



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA
FACULTAD DE MEDICINA

SECRETARIA DE INVESTIGACIÓN Y ESTUDIOS DE POSGRADO
MAESTRÍA EN CIENCIAS MÉDICAS E INVESTIGACIÓN

TESIS:

Estudio de las propiedades estimuladoras e inductoras de apoptosis de las proteínas aisladas del extracto acuoso de *A. indica* en linfocitos de sujetos normales y líneas celulares de cáncer de mama

Que para obtener el grado de
MAESTRÍA EN CIENCIAS MÉDICAS E INVESTIGACIÓN

Presenta

Miriam Fernández Gallardo

Director de Tesis:

D.C. María Alicia Díaz y Orea

Co-Directores Externos

D.C. Lilian Karem Flores Mendoza

D.C. Maricruz Anaya Ruiz



Puebla, Pue. Julio 2016

Índice

Abreviaturas	1
Resumen	2
Introducción	3
Antecedentes Generales	4
El Cáncer de mama	4
Factores de riesgo.....	5
Tipos de cáncer de mama.....	5
Ciclo celular.....	6
Apoptosis	8
Sistema Inmune y cáncer de mama	9
Terapias adyuvantes.....	12
<i>Azadirachta indica</i>	13
Línea celular MDA-MB 231.....	18
Antecedentes Específicos	19
Justificación	23
Planteamiento del Problema.....	24
Hipótesis Científica	25
Objetivos.....	25
Objetivo General	25
Objetivos Particulares.....	25
Material y métodos	25
Diseño del estudio	25
Ubicación espacio-temporal.	26

Estrategia de trabajo.....	26
Muestreo.....	27
Definición de la población.....	27
Grupo 1	27
Criterios de inclusión.....	27
Criterios de eliminación	27
Grupo 2	27
Criterios de Selección de la población	27
Criterios de inclusión.....	27
Criterios de exclusión	27
Criterios de eliminación	28
Tamaño de la muestra.....	28
Variables	28
Técnicas y Procedimientos.....	29
Análisis de los datos.....	30
Logística	30
Recursos Humanos.....	30
Recursos materiales.....	31
Recursos Financieros	31
Bioética	32
Resultados	33
Discusión.....	44
Conclusiones.....	48
Anexos	49

Anexo 1	49
Consentimiento informado.....	49
Anexo 2	50
Anexo 3	50
Anexo 4	51
Anexo 5	51
Anexo 6	52
Anexo 7	52
Anexo 8	53
Anexo 9	53
Anexo 10	54
Anexo 11	55
Anexo 12	56
Bibliografía.....	58

Esta Tesis fue realizada con el apoyo del Posgrado de la Maestría en Ciencias Médicas e Investigación y la Vicerrectoría de Investigación y Estudios de Posgrado (VIEP)

Abreviaturas

ADN Ácido Desoxirribonucleico.

Bcl-2, bcl x, MCL-1 Proteínas anti-apoptóticas.

BRCA Acrónimo de breast cáncer. Antígeno

CD 2 Diferenciación de Grupo, 2 familia de inmunoglobulinas.

CD 28 Diferenciación de Grupo, 28, glicoproteína de la familia de inmunoglobulinas.

CD 3 Diferenciación de Grupo, 3, Antígeno CD.

CD 4 Diferenciación de Grupo, 4, glucoproteína.

CD 40 Diferenciación de Grupo, 40, Proteína coestimuladora.

CD 45 Diferenciación de Grupo, 45, proteína tirosina fosfatasa.

CD 56 o NCAM Molécula de adhesión neural.

CD 8 Diferenciación de Grupo, 8.

Cdk Proteínas cinasas dependientes de ciclina.

Con A Concanavalina A

ERB-2 Receptor de la familia de factor de crecimiento epidermal

Fraciones proteicas Proteínas obtenidas a partir del extracto acuoso de hoja de Neem

IgG Inmuno Globulina G

IL-10 Interleucina 10

IL-12 Interleucina 12

IL-2 Interleucina 2

IL-4 Interleucina 4

IL-5 Interleucina 5

INEGI Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática.

INF- γ Interferón gamma

MDA-MB-231 Línea celular de adenocarcinoma mamario humano.

Neem *Azadiractha indica*

NF κ B *factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas*

NK Natural Killer

NLP neem leaf preparation, Extracto de hoja de neem

OMS Organización Mundial de la Salud

Th1 Linfocitos T cooperadores

Th2 Linfocitos B

TNF- α Factor de Necrosis Tumoral alfa

Resumen

El cáncer de mama es un padecimiento maligno, con una alta tasa de incidencia y mortalidad a nivel mundial. En México se reporta que 15 de cada 100 mujeres con neoplasias fallecen por causa de esta enfermedad.

Debido al alto costo en el tratamiento y control de esta malignidad y a los efectos secundarios producidos por algunos tratamientos hace necesario la investigación en terapias adyuvantes que mejoren la eficiencia de los tratamientos existentes y la prognosis del paciente, se han estudiado las inmunoterapias con extractos naturales que muestran efectos favorables en la terapia quimiopreventiva e investigaciones preclínicas entre la cuales encontramos al árbol *Azadiractha indica*, comúnmente conocido como *Neem*. Por tal motivo, El objetivo del presente trabajo fue estudiar el efecto de las fracciones proteicas obtenidas del extracto acuoso de *A. indica* en linfocitos de sujetos normales y líneas tumorales de cáncer de mama.

Material y métodos: Se preparo un extracto acuoso a partir de hojas de *Neem* del cual se obtuvieron las fracciones proteicas por medio de una columna de exclusión, se determinó la concentración proteica de dichas fracciones para realizar la interacción en los cultivos celulares de linfocitos y células de cáncer de mama MDA-MB-231, por medio de MTT y citometría de flujo, se determino la producción de IL-2 e IL-4 por la técnica de ELISA.

Resultados: Se obtuvieron 7 fracciones proteicas de diferentes pesos moleculares a partir del extracto completo, todas las fracciones indujeron proliferación de los linfocitos de sujetos normales y disminución de la viabilidad de células de líneas celulares de cáncer de mama. Hubo una producción de citocinas IL-2 e IL-4 por todas las fracciones con una $p=0.03$, para IL-2 con F1. La producción de IL-4 por todas las fracciones, fue significativa de $p=0.001$ hasta $p=0.009$.

Conclusiones: Las fracciones proteicas estimulan la proliferación y activación de los linfocitos desencadenando una respuesta celular y humoral y disminuyen la viabilidad de las células MDA-MB 231 de cáncer de mama.

Palabras Clave: *Azadiractha indica* (*Neem*), Cáncer de mama, terapias adyuvantes, inmunomodulación.

Introducción

El cáncer de mama es una de las neoplasias con mayor incidencia entre las mujeres (ocupando el segundo lugar), se presentan a nivel mundial más de un millón de casos nuevos cada año. Es una enfermedad silenciosa multifactorial que en la mayoría de las veces es diagnosticada en estadios tardíos donde las células tumorales han invadido tejidos y órganos circundantes, lo que provoca una alta tasa de mortalidad (Ferlay J, *et al.*, 2015).

En México, desde el año 2006, el cáncer de mama ha sido considerado como la segunda causa de muerte en mujeres adultas, sin importar su nivel socioeconómico. Datos estadísticos en 1990 mostraron 6000 nuevos casos y se estima un incremento cercano a los 16,500 nuevos casos para el año 2020 (INEGI, 2012). La mayoría de estos casos son autodetectados y sólo el 10% de todos los casos se identifica en la etapa I. La seguridad social en México cubre alrededor de 40 a 45% de la población e incluye tratamiento del cáncer de mama (Ban KA & Godellas CV, 2014). A partir del año 2007, la población sin seguridad social que presenta cáncer de mama puede ser atendida a través del Seguro Popular de Salud. A pesar de esto, los servicios escasean y las intervenciones de detección temprana, son muy limitadas. Existen barreras tanto en la demanda como en la oferta. Por lo que en los últimos años se ha buscado la implementación de terapias adyuvantes basadas en extractos naturales, que ayuden a mejorar la respuesta a los tratamientos pre-establecidos, fortaleciendo la respuesta inmunológica y la vida del paciente.

Por lo que en el presente trabajo se desarrolló una investigación sobre las propiedades inmunológicas de las fracciones proteicas, obtenidas a partir del extracto acuoso de hoja del árbol *Azadirachta indica*, haciendo una interacción con las fracciones proteicas en cultivos celulares de linfocitos y líneas celulares de cáncer de mama, con el fin de proponerlo como una terapia adyuvante. El uso de diferentes partes del árbol se han utilizado en la medicina tradicional por sus propiedades medicinales entre ellas inmunomoduladoras, anticancerígenas, quimioterapéuticas, y adyuvantes, mostrando efectos favorables en diferentes investigaciones.

Antecedentes Generales

El Cáncer de mama

El cáncer de glándula mamaria o cáncer de mama es uno de los principales carcinomas que se presentan en mujeres adultas (OMS 2014), siendo un cáncer invasivo y frecuente en mujeres de todo el mundo; constituyendo una de las principales causas de muerte y mostrando un porcentaje del 29% total de casos de neoplasias (Ban KA & Godellas CV, 2014; Siegel R, *et al.*, 2014).

A nivel mundial, se estima que 1.67 millones de mujeres al año reciben un diagnóstico de cáncer de mama, mientras que 458,000 mueren por la enfermedad (Ferlay J, *et al.*, 2015).

En México, se reportó que el cáncer de mama es el más común entre las mujeres representando una incidencia del 29% y una tasa de mortalidad del 15% de todas las neoplasias. El cáncer de mama es la principal causa de morbilidad hospitalaria entre los tumores malignos para la población mexicana de 20 años y más (18.7%); 3 de cada 10 mujeres son hospitalizadas por dicha causa (INEGI, 2012).

El cáncer se debe a la mutación de genes que codifican para proteínas que regulan tanto la proliferación como la apoptosis celular en los que participan, oncogenes, genes supresores de tumores, proteínas apoptóticas y proteínas anti-apoptóticas; cuyo cambio en sus niveles de expresión provocan que las células pierdan el control de su capacidad replicativa y de su función específica, por lo que estas células “desdiferenciadas” comienzan a proliferar de manera descontrolada, produciendo tumores benignos, los cuales se transforman a tumores malignos a corto o largo plazo, incrementándose de esta manera su capacidad de invadir tejidos y órganos circundantes (Evan GI & Vousden KH, 2001).

Potencialmente las señales proliferativas oncogénicas están acopladas a una variedad de procesos que inhiben el crecimiento, como la apoptosis, la diferenciación o senescencia, cada uno de los cuales restringe la expansión clonal y la evolución neoplásica. La progresión del tumor ocurre solamente cuando algunos de estos procesos resultan afectados negativamente (Evan GI & Vousden KH, 2001).

Factores de riesgo

Estudios epidemiológicos muestran que las mujeres que tienen su primera menstruación a una edad muy temprana (antes de los 11 años), las que no tienen periodos de lactancia, las que presentan retraso en la menopausia (después de los 55 años) y las que no tienen hijos o los tienen después de los 40 años, estilos de vida como, sedentarismo, tabaquismo, alcoholismo, muestran mayor incidencia en presentar cáncer de mama (Wilson B & Tellechea G, 2000).

Del mismo modo, las mujeres que tienen familiares en primer grado de consanguinidad (madre o hermanas) con antecedentes de cáncer de mama diagnosticado antes de los 50 años tienen mayor riesgo de desarrollar este tipo de cáncer. En estos grupos familiares se ha identificado un gen anormal denominado *BRCA* (acrónimo de *breast cancer*, cáncer de mama en inglés). Las mujeres que heredan el gen *BRCA*, que predispone al cáncer, tienen un 80% de riesgo de desarrollar esta enfermedad. Sin embargo, este tipo de anomalía sólo se presentó en el 5 y el 10% de los cánceres de mama (Instituto Nacional de Cancerología de Colombia, 2001).

Tipos de cáncer de mama

Los tipos de cáncer de mama se definen conforme a la anatomía de la mama en donde se desarrolla el tumor, estos son: el lobulillar, ductal y mixto, estos pueden ser *in situ* o infiltrante (Pichard B, *et al.*, 2007).

Se ha descrito que el tipo de cáncer mamario que se presenta con mayor frecuencia es el carcinoma ductal infiltrante que representan el 70% de todos los tipos (Pichard B, *et al.*, 2007).

