamario normal.
2	Moderadamente diferenciado	6,7	Mayor crecimiento de las células y su aspecto corresponde a un valor entre los grados 1 y 3.
3	Pobrementemente diferenciado	8,9	Las células cancerosas continúan creciendo y probablemente se propagaran más rápido, tienen un aspecto muy diferente a las células normales.



## Nutrición y cáncer de mama

La intervención nutricional es una parte importante de la prevención del cáncer y de su tratamiento. La OMS estima que aproximadamente la tercera parte de las muertes por cáncer se deben a cinco factores conductuales y dietéticos: falta de actividad física, un pobre consumo de frutas y verduras, un alto índice de masa corporal (IMC), consumo de tabaco y la ingesta excesiva de alcohol (Wallace et al., 2018). El tratamiento nutricional en el paciente oncológico enfocado a la ingesta adecuada de nutrientes y energía, puede mejorar la respuesta y reducción de la toxicidad de los tratamientos farmacológicos contra el cáncer (Cicco et al., 2019). Existe una íntima relación entre la nutrición y la enfermedad, debido a que la enfermedad puede causar trastornos en la nutrición y esta a su vez puede influir de forma negativa a la enfermedad (Cisneros et al., 2014). Durante las últimas décadas la ciencia ha evaluado la relación entre alimentos específicos (verduras, frutas, alcohol, alimentos de soja, carne, etc.) y el desarrollo del cáncer de mama. Como se había mencionado anteriormente es importante seguir ciertas recomendaciones como estar físicamente activo, mantener un peso corporal saludable, limitar la ingesta de grasas (en especial las grasas saturadas), seguir una dieta rica en fibra y soja, aumentar el consumo de cereales integrales, bajo consumo de carnes rojas y alimentos refinados, así como aumentar el consumo de frutas y verduras. En conjunto esto puede mejorar la supervivencia y el pronóstico general después del diagnóstico de cáncer de mama, sobretodo en mujeres que han sido diagnosticadas con esta enfermedad en etapa temprana (etapa I, etapa II o etapa IIIA) (Cicco et al., 2019). También se ha demostrado que el consumo adecuado de vitamina D en la dieta puede ser un factor protector contra el cáncer de mama (Puente-Yagüe, Cuadrado-Cenzual, Ciudad-Cabañas, Hernández-Cabria, & Collado-Yurrita, 2018). Se ha descrito que la vitamina D puede interferir en la proliferación de las células cancerosas, presenta actividades de estrés antioxidante, antiinvasión, antiangiogénesis y presenta un efecto antiproliferativo, incluso puede utilizarse antes o durante la quimioterapia para buscar estos efectos (Viala et al., 2018)

## **Tratamiento para cáncer de mama**

El tratamiento para cáncer de mama debe ser planificado de acuerdo con el estadio de la enfermedad, habitualmente se utilizan combinaciones de cirugía, radioterapia, quimioterapia adyuvante y hormonoterapia. Los medicamentos utilizados en estas terapias no son selectivos para atacar solo a las células neoplásicas, otras estirpes celulares también resultan afectadas, como las células sanguíneas principalmente los neutrófilos, lo cual es una limitante para la frecuente administración del tratamiento, esto además puede inducir inmunosupresión (Cisneros et al., 2014).

La terapia sistémica y locoregional son los dos principales tratamientos en el manejo del cáncer de mama, las características histológicas y moleculares de este tipo de cáncer influyen en gran medida en las decisiones del tratamiento. Es importante un enfoque multidisciplinario especializado en el tratamiento, esto puede mejorar la supervivencia y la calidad de vida de los pacientes con cáncer de mama en etapa temprana y cuando ha llegado a metástasis (Harbeck et al., 2019). Los factores patológicos y predictivos del cáncer de mama invasivo pueden predecir los resultados de supervivencia y la selección de la terapia adyuvante para cada paciente. Los parámetros de pronósticos convencionales a considerar son: el tipo de tumor, grado, tamaño y el estado de los ganglios linfáticos, proporcionando información del curso probable de la enfermedad (Shea et al., 2020). Por otro lado, se han desarrollado nuevas estrategias para la terapia oncológica como la terapia fototérmica (usando un agente fototérmico activado por la luz que produce calor para dañar las células tumorales), la terapia fotodinámica (donde se destruyen las células tumorales utilizando un fármaco fotosensibilizante activado por longitudes de onda específicas de luz), la terapia génica (tratar o modificar células tumorales utilizando materiales genéticos o estimular las células inmunitarias) y la terapia con nanopartículas (fármacos dirigidos directamente a los tumores) (Bidram et al., 2019).

Al igual que en otros tipos de cáncer, la metástasis, la recurrencia y la resistencia a los medicamentos son las principales barreras para el tratamiento del cáncer de mama. Evidencia científica ha demostrado que las frutas y verduras ricas en diversos fitoquímicos bioactivos como los polifenoles pueden disminuir la incidencia del cáncer y su reaparición, los polifenoles dietéticos poseen efectos positivos en la inhibición de la tumorigénesis y potencian la sensibilidad de los fármacos en el tratamiento del cáncer (Gu, Mao, & Du, 2019). La curcumina es un polifenol dietético de la cúrcuma que ha demostrado tener efectos anticancerígenos (Gu et al., 2019), además una de las propiedades más interesantes es que puede interferir con varias vías de señalización y con diferentes moléculas bioactivas (Bahrami, Majeed, & Sahebkar, 2019). El enfoque en estas moléculas puede ser un punto clave en la terapia contra el cáncer de mama, el uso de productos naturales es atractivo por que presenta un alto potencial terapéutico y al mismo tiempo pueden ser menos propensos a inducir efectos adversos (Song et al., 2019). Diversos estudios han proporcionado evidencia convincente de la conexión entre el metabolismo de hierro celular profundamente desregulado y la progresión del cáncer de mama. (Chekhun et al., 2013). La combinación de tratamientos con agentes no citotóxicos puede mejorar los resultados y superar la quimioresistencia sin aumento de toxicidad para el organismo. (Bayet-Robert et al., 2010) Los quelantes del hierro son pequeñas moléculas naturales o sintéticas que se unen al hierro con una alta afinidad, la curcumina es considerada un quelante de hierro natural (Torti, 2013).

## **Metabolismo del hierro**

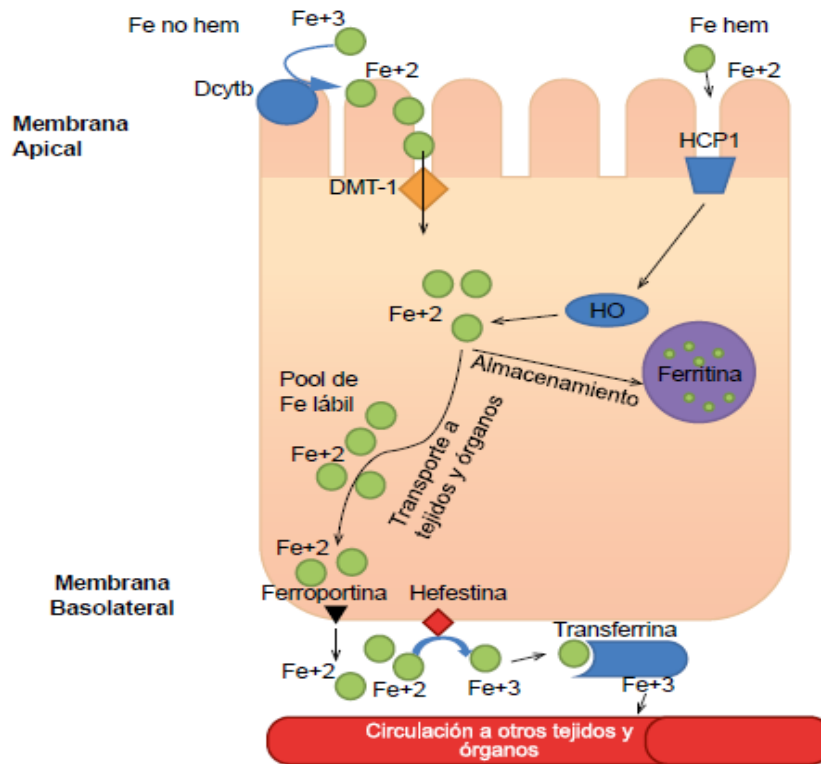
El hierro (Fe) es un oligoelemento esencial para una gran variedad de funciones fisiológicas en el organismo (Nishito & Kambe, 2018). Tiene un papel importante como cofactor o componente estructural para numerosas enzimas (Abbaspour, Hurrell, & Kelishadi, 2014), participa en el control del crecimiento, la diferenciación celular, el metabolismo energético y la síntesis de proteínas de transporte de oxígeno (Gulec, Anderson, & Collins, 2014). A lo largo del tiempo los mamíferos han desarrollado

mecanismos regulatorios muy complejos que intervienen en la absorción, el transporte y el reciclaje del hierro, la diferencia con otros nutrimentos esenciales radica en que los seres humanos no cuentan con un mecanismo activo para la excreción de hierro, aunque se pierden pequeñas cantidades a través de la bilis, células gastrointestinales, la exfoliación de la piel y la orina (Gulec et al., 2014). Debido a que el hierro esta relacionado con diferentes procesos fisiológicos, su sobrecarga puede ser tóxica, el control del hierro en el cuerpo se debe dar de manera compleja y ajustada. El primer control es la absorción instestinal, seguida de la regulación hepática y la redistribución en diferentes tejidos, sobretodo en el sistema retículo endotelial (Mittler et al., 2018).

La única fuente de hierro para el cuerpo es a través de la dieta, a excepción de las transfusiones de eritrocitos y la administración de hierro por vía parenteral para el tratamiento en la deficiencia de hierro o anemia (Coffey & Ganz, 2017). En el organismo podemos encontrar dos tipos de hierro, el hierro exógeno que obtenemos de los alimentos y el hierro endógeno que esta presente por la recirculación del mismo en las proteínas que lo contienen, principalmente la hemoglobina (Milto, Suhodolo, Prokopieva, & Klimenteva, 2016). Existen dos tipos de hierro presente en los alimentos, el hierro hemo y el hierro no hemo. El hierro hemo proviene de la hemoglobina y mioglobina de los alimentos de origen animal y el hierro no hemo está presente en tejidos animales y en alimentos de origen vegetal. El hierro no hemo se absorbe en menor cantidad que el hierro hemo. (Egli, 2010).

El nivel de absorción de los alimentos con hierro es bastante variable, normalmente solo se absorbe una pequeña parte. La asimilación del hierro en el tracto gastrointestinal también depende en gran medida de la proporción en los alimentos de los productos de origen animal y vegetal (Milto et al., 2016). La cantidad total de hierro en el organismo en un adulto es de 3-4g, el 65% se encuentra en la hemoglobina, 25% en los órganos de depósito (hígado, macrófagos del sistema retículo endotelial y medula ósea) y el 10% restante en la mioglobina, peroxidasa, catalasas y citocromos. Normalmente se absorben de 1-2mg de hierro al día de la dieta y esta misma cantidad se excreta a diario (Conde, De, Allende, & Conde, 2017).

La absorción de hierro tiene lugar en el duodeno por los enterocitos duodenales y en la región proximal del yeyuno. El hierro que recibimos de los alimentos entra al organismo en estado ferrico ( $\text{Fe}_{3+}$ ), para ser absorbido se somete a diferentes fases, la primer fase es la fase luminal donde es solubilizado y se convierte en estado ferroso ( $\text{Fe}_{2+}$ ) por medio del citocromo B duodenal (DCYTB) (Andrews, 2009), una ferrireductasa que se encuentra en el borde de cepillo para poder transportarse a los enterocitos. Después de reducirse a estado ferroso el hierro hemo es liberado por la digestión enzimática de la hemoglobina y mioglobina en la fase mucosa, así entra al enterocito a través de la proteína transportadora de hemo (PCH) (E. Albertine, 2014), por otro lado, el hierro no hemo se une a la membrana de borde en cepillo (BBM) y se transporta a la célula mucosa por el transportador de iones metálicos divalentes 1 (DMT1) (Gulec et al., 2014) (J. Wang & Pantopoulos, 2011), este transportador acoplado a protones está ubicado en la membrana apical (Nishito & Kambe, 2018). El hemo es degradado por la homooxigenasa y se libera hierro en la fase celular. El hierro es almacenado en ferritina celular o se transporta directamente a un sitio opuesto al lado de la mucosa. En la ultima fase de absorción del hierro, la ferroportina, un transportador celular basolateral libera  $\text{Fe}_{2+}$  en la circulación portal (Figura 1) (E. Albertine, 2014).



**Figura 1.** Absorción del hierro en su forma hemo y no hemo por el enterocito. Para lograr la absorción del Fe no hémico debe reducirse a  $Fe^{+2}$  por la DCytB, el siguiente paso es incorporarse al citoplasma por medio de DMT1, donde forma parte del pool de Fe libre (hierro en estado ferroso). El Fe puede ser almacenado en ferritina o ser transportado a la circulación a través de la ferroportina. Después se oxida a  $Fe^{+3}$  por la proteína hefestina que se encuentra en la membrana del enterocito y es transportado por la transferrina a la circulación. El Fe hémico es captado por el transportador HCP1, la enzima hem oxigenasa libera al Fe y tiende a seguir los mismos pasos del Fe no hémico (Sermini, Acevedo, & Arredondo, 2017).

Se ha identificado que existe un eje regulador en el metabolismo sistémico del hierro, formado por la ferroportina-hepcidina (Torti, 2013). La hepcidina es una hormona peptídica que se sintetiza en el hígado, actúa como un regulador negativo de los depósitos de hierro, en respuesta al aumento de los niveles de hierro, el hígado puede aumentar la síntesis de hepcidina para actuar sobre los sitios de absorción (enterocitos en el duodeno), como almacenamiento (principalmente en los hepatocitos del hígado) o como método de reciclaje (macrofagos del sistema reticuloendotelial), lo que conlleva a una disminución de la liberación de hierro de estos tejidos (Rishi, Wallace, & Subramaniam, 2015). Esta hormona inhibe la absorción de hierro en el duodeno y la salida del mismo a los hepatocitos y macrófagos a través de su unión e induciendo la degradación de ferroportina, exportador del hierro. La desregulación del eje ferroportina-hepcidina está relacionada no solo a las enfermedades de hierro como la hemocromatosis hereditaria y la anemia, también esta implicada en el desarrollo de diferentes tipos de cáncer (Coffey & Ganz, 2017). Las personas con hemocromatosis tienen mucha más probabilidad de desarrollar cáncer de hígado y de colon, debido a que su organismo acumula Fe en exceso, debido a una absorción aumentada de Fe intestinal por una mutación en el gen de la proteína HFE (E. Albertine, 2014).