El cáncer de mama es una enfermedad que en la mayoría de los casos, no presenta síntomas en su etapa inicial. Por lo general aparece una masa no dolorosa que fácilmente se confunde con los cambios benignos que se presentan en las mamas de la mujer, como los quistes. La manera más eficaz de controlar el cáncer de mama es su temprana detección, ya que es una enfermedad sistémica, por lo que su probabilidad de progresión e invasión a otros tejidos y órganos es muy alta. El cáncer de mama en sus estadios tardíos

tiene una alta capacidad metastásica principalmente en hueso, cerebro y pulmón. (Instituto Nacional de Cancerología de Colombia, 2001).

Se ha observado que la malignidad del tumor está relacionada con su microambiente, modificando el perfil bioquímico de las células, así el reconocimiento de las células tumorales por el sistema inmune (Vaupel P, *et al.*, 1989; Raleigh J, *et al.*, 1998; Witz I, 2009), condiciones que estimulan el crecimiento, la progresión, invasión y metástasis del tumor (Mbeunkui F & Johann D, 2009).

Los estadios del cáncer son clasificados en función del tamaño del tumor, se han descrito cinco estadios: 0, I, II, III, IV. En el estadio cero es el estado incipiente tumoral donde no hay una masa tumoral solo empiezan a formarse las células malignas, mientras que en el estadio IV las células tumorales se diseminan hacia órganos y tejidos circundantes (Skolov A & Paull EO, 2016).

El cáncer de mama se considera como una enfermedad multifactorial que es ocasionada por un descontrol en el ciclo celular, generando células tumorales que llegan a evadir los mecanismos de defensa del sistema inmunológico (Siegel R, *et al.*, 2014).

Ciclo celular

El ciclo celular es el proceso que inicia al término de una división celular y finaliza al culminar la siguiente división celular. Las células se reproducen mediante un ciclo de división en el que primero se duplica su contenido genético, y luego se dividen en dos células hijas idénticas. Las fases del ciclo celular son (Agami R & Bernards R, 2002):

- a) Fase G1, esta fase transcurre entre el final de una mitosis y el inicio de la síntesis del ADN, es una fase en la que la célula desarrolla una intensa actividad metabólica, aumentando de tamaño y generando nuevos organelos. Igualmente se producen los desoxinucleótidos y las enzimas necesarias para la replicación. El crecimiento de los tejidos depende principalmente de la duración del ciclo celular, siendo la fase G1 la de duración más variable, incluso entre células del mismo linaje y dentro del mismo cultivo. La duración de la fase G1 parece depender en gran medida de las condiciones de cultivo (Agami R & Bernards R, 2002), por ejemplo, en condiciones sub-óptimas de cultivo las células permanecen por

tiempo indefinido en dicha fase, es decir en estado quiescente o de reposo, fase que se denomina G₀ (Viallard JF, *et al.*, 2001). La duración del resto de las fases es prácticamente constante (S: 7-12 h; G₂:1-6 h, y M: 1-2 h).

- b) Fase S, es la fase de síntesis de ADN y ADN polimerasa. En esta fase se sintetizan las proteínas histonas, asociadas al ADN en las células eucariotes. Al final de la fase cada cromosoma queda duplicado y formado por dos cromátides idénticas.
- c) Fase G₂, es la fase donde se sintetizan las enzimas necesarias para la mitosis. Puede haber cierto crecimiento celular y la fase acaba cuando los cromosomas empiezan a condensarse al inicio de la mitosis.
- d) Fase M o de mitosis, fase en que se desarrolla una gran actividad celular y es donde ocurre la división del núcleo (cariocinesis), y la división celular (citocinesis). Los cromosomas duplicados se distribuyen de manera idéntica en cada una de las células hija (Lundberg AS & Weinberg RA, 1999).

El paso de la fase G₁ a la fase S y el paso de la fase G₂ a la fase M es controlado por los denominados “check points” o puntos de verificación, de tal forma que no se puede avanzar en el ciclo hasta que las condiciones no sean apropiadas, o haya inducción por señales extracelulares. Los puntos de control más importantes son dos: uno se encuentra al final de la fase G₁, permitiendo que se repare el ADN dañado antes de ser replicado en la fase S, y el otro en G₂, antes de entrar a mitosis. El punto de control en G₂, detecta el ADN que no ha sido replicado y o el ADN dañado, generando una señal que evita que comience la fase M antes de que se haya completado la fase S, permaneciendo la célula en G₂ (Lukas J, *et al.*, 2004).

En las células normales de mamíferos, la detención en el punto de control de G₁, está mediada por la acción de una proteína conocida como p53, la cual es inducida rápidamente en respuesta al ADN dañado. El ciclo celular de todas las células eucariotes está controlado por un conjunto de complejos proteicos cdk/ciclinas (proteínas cinasas dependientes de ciclinas) (Johnson DG & Walker CL, 1999; Nigg EA, 2001; Malumbres M & Barbacid M, 2005). El paso de la fase G₁ a S se lleva a cabo por el complejo cdk4/ciclina D y cdk6/ciclina D, y más tarde, el tránsito se lleva a cabo por el complejo cdk2/ciclina E para

la fase S. La progresión a través de la fase S, se lleva a cabo por el complejo cdk2/ciclina A. El paso de G2 a M, está regulado por el complejo cdk1/ciclina B (Malumbres M & Barbacid M, 2005).

Existen dos familias de inhibidores de cinasas dependientes de ciclinas: la familia INK4, formada por las proteínas p16, p15, p18 y p19, y la familia Cip/kip, formada por las proteínas p21, p27 y p57. Las proteínas p21 y p27 pueden ser fosforiladas, lo cual determina su localización celular y función, por ejemplo si se localizan en el núcleo funciona como supresor de tumores, mientras que en el citoplasma tiene un efecto oncogénico (Swanton C, 2004).

Apoptosis

El término apoptosis se acuñó en 1972 para definir un mecanismo general de pérdida o deleción de células aisladas, complementario a la mitosis, que poseía características morfológicas, bioquímicas y genéticas específicas (Kerr *et al.*, 1972). La apoptosis o muerte celular programada, es la forma de muerte celular eucariótica más común, ya que la muerte fisiológica, es esencial para el adecuado desarrollo y función de los organismos multicelulares (Vaux, 1993; Stellar, 1995).

La apoptosis es un proceso controlado y regulado genéticamente, donde participan genes que previenen y promueven su inicio (Krajewski *et al.*, 1999; Cory a Adams, 2002). Este es un proceso dependiente de proteínas caspasas, familia de cisteinil proteasas mitocondriales (caspasas -2, -3, -8, -9), cuyo accionar da lugar a la mayoría de los distintivos morfológicos de la muerte celular, como fragmentación nuclear, desensamblaje del citoesqueleto y exposición de fosfatidilserina en la superficie extracelular. Sin embargo, se han descrito formas de apoptosis independientes de caspasas, mostrándose a la mitocondria como un elemento central en dicho proceso (Parone *et al.*, 2002).

La proteína p53 es un mediador crítico de la apoptosis, su nivel se incrementa en respuesta a un daño genotóxico (Lane DP, 1992). Se conoce que cuando ocurre un daño en el ADN, se activa p53 que frena la división celular, y permite la acción de las enzimas reparadoras del ADN, previo a la replicación del mismo. Si el daño no puede ser reparado,

p53 participa en la inducción de la apoptosis, inhibiendo la propagación de una célula con alteraciones genómicas, susceptible a sufrir una transformación tumoral (Lane *et al.*, 1994).

El gen supresor de tumores p53 es el gen más comúnmente mutado en los cánceres humanos, inhibiendo su actividad apoptótica intrínseca, es decir, induciendo genes proapoptóticos (proteína Bax, Bad, Bak y Bid) e inhibiendo genes antiapoptóticos (proteína bcl-2, bcl-x, MCL-1) (Zhu *et al.*, 2000).

Para protegernos de agentes extraños, como pueden ser las células tumorales, las cuales pueden presentar una afección en su ciclo celular, el organismo cuenta con mecanismos de vigilancia, como es el sistema inmune, encargado de la prevención de tumores, eliminación de tumores inducidos por virus, eliminación de agentes patógenos y pronta resolución de la inflamación, eliminación de células tumorales por la expresión de antígenos específicos de tumores (TSA), inmunovigilancia (Minaker, 2011).

Sistema Inmune y cáncer de mama

Las células de cada individuo expresan proteínas en la superficie llamadas antígenos, marcas de identidad, reconocidas como propias del organismo, evitando que sean atacadas y eliminadas (Balkwill & Mantovani, 2001).

Si se encuentran con antígenos que no son propios, como bacterias, virus, células anormales, activan señales de peligro que desencadenan una reacción del sistema inmunológico lo que permite su eliminación (Balkwill & Mantovani, 2001).

Las células anormales expresan antígenos tanto en su superficie como secretadas por las células, los antígenos extraños son reconocidos por el sistema, principalmente por los linfocitos T, Linfocitos B y células Natural Killer (NK) (Balkwill & Mantovani, 2001).

Existen dos tipos de inmunidad, la inmunidad innata que corresponde a células y moléculas que actúan de manera rápida contra agentes extraños, es la primera barrera defensiva que no genera memoria, es un sistema de barrera que se encuentra en la piel y en mucosas principalmente, las secreciones antimicrobianas de estos tejidos, contienen

moléculas que favorecen la inflamación como señal de alarma. (Balkwill & Mantovani, 2001).

La inmunidad adaptativa se desarrolla después del primer contacto con un agente extraño, es mediada por receptores específicos en la membrana de los linfocitos, generando una memoria inmunológica (Balkwill & Mantovani, 2001).

Los linfocitos son de las principales células circulantes del sistema inmune encargadas de la vigilancia que reaccionan contra agentes extraños, representan el 30% de sangre periférica, y se localizan principalmente en linfa, sangre y órganos linfoides.

Los linfocitos cuentan con receptores específicos para antígenos que les permite producir anticuerpos y destruir células anormales. El reconocimiento de estos antígenos ocurre en el interior de los órganos linfoides con el ambiente adecuado para la interacción eficiente entre linfocitos, macrófagos y el antígeno extraño (Karp, 2007). En el mecanismo adquirido las células que participan son las células T y los anticuerpos, la interacción con los antígenos puede desarrollar una respuesta Th1, Th2 que son las más comunes.

Para conducir una respuesta antitumoral efectiva, es necesario la participación tanto de la inmunidad innata como la adquirida. Sin embargo, el rápido crecimiento y propagación de los tumores sobrepasa la capacidad del sistema inmune. Esto debido a que las células tumorales crecen sin generar inflamación, evitando la producción de una señal de peligro (Hadden J, 1999; Dunn G, *et al.*, 2004).

Sin embargo, con el transcurso de los años el individuo comienza a envejecer ocasionando daño en las células, tejidos, órganos o en la totalidad del individuo, declinando la funcionalidad de mecanismos inmunológicos contra bacterias, virus o células tumorales (Minaker, 2011).

Mutaciones secuenciales ocurridas en el ADN de la célula tumoral inducen cambios en las concentraciones hormonales, en la producción de enzimas y citocinas, así como en la expresión de nuevos antígenos lo que posibilita que estas células transformadas escapen del control homeostático y se tornen resistentes a la destrucción mediada por los mecanismos de la respuesta inmune (Hadden J, 1999; Dunn G, *et al.*, 2004).

En el microambiente tumoral se encuentran células del sistema inmunológico que presentan un funcionamiento alterado como son las células natural killer (NK), la población predominante son las células T que tienen un fenotipo de memoria. Las citocinas liberadas por estas células T, infiltrantes del tumor no han sido estudiadas. En algunos tumores, como el sarcoma de Kaposi, Enfermedad de Hodgkin, carcinoma bronquial, cervical y carcinoma se producen principalmente las interleucinas IL- 4 e IL-5 y no interferón γ . Las IL 4 e IL 5 están asociados con una respuesta Th2, mientras que el interferón γ es asociado con las respuestas Th1. Las respuestas Th2 polarizadas son generalmente ineficaces contra los tumores y virus (De Visser K, *et al.*, 2006).

La inmunodeficiencia se presenta cuando el sistema inmunitario no responde adecuadamente, lo que provoca un déficit en la eliminación de agentes extraños.

A partir de la segunda mitad del siglo XX los cirujanos comenzaron a reportar la presencia de infiltración linfocítica en los tumores mamarios, suceso que sugería una participación efectiva del sistema inmune (De Visser K, *et al.*, 2006).

Por lo que en los últimos años se ha investigado el empleo de adyuvantes que, en combinación con las terapias existentes, permitan potenciar la respuesta inmunológica y la eliminación de las células tumorales (Dunn G, *et al.*, 2004).

Las modalidades terapéuticas contra el cáncer de mama son: la cirugía, la radioterapia, la quimioterapia, la hormonoterapia y la terapia biomolecular. Las dos primeras actúan a nivel local, sobre las células presentes en la mama y los ganglios linfáticos, constituyen el tratamiento de elección en la enfermedad localizada no metastásica. Las restantes actúan tanto a nivel local como general en todo el organismo, en lo que se denomina tratamiento sistémico, y se utilizan de forma complementaria, al tratamiento local con cirugía y/o radioterapia o como tratamiento de primera elección en la enfermedad metastásica (OMS, 2014).

Una de las desventajas en la quimioterapia es que el fármaco no puede distinguir entre células normales y células tumorales, lo que ocasiona un daño en las células normales que produce efectos secundarios indeseables (Coates A, *et al.*, 1983).

Entre estos efectos secundarios encontramos: cansancio, fatiga, náusea, vómito, linfedema (inflamación en el brazo, pecho por la acumulación de líquido linfático), puede dañar pulmones causando dificultad para respirar, problemas en el sistema endócrino. Cuando el tratamiento ha sido hormonal, problemas en los huesos debido a que se usan corticoesteroides en conjunto con la terapia de elección produciendo adelgazamiento y factor de riesgo para padecer osteoporosis, trastornos digestivos, emocionales entre otros (Coates A, *et al.*, 1983).

Para disminuir los efectos secundarios generados por la terapéutica contra el cáncer han surgido tratamientos coadyuvantes que mejoren a la eficacia de las terapias existentes, con extractos naturales que ofrecen un favorable remedio o control en la progresión del cáncer, mostrando resultados favorables en la investigación y en la terapéutica, además de una disminución en los costos y los efectos adversos producidos (Elansary, HO *et al.*, 2014). Los tratamientos para combatir esta malignidad se aplican de acuerdo al tipo de cáncer mamario.

Terapias adyuvantes

Un agente adyuvante es aquella sustancia que al ser administrada, estimula y potencializa la respuesta inmunológica. En las terapias contra el cáncer, se pueden aplicar antes del tratamiento para disminuir el tamaño del tumor y mejorar la eficiencia del tratamiento, son conocidas como neo-adyuvantes y adyuvantes aquellas que se aplican conjuntamente con el tratamiento para mejorar la respuesta inmune (Morris Quevedo HJ, *et al.*, 1999).

Entre estas terapias encontramos el tamoxifen, que actualmente es empleado para terapia complementaria en el cáncer de mama, siendo un antagonista de los receptores para estrógenos, lo que ayuda a disminuir el crecimiento de las células tumorales suprimiendo proteínas asociadas al ciclo celular, el problema es que solo funciona en mujeres que presentan células tumorales de mama ER+. Entre los efectos secundarios se ha relacionado con cáncer endometrial y enfermedad tromboembólica, además de que su

principio activo proveniente de planta, se ha sintetizado químicamente elevando su costo (Kieback, *et al.*, 2010).

La Curcumina es un adyuvante natural que está en desarrollo experimental, se obtiene de la planta *Curcuma longa*. Estudios en células de cáncer de mama MCF -7 mostraron que la Curcumina induce apoptosis. Las células tumorales, inducen la expresión del gen *CAMP* que promueve la respuesta innata y no presenta efectos citotóxicos en células sanas (Guan F, *et al.*, 2016).

Por lo anterior estos adyuvantes naturales poseen un gran potencial para tratamientos complementarios anticancerígenos.

Azadirachta indica

La *Azadirachta indica* es un árbol proveniente de la familia Meliaceae originario de la India, comúnmente es conocido como “*Neem*”, es una familia distribuida en los trópicos y subtropicos con algunos representantes en zonas templadas (Rajkumar P *et al.*, 2011). El árbol de *Neem* presenta un rápido crecimiento, puede alcanzar de 15 a 20 m de altura, presenta un abundante follaje en todas las temporadas del año, tal y como se muestra en la **(Figura 1)**, en condiciones de adversidad tiende a deshojarse casi completamente. El ramaje es amplio llegando a medir de 15 a 20 metros ya desarrollado. El tronco es corto, recto y puede alcanzar 120 cm de diámetro. La corteza es dura, agrietada y desde color gris claro hasta castaño rojizo. La savia es blanca grisácea y el corazón del tronco es rojo; cuando se expone al aire se torna de castaño rojizo. Las raíces consisten de una robusta raíz principal y ampliamente desarrolladas las raíces laterales. Sus hojas son verde oscuro de 3 a 8 cm de longitud, las hojas jóvenes son de color rojo o púrpura. La forma de las hojas maduras, son menos asimétricas y sus márgenes están dentados. Las flores son blancas y fragantes, están dispuestas axialmente, normalmente en racimos colgantes que miden más de 25 cm de longitud, puede haber flores femeninas y masculinas en el mismo árbol, pero en periodos diferentes. Su fruto es parecido a la aceituna en forma que varía desde un ovalo elongado hasta uno ligeramente redondo, y cuando madura mide 14 a 28 mm de longitud y 10 a 15 mm de ancho (Puri 1999; Biswas *et al.* 2002; Brahmachari 2004).



Figura 1. Árbol de *Neem*. Rajkumar Paul *et al.*, 2011

Las semillas del árbol del *Neem* son comúnmente utilizadas como insecticida ya que es eficiente para el control de plagas, afectando el ciclo vital de los insectos, pero sin una afección tóxica para el ser humano, además de que ha presentado alta eficiencia para el tratamiento de diferentes enfermedades, ya que cuenta con al menos 60 tipos de sustancias bioactivas incluyendo terpenoides y esteroides, por los que en la última década sus propiedades han sido ampliamente estudiadas pero sin tener un total entendimiento de su funcionamiento (Rajkumar P *et al.*, 2011).

Todas las partes del árbol, principalmente las hojas (**Figura 2**), su corteza, semillas, frutos, y la purificación de sus productos son ampliamente utilizados para el tratamiento de múltiples enfermedades (**Cuadro 1**) además de contar con propiedades anticancerígenas y quimiopreventivas ayudando a la prevención, protección, supresión, inmunomodulación y efectos apoptóticos en varios tipos de cáncer como cáncer de próstata, estómago y mama entre otros (Fang H, *et al.*, 2014; Rajkumar P *et al.*, 2011).



Figura 2. Hoja del árbol del *Neem*. A partir de la cual se realiza el extracto acuoso (Rajkumar Paul *et al.*, 2011)

Cuadro 1. Partes del árbol de *Neem* para sus usos terapéuticos.

N°	Partes del árbol	Dolencias tratables
1	Corteza	Analgésico, curativo de fiebre
2	Rama	Tos, Asma, Hemorroides, tumor intestinal, gusanos, espermatorrea, trastorno urinario, diabetes.
3	Hoja	Lepra, conjuntivitis, epistaxis, anorexia, bilis, úlceras de la piel, cáncer.
4	Flor	Supresión de la bilis, eliminación de gusanos intestinales, flemas.
5	Fruto	Gusanos intestinales, epistaxis, trastorno urinario, diabetes, heridas de lepra, problemas de los ojos.
6	Semilla	Lepra, cáncer, gusanos intestinales.
7	Aceite	Lepra, gusanos intestinales.
8	Goma	Sarna, heridas, úlceras, alergias.

Cuadro obtenida del artículo de revisión de Rajkumar P., *et al.* 2011. En donde se muestran las diferentes partes del árbol para el tratamiento de diferentes enfermedades.

En las investigaciones de cáncer se ha visto que el microambiente tumoral desempeña papeles esenciales en la aparición y progresión de los tumores. Curiosamente, los componentes del *Neem* modulan el microambiente tumoral a través de una serie de mecanismos como la atenuación de la angiogénesis y aumento de la citotoxicidad del sistema inmunitario (**Figura 3**).

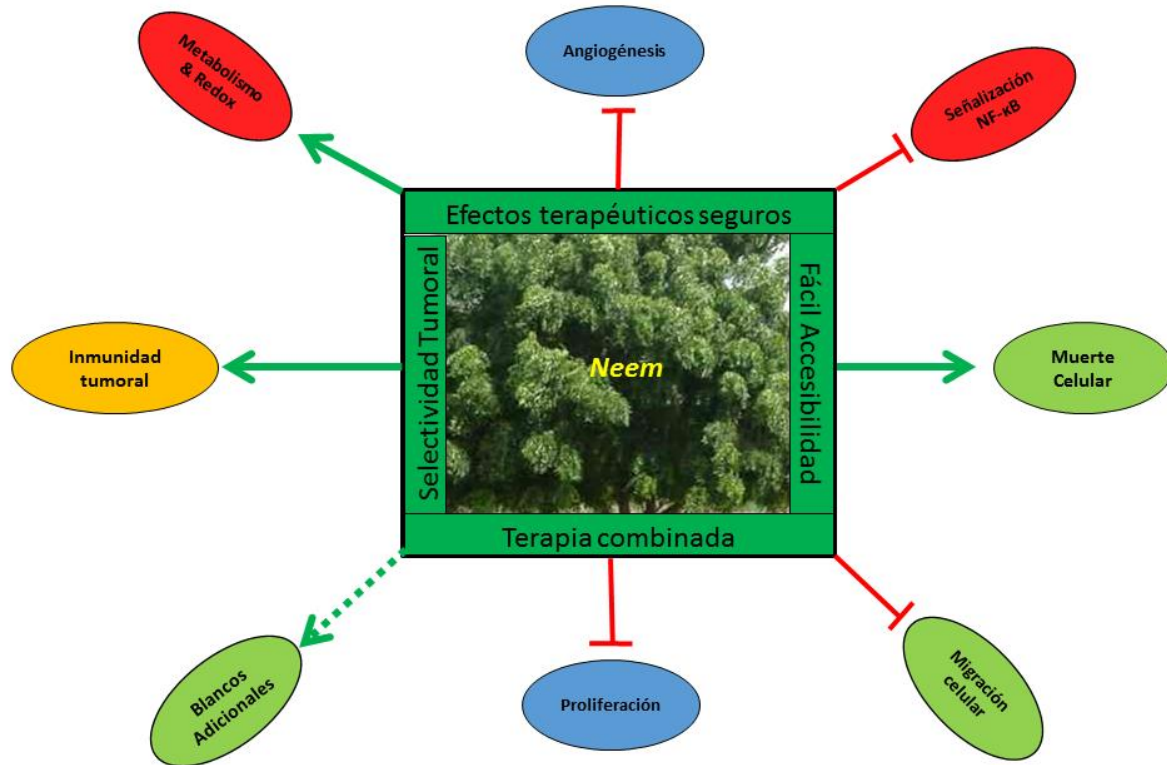


Figura 3. El espectro de *Neem* (*Azadirachta indica*) componente anti-cáncerigenos. Contiene diferentes propiedades beneficiosas de los componentes de *Neem*, incluyendo la fácil disponibilidad, la selectividad del tumor, seguridad en la terapéutica, y el uso en combinación con otros medicamentos contra el cáncer. La eficiencia del extracto de *Neem* en cáncer: suprime la angiogénesis, la migración celular, proliferación y señalización NF-kB. Los extractos de neem inducen muerte celular, la inmunidad contra el tumor, el metabolismo celular incluyendo la modulación de los potenciales redox (Fang H *et al.*, 2014).