### **Metabolismo del hierro en las células cancerosas**

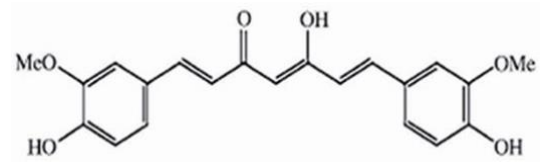
La homeostasis del hierro desregulado normalmente se asocia con el fenotipo del cáncer maligno, en especial la expresión de genes regulados por el hierro que captan mayores demandas metabólicas de hierro necesarias para la división, crecimiento y supervivencia. Las células tumorales adaptan el metabolismo intracelular del hierro a su favor para poder acumular una mayor cantidad de este, al aumentar la absorción y almacenamiento de hierro, al mismo tiempo que limitan la exportación del hierro (Jung, Mertens, Tomat, & Brüne, 2019). Algunos estudios, han encontrado que existen tumores que crean su propio microambiente para así evitar las restricciones impuestas por la limitada disponibilidad sistémica del hierro. En el caso de los tumores de mama, estos reducen la ferroportina e incrementan los niveles de hepcidina, perturbando el

control homeostático normal para adquirir mayor cantidad de hierro (Torti, 2013). En la región traducida de 5' del ARNm de FPN1 (la principal proteína para la transferencia de hierro de las células a la circulación) está presente un elemento sensible al hierro (IRE), la deficiencia de hierro en el citoplasma puede ser detectado mediante proteínas reguladoras del hierro (IRP)-1 y -2, lo que mejora su actividad para unirse a IRE y así inhibir la producción de FPN1. Como capacidad de este mecanismo, la exportación de hierro se inhibe cuando el hierro intracelular es escaso. El sistema IRP/IRE es considerado importante para la proliferación de células tumorales, se ha documentado que la activación de IRP2 está relacionado con el aumento de la presencia de hierro en las células de cáncer de próstata en ensayos *in vitro* y la sobreexpresión de IRP1 afecta el crecimiento de las células de cáncer de pulmón transplantadas en ratones a pesar del aumento de los niveles de TFR1. Cuando la sobreexpresión de FT, TFR1, DMT1 y la desregulación de IRP y el eje FPN1-hepcidina están a favor de un fenotipo de carga de hierro, la progresión tumoral de las células cancerosas es acelerada. Diversos ensayos *in vitro* e *in vivo* sugieren que la aplicación de quelantes de hierro, el agotamiento del hierro en la dieta y la interferencia con el eje FPN1-hepcidina puede retirar de forma exitosa el hierro de las células malignas, por lo tanto puede ser probable que el equilibrio de los niveles del hierro pueda satisfacer las necesidades metabólicas sin causar daño celular, deteriore la señalización oncogénica o pueda inducir ferroptosis en las células de cáncer para sostener o detener la progresión de la enfermedad (Pfeiffer-Obermair, Tymoszek, Petzer, & Weiss, 2018). Conocer las alteraciones en el metabolismo del hierro en las células con cáncer nos puede proporcionar valor diagnóstico y pronóstico para los pacientes con esta enfermedad y puede ser una estrategia terapéutica potencial para el tratamiento del cáncer de mama. (Chekhun et al., 2013)



## Características de la curcumina

La curcumina fue descubierta por primera vez por Vogel y Pelletier a partir de los rizomas de curcuma es un polifenol hidrófobo (Kunnumakkara et al., 2017), es un compuesto de color amarillo (Zhao, Pi, Ye, Zhao, & Wei, 2019), tautomérico ceto-enol con una forma ceto predominante en soluciones ácidas o neutras y forma enol predominante en soluciones alcalinas con buenas propiedades como quelante de iones metálicos y tiene un pH de 2.5 a 7. La curcumina es el principio activo de la hierba *Curcuma longa* (cúrcuma), una planta herbácea perenne rizomatosa de la familia del jengibre (Hsieh, Chang, Hung, Lin, & Shih, 2017). Es considerada una especie tradicional de la india utilizada en la industria textil por sus propiedades para teñir (Ravindranath & Nanjundiah, 1980) y utilizada en la gastronomía india por su sabor, también se ha utilizado a lo largo de los años en los países asiáticos como hierba medicinal (Srimal & Dhawan, 1973). La curcumina se identificó como (1E,6E)-1,7-bis(4-hidroxi-3-metoxifenol)-1,6-heptadieno-3,5-diona, también llamada diferuloilmetano (Mario Pulido-Moran, Jorge Moreno-Fernandez, 2016). Se ha identificado una familia de sustancias en la cúrcuma llamada curcuminoides, entre ellas se encuentran: curcumina (curcumina I), demetoxicurcumina (curcumina II), bisdemetoxicurcumina (curcumina III) y la ciclocurcumina recientemente identificada (Kunnumakkara, Anand, & Aggarwal, 2008). La curcumina tiene un peso molecular de 368.38 g/mol y su fórmula química es  $C_{21}H_{20}O_6$ , presenta al menos tres estructuras químicas, incluidos dos sistemas de anillos aromáticos con grupos O-metoxifenólicos que están unidos por un enlace de siete carbonos que contiene un resto de  $\alpha,\beta$ -insaturado y  $\beta$ -dicetona (Figura 2) (Shafabakhsh, Hossein, & Reza, 2019).



**Figura 2.** Color y estructura química de la curcumina (Lv et al., 2014).

El uso de la curcumina para efectos medicinales se ve limitado en gran medida por su color, baja biodisponibilidad y falta de solubilidad en agua. Algunos de los factores que pueden estar relacionados con la baja biodisponibilidad de la curcumina en plasma y tejidos se asocian con una mala absorción, metabolismo lento y eliminación sistémica rápida (Kunnumakkara et al., 2017). La curcumina tiene una baja solubilidad acuosa (11 ng/ml en agua), esta débil solubilidad causa dificultades en su administración oral. Al administrarse vía intravenosa o intraperitoneal, una cantidad de curcumina se excreta a través de la bilis en forma de derivados de hexahidrocurcumina y tetrahydrocurcumina glucoronida (Shafabakhsh et al., 2019). La presencia de los dos grupos OH fenólicos en la estructura de la curcumina son fácilmente metabolizados por transferasas, a través de una transformación en glucoronidos y sulfatos, por esto la vida media de la curcumina es muy corta y es necesario crear nuevas formas para dosificar la curcumina como, micelas, encapsulación de ciclodextrina, nanopartículas y complejos con fosfolípidos (Hsieh et al., 2017). En general el consumo de curcumina es seguro, según el Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios y la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria, la ingesta diaria admisible (IDA) es de 0-3 mg/kg, su seguridad y eficacia se evaluó en ensayos clínicos que involucrarán sujetos humanos sanos (Kunnumakkara et al., 2017).

### **Curcumina y cáncer**

La curcumina ha sido estudiada por sus efectos antiangiogénicos, antiinflamatorios, antioxidantes y anticancerígenos. Diferentes autores han demostrado que la curcumina, sola o en conjunto con otros agentes anticancerígenos, pueden inducir apoptosis en las células tumorales (Lv et al., 2014), así como la supresión de la proliferación celular y metástasis (Liu & Ho, 2018). En la terapia contra el cáncer, se ha identificado que la curcumina presenta una variedad de efectos multifacéticos debido a sus numerosos mecanismos antineoplásicos (Shafabakhsh et al., 2019). El efecto antiproliferativo de la curcumina podría estar relacionado a la capacidad para regular el ciclo celular, quinasas de proteínas y factores de transcripción, incluyendo NF- $\kappa$ B (factor nuclear kappa-B) (Liu & Ho, 2018). La mayor parte de las investigaciones en el

último medio siglo han revelado funciones importantes de la curcumina en la terapia contra el cáncer, uno de los más importantes como ya se mencionó anteriormente, el factor de transcripción NF-kB relacionado con el efecto antiproliferativo en muchos tipos de células cancerosas (Zhao et al., 2019). La mayoría de los tumores activan el factor de transcripción NF-kB mientras que los agentes naturales quimiopreventivos lo pueden suprimir, lo que indica una fuerte relación entre la biología tumoral y los efectos contra el cáncer de diferentes compuestos naturales. Según Xie, et al (2010) NF-kB también regula la expresión de genes como *Mmps*, *Vegf* y *Cox-2*, que están implicados en la metástasis del cáncer, este factor se activa especialmente en los cánceres mal diferenciados como el cáncer de mama. La curcumina puede inhibir la angiogénesis del cáncer, así como la migración y la invasión a través de la interacción con las moléculas reguladoras clave como NF-kB (Farhangi, Mohammad, Khodayari, & Khodayari, 2015).

Se ha demostrado que la curcumina es un compuesto relativamente seguro y bien tolerado por animales y humanos, incluso en dosis altas (Moghtaderi, Sepehri, & Attari, 2017). La combinación de tratamientos con agentes no citotóxicos puede mejorar los resultados y superar la quimioresistencia sin aumento de toxicidad para el organismo (Bayet-Robert et al., 2010), aunque la mayoría de las células cancerosas mueren por las terapias anticancerígenas, este efecto disminuirá o incluso puede desaparecer después de varias rondas o ciclos del tratamiento (Liu & Ho, 2018). Sin embargo, la gran mayoría de los estudios sobre la curcumina en el cáncer son *in vitro* o en modelos en animales *in vivo* donde es administrada por vía sistémica, principalmente por vía intraperitoneal (Babaei et al., 2012), por lo tanto en nuestro estudio es indispensable investigar el efecto de la curcumina administrada vía intragástrica con la finalidad de conocer y comparar sus beneficios con otras investigaciones.

Los métodos terapéuticos basados en combinaciones tratan de mejorar las respuestas clínicas y minimizar los efectos secundarios, así como disminuir la tasa de resistencia a los medicamentos. Al combinar múltiples compuestos, surge el hecho de que cada agente puede tener un único objetivo o mecanismos de acción, o que ambos

compuestos puedan compartir el mismo objetivo o mecanismos de acción contra las células cancerosas (Moghtaderi et al., 2017). La curcumina ha sido utilizada en combinación con otros agentes seguros, se ha buscado obtener una sinergia de la curcumina con otros nutraceuticos en la practica clínica para lograr una terapia con mayor eficacia y menos toxicidad (Kunnumakkara et al., 2017).

Las cifras demuestran que la tendencia de cáncer de mama va en aumento en toda la región, y que sin un mejor sistema de información no habrá condiciones para evaluar el impacto de la detección oportuna, es por ello la urgencia y pertinencia de investigar las características del cáncer de mama que puedan ayudar a determinar los pronósticos y tratamientos más certeros y eficientes para esta enfermedad. Por todo lo anterior, se propone investigar el metabolismo del hierro, y de su quelación con curcumina en la proliferación celular en líneas celulares de cáncer de mama MCF-7 y 4T1, así como el administración de forma intragástrica de la curcumina, un agente quelante de hierro, como coadyuvante en el tratamiento del cáncer de mama.

## HIPÓTESIS

La curcumina inhibe la confluencia y proliferación celular *in vitro* en las líneas celulares de cáncer de mama MCF-7 y 4T1 por medio de la quelación de hierro y disminuye el crecimiento tumoral en un modelo murino de cáncer de mama.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo General**

Investigar el papel del hierro, y de su quelación con curcumina, en la proliferación celular en líneas celulares de cáncer de mama y evaluar el efecto antitumoral *in vivo* de la curcumina en un modelo murino de cáncer de mama.

### **Objetivos Específicos**

Investigar el efecto de la curcumina y del hierro intracelular en el crecimiento y proliferación celular *in vitro* en células de cáncer de mama MCF-7.

Investigar el efecto de la curcumina y del hierro intracelular en el crecimiento y proliferación celular *in vitro* en células de cáncer de mama 4T1.

Evaluar los efectos de la quelación de hierro con curcumina, administrada por sonda intragástrica, en un modelo murino de cáncer de mama inducido con células 4T1.

# MATERIALES Y MÉTODOS

## Materiales

Líneas celulares de cáncer de mama MCF-7 y 4T1, medio DMEM, glutamina, penicilina/estreptomina, suero fetal bovino al 5% y 10% (FBS), buffer fosfato salino (PBS), placa de cultivo celular, tubos eppendorf, botellas para cultivo celular, pipetas, puntillas, jeringas, agujas, citrato de amonio férrico (FAC), curcumina, optim curcuma, medio RPMI-1640, dimetil sulfóxido, ratones BALB/c, alimento, agua y aserrín esterilizado, jaulas para ratones, Vybrant MTT Cell Proliferation Assay Kit de Thermofisher, microscopio óptico, centrifuga, incubadora, micropipetas, calibrador Vernier digital, bascula.

## Metodología

### Diseño del experimento

Se llevó a cabo un ensayo experimental *in vitro* e *in vivo*. En los estudios *in vitro* se utilizaron las líneas de cáncer de mama MCF-7 y 4T1, se sembraron 150,000 células por pozo y se agregó citrato de amonio férrico (FAC) en diferentes concentraciones, se observó el crecimiento celular en diferentes rangos de tiempo para conocer la proliferación celular inducida por el FAC. Se midió la viabilidad celular por el ensayo MTT conteniendo diferentes concentraciones de FAC en presencia y ausencia de curcumina por 48 horas.

Para el estudio *in vivo* se emplearon ratones BALB/c inoculados con una suspensión de células tumorales de cáncer de mama 4T1. Una vez establecida la masa tumoral, los animales se asignaron al azar en 4 grupos de 5 ratones cada uno para iniciar los tratamientos por sonda gástrica. Posteriormente se midió el tamaño de los tumores cada semana utilizando un calibrador vernier digital, los ratones se sacrificaron por



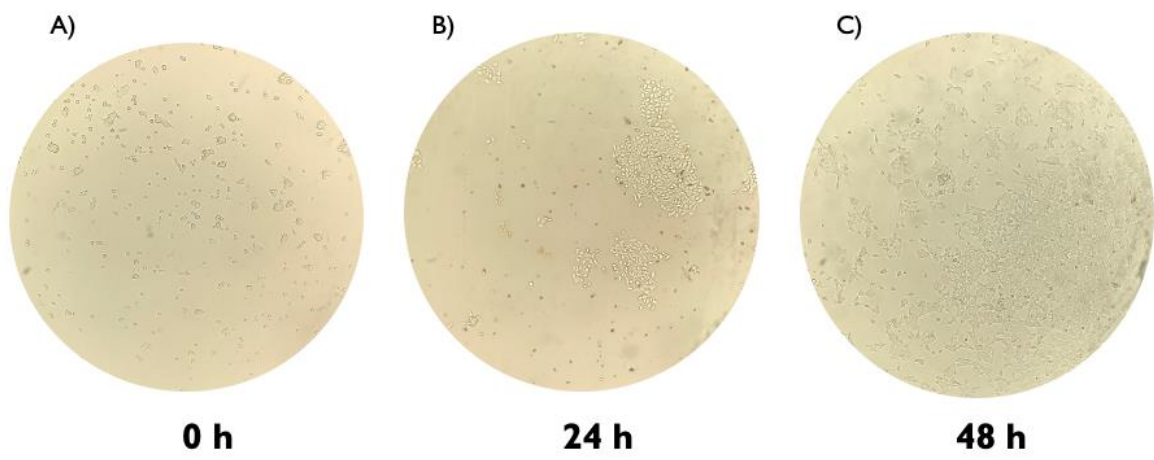
dislocación cervical de acuerdo con la guía ética para el cuidado y uso de animales en el laboratorio.

### **Líneas celulares y condiciones de cultivo**

Se utilizaron células de cáncer de mama MCF-7 derivadas del sitio metastásico: derrame pleural y 4T1 que pertenecen a un modelo animal de cáncer de mama estadio IV. Las células fueron crecidas en un frasco T75 en medio DMEM suplementado con piruvato, glutamina, aminoácidos no esenciales, penicilina/estreptomicina y suero fetal bovino inactivado al 10% e incubadas a una concentración del 5% de CO<sub>2</sub> y a una temperatura de 37°C.

### **Ensayo de crecimiento celular**

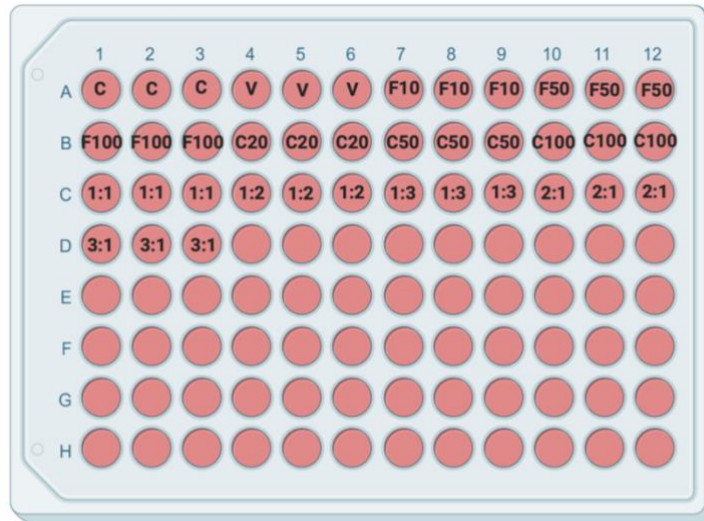
Para el ensayo de crecimiento celular se sembraron 150,000 células MCF-7 por pozo en medio de cultivo suplementado con FBS al 5% y se agregó citrato de amonio férrico (FAC) a las siguientes concentraciones: 0, 10, 50 y 100µM. Se observó el crecimiento celular a las 24 y 48 horas (Figura 3). Para determinar el crecimiento celular se tomó el porcentaje de confluencia determinada de manera independiente por tres expertos en microscopía óptica y cultivo celular, utilizando el método de ciego sencillo.



**Figura 3.** Crecimiento de las células MCF-7 a las 0, 24 y 48 horas.

## **Ensayo para la viabilidad celular MTT**

La viabilidad celular se midió mediante un ensayo de MTT utilizando el kit comercial Vybrant<sup>®</sup> MTT Cell Proliferation Assay Kit (V-13154) de THERMOFISHER. Las células de cáncer de mama ( $5 \times 10^3$ ) fueron sembradas en 200 $\mu$ L de medio RPMI-1640, en una placa de 96 pozos durante la noche para las células MCF-7 y por dos horas para las 4T1. Después este medio fue remplazado con medio fresco RPMI-1640, conteniendo diferentes concentraciones de FAC en ausencia y presencia de curcumina y diferentes concentraciones de curcumina en presencia y ausencia de FAC por 48 (Figura 4). Los tratamientos para ambas líneas celulares se agregaron por triplicado en cada placa. Posteriormente se agregaron 50 $\mu$ L de MTT (2mg/ml) a cada pozo, continuando su incubación por 4 horas. El medio es descartado y se adicionó 150 $\mu$ L por pozo de dimetil sulfóxido dentro de cada pozo y se incubó por 20 minutos. Por último, se midió la densidad óptica (OD) a 490 nm. El índice de viabilidad celular fue calculado de acuerdo con la fórmula:  $(\text{valor OD tratamiento/control OD}) \times 100\%$ .