Por ejemplo, un estudio *in vitro* sugiere que la proliferación y migración de células endoteliales humanas fueron inhibidas por NLP, lo que sugiere una angiogénesis atenuada en el microambiente tumoral (Mahapatra S, *et al.*, 2012). Además, extractos de *Neem* muestran citotoxicidad selectiva hacia las células cancerosas en comparación con las células normales, lo que tiene importancia en la reducción de la toxicidad durante la terapia del cáncer (Ricci F, *et al.*, 2008 y Kikuchi T, *et al.*, 2011). Extractos de *Neem* se preparan usando una variedad de diferentes disolventes incluyendo éter, acetato de etilo y alcohol, por lo que el espectro de componentes bioactivos presentes y su porcentaje

varían dependiendo del proceso de extracción. Esta variación puede afectar los resultados obtenidos, la interpretación de los datos y las comparaciones a través de múltiples estudios que utilizan extracto de *Neem*. La mayoría de los investigadores utilizan una mezcla del disolvente extraído de *Neem* en conjunto con sus componentes para estudiar los efectos sobre el cáncer, pero el funcionamiento de sus componentes no ha sido totalmente entendido. Pocos componentes bioactivos han sido ampliamente estudiados, que incluyen azadiractina y nimbolide. La azadiractina es un metabolito secundario del *Neem* y se concentra principalmente en las semillas (Veitch G,E, *et al.*, 2008 y Morgan, ED, 2009). Debido a la complejidad de su estructura, la primera síntesis de la azadiractina no se llevó a cabo hasta 22 años después de su descubrimiento (Morgan, ED, 2009). Nimbolide fue aislado por primera vez de las hojas y flores de *Neem*, pero más tarde se encontró también en otras partes del árbol (Bodduluru, LN, *et al.*, 2014).

La comprensión de los efectos de los componentes individuales facilitará el desarrollo de terapias que implican solo un agente o los regímenes de tratamiento en conjunto.

En el cáncer de próstata se ha reportado que el extracto de *Neem* reduce la proliferación e induce la apoptosis a través de la estimulación de células mononucleares de sangre periférica, mediante la regulación de ciclinas que llevan a la célula a un estado quiescente (Bose & Baral, 2007). Los tratamientos con extracto de *Neem*, han tenido resultados muy favorables.

Específicamente en el desbalance del metabolismo oxido-reducción, en células tumorales de estómago, produciendo una regulación positiva que reduce las especies reactivas de oxígeno aumentando los niveles de glutatión (Fang, H., *et al.*, 2014).

Los efectos antitumorales del extracto del *Neem* en relación con la proliferación celular, angiogénesis y apoptosis se han estudiado en líneas celulares de cáncer de mama como MDA-MB-231 (Arunkumar A *et al.*, 2014).

Línea celular MDA-MB 231

Las líneas celulares de cáncer han sido de gran importancia para la investigación desde hace décadas, siendo utilizadas como excelentes modelos experimentales con el fin de entender los mecanismos moleculares subyacentes al desarrollo y progresión del cáncer, así como para mejorar la eficacia de diferentes terapias, antes de su uso en humanos.

Dentro de las líneas celulares de cáncer de mama empleadas experimentalmente para ensayos *in vitro*, existe una amplia variedad, que se encuentran catalogadas y disponibles comercialmente en la American Type Culture Collection (www.atcc.org). Dichas líneas han sido establecidas procedentes de adenocarcinomas (MDA-MB 231, MDA-MB-361, MCF-7, etc.) de tumores epiteliales (HMT-3522 S1, HMT-3522 S2, HMT-3522 T4-2 etc.) o transformadas (fR2, fR5, SVCT, SVCT-MI2, etc.).

Las células MDA-MB 231, han sido de las primeras células de cáncer de mama humano en ser permanentemente mantenidas en cultivo celular. La amplia distribución de la línea celular en laboratorios de todo el mundo, han conllevado al desarrollo de variedades aparentes de células MDA-MB-231, ya que se observan diferentes características entre células mantenidas en distintos laboratorios. Esta línea celular es una de las que más se ha utilizado para llevar a cabo estudios experimentales de cáncer de mama. Una de las características de la línea MDA-MB 231 es que expresa altos niveles de una mutante de la proteína p53, que funciona como un factor tumorigénico, y que además estabiliza la actividad de la fosfolipasa D, lo cual provee a la célula de señales de sobrevivencia cuando son mantenidas en ausencia de factores de crecimiento contenidos en el suero (Hui L, *et al.*, 2006).

La línea celular MDA-MB 231 fue obtenida de una mujer de raza blanca que sufría adenocarcinoma de mama metastásico, y se obtuvo por efusión pleural en 1973 en el Centro de Cáncer D. Anderson. Las células poseen una morfología tipo epitelial, aparentan un fenotipo de un huso, es decir, una región central redonda y voluminosa, sus extremos son delgados y alargados. En condiciones *in vitro*, las células MDA-MB 231 muestran una alta capacidad invasiva. Desde entonces ha sido un modelo de sistema importante para el

estudio del cáncer de mama, ya que representa los últimos estadios de la enfermedad, presentando como características, la no expresión de los receptores a estrógenos (ER), progesterona (PR) y ERB-2, de ahí que se le considere la línea celular triple negativo por excelencia.

Antecedentes Específicos

El cáncer de mama es una enfermedad que se mantiene latente por un período largo. En esa etapa, el sistema inmune puede inhibir el desarrollo de las células neoplásicas o aceptarlas como “propias”. Por otra parte, esas células durante su crecimiento exhiben gran variabilidad antigénica, característica que no favorece una respuesta inmunológica determinada y muchos tumores escapan a los mecanismos de protección del sistema inmunológico (De Visser, *et al.*, 2006).

El sistema inmune consiste en una red compleja de células y moléculas que interactúan entre sí para iniciar el sistema de defensa del huésped. Muchas de estas interacciones involucran a estructuras de carbohidratos y proteínas que permiten un reconocimiento específico (Jones J y Dang J, 2006).

De esta forma, se establece la sinapsis inmunológica entre el linfocito y la célula presentadora de antígeno. Las principales moléculas que están implicadas en este fenómeno de reconocimiento son el CD4, CD8, CD2, CD3, CD45 y CD28, y sus respectivos ligandos. Todas estas moléculas de adhesión también juegan un importante papel en la transducción de señales y activación de la célula T (Nemec M 2001).

El término proteína deriva del griego "*proteos*" (lo primero, lo principal) y habla de su gran importancia para los seres vivos. La importancia de las proteínas es, en un primer análisis, cuantitativa: constituyen el 50% del peso seco de la célula (15% del peso total) por lo que representan la categoría de biomoléculas más abundante después del agua.

Sin embargo, su gran importancia biológica no reside en su abundancia en la materia viva, sino en el elevado número de funciones biológicas que desempeñan, su versatilidad funcional y sobre todo en la particular relación que las une con los ácidos nucleicos (Murzin A, *et al.*, 1995).

Las proteínas son las macromoléculas más versátiles que existen en la materia viva: desempeñan un elevado número de funciones biológicas diferentes. Cada proteína está especializada en llevar a cabo una determinada función.

Entre las funciones de las proteínas cabe destacar las siguientes: catalíticas, estructurales, de transporte, nutrientes y de reserva, contráctiles o motiles, de defensa y reguladoras del metabolismo (Murzin A, *et al.*, 1995).

Además de mantener la homeostasis celular, las proteínas en condiciones fisiológicas y de estrés son potentes inductores de la inmunidad y se han aprovechado como adyuvantes de vacunas dirigidas al cáncer e infecciones. Son un grupo de moléculas ubicuas que funcionan como chaperonas moleculares en numerosos procesos, como la proliferación, plegamiento de proteínas, transporte, pueden inducirse en condiciones de estrés como la fiebre y la radiación. Son potentes inductores de la inmunidad innata y específica de antígeno. Activan células dendríticas, NK, aumentan la eficiencia para la presentación de antígeno a las células efectoras, estimulan a las células T y la respuesta humoral. Sus papeles en múltiples vías de defensa contra el huésped están siendo explotados en el desarrollo de vacunas contra el cáncer y enfermedades infecciosas (Segeal BH *et al.*, 2006)

Debido a la participación de las proteínas como potentes inductores de la inmunidad y las propiedades del extracto acuoso de hoja de *Neem* en cáncer mencionadas con anterioridad se realizará una investigación de las fracciones proteicas de dicho extracto. Sustentado en los siguientes estudios:

En un modelo murino, se reportó una reducción de los efectos citotóxicos de la respuesta inmune mediante el empleo del extracto acuoso del *Neem*, en este ensayo se observaron los siguientes efectos: primero, se restringe la proliferación e induce la apoptosis a través de la estimulación de células mononucleares de sangre periférica; segundo, favorece la respuesta inmune activa, aumentando la expresión de CD40 y de linfocitos CD56, esta regulación positiva estimula a los macrófagos para liberar interleucinas como, IL-12, IL-2; y tercero el aumento en la expresión de la IL-2 conduce a la activación de células asesinas naturales (NK), diferenciación de linfocitos T, y la secreción

de citocinas como interferón gama (INF- γ) que conduce a la activación de macrófagos y factor de necrosis tumoral (TNF- α). Todo lo anterior favorece una respuesta inmune eficaz, desencadenada por el tratamiento con el extracto acuoso de *Neem* (Bose & Baral, 2007).

Los ensayos anteriores han permitido identificar los efectos de manera preliminar. Sin embargo, aún se desconoce el mecanismo de funcionamiento del factor o factores producidos por el *Neem*. La preparación acuosa de hojas de *Neem* (NLP por sus siglas en inglés “aqueous preparation from neem leaf”), es un extracto no tóxico e inmunoestimulador (Haque, *et al.*, 2006). Adicionalmente se ha identificado funciones inmunoproliféricas; que impiden el crecimiento del carcinoma y melanoma murino B16 de Ehrlich (Baral R & Chattopadhyay U, 2004). El NLP actúa como un adyuvante mediante la inducción de una inmunidad antitumoral contra el melanoma murino B16 (Baral R, *et al.*, 2005) y el tumor de mama antígeno asociado (Mandal-Ghosh, *et al.*, 2007). Además, la activación inmune mediada NLP protege a los ratones de leucopenia, causados por la quimioterapia del cáncer (Ghosh D *et al.*, 2009; Ghosh D, *et al.*, 2006). Esta respuesta puede estar asociada con la generación de la respuesta inmune tipo 1, como se evidencia por el aumento de la liberación de IFN, TNF α (Bose A & Baral R, 2007) y la IL-12 (Bose A & Baral R, 2007). Estos trabajos se encuentran resumidos en el **Cuadro 2**.

Nuestro grupo de investigación evaluó la respuesta inmunológica inducida por la inmunización en ratones *Balb/c* con extracto acuoso completo de *Neem*. Se inmunizaron ratones en el día 0 y 7 con 125 y 250 μ g de extracto acuoso. Se obtuvieron los linfocitos por medio de compresión del bazo a los tiempos 0, 7, 15 y 30 días posteriores a la inmunización. Los linfocitos se cultivaron en una caja de cultivo de 96 pozos con medio RPMI 1640, utilizando Concanavalina A (Con A) como control positivo ya que es conocido como un estimulador de los linfocitos y extracto de *Neem* como adyuvante a concentraciones de 7.5 y 12.5 μ g.

La proliferación celular se determinó por la reducción de azul de tetrazolio a formazán con un Kit MTT de Promega. Las proteínas del extracto acuoso indujeron una respuesta inmunológica celular y humoral, demostrada por los elevados niveles de

proliferación y de anticuerpos, lo que indica que contiene un epítotope T y un epítotope B. Por tal motivo, el extracto puede ser utilizado, como inmunomodulador en células de pacientes con algún tipo de inmunodeficiencia (Díaz Orea, *et al.* 2010).

Cuadro 2. Trabajos realizados con el extracto acuoso del Neem

Autor y Año	Estudio	Observaciones
Baral R <i>et al.</i>, 2004	Inmunización de ratones hembra C57BL16 con NLP. Tx de líneas celular MCF-7 y melanoma B16	La vacunación con NLP previene de manera eficiente el crecimiento de células B16 y activa la generación de anticuerpos IgG.
Haque E, Baral R., 2006	Inmunización de ratones Swiss femeninos y líneas celulares	Observaron un aumento en células T, TNF α , INF γ . Regulación de la citotoxicidad tumoral.
Beuth J <i>et al.</i>, 2006	Medición de los efectos inmonomoduladores y antimetastásicos del extracto acuoso del Neem (Fracciones) en ratones Balb/c	Observaron efectos inmunoestimulatorios, incremento en los linfocitos en sangre periférica (T cooperador y T supresor) Disminución de metástasis después del Tx.
Ishita Mandal-Ghosh <i>et al.</i>, 2007	Inmunización de ratones Balb/c y ratas Sprague Dawley con BTAA, NLP, y BTAA+NLP	Inducción de una respuesta Th1 y mostrando que no es citotóxico
Arunkumar A <i>et al.</i>, 2014	Tx de Líneas celulares MDA-231 y MCF-7	Inhibición de la progresión tumoral, regulación de NF κ B

Cuadro 2. Se muestra de manera resumida algunas de las investigaciones realizadas con el extracto acuoso del *Neem* en donde se observan efectos positivos en la inmomodulación, restricción en la proliferación celular de tumores y disminución en metástasis en modelos animales y líneas celulares de cáncer.

Justificación

Debido a que el cáncer de mama es una de las neoplasias con mayor incidencia entre las mujeres y la segunda causa de muerte a nivel mundial, se han desarrollado investigaciones en forma paralela para la búsqueda de nuevas opciones terapéuticas, que disminuyan el costo de las existentes y sus efectos secundarios sean menores, por lo que el estudio en plantas medicinales ofrecen un favorable remedio o control en la progresión del cáncer.

En los últimos años se ha estudiado el tratamiento del cáncer con inmunoterapias de extractos naturales provenientes del *Neem*, encontrando propiedades anticancerígenas con un efecto favorable en la terapia quimiopreventiva y en investigaciones preclínicas controlando la progresión del tumor y mejorando la respuesta inmunológica. A la fecha no existe un total entendimiento sobre los principios activos presentes en el extracto acuoso de hoja de *Neem* responsable de esta respuesta inmune antitumoral. En el presente trabajo planteamos estudiar las propiedades inmunogénicas de las proteínas del extracto acuso de *Azadirachta indica* con la finalidad de identificar un potencial adyuvante para la terapia del cáncer de mama. Es decir, un agente inmunomodulador que active el sistema inmunológico en combinación con el tratamiento anticancerígeno para eliminar un mayor número de células tumorales mejorando la prognosis de pacientes con este padecimiento.

Planteamiento del Problema

El cáncer de mama en México representa una de las primeras causas de muerte entre mujeres adultas, con una incidencia del 30.9% entre las mujeres mayores a 20 años, aunque la terapéutica empleada como la radioterapia y la quimioterapia son los tratamientos más eficaces para erradicar el cáncer, no sólo ataca a células tumorales, sino también a células normales de todo el organismo ocasionando una respuesta inmunológica inadecuada, por lo que en estos años se han desarrollado investigaciones relacionadas con la inmunoterapia que ayudan a disminuir el crecimiento tumoral y mejoran la calidad de vida del paciente, activando su respuesta inmunológica.

El extracto del *Neem* posee propiedades anticancerígenas estimulando las células del sistema inmunológico. Por tal motivo, se evaluarán las diferentes proteínas que se encuentran en el extracto acuoso para correlacionar con una respuesta Th1 necesaria para eliminar células malignas, por lo que se planteó la siguiente pregunta:

¿Qué efecto ejercen las fracciones proteicas obtenidas del extracto acuoso de *Azadirachta indica* en los linfocitos de sujetos normales y líneas tumorales de cáncer de mama?

Hipótesis Científica

Las fracciones proteicas del extracto acuso de *Azadirachata indica* estimulan la proliferación y activación de los linfocitos de sujetos normales e inducen apoptosis en la línea tumoral de cáncer de mama.

Objetivos

Objetivo General

- Estudiar el efecto de las fracciones proteicas obtenidas del extracto acuoso de *A. indica* en linfocitos de sujetos normales y en la línea tumoral de cáncer de mama.

Objetivos Particulares

- Purificar las fracciones proteicas presentes en el extracto acuoso del *Neem*.
- Evaluar el efecto de las fracciones proteicas en linfocitos de sujetos normales.
- Evaluar el efecto de las fracciones proteicas en la línea tumoral de cáncer de mama.

Material y métodos

Diseño del estudio

Taxonomía de Feinstein	
Por el Objetivo	Comparativo
Por la maniobra	Experimental
Por la temporalidad	Transversal
Por la recolección de datos	Prolectivo
Por la composición de grupos	Heterodémico

Ubicación espacio-temporal.

El trabajo de investigación se realizó durante el periodo de tiempo comprendido de 2014 a 2016, en el laboratorio de investigación de inmunología experimental de la Facultad de Medicina en la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, en el Centro de Investigación Biomédica de Oriente del IMSS y en el Hospital Universitario de Puebla.

Estrategia de trabajo

1. Se recolectaron las hojas del árbol del *Neem*.
2. Se preparó el extracto acuoso con 1 gramo de hojas en 10ml de PBS
3. Se realizó la determinación de proteínas y una electroforesis con el extracto completo.
4. Se separaron las fracciones proteicas por tamaño a través de una columna de exclusión.
5. Se midió la absorbancia de cada fracción recolectada en un espectrofotómetro ultravioleta/visible (Nano Drop 2000).
6. Se juntaron los volúmenes correspondientes al patrón generado de cada fracción de acuerdo a los resultados obtenidos en la gráfica de absorbancia.
7. Se determinó la concentración proteica a cada fracción.
8. Se cultivaron los linfocitos (obtenidos de paquetes residuales de donación de sangre del Hospital Universitario de Puebla) y las líneas celulares (Donadas por el CIBIOR).
9. Se inició la interacción en linfocitos y líneas celulares (las cuales serán trabajadas en el CIBIOR) a diferentes concentraciones con las fracciones proteicas obtenidas.
10. Se determinó el índice de proliferación y perfil de citocinas en linfocitos y la proliferación en la línea celular.

Muestreo

Definición de la población

Para las células del grupo 1, el Hospital Universitario de Puebla nos donó los paquetes sanguíneos residuales de donadores que reunieron los requisitos del banco de sangre, entendiendo por paquete residual que ya no son necesarios para el paciente, quedando en el residual, células linfocitarias, entre otras en óptimas condiciones, para realizar los cultivos celulares primarios.

El grupo 2 está conformado por la línea celular de cáncer de mama MDA-MB-231. La cuál representa de los estadios más avanzados de cáncer de mama, es una línea altamente invasiva, triple negativo (no presenta los receptores ER, PR y ERB-2).

Grupo 1

Criterios de inclusión

- Paquetes residuales sanguíneos de Mujeres aparentemente sanas.
- Que cumplan con los requisitos de donación sanguínea

Criterios de eliminación

- Alguna alteración del paquete globular.

Grupo 2

Criterios de Selección de la población

La selección de la población se hará de acuerdo a los siguientes criterios

Criterios de inclusión

- El cultivo celular tiene que tener una confluencia adecuada para iniciar el plaqueo.
- Morfología celular debe de ser la adecuada de acuerdo a las características de la línea celular.

Criterios de exclusión

- Que el crecimiento celular no sea correcto.

Criterios de eliminación

- Que en el proceso de tratamiento se despeguen las células
- Contaminación de cultivos.

Tamaño de la muestra

- El tamaño de la muestra será de 30 pacientes obtenido al comparar dos proporciones con un alfa= 0.05 y beta= 0.10.

Variables

Variables	Clasificación	Escala	Definición Conceptual	Definición Operacional
Índice de Proliferación de Linfocitos	Dependiente	Dimensional continua	Células linfáticas del sistema inmunológico	Determinación de D.O.
Proteínas del Extracto acuoso	Independiente	Numérica	Moléculas formadas por cadenas lineales de aminoácidos	Separación por peso molecular kDa
Concentración de IL-2, IL-4.	Dependiente	Dimensional Continua	Proteínas que regulan funciones del sist. inmune	Absorbancia
Índice de Proliferación Líneas celulares MDA-MB-231	Dependiente	Dimensional continua	Modelo experimental	Determinación de D.O.

Técnicas y Procedimientos

Preparación del extracto acuoso

Se preparó el extracto acuoso a partir de 1 gramo las hojas del *Neem* con 10 ml de PBS pH 7.3 con un homogeneizador Douncen a partir del cual se obtuvo un volumen aproximado de 11 ml de extracto acuoso de hoja del *Neem* (Anexo 2).

Electroforesis

Se determinó el perfil de proteínas presentes por electroforesis en geles de Poliacrilamida con SDS, al 10%. Con una concentración de la muestra del extracto de 7.5 mg/ml para el corrimiento, en una dilución 1:2 con el buffer de carga, colocando en cada pozo un volumen de 25µl (Anexo 3).

Cromatografía de exclusión

Esta técnica se usó para la separación de proteínas, utilizando como resina Sephadex G-200, para la realización de la columna se utilizaron 2 g. de Shephadex G-200 hidratados en 20 ml para llenar una columna con una capacidad de 30 ml. Para la realización de la cromatografía se utilizó 1ml del extracto recolectado en 60 tubos de 1ml. (Anexo 4).

Determinación de proteínas Nano Drop 2000

Espectrofotómetro para la cuantificación de proteínas. Se utilizaron 10µl de cada muestra para la lectura. (Anexo 5).

Separación de linfocitos por gradiente de densidad 1.077 (linfopred) (Anexo 6)

Se utilizaron 5ml del paquete globular diluido en 5ml de Solución Salina, se homogenizo y se agregó 2.5ml de linfopred, se centrifugo 20 min a 2500 rpm para la obtención del anillo de linfocitos.

Cultivo celular de linfocitos

Se ajustó la población de linfocitos a 1×10^6 células por mililitro, para sembrar 100 mil células en 200µl por pozo en cajas de 96 pozos (Anexo 7).

Cultivo celular de líneas tumorales

El modelo celular que se utilizo es la Línea MDA-MB-231 esquematiza uno de los estadios más avanzados de cáncer de mama (Anexo 8)

Evaluación de la viabilidad celular

Se mide la actividad mitocondrial por la conversión de (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide) (MTT colocando 37µl de la solución stock por pozo) en cristales de formazano, se disolvieron con 70 µl de DMSO. A continuación la coloración desarrollada se midió en un lector de ELISA a 570nm (Anexo 9)

Determinación de citocinas por ELISA

A partir de la recolección al tercer día del sobrenadante del cultivo de los linfocitos se realizó la prueba de ELISA siguiendo las indicaciones del proveedor (eBioscience) Human IL-2 ELISA Ready-SET-Go #88-7025 y Human IL-4 ELISA Ready-SET-Go #88-7046 (Anexo 10).

Evaluación de proliferación celular por citometría de flujo

Medición de la tinción celular con CFSE por citometría de flujo. Se mantuvo el cultivo celular de linfocitos humanos durante cinco días, al cual antes de ser sembradas las células se le adicionó el 1 µl de CFSE por cada mililitro, para la tinción de las células durante 20 minutos a temperatura ambiente, posterior a los 7 días se recolectaron las células para su lectura en el citómetro de flujo. (Anexo 11)

Análisis de los datos

- Se realizó un análisis de las variables dependiendo de ello se usó un análisis paramétrico o no paramétrico.
- Paramétrico t de student para grupos independientes y ANOVA para la diferencia entre los grupos.
- No Paramétrico: U de Mann Whitney y comparación de Dunns.
- Se utilizó para la estadística el programa GrandPrims

Logística

Recursos Humanos

- Alumna que realizó el proyecto Miriam Fernández Gallardo.
- Directora del proyecto: D.C. Ma. Alicia Díaz y Orea.

- Co-Directoradas: D.C. Lilian Karem Flores Mendoza, D.C. Maricruz Anaya Ruiz.
- Químicos del Hospital Universitario encargados de obtener las muestras de Sangre.
- Estudiantes de pregrado.

Recursos materiales

- Instalaciones del Laboratorio de Inmunología experimental de la Benemérita. Universidad Autónoma de Puebla, CIBIOR.
- Material bibliográfico recopilado.
- Papelería, computadora, impresora, Paquete para análisis estadístico.

Recursos Financieros

- Recursos e Instalaciones del laboratorio de Inmunología Experimental de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.
- CIBIOR
- Apoyo de Posgrado
- VIEP
- Beca CONACyT.

Bioética

En esta investigación se obtuvieron 30 muestras de paquetes globulares residuales de personas aparentemente sanas que acuden al procedimiento de donación de sangre, por lo que es considerado un riesgo mínimo de acuerdo a la Ley General de Salud en su artículo 17, fracción II especificando lo siguiente: en cuanto a estudios prospectivos y extracción de sangre por punción venosa, en adultos en buen estado de salud, con frecuencia máxima de dos veces a la semana y volumen máximo de 450 ml en dos meses.

El único dato utilizado para la investigación fue el género del paciente, del cual provino el paquete globular.

La toma de muestra se realizó por el personal experto del hospital Universitario de Puebla.