C: Control (sin tratamiento)    C100: Curcumina 100  $\mu$ M  
 V: Vehículo    1:1: FAC:CUR  
 F10: FAC 10  $\mu$ M    1:2: FAC:CUR  
 F50: FAC 50  $\mu$ M    1:3: FAC:CUR  
 F100: FAC 100  $\mu$ M    2:1: FAC:CUR  
 C20: Curcumina 20  $\mu$ M    3:1: FAC:CUR  
 C50: Curcumina 50  $\mu$ M

**Figura 4.** Concentraciones de los tratamientos utilizados en el ensayo para la viabilidad celular MTT en la línea celular de cáncer de mama MCF-7 y 4T1.

## **Ensayo *in vivo***

### Manejo y cuidado de los animales

En este modelo experimental se utilizaron ratones BALB/c hembras de 6-8 semanas de edad de entre 20 y 25 g de peso, mantenidas bajo condiciones estándar, con un máximo de 5 ratones por jaula y con suministro de agua y comida *ad-libitum*. Los ratones se mantuvieron con un ciclo de 12 horas luz y 12 horas oscuridad, con una semana de acondicionamiento previo al ensayo.

Los grupos fueron depilados en el dorso con crema para depilar (para piel sensible), al día siguiente se inocularon por vía subcutánea  $5 \times 10^5$  de células 4T1 resuspendidas en 200  $\mu$ L de medio RPMI-1640.

### Grupos y tratamientos

Una vez establecida la masa tumoral, aproximadamente entre el día 5 y 7, los animales se asignaron al azar en 4 grupos ( $n=5$ ) para iniciar los tratamientos por sonda gástrica, todos los tratamientos a excepción del grupo taxol fueron emulsificados con Tween 20 al 0.01%. Los grupos se caracterizaron de la siguiente manera, grupo 1: control (agua), grupo 2: curcumina, grupo 3: optim curcuma (OC), grupo 4: quimioterapia con Taxol. Decidimos utilizar optim curcuma como tratamiento para uno de los grupos porque es un producto desarrollado por investigadores de la Universidad de California Los Ángeles (UCLA) que ha probado su eficacia en diferentes estudios clínicos. Este producto es un complejo encapsulado de curcumina con lecitina y ácidos grasos para formar pequeñas partículas que puedan ser mayormente absorbidas y asimiladas por el organismo (Frautschy & Cole, 2019). Considerando lo anterior, decidimos analizar la función de la curcumina en un estado puro y la combinación de curcumina con otro compuesto para observar si había diferencias significativas entre ellas.

En la Tabla 3 se puede observar las concentraciones y dosis administradas diariamente durante el tratamiento, a excepción de la quimioterapia que solo se aplicó una vez al iniciar el ensayo.

**Tabla 3.** Dosis administradas y periodo de administración de los tratamientos durante el ensayo *in vivo*.

Tratamientos	Dosis Administrada	Periodo de administración
Grupo 1: control	N/A	3 semanas
Grupo 2: curcumina	5 mg/kg	3 semanas
Grupo 3: optim curcuma	2.5 mg/kg	3 semanas
Grupo 4: quimioterapia	15 mg/kg	1 aplicación al iniciar el tratamiento

Los ratones fueron pesados cada semana, iniciando el día en que se aplicó por primera vez los tratamientos descritos previamente. También se midió el tamaño de los tumores cada semana utilizando un calibrador vernier digital usando la siguiente fórmula  $(ab^2)/2$ , donde a y b se refieren a las dimensiones más largas y más cortas respectivamente para obtener el volumen de este. Los ratones se sacrificaron al finalizar la semana 5 posterior a la inoculación del tumor por dislocación cervical de acuerdo con la guía ética para el cuidado y uso de animales en el laboratorio de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

### **Análisis Estadístico**

Los resultados se presentan en forma de media  $\pm$  desviación estándar. Para el análisis estadístico entre los diferentes tratamientos, se utilizó el análisis estadístico prueba t de student. Se consideraron diferencias estadísticas cuando el valor de p fue  $< 0.05$ .

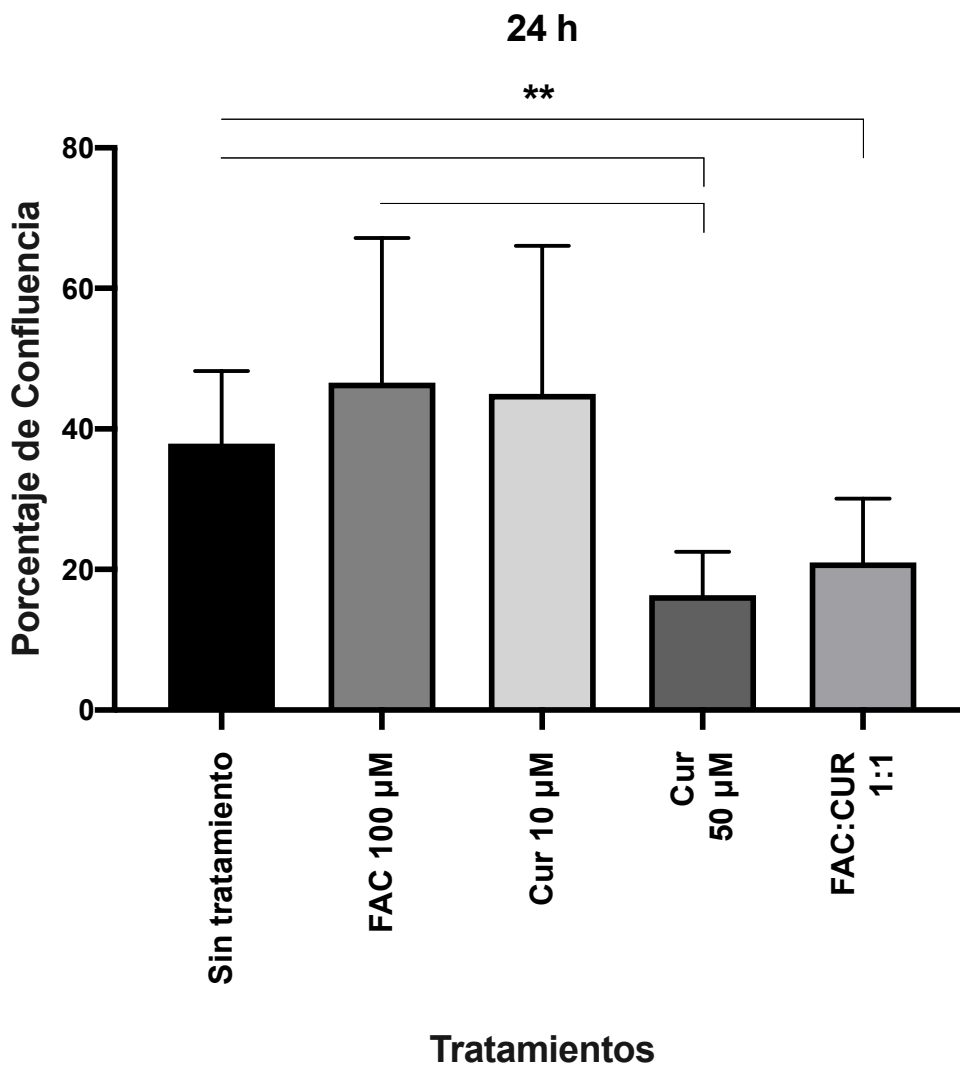


## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La curcumina es considerado un polifenol dietético de la cúrcuma longa con efectos anticancerígenos (Gu et al., 2019). Existe un gran número de estudios sobre el tratamiento del cáncer en sus diferentes etapas y el uso de la curcumina como un tratamiento favorable para la quimioprevención del cáncer, utilizada sola o combinada con otros medicamentos (Y. Wang, Yu, Cui, Lin, & Ding, 2016). La curcumina también puede funcionar como quelante de hierro (Song et al., 2019). Este punto es importante porque debemos considerar que en el cáncer es muy frecuente que se muestren tasas excesivas de proliferación y alta rotación metabólica, por lo tanto se cree que las células tumorales requieren más hierro que sus contrapartes no malignas (Pfeifhofer-Obermair et al., 2018). Estudios *in vitro* han demostrado que la curcumina induce apoptosis en varios tipos de células tumorales, como las células de cáncer de pulmón, mieloma, melanoma, próstata, líneas celulares de leucemia, células de neuroblasto humano, células de cáncer oral y cáncer de mama (Bengmark, Mesa, & Gil, 2009). Por esto, se decidió investigar los efectos de la curcumina en las líneas celulares de cáncer de mama y en un modelo murino de cáncer de mama.

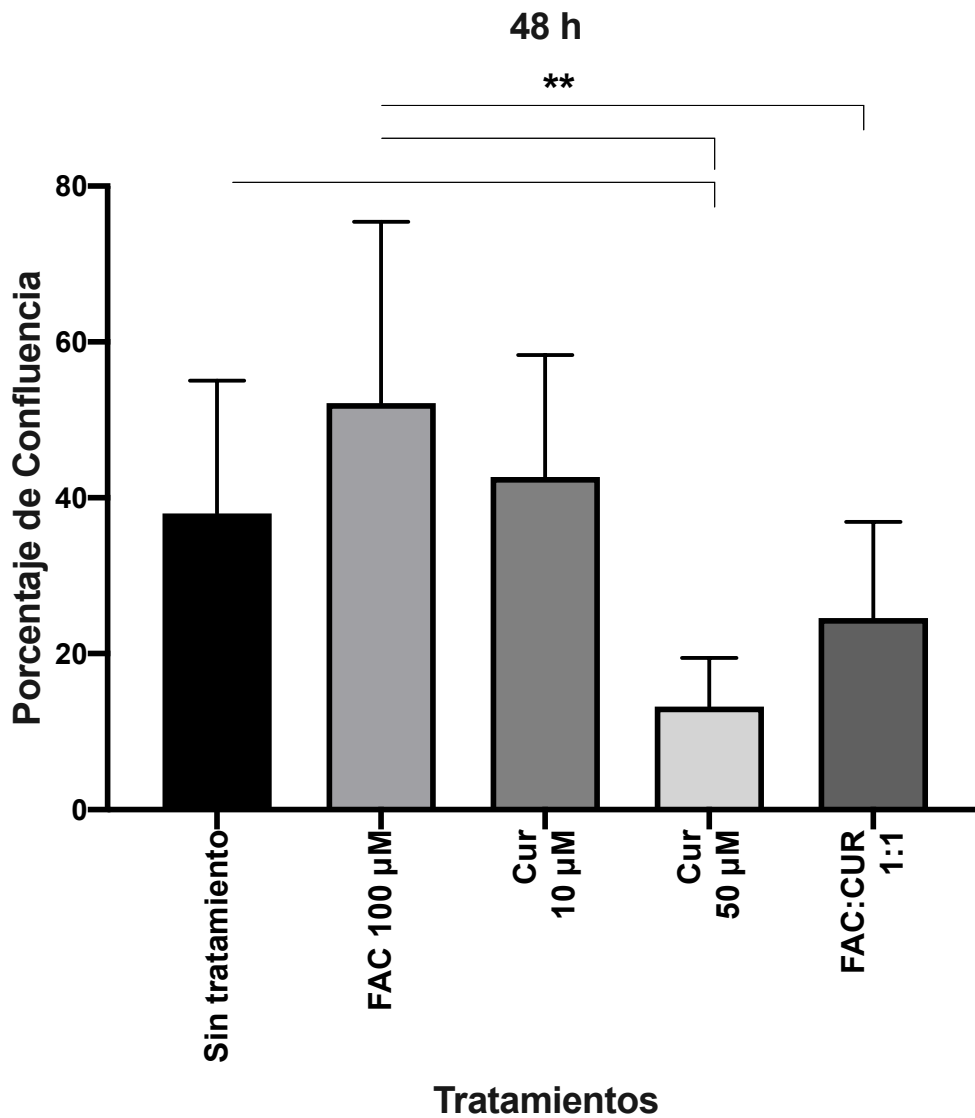
### **Confluencia de las células MCF-7 a las 24 y 48 horas**

Como era de esperarse, en las células con FAC 100  $\mu\text{M}$  a las 24 horas aumentó la confluencia celular en un 11% comparada con las células sin tratamiento, pero no fue estadísticamente significativo ( $p > 0.05$ ). Las células tratadas con curcumina 10  $\mu\text{M}$  no presentaron diferencias estadísticamente significativas en el crecimiento celular, mientras que en las células tratadas con curcumina 50  $\mu\text{M}$  se observó una disminución estadísticamente significativa en un 20% comparada con las células sin tratamiento ( $p < 0.01$ ) y de 32 % en comparación con células con FAC 100  $\mu\text{M}$  ( $p < 0.01$ ). Las células tratadas con la combinación FAC:curcumina 1:1 (50:50  $\mu\text{M}$ ) presentaron una confluencia 14% menos comparada con las células sin tratamiento ( $p < 0.01$ ) (Figura 5).



**Figura 5.** Porcentaje de confluencia celular a las 24 h por los diferentes tratamientos: células sin tratamiento, FAC 100 µM, Cur 10 µM, Cur 50 µM y la combinación FAC:CUR 1:1. Los resultados son expresados en forma de media ± desviación estándar en un ensayo por triplicado. \*Indica  $p < 0.05$ . \*\*Indica  $p < 0.01$ .

A las 48 horas la confluencia de las células con FAC 100  $\mu\text{M}$  aumentó un 11% comparado con las células sin tratamiento, sin diferencias estadísticamente significativas ( $p>0.05$ ). Las células tratadas con curcumina 10  $\mu\text{M}$  por 48 horas, no presentaron diferencias estadísticamente significativas comparadas con las células sin tratamiento, mientras que las que fueron tratadas con curcumina 50  $\mu\text{M}$  mantuvieron su efecto disminuyendo la confluencia celular en un 17% comparada con las células sin tratamiento ( $p<0.01$ ). A diferencia de las 24 horas, donde se observó menor confluencia celular en el tratamiento FAC:curcumina 1:1 en comparación con las células sin tratamiento, no se observaron diferencias estadísticamente significativas a las 48 horas ( $p>0.05$ ) pero si se encontraron diferencias significativas con las células tratadas con FAC 100  $\mu\text{M}$  ( $p<0.01$ ) (Figura 6). Zhou et al., utilizaron tratamientos de quimioterapias como paclitaxel, cisplatino y doxorubicina solos o combinados con curcumina en líneas celulares de cáncer de mama MBA-MB-231 y MCF-7, demostrando que los medicamentos de quimioterapia disminuyeron las tasas de supervivencia y la curcumina disminuyó en un 50% la confluencia celular, confirmado de este modo que la curcumina reduce la quimioresistencia y aumenta la quimiosensibilidad de las células tumorales (Liu & Ho, 2018), algo muy similar a lo que observamos en nuestros resultados, donde la curcumina 50  $\mu\text{M}$  por si sola puede inhibir hasta en un 20% la confluencia en la línea celular MCF-7 a las 24 y 48 horas comparada con las células sin tratamiento ( $p<0.01$ ). Chenxia et al., también demostraron el efecto de la curcumina en la viabilidad celular de estas dos líneas de cáncer de mama (MBA-MB-231 y MCF-7), el tratamiento con curcumina 20  $\mu\text{M}$  durante 24 y 48 horas presentó un efecto inhibitorio en los dos tipos de células tumorales comparada con las células control que fueron tratadas solamente con DMSO (Chenxia et al., 2019). Los resultados obtenidos en nuestro estudio revelan que la curcumina puede ejercer un papel inhibitorio en la proliferación celular de las células MCF-7 de una manera dependiente de las dosis y el tiempo en comparación con las células sin tratamiento y las células que recibieron otras combinaciones de tratamientos.

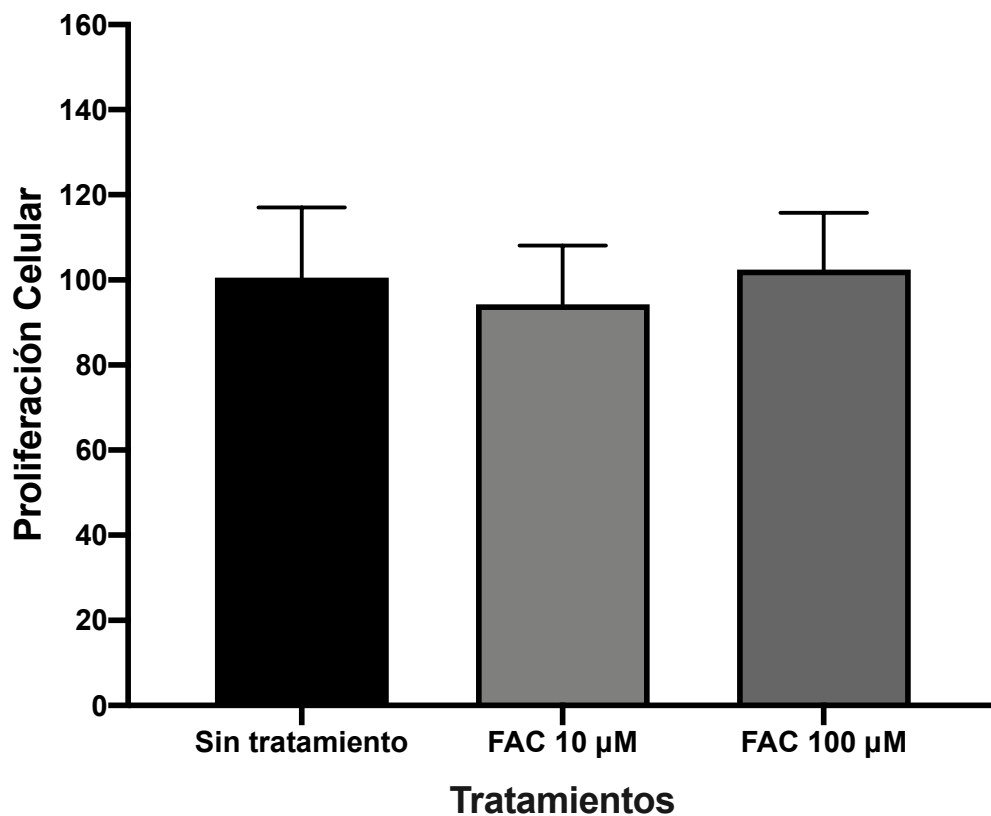


**Figura 6.** Porcentaje de confluencia celular a las 48 h por los diferentes tratamientos: células sin tratamiento, FAC 100  $\mu\text{M}$ , Cur 10  $\mu\text{M}$ , Cur 50  $\mu\text{M}$  y la combinación FAC:CUR 1:1. Los resultados son expresados en forma de media  $\pm$  desviación estándar en un ensayo por triplicado. \*Indica  $p < 0.05$ . \*\*Indica  $p < 0.01$ .

## **Efecto del hierro en la proliferación celular en líneas celulares de cáncer de mama**

Para evaluar los efectos del hierro en la proliferación celular sobre las líneas celulares de cáncer de mama, se trataron las células MCF-7 y 4T1 con diferentes concentraciones de FAC. Las células MCF-7 tratadas con FAC 10  $\mu\text{M}$  presentaron una disminución en la proliferación celular del 6% comparadas con las células sin tratamiento ( $p>0.05$ ), mientras que las células tratadas con FAC 100  $\mu\text{M}$  presentaron una capacidad de proliferación celular similar a las células sin tratamiento ya que solo aumentaron su proliferación en un 2%, de manera no estadísticamente significativa ( $p>0.05$ ) (Figura 7).

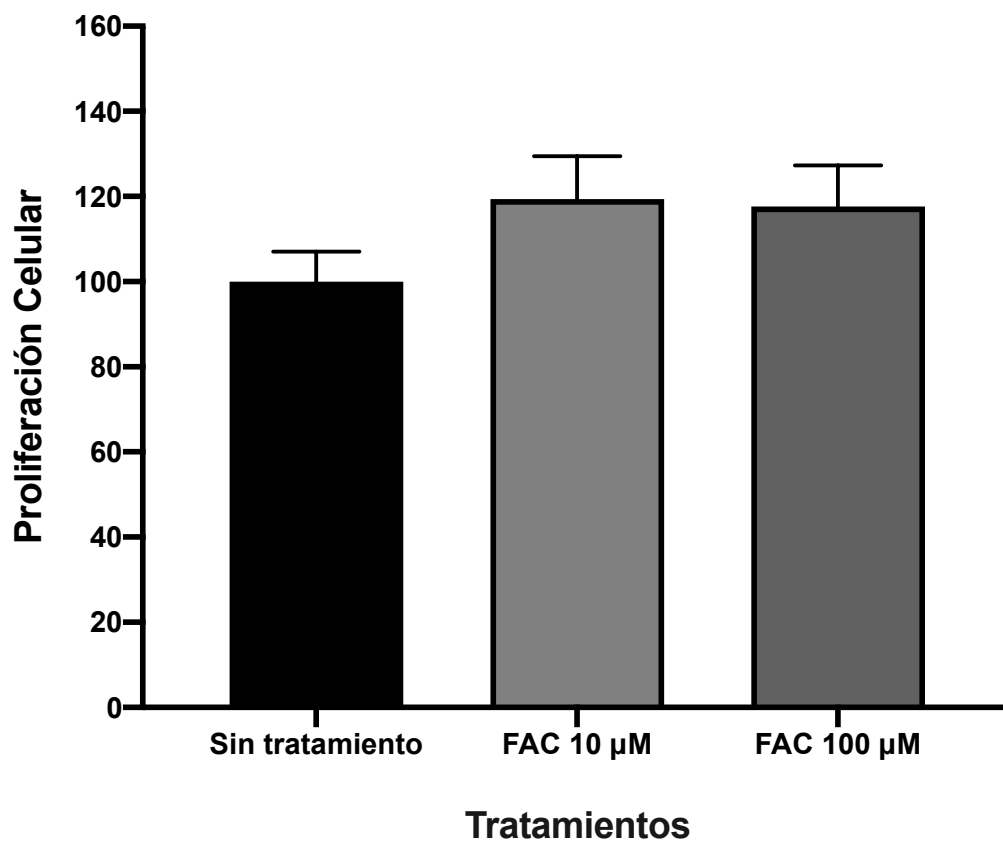
### MTT línea celular MCF-7



**Figura 7.** Porcentaje de proliferación celular mediante el ensayo MTT en células de cáncer de mama MCF-7 con los tratamientos: células sin tratamiento, FAC 10 µM y FAC 100 µM. Los resultados son expresados en forma de media ± desviación estándar en un ensayo por triplicado.

En las células 4T1 se pudo observar que a una concentración de FAC 10  $\mu\text{M}$ , se presentó un aumento no estadísticamente significativo en la proliferación celular, siendo este un 19% mayor que en las células sin tratamiento ( $p>0.05$ ). Para la concentración de 100  $\mu\text{M}$  se observó un aumento similar al de 10  $\mu\text{M}$ , siendo este de 18% en comparación con las células sin tratamiento ( $p>0.05$ ) (Figura 8).

### MTT línea celular 4T1



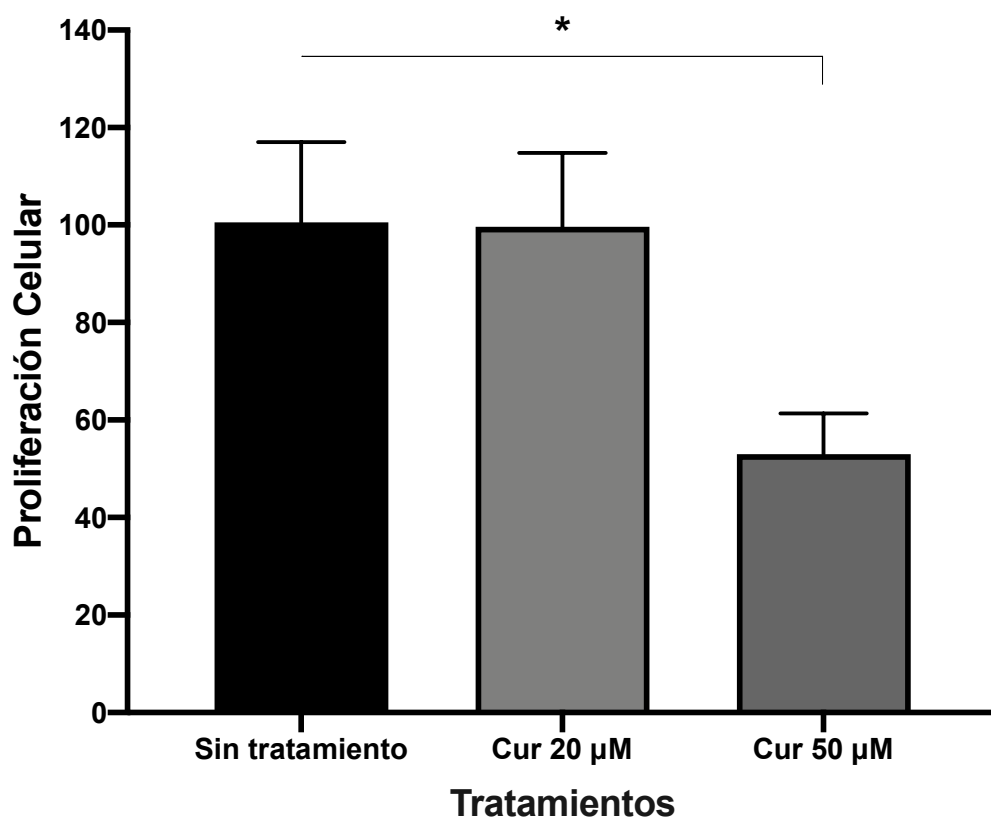
**Figura 8.** Porcentaje de proliferación celular mediante el ensayo MTT en células de cáncer de mama 4T1 con los tratamientos: células sin tratamiento, FAC 10 µM y FAC 100 µM. Los resultados son expresados en forma de media  $\pm$  desviación estándar en un ensayo por triplicado.



## **Efecto de la curcumina en la proliferación celular en líneas celulares de cáncer de mama**

En las células MCF-7 tratadas con curcumina 20  $\mu\text{M}$  la proliferación celular se mantuvo pues solo se observó una disminución celular del 1% comparado con las células sin tratamiento ( $p > 0.05$ ). Como esperabamos, en las células tratadas con curcumina 50  $\mu\text{M}$  la proliferación celular disminuyó en un 47% comparado con las células sin tratamiento ( $p < 0.05$ ) (Figura 9). Lv et al., realizaron un ensayo *in vitro* para determinar la inhibición del crecimiento en células de cáncer de mama MDA-MB-231 y MCF-7, las células fueron tratadas durante 24 y 48 horas y después se midieron las células viables por MTT. Obtuvieron una disminución significativa de las células viables expuestas a la curcumina de una forma dependiente al tiempo y dosis (Lv et al., 2014). Whitnall et al., han demostrado que el metabolismo celular alterado del hierro puede contribuir a la adquisición de un fenotipo resistente a los medicamentos contra células cancerosas. Esto resultó evidente a partir de las investigaciones que muestran que el tratamiento de las células de cáncer de mama MCF-7 resistentes al etopósido humano con agentes quelantes de hierro revirtió la resistencia de las células cancerosas a agentes quimioterapéuticos (Chekhun et al., 2013).

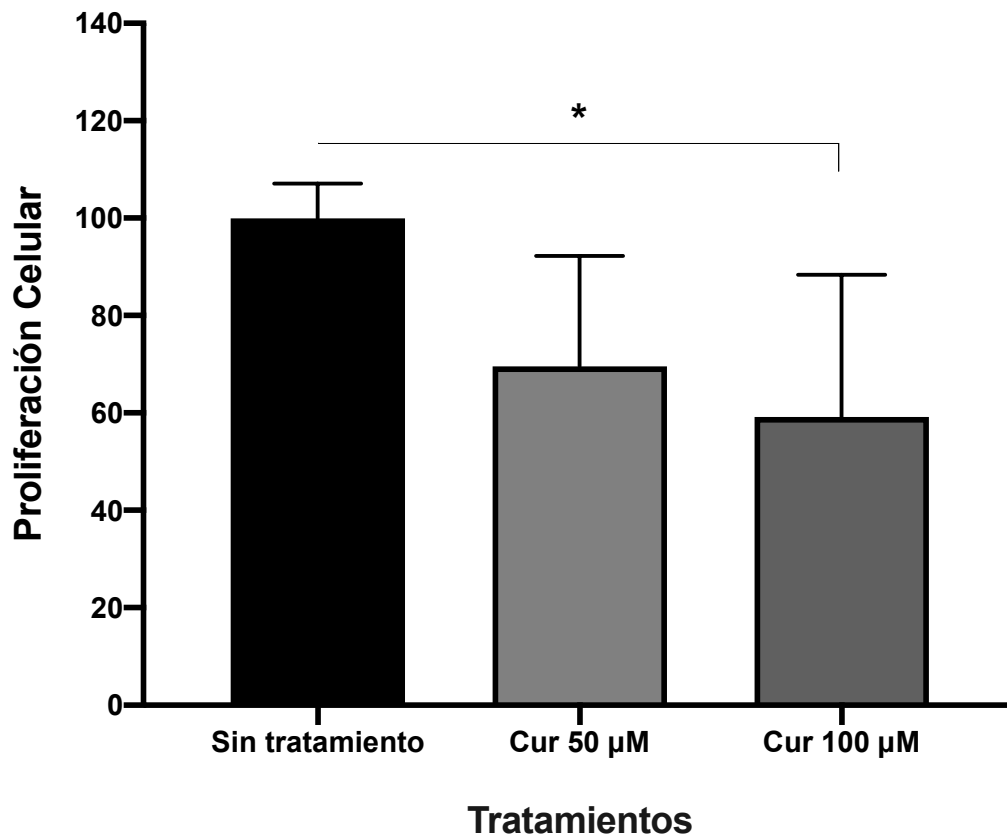
### MTT línea celular MCF-7



**Figura 9.** Porcentaje de proliferación celular mediante el ensayo MTT en células de cáncer de mama MCF-7 con los tratamientos: células sin tratamiento, Curcumina 20 µM y Curcumina 50 µM. Los resultados son expresados en forma de media  $\pm$  desviación estándar en un ensayo por triplicado.

En las células 4T1 tratadas con una concentración de curcumina al 50  $\mu\text{M}$  se inhibió la proliferación celular en un 30% comparado con las células sin tratamiento, sin embargo no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0.05$ ), mientras que al aumentar la concentración de curcumina a 100  $\mu\text{M}$  se inhibió hasta en un 41% la proliferación de las células en comparación con las células que se mantuvieron sin tratamiento, siendo este efecto estadísticamente significativo ( $p < 0.05$ ) (Figura 10). A pesar de que la línea celular 4T1 es una línea más agresiva que las células MCF-7, al aumentar la concentración de curcumina obtuvimos resultados estadísticamente significativos. En líneas celulares más agresivas como las MBCDF-T y EA.hy926 (cáncer de mama triple negativo), García-Cortez et al., probaron que la proliferación celular de estas células disminuye al agregar diferentes concentraciones de curcumina *in vitro* (García-Quiroz et al., 2019).

### MTT línea celular 4T1



**Figura 10.** Porcentaje de proliferación celular mediante el ensayo MTT en células de cáncer de mama 4T1 con los tratamientos: células sin tratamiento, Curcumina 50 µM y Curcumina 100 µM. Los resultados son expresados en forma de media ± desviación estándar en un ensayo por triplicado. \*Indica  $p < 0.05$ .

## **Los efectos antiproliferativos de la curcumina son dependientes del hierro**

Para comprobar si los efectos antiproliferativos de la curcumina involucran la quelación de hierro se realizaron combinaciones de ambos tratamientos con las siguientes proporciones: FAC:Curcumina 1:1 (50:50  $\mu\text{M}$ ), FAC:Curcumina 1:2 (50:100  $\mu\text{M}$ ), FAC:Curcumina 1:3 (50:150  $\mu\text{M}$ ), FAC:Curcumina 2:1 (100:50  $\mu\text{M}$ ), FAC:Curcumina 3:1 (150:50  $\mu\text{M}$ ). En las células MCF-7 la combinación de los tratamientos FAC:Curcumina en relación 1:1 mostró una inhibición celular del 11% ( $p>0.05$ ) comparado con las células sin tratamiento. Para la relación FAC:Curcumina 1:2 se observó una disminución de 22% comparada con las células sin tratamiento, aunque esto no fue estadísticamente significativo ( $p>0.05$ ). Al analizar la relación FAC:Curcumina 1:3 se observó una inhibición celular del 23% comparado con las células sin tratamiento ( $p<0.05$ ), esto concuerda con lo observado en la línea celular 4T1, con esto podemos deducir que el efecto de la curcumina es través de la quelación del hierro en ambas líneas celulares (Figura 11).