Este trabajo está apegado a las pautas éticas Internacionales para la Investigación y Experimentación Biomédica en Seres Humanos. ISBN 92 9036 056 9. Consejo de Organizaciones Internacionales de las Ciencias Médicas (CIOMS), 1993, Ginebra, pp.53-56 y los citados en los artículos 100 en los incisos I al VII y en el artículo 101 de la Ley General de Salud en México.

El presente trabajo se basa en la NORMA oficial Mexicana NOM-007-SSA3-2011, para la organización y funcionamiento de los laboratorios clínicos.

Se basa en los principios básicos de la declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial- Guía de Recomendaciones para los Médicos Biomédica en personas adoptada por la 18 Asamblea Medica Mundial, Helsinki Finlandia. Junio de 1964 y enmendada por la 29 Asamblea Medica Mundial Tokio Japón, Octubre de 1965. La 35 Asamblea Medica Mundial, Hong Kong, Septiembre de 1989.

Los procedimientos se ajustan a las Normas Éticas Institucionales contempladas en la Declaración de Helsinki: Modificación en Brasil, Octubre 2013.

El protocolo está registrado en el comité de ética de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla el día 28 de Septiembre del 2015, N° de libro 2, N° de Hoja 13, N° de registro 377.

Resultados

Se realizó de manera inicial la obtención del extracto a partir de hojas del árbol *Neem* siguiendo las especificaciones presentadas en el Anexo 2. La concentración de proteínas del extracto crudo determinada por medio de espectrofotometría (Nano Drop) fue de 17 mg/ml, realizando una dilución 1:2 para correr el gel de electroforesis. La Figura 4 muestra el perfil proteico del extracto crudo completo, observándose la presencia de proteínas de diferente peso molecular (Carril 2, 3 y 4) que van desde los 15 hasta los 260 kDa (marcador de peso molecular carril 1). La intensidad de las bandas nos permite sugerir que hay una mayor concentración de proteínas con un peso molecular de 40 a 50 kDa.

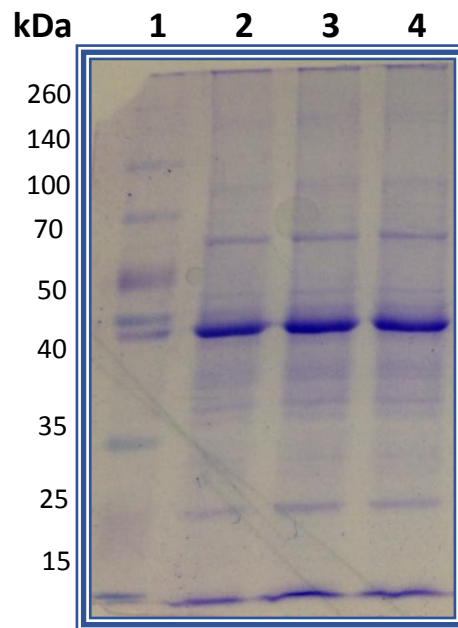


Figura 4. Perfil proteico del Extracto Acuoso de Hoja del Neem. En la imagen podemos observar en el carril 1 el marcador de peso molecular, y en los siguientes carriles (2, 3 y 4) se encuentra el corrimiento del extracto completo, observando que encontramos proteínas con diferentes pesos moleculares que van de los 15 kDa a los 260 kDa.

El primer objetivo fue la obtención de fracciones proteicas en función de su peso molecular empleando una cromatografía de exclusión con Sephadex G-200. Se obtuvieron 60 tubos del fraccionamiento proteico con un volumen de 1 ml cada uno de ellos. Se tomó una alícuota de cada uno de estos tubos y se procedió a medir la absorbancia a 280 nm,

los resultados se muestran en la Figura 5. Se realizó el agrupamiento de los tubos a partir de los diferentes picos observados en la gráfica para obtener 7 diferentes fracciones proteicas, de las cuales se realizó la electroforesis pero no se observaron bandas debido a que estaban muy diluidas las fracciones.

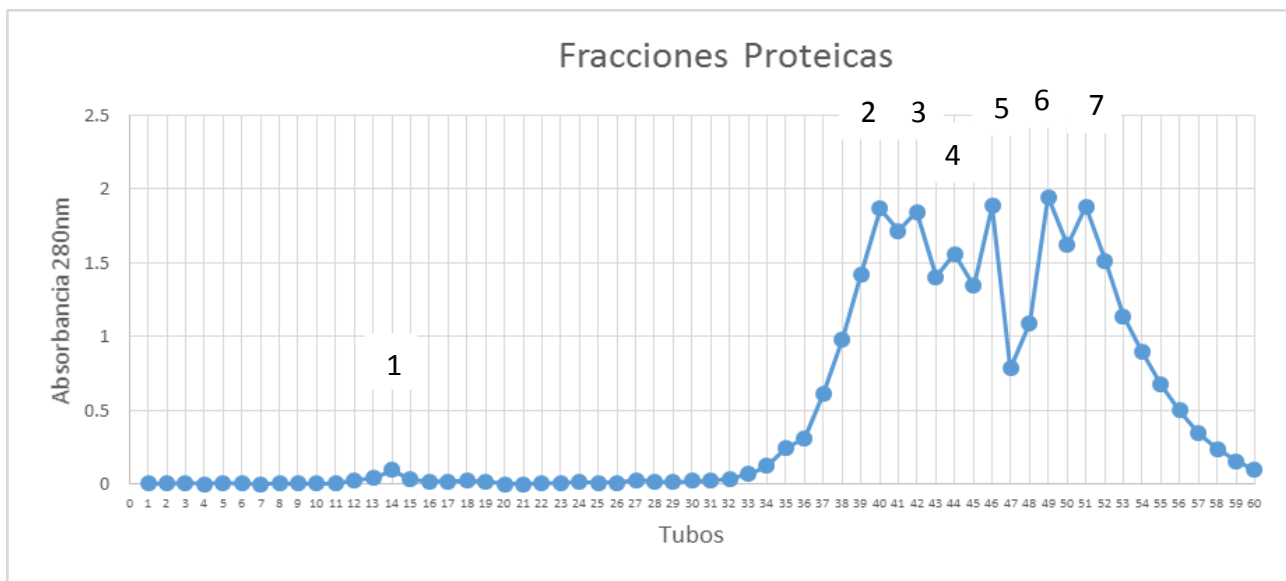


Figura 5. Grafica de absorbanza del fraccionamiento proteico del Extracto Acuoso de Hoja de *Neem*. La grafica indica que tenemos diferentes fracciones obtenidas a partir del extracto completo siendo las primeras que se observa a partir del número 12 al 16 que es la de mayor peso molecular y así sucesivamente hasta completar la revisión de los 60 puntos.

Evaluación indirecta de la apoptosis de linfocitos por MTT

Una vez obtenidas las diferentes fracciones proteicas del extracto crudo, se evaluó su efecto apoptótico en linfocitos de humano mediante el ensayo de MTT.

La Figura 6 muestra que las diferentes fracciones proteicas estimulan de manera significativa la proliferación de los linfocitos, ya que la media de las fracciones proteicas se encuentra por arriba de la condición control, incluso se observa que el efecto de estas fracciones es mayor a la registrada en la condición de Con A, compuesto conocido que estimula de los linfocitos.

Efecto de las fracciones en linfocitos

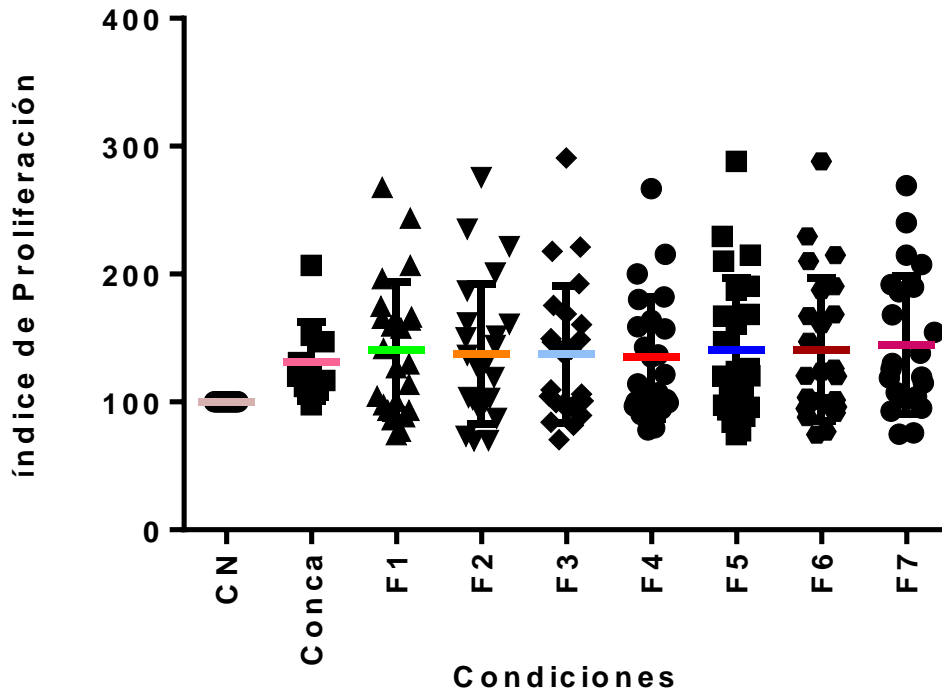


Figura 6. Gráfica de índice de proliferación, en la cual se reporta el efecto de las diferentes fracciones obtenidas del extracto acuoso de *Neem* en muestras de 30 sujetos, las fracciones fueron adicionadas a una concentración de 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, durante 7 días. Observando que las fracciones proteicas inducen un efecto positivo sobre la proliferación. Los valores obtenidos presentan una $p < 0.05$.

Evaluación de la proliferación de linfocitos por citometría de flujo.

De manera complementaria al ensayo de MTT, se realizó el análisis de proliferación celular por citometría de flujo, para comprobar la especificidad del efecto de las fracciones proteicas sobre la proliferación de los linfocitos. De manera representativa se presentan los resultados gráficos obtenidos de la condición control y de la fracción 1, el resto de los resultados gráficos obtenidos de las demás fracciones se muestran en el Anexo 12.

Lo que se observa en la primera fotografía de la Figura 7 son las células en condición control, es decir, sin estímulo, los linfocitos están representados con el color

morado, en donde el eje x representa el tamaño de la muestra y el eje y la complejidad de las células. La gráfica del lado derecho representa la concentración de coloración del compuesto CFSE, el cual al irse dividiendo las células disminuirá su concentración, por lo que en las células sin estímulo observamos que no existe proliferación. En la fotografía de microscopía en campo claro observamos que las células son pequeñas (Figura 7). A diferencia de lo observado en la Figura 7, la primera gráfica de la Figura 8 donde los linfocitos fueron estimulados con la fracción proteica 1, se observan linfocitos de un mayor tamaño y representados en color verde, en la gráfica de la derecha se muestra que la concentración del CFSE va disminuyendo, lo que nos indica que existe una división celular, por lo tanto un aumento en su tasa proliferativa, resultado que se ve comprobado con la imagen de la microscopia, en donde es común observar acúmulos de linfocitos.