### MTT línea celular MCF-7

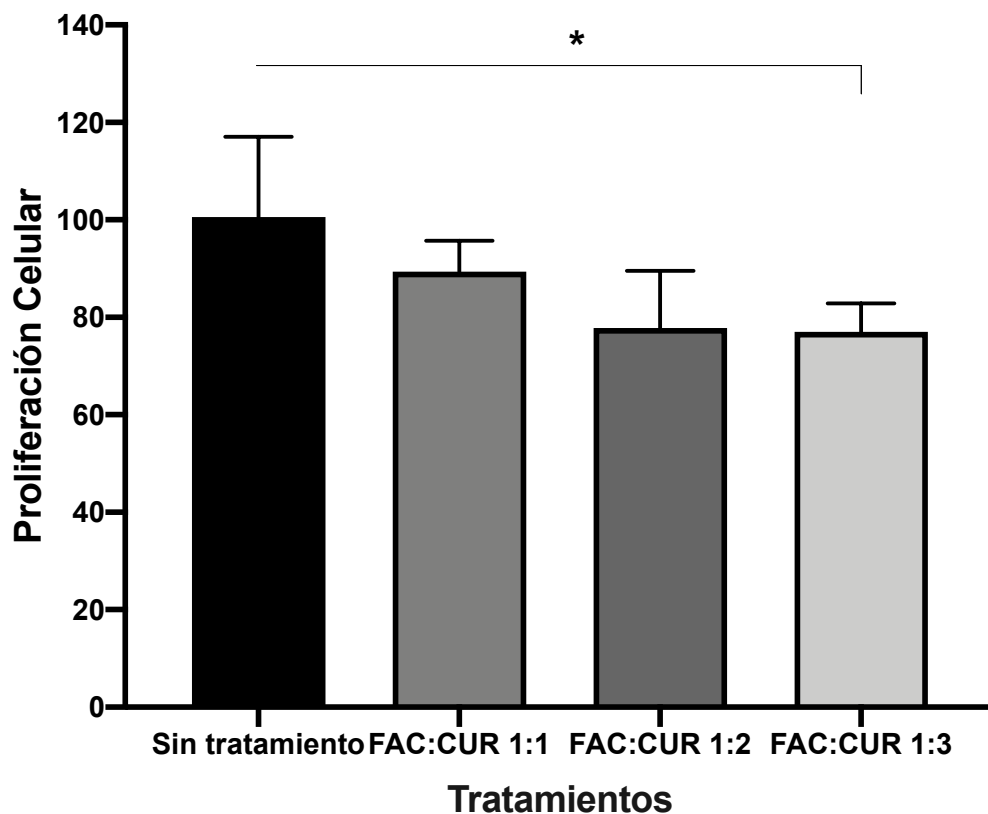
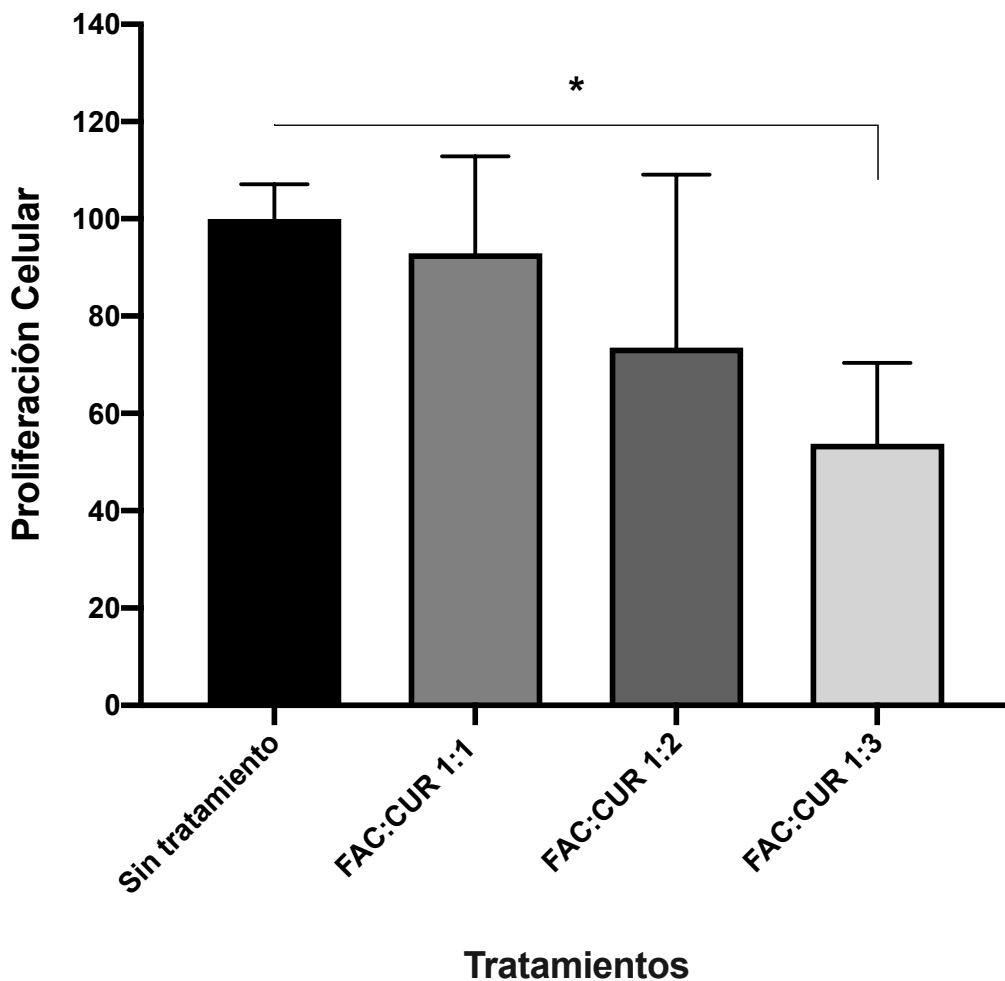


Figura 11. Porcentaje de proliferación celular mediante el ensayo MTT en células de cáncer de mama MCF-7 con los tratamientos: células sin tratamiento, FAC:CUR 1:1, FAC:CUR 1:2 y FAC:CUR 1:3. Los resultados son expresados en forma de media  $\pm$  desviación estándar en un ensayo por triplicado. \*Indica  $p < 0.05$ .

En la línea celular 4T1 los resultados mostraron que para la combinación de los dos tratamientos en relación 1:1 solo se observó un 7% en la inhibición de la proliferación celular ( $p>0.05$ ) comparada con las células sin tratamiento. Sin embargo, fue interesante observar que el aumento de la concentración de FAC:Curcumina 1:2 mostró una proliferación menor en un 26% comparada con las células sin tratamiento ( $p>0.05$ ). Estos efectos fueron más evidentes cuando se utilizó la concentración de FAC:Curcumina en relación 1:3, donde se observaron efectos estadísticamente significativos por una disminución del 46% comparada con las células sin tratamiento ( $p<0.05$ ) y de un 20% en comparación con la relación 1:2 ( $p>0.05$ ) (Figura 12). Yang et al., en el 2017 plantearon como hipótesis que la curcumina puede inducir apoptosis y autofagia en células de cáncer de próstata resistentes a la castración (DU145 y PC3) a través de sus propiedades como quelante del hierro. Utilizaron concentraciones de FAC en placas de 96 pocillos con o sin curcumina 50  $\mu\text{M}$  durante 30 minutos, donde encontraron que los cambios característicos en la apoptosis inducida por la curcumina fueron neutralizados en su mayoría por cantidades iguales de FAC en ambas líneas celulares porque la apoptosis y la autofagia de las células DU145 y PC3 inducidas por la curcumina se inhibieron significativamente con la incubación conjunta de cantidades iguales de FAC. Se considera que FAC protegió a las células CRPC de la apoptosis y la autofagia inducidas por la curcumina. Esto respalda la hipótesis de que los efectos inductores apoptosis y autofagia de la curcumina están asociados con propiedades quelantes de hierro (Yang et al., 2017).

### MTT línea celular 4T1

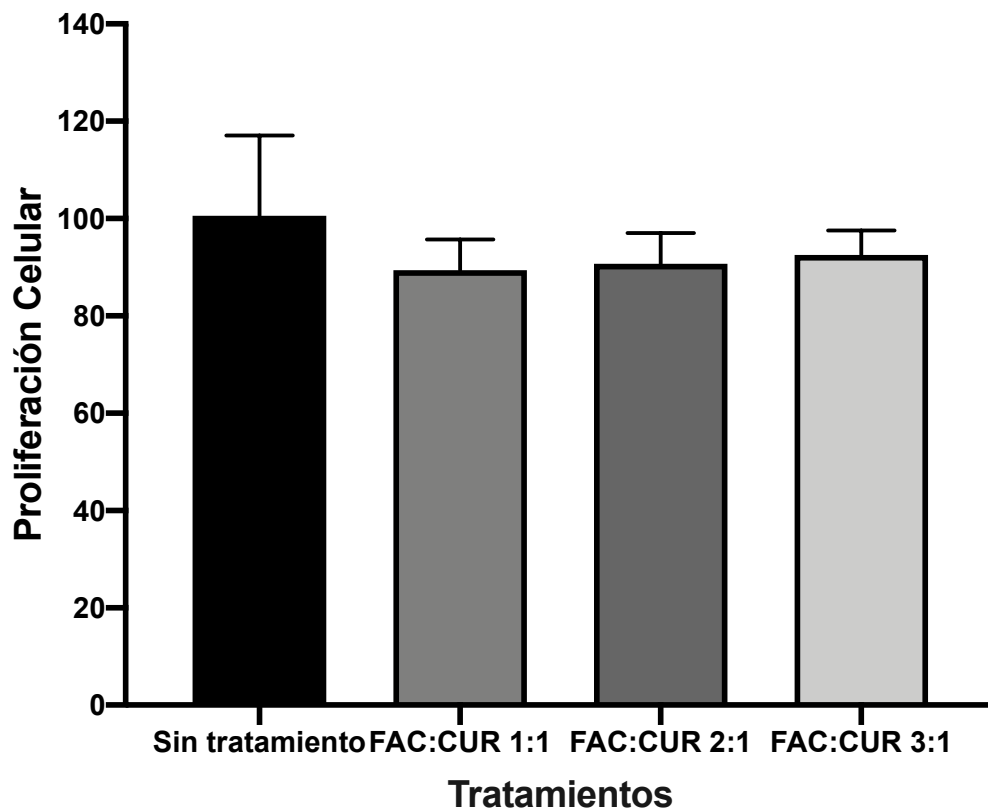


**Figura 12.** Porcentaje de proliferación celular mediante el ensayo MTT en células de cáncer de mama 4T1 con los tratamientos: células sin tratamiento, FAC:CUR 1:1, FAC:CUR 1:2 y FAC:CUR 1:3. Los resultados son expresados en forma de media  $\pm$  desviación estándar en un ensayo por triplicado. \*Indica  $p < 0.05$ .



En la línea celular MCF-7 la combinación FAC:Curcumina 2:1 presentó una inhibición celular del 9% comparada con las células sin tratamiento ( $p>0.05$ ), mientras que las células tratadas con la relación FAC:Curcumina 3:1 presentaron 7% menos de proliferación ( $p>0.05$ ). Aunque no se obtuvieron resultados estadísticamente significativos se puede observar que las células mantienen una proliferación celular dependiente de la concentración FAC:Curcumina a la que fueron sometidas (Figura 13).

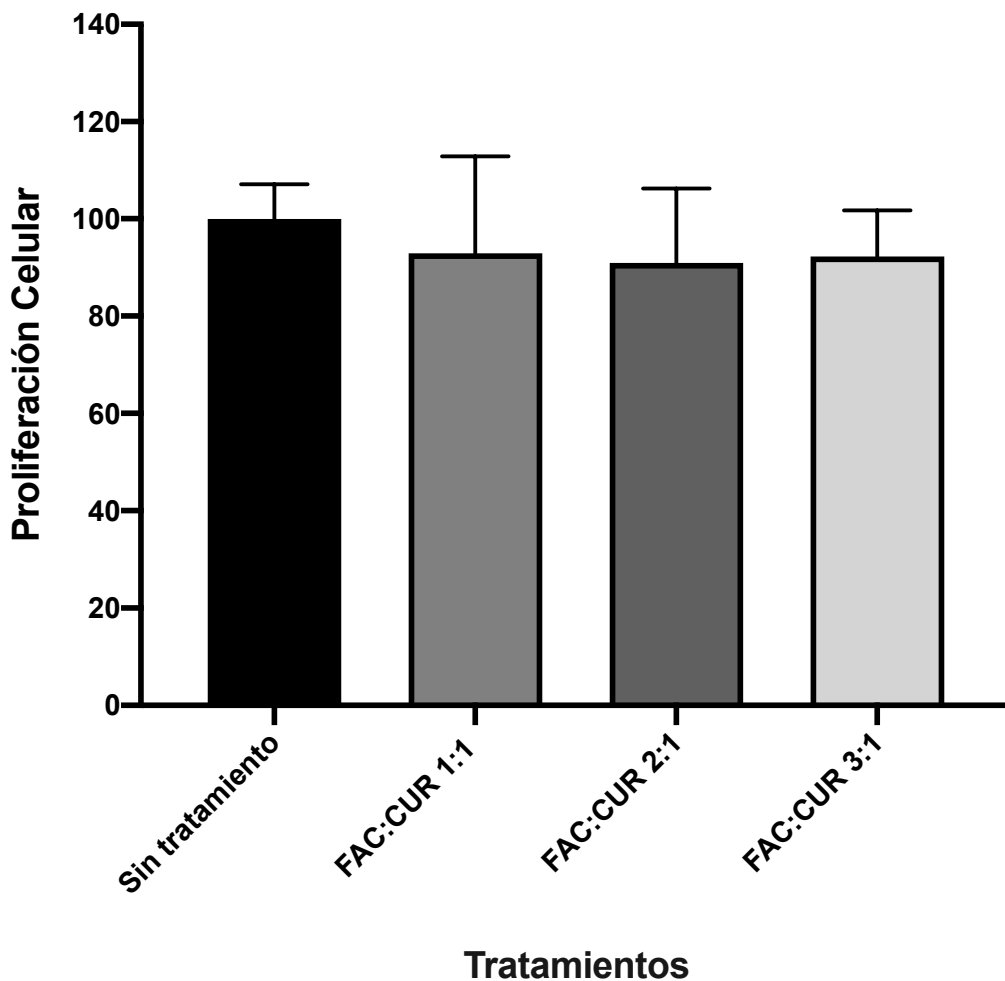
### MTT línea celular MCF-7



**Figura 13.** Porcentaje de proliferación celular mediante el ensayo MTT en células de cáncer de mama MCF-7 con los tratamientos: células sin tratamiento, FAC:CUR 1:1, FAC:CUR 2:1 y FAC:CUR 3:1. Los resultados son expresados en forma de media  $\pm$  desviación estándar en un ensayo por triplicado.

Además, cabe mencionar que cuando se utilizó una mayor concentración de FAC que de curcumina en las células 4T1, no se observó ningún efecto estadísticamente significativo en la proliferación celular. Cuando se utilizó la combinación de los tratamientos en relación FAC:Curcumina 2:1 y FAC:Curcumina 3:1, no se observó ningún efecto estadísticamente significativo en comparación con la relación 1:1 ( $p > 0.05$ ). Por otro lado, cuando se compararon con células sin tratamiento, solo se observó una disminución, no estadísticamente significativa, de 9% en la relación 2:1 y 8% en la relación 3:1 ( $p > 0.05$ ) (Figura 14).

### MTT línea celular 4T1

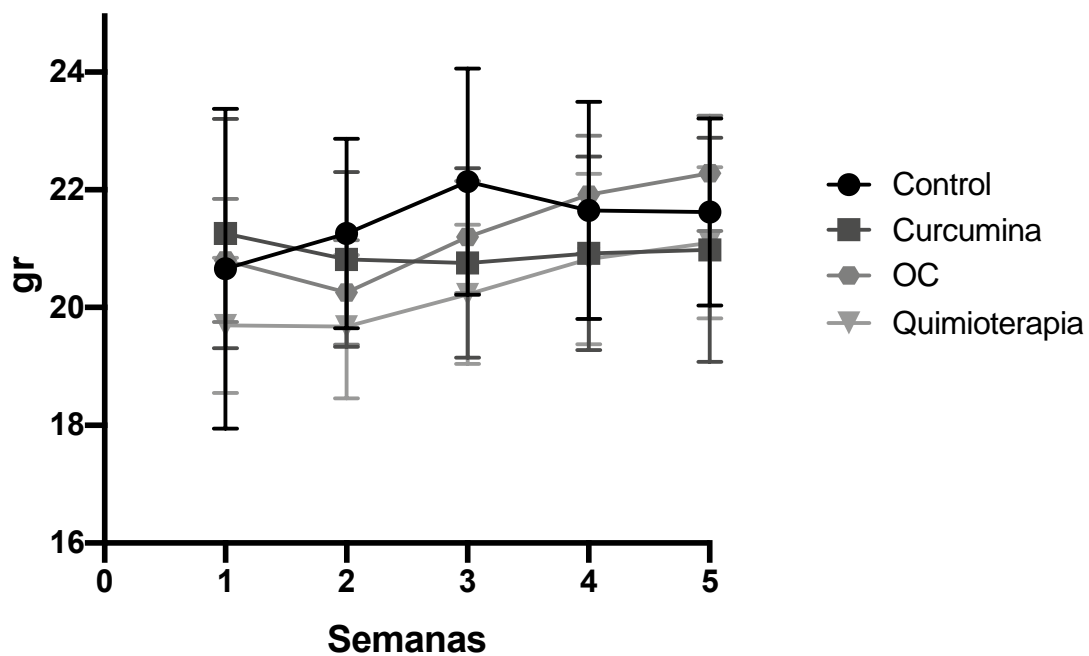


**Figura 14.** Porcentaje de proliferación celular mediante el ensayo MTT en células de cáncer de mama 4T1 con los tratamientos: células sin tratamiento, FAC:CUR 1:1, FAC:CUR 2:1 y FAC:CUR 3:1. Los resultados son expresados en forma de media  $\pm$  desviación estándar en un ensayo por triplicado

## **La curcumina administrada por vía oral inhibe el crecimiento tumoral *in vivo***

Se llevó un control del peso de los 5 ratones por grupo durante las 5 semanas que duró el ensayo, los rangos de peso entre los ratones durante el estudio fueron de 16.6 a 24.2 gramos. En la Figura 15 podemos observar que los ratones del grupo control y de OC presentaron un aumento en el peso total comparado con el grupo de curcumina y el de quimioterapia, esto puede estar relacionado con un mayor crecimiento de la masa tumoral en estos grupos, aunque estadísticamente no se presentó una diferencia significativa entre los cuatro grupos ( $p > 0.05$ ).