Células sin estímulo

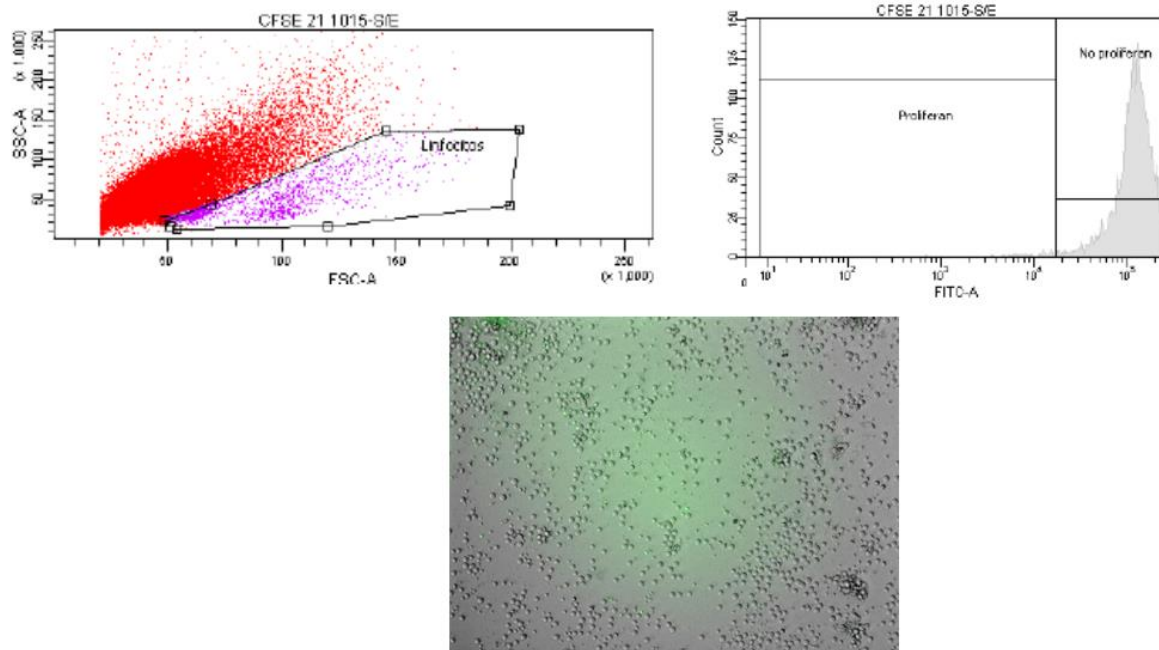


Figura 7. Células sin estímulo. Se mantuvo el cultivo celular de linfocitos humanos durante cinco días, al cual antes de ser sembradas las células se le adicionó el 1 μ l de CFSE por mililitro, para la tinción de las células durante 20 minutos a temperatura ambiente, posterior a los 5 días se recolectaron las células para su lectura en el citómetro de flujo.

Células con la Fracción 1

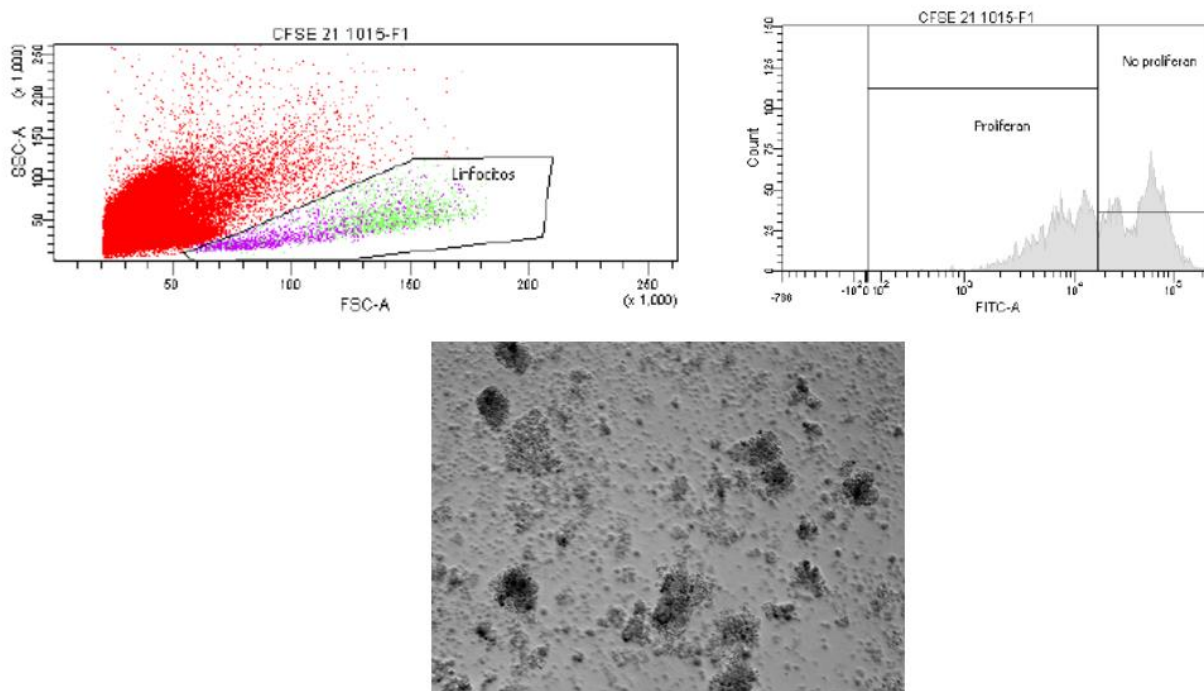


Figura 8. Fracción 1. Al igual que a las células sin estímulo, se tiñeron con CFSE los linfocitos, una vez sembrados se les adiciono 10 μ g de la fracción 1 posterior a las 7 días se recolectaron las células y se evaluó su proliferación.

Respuesta inmunológica activada por las fracciones proteicas

Las fracciones proteicas del extracto crudo de *Neem* activan a los linfocitos. Por lo que era importante conocer el tipo de respuesta inmunológica que está participando, la Th1 o la Th2. Para resolver este cuestionamiento, se decidió evaluar el efecto de las fracciones proteicas sobre los niveles de producción de IL-2 e IL-4 en los linfocitos. La IL-2 es considerada un indicador de la respuesta Th1, mientras que IL-4 lo es para la respuesta Th2.

Los resultados de la ELISA para IL-2 se presentan en la **Cuadro 3**. Las 7 fracciones proteicas inducen una clara tendencia al alza en la secreción de IL-2, solo presentando un diferencia estadísticamente significativa la F1 con respecto al control. El aumento en los niveles de IL-2 sugiere la probable participación de una respuesta celular, es decir, Th1.

Cuadro 3. ELISA IL-2

Condiciones	Media	Max	Mínimo	SD	P
CN	12.77	14.22	11.9	0.8	
F1	16.11	46.15	12.19	11.75	0.03*
F2	15.53	44.7	12.77	12.16	0.07
F3	14.22	33.96	12.48	7.4	0.06
F4	12.85	36.86	11.9	7.8	0.14
F5	14.37	36.57	12.9	8.6	0.11
F6	13.93	30.76	11.9	6.3	0.17
F7	13.35	28.15	11.9	5.2	0.2

Cuadro 3. ELISA IL-2. La ELISA se realizó a partir de la recolección de 150 µl del sobrenadante al tercer día del cultivo celular de los linfocitos, los sobrenadantes se mantuvieron en congelación hasta completar las 30 muestras, encontrando una $p < 0.05$ en la fracción 1.

Por su parte, los resultados obtenidos del ELISA para IL-4 se muestran en el cuadro 4. Las fracciones, inducen de manera significativa un aumento en los niveles de secreción de IL-4 con respecto a la condición control, lo que indica claramente la participación de una respuesta Th2. Considerando los resultados de los dos ensayos de ELISA, se puede decir que las fracciones proteicas del extracto crudo inducen en mayor medida la participación de linfocitos CD8+ que los linfocitos CD4+, existiendo una coordinación de las dos respuestas tanto Th1 como Th2 con la Fracción 1 y participando una respuesta Th2 con las demás fracciones.

Cuadro 4. ELISA IL-4

Condiciones	Media	Max	Minimo	SD	p
CN	43.85	49.4	38.1	5.54	
F1	153.2	169.4	40.32	36.57	0.006*
F2	159.2	185.5	38.31	44.78	0.004*
F3	163.3	181.5	149.2	9.2	0.001*
F4	161.3	173.4	40.32	40.47	0.001*
F5	155.2	165.3	38.31	42.05	0.003*
F6	153.2	165.3	38.31	36.14	0.005*
F7	157.3	169.4	40.32	37.54	0.009*

Cuadro 4. ELISA IL-4. La ELISA se realizó a partir de la recolección de 150 µl del sobrenadante al tercer día del cultivo celular de los linfocitos manteniendo en congelación los sobrenadantes hasta completar las 30 muestras, encontrando una $p < 0.05^*$.

Efecto del extracto acuoso de hoja de Neem sobre la viabilidad en células de cáncer de mama

El tercer objetivo a resolver de nuestro trabajo de tesis fue evaluar el efecto de las fracciones proteicas del extracto crudo sobre la viabilidad en una línea tumoral de cáncer de mama, en este caso se utilizó la línea celular MDA-MB-231.

Se realizó de manera inicial la curva dosis-efecto (Figura 9). En el gráfico se observa que a partir de una concentración de 25 y hasta 250 µg/ml existe una disminución en la viabilidad celular, mostrando que el efecto del extracto no depende de la concentración, ya que con todas las concentraciones del extracto evaluadas se observa una reducción en la viabilidad celular de la misma magnitud.

Curva dosis-respuesta Extracto

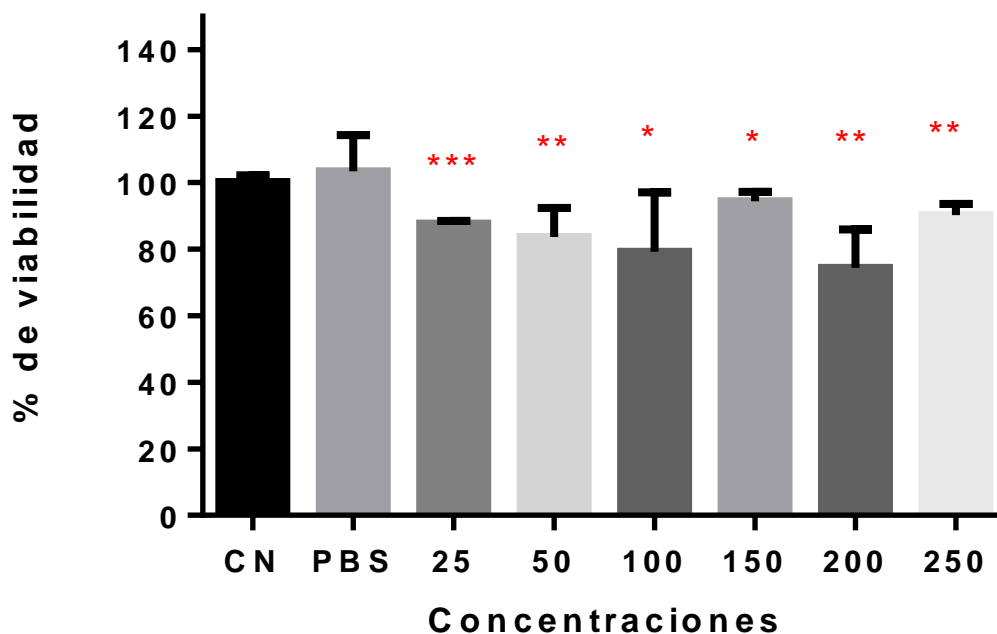


Figura 9. Curva dosis-respuesta del Extracto acuoso de Neem. Se realizó la interacción en las células MDA MB-231 con el extracto completo a diferentes concentraciones (25, 50, 100, 150, 200, 250 $\mu\text{g/ml}$) durante 48 hrs. Posteriormente, se realizó el ensayo de MTT. Los resultados presentan una diferencia significativa con una $p < 0.05$.

Efecto de las fracciones proteicas sobre la viabilidad en las células MDA-MB-231

El extracto acuoso de *Neem* reduce la viabilidad de las células de cáncer de mama MDA-MB-231, por lo que la pregunta era saber si alguna fracción proteica en particular es la responsable de dicho efecto. Debido a que cada fracción presenta una diferente concentración se utilizaron las concentraciones más altas que podía alcanzar cada una de ellas presentada en las figuras 10, 11 y 12. Las fracciones proteicas que tienen una menor concentración de proteínas, tales como la 5, 6 y 7, presentan el mayor efecto inhibitorio sobre la viabilidad celular aproximadamente de un 80%, sin dejar de destacar que todas

las fracciones presentan un mayor efecto disminuyendo un 50% la viabilidad celular en comparación con el extracto completo que la disminuye un 15% la viabilidad celular.