### Peso de los ratones



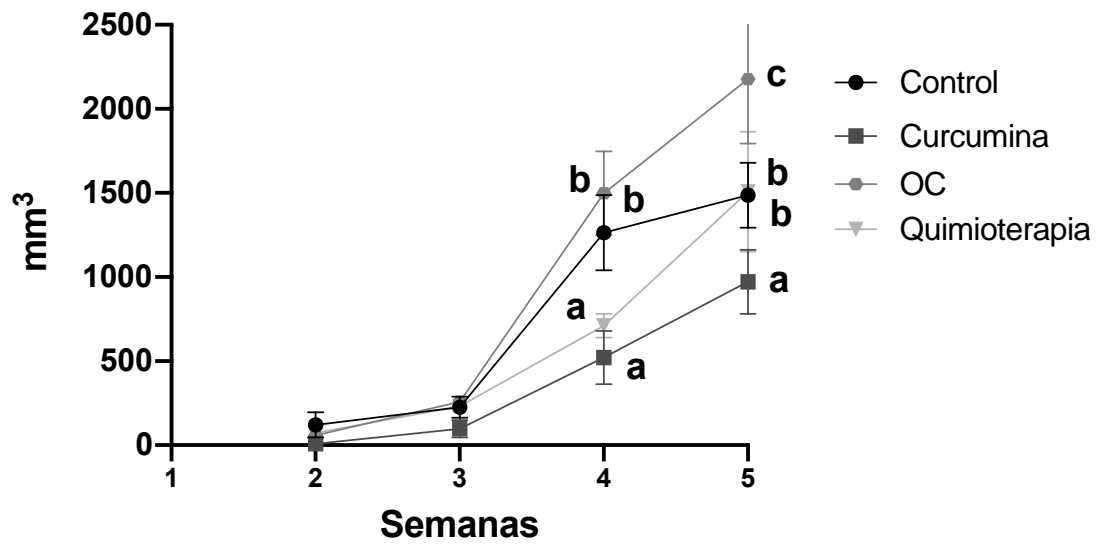
**Figura 15.** Control del peso (gr) de los ratones hembras BALB/c sometidos al ensayo *in vivo* durante 5 semanas. Grupo control, grupo curcumina, grupo OC y grupo quimioterapia. Los resultados son expresados en forma de media  $\pm$  desviación estándar.

En la Figura 16 podemos observar que a partir de la semana 2 el crecimiento tumoral es muy similar en los 4 grupos, es a partir de la semana 3 que el volumen tumoral del grupo control y el grupo tratado con OC aumentan. Al comparar el grupo tratado con curcumina con el grupo control ( $p < 0.05$ ) y el grupo OC ( $p < 0.05$ ) se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas en la semana 4. Los ratones tratados con quimioterapia presentaron un menor volumen tumoral comparado con el grupo OC ( $p < 0.05$ ), comportamiento similar al del grupo tratado con curcumina. Al finalizar el ensayo, en la semana 5 se pudo observar como el grupo tratado con OC aumentó su volumen tumoral comparado con los demás grupos. Los grupos control y quimioterapia mostraron un volumen tumoral similar al finalizar el tratamiento ( $p > 0.05$ ). Como esperábamos, el grupo que fue solamente tratado con curcumina mostró resultados significativos comparado con el grupo control ( $p < 0.05$ ) y con el grupo tratado con OC ( $p < 0.05$ ). García-Quiroz et al., propuso un modelo *in vivo* de cáncer de mama triple negativo (MBCDF-T y EA.hy926) en ratones desnudos por xenoinjerto. Administrando diferentes tratamientos durante tres semanas, control 1, control 2, calcitrol (hormona considerada anticancerígena), curcumina, calcitrol+curcumina, resveratrol y calcitrol+curcumina. Los ratones tratados con curcumina sola redujeron su volumen tumoral en comparación con el grupo control, aunque no fue estadísticamente significativo, pero al combinar el calcitrol con la curcumina redujeron significativamente el volumen tumoral comparado con los demás grupos. También se presentó un retraso de la aparición del tumor y disminución de la densidad de microvasos en los ratones de este grupo (García-Quiroz et al., 2019). Debido a que los tratamientos del cáncer como la quimioterapia y radioterapia no solo atacan a las células tumorales, también pueden ocasionar daño a las células sanas, es de suma importancia proponer alternativas que pueden disminuir estos efectos. Un punto muy importante en el tratamiento del cáncer es la detección oportuna de factores del estado nutricional, que pueden ser prevenibles o tratables y que se asocian con la reducción de la tolerancia y eficacia de estas terapias (Laviano, Lazzaro, & Koverech, 2018). Las enfermedades y los tratamientos tienen un gran impacto en el estado nutricional, el uso de productos naturales como la curcumina es atractivo por que presenta un alto potencial terapéutico y al mismo tiempo pueden ser menos propensos a inducir efectos adversos (Song et

al., 2019). Nuestros resultados ponen en manifiesto el potencial de los tratamientos nutricionales para el cáncer y otras enfermedades crónicas y autoinmunes.



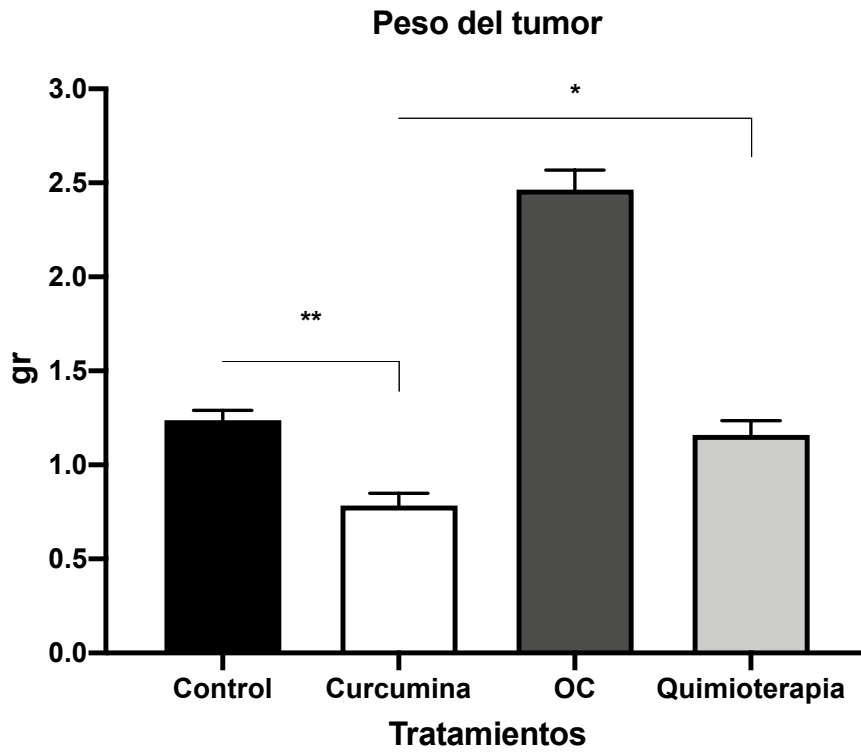
## Volumen Tumoral



**Figura 16.** Crecimiento del volumen tumoral (mm<sup>3</sup>) de los ratones hembras BALB/c sometidos al ensayo *in vivo* durante 5 semanas. Grupo control, grupo curcumina, grupo OC y grupo quimioterapia. Los resultados son expresados en forma de media  $\pm$  desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.

Al finalizar el tratamiento en la semana 5 se obtuvo el peso tumoral al extraer la totalidad de los tumores, en concordancia con los datos de medición del volumen tumoral, el grupo tratado con curcumina presentó un peso tumoral menor de 0.78 gramos, comparado con los demás grupos, el grupo control presentó un peso tumoral de 1.23 gramos ( $p < 0.01$ ), OC de 2.46 gramos ( $p < 0.01$ ) y quimioterapia de 1.16 gramos ( $p < 0.05$ ). También observamos que el grupo control y el grupo tratado con quimioterapia no presentaron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) en el peso tumoral final, los ratones tratados con OC, a pesar de que esperábamos que tuvieran un resultado similar o mejor que la curcumina sola, presentaron un aumento del peso total del tumor, casi un 60% más que en grupo tratado con curcumina. Esto puede estar implicado con otros efectos de este fármaco o con la dosis administrada durante el tratamiento, consideramos dos posibles efectos, el de toxicidad, que se observó en un ensayo previo donde se administró la misma dosis de curcumina y OC, los ratones tratados con OC comenzaron a presentar síntomas como desorientación, pérdida de apetito, dificultad para moverse o pérdida total de la parte inferior de su cuerpo, es por esto que decidimos repetir el experimento con una dosis menor, o también pudiera relacionarse con una absorción mayor de la OC al grado de ocasionar efectos secundarios en los ratones, consideramos medir en ensayos futuros la presencia de curcumina en suero por HPLC para conocer la biodisponibilidad de la curcumina en sangre (Figura 17). Lv et al., presentó un modelo *in vivo* de ratones con xenoinjertos de células de cáncer de mama MDA-MB-231 para evaluar el efecto de la curcumina. Los ratones que fueron tratados con curcumina al finalizar el tratamiento presentaron tumores visiblemente más pequeños que los ratones que fueron tratados con solución salina, el volumen y el peso de los tumores también disminuyeron significativamente al finalizar el tratamiento con curcumina a las 4 semanas. Estos resultados concuerdan con los estudios *in vitro* que muestran que el tratamiento con curcumina en las células de cáncer de mama resulta una inducción dependiente de la dosis y el tiempo de apoptosis (Lv et al., 2014). A diferencia de nuestro modelo, donde los tratamientos se administraron por vía intragástrica, Lv. et al., administraron la curcumina de forma intraperitoneal, esto puede ser un problema si su finalidad es la replicación en humanos, debido a las complicaciones que pueden surgir al administrar el tratamiento,

mientras que el consumo por vía oral si puede recomendarse en humanos, pues en general el consumo de curcumina es seguro según la FAO/OMS, hasta en una dosis de 0-3 mg/kg al día (Kunnumakkara et al., 2017). La curcumina puede ser parte del tratamiento coadyuvante del cáncer de mama y de otros tipos de cáncer, este polifenol no vino a reemplazar a los tratamientos tradicionales, pero si puede sumar beneficios a la calidad de vida de las personas con esta enfermedad.



**Figura 17.** Peso total (gr) de los tumores extraídos de los ratones hembras BALB/c sometidos al ensayo *in vivo* durante 5 semanas. Grupo control, grupo curcumina, grupo OC y grupo quimioterapia. Los resultados son expresados en forma de media  $\pm$  desviación estándar. \*Indica  $p < 0.05$ . \*\*Indica  $p < 0.01$ .

## CONCLUSIONES

En ensayos *in vitro*, la curcumina ejerce un papel inhibitorio en la proliferación de las células de cáncer de mama MCF-7 y 4T1, de una manera dependiente de la quelación del hierro.

El hierro puede aumentar la confluencia celular y la adición de curcumina contrarresta este efecto. Esto respalda la idea que la curcumina es dependiente del hierro y sus efectos están asociados con propiedades quelantes de hierro.

El tratamiento intragástrico con curcumina a una dosis de 5mg/kg disminuye la proliferación tumoral de cáncer de mama *in vivo*.

## RECOMENDACIONES

En los ensayos *in vitro* se recomienda incluir nuevos tiempos de incubación y diferentes concentraciones de los tratamientos además de las utilizadas en este estudio. Otra recomendación sería comprobar que existe una interacción directa entre el hierro y la curcumina, y evaluar que efectivamente la curcumina está actuando como quelante de hierro.

En el ensayo *in vivo* es importante investigar si los efectos observados por la OC se deben a la dosis administrada, además de probar nuevas dosis para comprobar el efecto en el desarrollo tumoral. Probar dosis más elevadas de curcumina para ver si hay efectos más potentes en la inhibición del tamaño tumoral. También sería interesante investigar un grupo donde se combine quimioterapia y curcumina para observar si existe un efecto aditivo en ambos tratamientos.

## REFERENCIAS

- Abbaspour, N., Hurrell, R., & Kelishadi, R. (2014). Review on iron and its importance for human health. *Journal of Research in Medical Sciences: The Official Journal of Isfahan University of Medical Sciences*, 19(2), 164–174.
- American Cancer Society. (2019). Grados del cáncer de seno. Retrieved from <https://www.cancer.org/es/cancer/cancer-de-seno/compreension-de-un-diagnostico-de-cancer-de-seno/grados-del-cancer-de-seno.html>
- Andrews, N. C. (2009). Forging a field : the golden age of iron biology ASH 50th anniversary review Forging a field : the golden age of iron biology. *Blood*, 112(2), 219–230. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-12-077388>
- Babaei, E., Sadeghizadeh, M., Mohammad, Z., Ali, M., Feizi, H., Naja, F., & Mahmoud, S. (2012). Dendrosomal curcumin significantly suppresses cancer cell proliferation in vitro and in vivo. *International Immunopharmacology*, 12, 226–234. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2011.11.015>
- Baena Ruiz, R., & Salinas Hernández, P. (2014). Diet and cancer: Risk factors and epidemiological evidence. *Maturitas*, 77(3), 202–208. <https://doi.org/10.1016/j.maturitas.2013.11.010>
- Bahrami, A., Majeed, M., & Sahebkar, A. (2019). Curcumin: a potent agent to reverse epithelial-to-mesenchymal transition. *Cellular Oncology*.
- Bayet-Robert, M., Kwiatkowski, F., Leheurteur, M., Gachon, F., Planchat, E., Abrial, C., ... Chollet, P. (2010). Phase I dose escalation trial of docetaxel plus curcumin in patients with advanced and metastatic breast cancer. *Cancer Biology & Therapy*. <https://doi.org/10.4161/cbt.9.1.10392>
- Bengmark, S., Mesa, M. D., & Gil, A. (2009). Efectos saludables de la cúrcuma y de los curcuminoides. *Nutricion Hospitalaria*, (January).
- Bidram, E., Esmaeili, Y., Ranji-burachaloo, H., Al-zaubai, N., Zarrabi, A., Stewart, A., & Dunstan, D. E. (2019). A concise review on cancer treatment methods and delivery systems. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, (July), 101350. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2019.101350>

- Brown, R. A. M., Richardson, K. L., Kabir, T. D., & Trinder, D. (2020). Altered Iron Metabolism and Impact in Cancer Biology, Metastasis, and Immunology. *Frontiers in Oncology*, 10(April). <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.00476>
- Chekhun, V. F., Lukyanova, N. Y., Burlaka, A. P., Bezdenezhnykh, N. A., Shpyleva, S. I., Tryndyak, V. P., ... Pogribny, I. P. (2013). Iron metabolism disturbances in the MCF-7 human breast cancer cells with acquired resistance to doxorubicin and cisplatin. *International Journal of Oncology*, 43(5), 1481–1486. <https://doi.org/10.3892/ijo.2013.2063>
- Chenxia, H., Mengjie, L., Tingting, G., Shaoxi, W., Weiping, H., & Ke, Y. (2019). Anti-metastasis activity of curcumin against breast cancer via the inhibition of stem cell-like properties and EMT. *Phytomedicine*, 58(April 2018). <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2018.11.001>
- Cicco, P. De, Catani, M. V., Gasperi, V., Sibilano, M., Quaglietta, M., & Savini, I. (2019). Nutrition and Breast Cancer: A Literature Review on Prevention, Treatment and Recurrence. *Nutrients*, 11, 1–28.
- Cisneros, K. M., Romero, J. E., Genaro Guevara Torres, A., Valencia, M. E., Olivia Méndez Estrada, R., Ortiz, O. T., ... García, H. A. (2014). Impacto del tratamiento antineoplásico en el estado nutricional en pacientes con cáncer de mama. *Nutricion Hospitalaria*, 30(4), 876–882. <https://doi.org/10.3305/nh.2014.30.4.7646>
- Coffey, R., & Ganz, T. (2017). Iron homeostasis An anthropocentric perspective. *The Journal of Biological Chemistry*, 12727–12734. <https://doi.org/10.1074/jbc.R117.781823>
- Conde, S., De, R., Allende, C., & Conde, E. (2017). Estado actual del metabolismo del hierro : implicaciones clínicas y terapéuticas. *Medicina Clinica*, 148(5), 218–224. <https://doi.org/10.1016/j.medcli.2016.10.047>
- Cserni, G., Chmielik, E., Cserni, B., & Tot, T. (2018). The new TNM-based staging of breast cancer. *Springer Nature*, (5).
- Deshmukh, S. K., Srivastava, S. K., Poosarla, T., Dyess, D. L., Holliday, N. P., Singh, A. P., & Singh, S. (2019). Inflammation, immunosuppressive microenvironment and breast cancer: opportunities for cancer prevention and therapy. *Annals of Translational Medicine*, 7(20), 1–14. <https://doi.org/10.21037/atm.2019.09.68>



- E. Albertine, et al. (2014). Practice guidelines for the diagnosis and management of microcytic anemias due to genetic disorders of iron metabolism or heme synthesis. *Blood Journal*, 29(2), 234–239. <https://doi.org/10.1182/blood-2014-01-548776>.
- Egli, R. H. and I. (2010). Iron bioavailability and dietary reference values. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 91, 1461–1467. <https://doi.org/10.3945/ajcn.2010.28674F.Am>
- Engin, A. (2017). *Obesity associated Breast Cancer: Analysis of risk factors*. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-48382-5>
- Farhangi, B., Mohammad, A., Khodayari, H., & Khodayari, S. (2015). Protective effects of dendrosomal curcumin on an animal metastatic breast tumor. *Molecular and Cellular Pharmacology*, 758, 188–196. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2015.03.076>
- Fortner, R. T., Katzke, V., Kühn, T., & Kaaks, R. (2016). Obesity and Breast Cancer. *Obesity and Cancer*, 43–65. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-42542-9>
- Frautschy, S., & Cole, G. (2019). Laboratoire Optim. Retrieved from <https://www.laboratoire-optim.es/optim-curcuma/>
- García-Quiroz, J., García-Becerra, R., Santos-Cuevas, C., Ramírez-Nava, G. J., Morales-Guadarrama, G., Cárdenas-Ochoa, N., ... Díaz, L. (2019). Synergistic Antitumorigenic Activity of Calcitriol with Curcumin or Resveratrol is Mediated by Angiogenesis Inhibition in Triple Negative Breast. *Cancers*, 11, 1739.
- Gu, H., Mao, X., & Du, M. (2019). Prevention of breast cancer by dietary polyphenols - role of cancer stem cells. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1–16. <https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1551778>
- Gulec, S., Anderson, G. J., & Collins, J. F. (2014). Mechanistic and regulatory aspects of intestinal iron absorption. *AJP: Gastrointestinal and Liver Physiology*, 307(4), G397–G409. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00348.2013>
- Harbeck, N., Cortes, J., Gnant, M., Houssami, N., Poortmans, P., Ruddy, K., ... Cardoso, F. (2019). Breast cancer. *Nature Reviews*. <https://doi.org/10.1038/s41572-019-0111-2>

- Hortobagyi, G. N., Edge, S. B., & Giuliano, A. (2019). New and Important Changes in the TNM Staging System for Breast Cancer. *American Society of Clinical Oncology*.
- Hsieh, M., Chang, L., Hung, H., Lin, H., & Shih, M. (2017). New bis (hydroxymethyl) alkanolate curcuminoid derivatives exhibit activity against triple-negative breast cancer in vitro and in vivo. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 131, 141–151. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.03.006>
- Instituto Nacional del Cancer. (2015). Estadificación del cáncer. Retrieved from <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/diagnostico-estadificacion/estadificacion>
- International Agency for Research on Cancer. (2018). *Latest global cancer data: Cancer burden rises to 18.1 million new cases and 9.6 million cancer deaths in 2018*.
- Jung, M., Mertens, C., Tomat, E., & Brüne, B. (2019). Iron as a Central Player and Promising Target in Cancer Progression. *International Journal of Molecular Sciences*.
- Knaul, F. M., Nigenda, G., Lozano, R., Arreola-Ornelas, H., Langer, A., & Frenk, J. (2009). Cáncer de mama en México: una prioridad apremiante TT - Breast cancer in Mexico: an urgent priority. *Salud Pública de México*, 51(3), s335–s344. <https://doi.org/10.1590/S0036-36342009000800026>
- Korgaonkar, N., & Yadav, K. S. (2019). Understanding the biology and advent of physics of cancer with perspicacity in current treatment therapy. *Life Sciences*, 117060. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2019.117060>
- Kunnumakkara, A. B., Anand, P., & Aggarwal, B. B. (2008). Curcumin inhibits proliferation, invasion, angiogenesis and metastasis of different cancers through interaction with multiple cell signaling proteins. *Cancer Letters*, 269(2), 199–225. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2008.03.009>
- Kunnumakkara, A. B., Bordoloi, D., Padmavathi, G., Monisha, J., Roy, N. K., Prasad, S., & Aggarwal, B. B. (2017). Curcumin, the golden nutraceutical: multitargeting for multiple chronic diseases. *British Journal of Pharmacology*, 174(11), 1325–1348. <https://doi.org/10.1111/bph.13621>
- Laviano, A., Lazzaro, L. Di, & Koverech, A. (2018). Conference on “Diet, nutrition and the changing face of cancer survivorship” Symposium 2: Diet for advanced and

late-stage care Nutrition support and clinical outcome in advanced cancer patients. *Proceedings of the Nutrition Society*, (December 2017), 1–6. <https://doi.org/10.1017/S0029665118000459>

Limon-Miro, A. T., Lopez-Teros, V., & Astiazaran-Garcia, H. (2017). Dietary Guidelines for Breast Cancer Patients: A Critical Review. *Advances in Nutrition*, 8(4), 613–623. <https://doi.org/10.3945/an.116.014423>

Liu, H., & Ho, Y. (2018). Anticancer effect of curcumin on breast cancer and stem cells. *Food Science and Human Wellness*, 7(2), 134–137. <https://doi.org/10.1016/j.fshw.2018.06.001>

Lv, Z., Liu, X., Zhao, W., Dong, Q., Li, F., Wang, H., & Kong, B. (2014). Curcumin induces apoptosis in breast cancer cells and inhibits tumor growth in vitro and in vivo. *Int J Clin Exp Pathol*, 7(6), 2818–2824.

Mario Pulido-Moran, Jorge Moreno-Fernandez, C. R.-T. and Mc. R.-T. (2016). Curcumin and Health. *Molecules*, 21, 264, 1–22.

Merino Bonilla, J. A., Torres Tabanera, M., & Ros Mendoza, L. H. (2017). El cáncer de mama en el siglo XXI: de la detección precoz a los nuevos tratamientos. *Radiologia*, 59(5), 368–379. <https://doi.org/10.1016/j.rx.2017.06.003>

Milto, I. V., Suhodolo, I. V., Prokopieva, V. D., & Klimenteva, T. K. (2016). Molecular and cellular bases of iron metabolism in humans. *Biochemistry (Moscow)*, 81(6), 549–564. <https://doi.org/10.1134/S0006297916060018>

Mittler, R., Yahana, M. D., Sung, Y., Bai, F., Song, L., & Ioav, Z. (2018). NEET proteins: A new link between iron metabolism, ROS and cancer. *Antioxidants and Redox Signaling*, 1–39. <https://doi.org/10.1089/ars.2018.7502>

Moghtaderi, H., Sepehri, H., & Attari, F. (2017). Combination of arabinogalactan and curcumin induces apoptosis in breast cancer cells in vitro and inhibits tumor growth via overexpression of p53 level in vivo. *Biomedicine et Pharmacotherapy*, 88, 582–594. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.01.072>

Naja, F., Nasreddine, L., Awada, S., El, R., Ahmad, S., & Hwalla, N. (2019). Nutrition in the Prevention of Breast Cancer: A Middle Eastern Perspective. *Frontiers in Public Health*, 7(November), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2019.00316>

- National Cancer Institute. (2020). Cancer Classification. Retrieved from <https://training.seer.cancer.gov/disease/categories/classification.html>
- Nishito, Y., & Kambe, T. (2018). Absorption Mechanisms of Iron, Copper, and Zinc: An Overview. *J Nutr Sci Vitaminol*, *64*, 1–7. <https://doi.org/10.3177/jnsv.64.1>
- OMS. (2018). Cáncer. Retrieved from <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>
- Pfeifhofer-Obermair, C., Tymoszuk, P., Petzer, V., & Weiss, G. (2018). Iron in the Tumor Microenvironment - Connecting the Dots. *Frontiers in Oncology*, *8*(November), 1–24. <https://doi.org/10.3389/fonc.2018.00549>
- Puente-Yagüe, M. de La, Cuadrado-Cenzual, M. A., Ciudad-Cabañas, M. J., Hernández-Cabria, M., & Collado-Yurrita, L. (2018). Vitamin D: And its role in breast cancer. *Kaohsiung Journal of Medical Sciences*, *34*, 423–427. <https://doi.org/10.1016/j.kjms.2018.03.004>
- Ravindranath, V., & Nanjundiah, C. (1980). Absorption and tissue distribution of curcumin in rats. *Toxicology*, *16*.
- Rishi, G., Wallace, D. F., & Subramaniam, V. N. (2015). Hepcidin: regulation of the master iron regulator. *Bioscience Report*, 1–12. <https://doi.org/10.1042/BSR20150014>
- Robles, S. C., & Galanis, E. (2009). El Cáncer De Mama En América Latina Y El Caribe, *12*(582), 147–156. <https://doi.org/10.1590/S1020-49892002000800018>
- Secretaría de Salud. (2017). Cáncer de mama en Sinaloa.
- Sermini, C. G., Acevedo, M. J., & Arredondo, M. (2017). Biomarcadores del metabolismo y nutrición del Hierro. *La Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, *34*(4), 690–698. <https://doi.org/10.17843/rpmesp.2017.344.3182>
- Shafabakhsh, R., Hossein, M., & Reza, H. (2019). Targeting regulatory T cells by curcumin: A potential for cancer immunotherapy. *Pharmacological Research*, *147*(July), 104353. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2019.104353>
- Shea, E. K. H., Koh, V. C. Y., & Tan, P. H. (2020). Invasive breast cancer: Current perspectives and emerging views. *Pathology International*, 1–11. <https://doi.org/10.1111/pin.12910>

- Sociedad Mexicana de Oncología. (2016). *Prevención y diagnóstico oportuno en el cáncer*. Retrieved from [https://www.smeo.org.mx/descargables/COPREDOC\\_GUIA.pdf](https://www.smeo.org.mx/descargables/COPREDOC_GUIA.pdf)
- Song, X., Zhang, M. U., Dai, E., & Luo, Y. (2019). Molecular targets of curcumin in breast cancer. *Molecular Medicine Reports*, 19, 23–29. <https://doi.org/10.3892/mmr.2018.9665>
- Srimal, R. C., & Dhawan, B. N. (1973). Pharmacology of diferuloyl methane (curcumin), a non-steroidal anti-inflammatory agent. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, (1789), 447–452.
- Testa, U., Castelli, G., & Pelosi, E. (2020). Breast Cancer: A Molecularly Heterogenous Disease Needing Subtype-Specific Treatments. *Medical Sciences*, 8, 18.
- Todua, F., Gagua, R., Maglakelidze, M., & Maglakelidze, D. (2015). Cancer incidence and mortality - Major patterns in GLOBOCAN 2012, worldwide and Georgia. *Bulletin of the Georgian National Academy of Sciences*, 9(1), 168–173. <https://doi.org/10.1002/ijc.29210>
- Torti, S. V. T. and F. M. (2013). Iron and cancer: more ore to be mined. *Nature*.
- Viala, M., Chiba, A., Thezenas, S., Delmond, L., Lamy, P., Mott, S. L., ... Jacot, W. (2018). Impact of vitamin D on pathological complete response and survival following neoadjuvant chemotherapy for breast cancer: a retrospective study. *BMC Cancer*, 18:770, 1–11.
- Wallace, T. C., Bultman, S., Adamo, C. D., Daniel, C. R., Ho, E., Eliassen, H., ... Seyfried, T. N. (2018). Personalized Nutrition in Disrupting Cancer Proceedings From the 2017 American College of Nutrition Annual Meeting. *Journal of the American College of Nutrition*, 0(0), 1–14. <https://doi.org/10.1080/07315724.2018.1500499>
- Wang, J., & Pantopoulos, K. (2011). Regulation of cellular iron metabolism. *Biochemical Journal*, 434(3), 365–381. <https://doi.org/10.1042/BJ20101825>
- Wang, Y., Yu, J., Cui, R., Lin, J., & Ding, X. (2016). Curcumin in Treating Breast Cancer: A Review. *Journal of Laboratory Automation*, 21 (6), 723–731. <https://doi.org/10.1177/2211068216655524>
- Watkins, E. J. (2019). Overview of breast cancer. *Journal of the American Academy of PAs*, 13–17. <https://doi.org/10.1097/01.JAA.0000580524.95733.3d>

Yang, C., Ma, X., Wang, Z., Zeng, X., Hu, Z., Ye, Z., & Shen, G. (2017). Curcumin induces apoptosis and protective autophagy in castration-resistant prostate cancer cells through iron chelation. *Drug Design, Development and Therapy*, 431–439.

Zhao, S., Pi, C., Ye, Y., Zhao, L., & Wei, Y. (2019). Recent advances of analogues of curcumin for treatment of cancer. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 180(319), 524–535. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.07.034>

# ANEXO 1



United States Department of Agriculture

Research, Education, and Economics  
Agricultural Research Service

Albany, CA., marzo 02 de 2020

A Quien Corresponda:

Por este conducto hago constar que la estudiante **Marce Yaneth Inzunza Soto** del programa de "Maestría en Ciencias de la Nutrición y Alimentos Medicinales" de la Universidad Autónoma de Sinaloa, realizó una estancia de investigación en Western Regional Research Center - U.S. Department of Agriculture dentro del grupo de investigación Healthy Processed Foods Research entre el 01 de Agosto del 2019 al 31 de Enero del 2020, en el cual participó en el desarrollo del proyecto de investigación titulado: "Efecto de la curcumina en la proliferación celular y el estrés oxidativo en líneas celulares y ratones con cáncer de mama". Proyecto colaborativo entre investigadores de la Universidad Autónoma de Sinaloa (México) y Western Regional Research Center (Albany, California).

Atentamente,

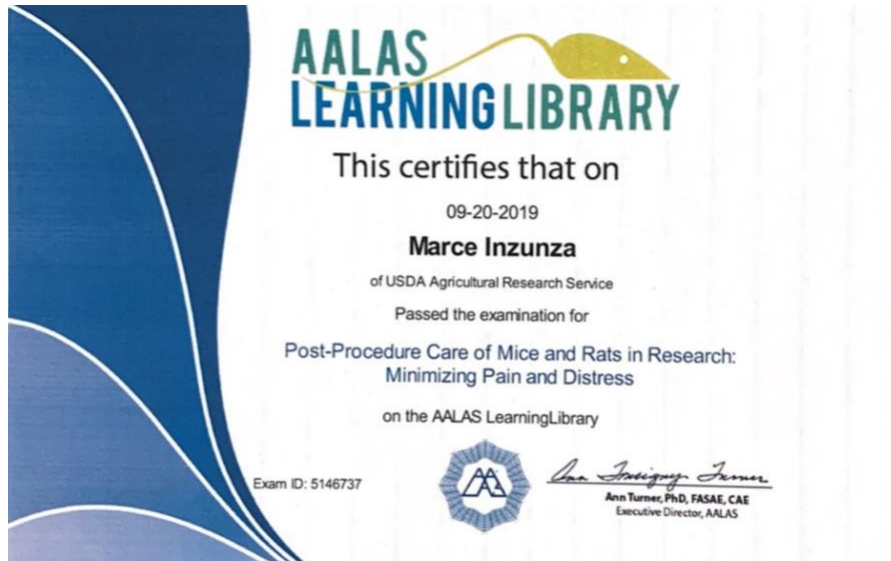
A handwritten signature in black ink, appearing to read "Roberto Avena Bustillos".

**Roberto Avena Bustillos, Ph.D. C.F.S.**

*Research Food Technologist*

Western Regional Research Center  
800 Buchanan St., Albany, CA 94710  
Voice 510.559.5954 Fax 510.559.5851 Cell 530.383.2792 E-mail roberto.avena@ars.usda.gov  
USDA is an Equal Opportunity Employer

## ANEXO 4





# ANEXO 3



Contact Information:  
roberto.avena@usda.gov

## Health benefits of dry-fractionated brewery spent grain fines with high protein and dietary fiber

R. AVENA-BUSTILLOS<sup>1</sup>, M. INZUNZA-SOTO<sup>2</sup>, S. THAI<sup>1</sup>, V. ROMAN<sup>3</sup>, L. WHITEHILL<sup>4</sup>, E. TERAN-CABANILLAS<sup>2</sup>, W. YOKOYAMA<sup>1</sup>, T. MCHUGH<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>Western Regional Research Center, ARS, USDA, Albany, CA, USA; Nutrition Dept., <sup>2</sup>University of Sinaloa, Culiacán, Sinaloa, México  
<sup>3</sup>University of California, Davis, Davis, CA, USA; <sup>4</sup>Berkeley High School, Berkeley, CA, USA



### INTRODUCTION

Use of organic byproducts, such as waste from agricultural and food industries, has increased in recent years. Brewery spent grain (BSG) is commonly diverted to landfill or used for feeding animals. Interest has recently been shown for its use as added value ingredient for human nutrition. BSG is rich in fiber, proteins, polyphenols, vitamins and minerals, as all these compounds remain untapped during brewing. Dry fractionation by particle size or density is a practical technology to increase protein and dietary fiber in dried BSG line fractions.

### AIM

The objective of this study was to evaluate relevant nutritional and health benefits of high protein and dietary fiber dry-fractionated BSG fines in comparison to regular dried BSG powder.

### METHOD

Fresh BSG was hot-air dried, partially milled and dry fractionated by differences in particle size by Rotap sieving. Regular dried BSG and BSG fines with less than 210 µm as 11.66±0.8% fraction of regular BSG, were analyzed for water activity, proximate analysis, soluble and insoluble fiber, in-vitro protein digestibility, amino acids and formulated at 40% BSG concentrations in high fat diet formulations for mice feeding for 5 weeks. Low and high fat control diets were also used for feeding comparison. After mice sacrifice, adipose tissue, liver, kidney and blood samples were obtained for fat, glucose and cholesterol analysis. Feces were used for protein and mice gut microbiome analysis. One-way ANOVA was used to define statistical differences.

### RESULTS

Table 1. Barley type in fresh BSG

Grain	Composition (%)
Admiral Pilsner malt (low protein barley)	53
Admiral Fieldblume malt (versatile malt)	13
Admiral wheat (hard white Patwin wheat)	25
Admiral oats (milled and kilned oats with intact husk)	9

Table 2. Proximate analysis of fresh BSG

Nutritional component	Whole BSG (%)	BSG Fines (%)
Protein	19.43±0.23 <sup>1</sup>	26.87±0.03 <sup>2</sup>
Moisture	2.58±0.21 <sup>1</sup>	5.95±0.39 <sup>2</sup>
Fat	8.60±0.20 <sup>1</sup>	10.87±0.09 <sup>2</sup>
Ash	5.00±0.03 <sup>1</sup>	3.94±0.01 <sup>1</sup>
Carbohydrates (by difference)	64.39 <sup>1</sup>	52.33 <sup>2</sup>
Available carbohydrates	17.99	17.97

Table 3. Dietary fiber in dried BSG

BSG type	Insoluble dietary fiber (%)	Soluble dietary fiber (%)	Total dietary fiber (%)
Whole BSG	42.8	3.6	46.4
BSG fines	31.3	3.0	34.4

Table 4. Ingredient composition of mice feed diets

Ingredient	Low fat control		High fat control		High fat whole BSG 40%		High fat BSG fines 40%	
	g	%	g	%	g	%	g	%
Butter	0	8	8	8	8	8	8	8
Soy oil	5	10	6.5	5.4	6.5	5.4	6.5	5.4
Cholesterol	0	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
Cellulose	5.25	5.3	0	0	0	0	0	0
Citron	20	20	12	8.6	12	8.6	12	8.6
Sucrose	30	30	30	11.9	30	11.9	30	11.9
Corn starch	34.64	21.5	18.4	18.4	18.4	18.4	18.4	18.4
BSG Whole			41.4	42.6				
BSG Fines					42.6	42.6		
Cysteine	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
Choline bitartrate	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
Mineral Mix	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5
Vitamin Mix	1	1	1	1	1	1	1	1

Table 5. Proximate analysis of diet formulations

Nutritional content (%)	Low-fat control	High-fat control	Whole BSG 40%	High-fat BSG fines 40%
Protein	17.28 ± 0.23	16.68 ± 0.23	16.50 ± 0.83	16.59 ± 0.09
Moisture	4.68 ± 0.21 <sup>1</sup>	3.70 ± 0.21 <sup>1</sup>		
Fat	5.0 ± 0.14 <sup>1</sup>	0.02 <sup>1</sup>	3.58 ± 0.04 <sup>2</sup>	4.67 ± 0.01 <sup>2</sup>
Ash	2.67 ± 0.08 <sup>1</sup>	2.61 ± 0.10 <sup>1</sup>	17.43 ± 1.17 <sup>2</sup>	18.57 ± 0.45 <sup>2</sup>
Carbohydrates (by difference)	70.37	58.95	58.03	56.11
Available carbohydrates	63.67	52.15	38.43	35.31

Table 6. Dietary fiber of diet formulations

Fiber type (%)	Low-fat control	High-fat control	High fat Whole BSG 40%	High fat BSG fines 40%
Soluble fiber	1.1	0.5	1.3	1.4
Insoluble fiber	5.6	6.3	18.3	19.4
Total fiber	6.7	6.8	19.6	20.8

Table 7. Average feed intake, liver, adipose tissue and kidney of mice

Diet	Feed intake (g)	Liver (g)	Adipose tissue (g)	Kidney (g)	Blood glucose (mg/dL)
Low fat control	128.84 ± 8.15 <sup>1</sup>	0.95 ± 0.13 <sup>1</sup>	0.33 ± 0.10 <sup>1</sup>	0.16 ± 0.02 <sup>1</sup>	160.38 ± 52.65 <sup>1</sup>
High fat control	108.38 ± 6.08 <sup>1</sup>	1.08 ± 0.11 <sup>1</sup>	0.60 ± 0.18 <sup>1</sup>	0.16 ± 0.02	152.25 ± 20.62
Whole BSG 40%	122.80 ± 9.11 <sup>1</sup>	0.92 ± 0.06 <sup>1</sup>	0.34 ± 0.15 <sup>1</sup>	0.18 ± 0.02	143.69 ± 19.68
BSG fines 40%	124.60 ± 9.58 <sup>1</sup>	0.92 ± 0.11 <sup>1</sup>	0.20 ± 0.09 <sup>1</sup>	0.16 ± 0.02	159.81 ± 25.64

Table 8. Mice fecal protein and liver fat

Diet	Fecal protein (%)	Liver fat (%)
Low fat control	9.62 ± 2.40 <sup>1</sup>	10.297 ± 1.847 <sup>1</sup>
High fat control	6.66 ± 0.98	15.010 ± 1.320 <sup>2</sup>
Whole BSG 40%	7.25 ± 2.37	10.140 ± 1.008 <sup>1</sup>
BSG fines 40%	8.42 ± 0.91	5.350 ± 0.970 <sup>1</sup>

Table 9. Cholesterol (mg/DL) in mice blood plasma

Diet	VLDL (mg/dL)	LDL (mg/dL)	HDL (mg/dL)	Total (mg/dL)
Low fat control	1.71 ± 0.64 <sup>1</sup>	6.43 ± 1.08 <sup>1</sup>	82.84 ± 34.03 <sup>1</sup>	
High fat control	2.86 ± 1.48	10.16 ± 2.75 <sup>2</sup>	101.71 ± 9.00	
Whole BSG 40%	2.02 ± 0.50	8.27 ± 2.82 <sup>2</sup>	94.97 ± 17.03	
BSG fines 40%	2.15 ± 0.97	8.77 ± 2.17 <sup>2</sup>	95.79 ± 20.06	

Fig. 1. Mice groups for feed study

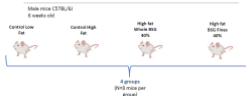
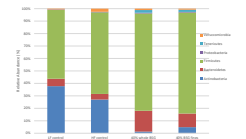


Fig. 2. Average weekly weight of mice, g



Fig. 3. Mice fecal gut microbiome



### RESULTS

Dry fractionated BSG fines had higher protein than regular BSG (26.9±0.1% vs. 19.4±0.2%) and higher soluble/insoluble fiber ratio (0.10 vs. 0.08). Glutamine (24.7%) and proline (9.4%) were the two main amino acids in BSG proteins. Mice weight gains were significantly lower with diet formulated with 40% BSG fines. Even regular BSG in high fat diet resulted in lower mice weight gain than consuming the low and high fat control diets, while there were no differences in fecal protein of mice eating the four different diets. Liver weight and adipose tissue were also lower in mice on high fat diets formulated with BSG and had no effect on kidney weight and blood glucose level, as indicators of health benefits. Remarkably liver fat was significantly lower in mice fed with diet supplemented with 40% BSG fines. Mice gut microbiome was modified and diversified by BSG. Actinobacteria were depleted while Firmicutes and Bacteroidetes were promoted by BSG in mice diets.

### CONCLUSIONS

A BSG fraction with less than 210 µm particle size with higher protein and soluble/insoluble fiber ratio can be obtained by dry fractionation to be used in diverse food applications with substantial health benefits.

### ACKNOWLEDGEMENTS

This research was supported by the intramural research program of the U.S. Department of Agriculture, National Institute of Food and Agriculture, Small Business Innovative Research, accession No. 1016055 granted to ReGrained Inc., Berkeley, CA.

### REFERENCES

- Liu K et al. Dry fractionation methods to produce barley meals varying in protein, beta-glucan, and starch contents. J Food Sci 2009 74(6): C487-C493
- Soukoulis C, Aprea E. Cereal bran fractionation: processing techniques for the recovery of functional components and their applications to the food industry. Rec Pat on Food, Nutri & Agric, 2012 4: 61-77

# ANEXO 4



Contact Information:  
roberto.avena@usda.gov

## First and second extraction drum-dried pitted olive pomaces phenolics and health benefits

R. AVENA-BUSTILLOS<sup>1</sup>, S. THAI<sup>1</sup>, M. INZUNZA-SOTO<sup>2</sup>, D. OLSON<sup>1</sup>, S. WANG<sup>3</sup>, E. TERAN-CABANILLAS<sup>2</sup>, W. YOKOYAMA<sup>1</sup>, T. MCHUGH<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Western Regional Research Center, ARS, USDA, Albany, CA, USA; <sup>2</sup>Nutrition Dept., University A. of Sinaloa, Culiacán, Sinaloa, México

<sup>3</sup>Dept. of Food Science and Technology, University of California, Davis, Davis, CA, USA



### INTRODUCTION

Main byproduct of olive oil extraction is pomace (OP) consisting of pulp, skins and pits. OP is used as feed for cows and other farm animals. After pits and skin removal, there is the possibility of using OP pulp as additive for human foods as it is rich in dietary fiber and contains high concentrations of phenolics with high antioxidant capacity compared to fruits and vegetables.

### AIM

This study evaluated mice health benefits of drum-dried pitted OP with high phenolics and dietary fiber, obtained after first and second oil extraction.

### METHOD

Fresh first and second oil extraction OP was steam blanched for enzymatic inactivation to reduce phenolics losses, then pits and skins separated in a pulper/finisher, and pulp was drum-dried and milled.

First and second oil extraction drum-dried OP were characterized by proximate analysis, total soluble phenolics (TSP), individual phenolics, soluble and insoluble fiber, and water activity.

Drum-dried pitted OP from first and second extraction was formulated at 10% and 20% in a high fat diet to feed mice. A low fat (5%) and high fat (18%) diets were also used for comparison.

After mice sacrifice, adipose tissue, liver, kidney and blood samples were obtained for fat, glucose and cholesterol analysis. Feces were used for protein and mice gut microbiome analysis. One-way ANOVA was used to define statistical differences at p<0.05.

### RESULTS

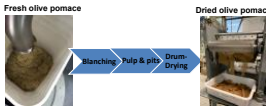


Table 1. Proximate analysis of drum-dried pitted OP

Nutritional component	OP 1st extraction	OP 2nd extraction
Protein	10.28 ± 0.31 <sup>a</sup>	9.76 ± 0.19 <sup>a</sup>
Moisture	2.82 ± 0.08 <sup>b</sup>	4.51 ± 0.02 <sup>b</sup>
Fat	10.28 ± 0.11 <sup>a</sup>	9.76 ± 0.19 <sup>a</sup>
Ash	9.02 ± 0.04 <sup>a</sup>	8.73 ± 0.04 <sup>a</sup>
Carbohydrates (by difference)	67.58	67.24
Available carbohydrates	33.59	28.44

Table 2. Dietary fiber of drum-dried pitted OP

Olive pomace type	Soluble fiber (g/g)	Insoluble fiber (g/g)	Total fiber (g/g)
OP 1st extraction	6.4	28	34
OP 2nd extraction	6.4	32.4	38.8

Table 3. Ingredient composition of formulation diets, in g

Ingredient	Control	HF	HF OP 1st	HF OP 1st 2nd 10%	HF OP 1st 2nd 20%
Fat 20%	0	88	88	88	88
Butter	55	110	97.13	100.1	84.7
Soy oil	0	1.1	1.1	1.1	1.1
Cholesterol	0	1.1	1.1	1.1	1.1
Fiber					
Cellulose (55 solid)	57.86	4	17.6	15.4	0
Protein 20%					
Casein	220	220	209	209	198
Starch, Balance					
Sucrose	330	330	330	330	330
Corn Starch	381.04	236.34	191.07	190.3	122.1
Other					
Olive Pomace			110	110	220
Cystine	3.3	3.3	3.3	3.3	3.3
Choline					
Bitartrate	3.3	3.3	3.3	3.3	3.3
Mineral Mix	28.5	28.5	28.5	28.5	28.5
Vitamin Mix	11	11	11	11	11
TOTAL (g)	1100.0	1100.0	1100.0	1100.0	1100.0
Calories/kg	3833.6	4481.6	4169.5	4191	3777

Fig. 1. Average mice diet formulation intake

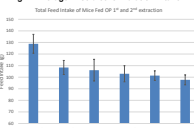


Fig. 2. Weekly mice weight gain during feeding study

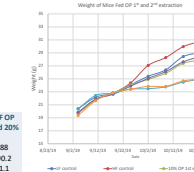


Fig. 3. Average weight of internal organs of mice



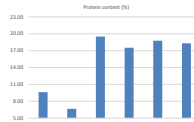
Table 4. Cholesterol levels (mg/DL) in mice blood plasma

Diet	LDL (mg)	TC	HDL
Low fat control	1.71 ± 0.64 <sup>a</sup>	6.43 ± 1.02 <sup>a</sup>	82.84 ± 24.03 <sup>a</sup>
High fat control	2.86 ± 1.48	10.16 ± 2.75	101.71 ± 9.00
OP 1st extraction 10%	1.78 ± 1.07	8.77 ± 1.43	104.34 ± 5.44
OP 2nd extraction 10%	2.66 ± 1.61	8.66 ± 4.41	100.39 ± 21.00
OP 1st extraction 20%	1.66 ± 1.06 <sup>a</sup>	9.68 ± 3.29 <sup>a</sup>	104.91 ± 8.67 <sup>a</sup>
OP 2nd extraction 20%	1.62 ± 0.44	10.62 ± 3.41	103.11 ± 9.37

Table 5. Mice liver fat

Diet	Liver fat (%)
Low fat control	10.30 ± 1.55 <sup>a</sup>
High fat control	15.01 ± 1.32 <sup>b</sup>
OP 1st extraction 10%	13.23 ± 0.99 <sup>a</sup>
OP 2nd extraction 10%	13.19 ± 0.70 <sup>a</sup>
OP 1st extraction 20%	6.12 ± 1.14 <sup>a</sup>
OP 2nd extraction 20%	6.94 ± 1.37 <sup>a</sup>

Fig. 4. Fecal mice protein by the different diets



### RESULTS

First extraction OP has higher oil and proteins and lower insoluble fiber than OP from second extraction. Also, first extraction OP has higher total soluble phenolics than OP from second extraction. Hydroxytyrosol was the main phenolic in both OP.

Mice weight gain was lower for the four OP diets compared to high and low-fat control diets. Fecal protein was high for all four OP diets, indicating poor protein retention in mice, possibly by phenolics protein and enzymes binding. Liver weight and adipose tissue were lower in mice consuming the four high fat OP diets compared to high fat control diet, and lowest in the 20% OP addition level. Blood cholesterol and mice kidney weight was not affected by OP in diets.

Increase in bacterial numbers of Bacteroidetes and Firmicutes in OP-containing diets may be the result of fermentable dietary fiber increasing bacterial diversity and may contribute to weight loss in mice.

Phenolics and fiber of OP in diet appear to have positive effects in health.

### CONCLUSIONS

Drum-dried pitted OP is a novel agricultural byproduct with potential of its bioactive compounds to be incorporated in feeds and foods while meeting sanitary regulations and providing health benefits.

### ACKNOWLEDGEMENTS

California Olive Ranch at Artois CA provided fresh samples of olive pomace from first and second olive oil extractions.

### REFERENCES

- Dermachea S et al. (Review) Olive mill wastes: Biochemical characterizations and valorization strategies. 2013. Proc Biochem 48: 1532-1552
- Sinrodo, AJG et al. Phenolics and antioxidant capacity of pitted olive pomace affected by three drying technologies. 2019. J Food Sci 84-3: 412-420

## ANEXO 5



ANIVERSARIO

**SEMANA NACIONAL  
DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA**

**DESASTRES NATURALES:  
TERREMOTOS Y HURACANES**

EL INSTITUTO DE APOYO A LA INVESTIGACIÓN  
OTORGA EL PRESENTE

# RECONOCIMIENTO

a: LIC. MARCE YANETH INZUNZA SOTO

por su valiosa participación en la XXV Semana Nacional  
de Ciencia y Tecnología.



Octubre, 2018.

Ing. Bernardino Antelo Esper  
Director General

Instituto de Apoyo a la Investigación e Innovación