Efecto de F1 y F7 en las Células MDA-MB-231

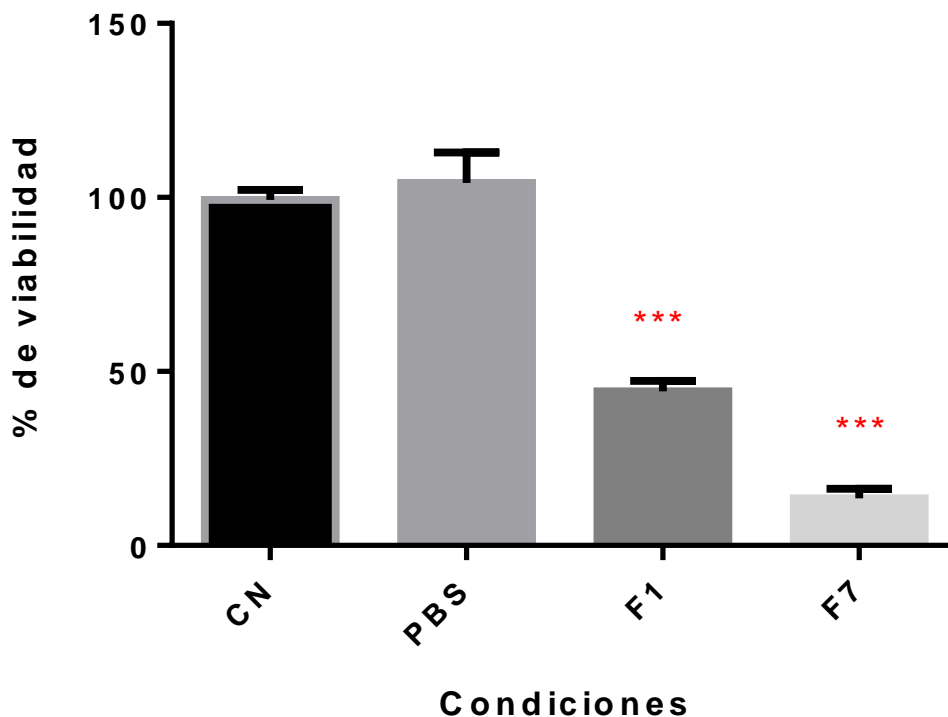


Figura 10. Efecto de la F1 y F7 en las células MDA MB-231. Se realizó la interacción en las células MDA MB-231, Las fracciones utilizadas fueron F1 y F7 5µg/ml durante 48 hrs. Para medir la viabilidad celular se utilizó la técnica de MTT obteniendo como resultado que la fracción F1 disminuye un 56% y la F7 un 84% la viabilidad de las células tumorales. Con una p significativa de 0.0001***.

Efecto de F2, F3 y F4 en las células MDA-MB-231

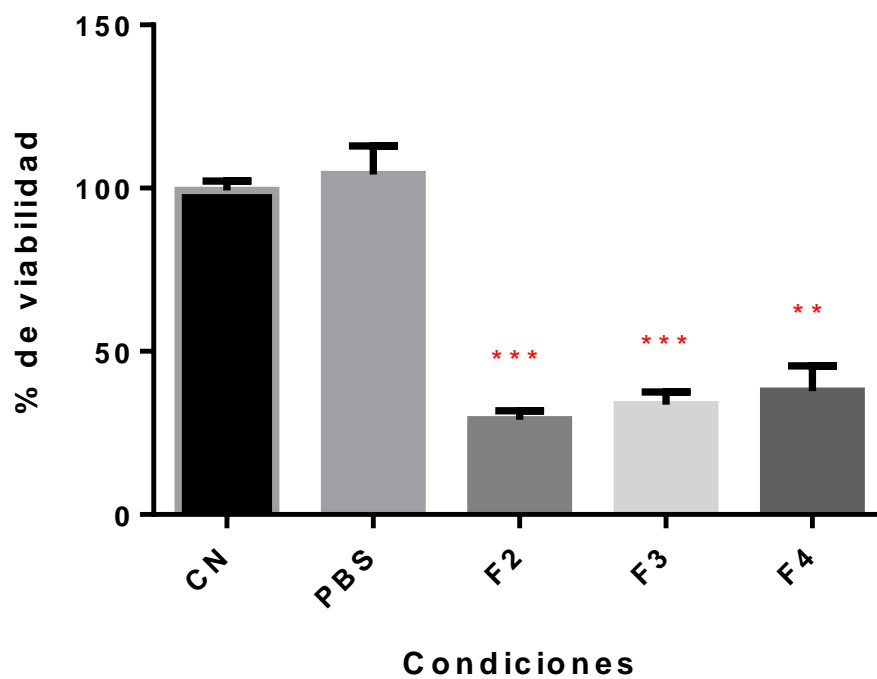


Figura 11. Efecto de F2, F3 y F4 en las células MDA-MB-231. Se realizó la interacción con las fracciones F2, F3 y F4 a una concentración de 36 $\mu\text{g/ml}$ observando que las fracciones F2, F3 y F4 disminuyen un 65% la viabilidad celular. Con una p de 0.0002**.

Efecto de F5 y F6 en las Células MDA-MB-231

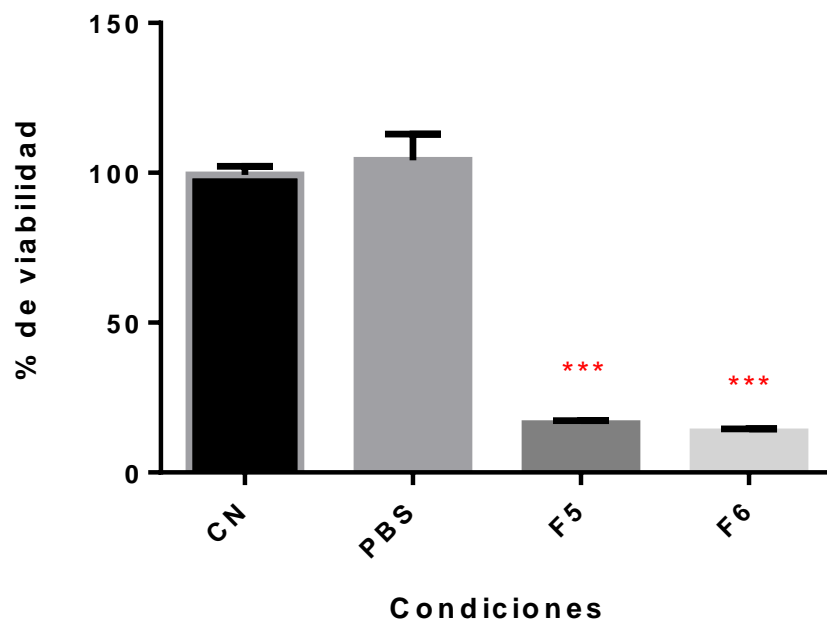


Figura 12. Efecto de F2, F3 y F4 en las células MDA-MB-231. Se realizó la interacción con las fracciones F5 y F6 a una concentración de 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ observando una disminución del 80% en la viabilidad celular. Una p de 0.0001***.

Discusión

La inmunoterapia representa uno de los principales avances en el tratamiento contra el cáncer en los últimos años. Esta estrategia incluye tratamientos diferenciales, donde algunos de ellos estimulan de manera inespecífica al sistema inmunológico, mientras que otros lo hacen de manera específica, todo esto para el reconocimiento de las células tumorales (Mittendorf EA & People GE., 2016).

Debido a que las células tumorales tienen un desarrollo diferente en cada organismo, la inmunoterapia presenta una mayor eficiencia para algunos tipos de cáncer que para otros, por lo que es utilizada solo para algunos de estos tipos de cáncer, ya que en otros presenta mayor eficiencia cuando es utilizada en conjunto con las terapias de elección (Zeichner SB *et al.*, 2015).

El sistema inmune es un conjunto de órganos, células y sustancias especiales, que ayudan a proteger de las infecciones y otras enfermedades al organismo. Las células inmunes y las sustancias que viajan a través del cuerpo, para protegerlo de los gérmenes que causan infecciones, también ayudan a la protección contra la formación y proliferación de células tumorales (Kindt TJ *et al.*, 2007).

El sistema inmune está en constante vigilancia de las sustancias que se encuentran normalmente en el cuerpo. Cualquier sustancia nueva que el sistema inmunológico reconoce como ajeno, genera una activación del sistema para eliminar la sustancia extraña. Por ejemplo, los gérmenes contienen sustancias tales como ciertas proteínas que normalmente no se encuentran en el cuerpo humano. Cuando estas sustancias “extrañas” como las bacterias, virus y células tumorales son reconocidas las elimina (Kindt TJ *et al.*, 2007).

El sistema inmunológico constantemente está eliminando células tumorales, sin embargo existen ocasiones en donde estas células logran evadir este sistema y las células comienzan a perder el control sobre sus funciones y a proliferar de manera incontrolada, ya que el sistema inmunológico no siempre reconoce a las células tumorales como extrañas (Kindt TJ *et al.*, 2007).

“En la actualidad disponemos de fármacos que aumentan la eficacia del sistema inmunológico para eliminar el cáncer, que serían eficientes y fármacos que aumentan el reconocimiento del cáncer por el sistema inmunológico”. Ante este panorama se han realizado diferentes investigaciones con plantas que ayuden a mejorar los tratamientos como es el árbol de *Azadirachta indica*, el cual, es un árbol autóctono de climas tropicales originario de la India (Ganguli S. 2002).

Las diferentes partes de esta planta se ha informado que poseen propiedades medicinales como hipoglucémico, antiséptico, antiinflamatorio y actividades inmunoestimuladoras (Biswas K *et al.*, 2002).

Los extractos acuosos de hojas de *Neem* se conoce que tiene efectos anticancerígenos (Paul R *et al.*, 2011), activando la respuesta inmunológica (Mahapara S *et al.*, 2012), modulando el microambiente tumoral (Mahapara S *et al.*, 2011), e induciendo apoptosis en las células tumorales (Paul R *et al.*, 2011).

Con el objetivo de desarrollar una herramienta inmunoterapéutica que pueda funcionar como adyuvante en conjunto con la terapéutica empleada para el cáncer de mama. La inmunización de cultivos celulares de linfocitos con las fracciones proteicas podría proporcionarnos un nuevo conocimiento para inducir funciones efectoras citotóxicas específicas contra el tumor y mejorar la respuesta inmunológica.

Baral *et al.*, 2004 reportó que el extracto acuoso de hojas del *Neem* presenta características inmunomoduladoras, proliferación de linfocitos y generación de anticuerpos (Diaz Orea *et al.*, 2010) por lo que nos preguntamos si existían proteínas presentes en el extracto acuoso de hoja de *Neem* que estuvieran participando en dichos efectos. El primer objetivo a realizar fue el conocimiento del perfil proteico presente en nuestro extracto encontrando que contiene proteínas que van de los 15 a los 260 KDa, mostrando que contienen diferentes proteínas que pueden estar participando en los efectos inmunomodulatorios.

Debido a que existe una amplia gama de proteínas presentes en el extracto, procedimos a su separación por su peso molecular a través de una columna de exclusión sephadex G-200, obteniendo siete fracciones proteicas con diferentes pesos moleculares.

Una vez obtenidas las fracciones procedimos a la interacción con los cultivos de linfocitos humanos en donde observamos que existe un aumento en la proliferación y activación de los mismos, las moléculas inmunoestimulantes o adyuvantes que ayudan a la presentación del antígeno adecuadamente para activar las diferentes funciones del sistema inmune necesitan la secreción de diversas citocinas ya sea para desarrollar una respuesta Th1 o Th2, por lo que a partir del sobrenadante de los cultivos de linfocitos evaluamos la presencia de IL-2 e IL-4 encontrando que existe un aumento en los niveles de IL-2 y una diferencia significativa con respecto a los niveles de IL-4 en la fracción 1 indicándonos que se puede estar desencadenando una leve respuesta celular y una respuesta humoral en mayor medida, en comparación con las investigaciones en donde utilizan el extracto completo en modelos murinos (Baral, R. & Chattopadhyay, U., 2004), donde se encuentra que no solo hay un aumento en las células inmunitarias circulantes, sino que también en la producción de anticuerpos localizados en el bazo (Bose, A. & Baral, R., 2007).

En concordancia con estas investigaciones y los resultados obtenidos de nuestro grupo de investigación, podemos confirmar que las fracciones están ejerciendo un efecto positivo en la proliferación y activación de los linfocitos. Con respecto a que solo existe un pequeño aumento en la producción de IL-2, convendría realizar la búsqueda de otras interleucinas como el interferón gamma ya que es uno de los principales en la respuesta celular en este trabajo no se pudo realizar debido a que el volumen recolectado del sobrenadante del celular no fue el suficiente para la realización de otra ELISA.

Para evaluar que el extracto acuso pudiera servir como un buen adyuvante, quisimos conocer el efecto producido en la célula tumoral de cáncer de mama, usando como modelo experimental la línea célula MDA-MB- 231, en donde encontramos que las fracciones disminuyen la viabilidad celular en mayor medida que el extracto completo esto puede ser por el componente presente en el extracto conocido como nimbolide (Elumalai *P et al.*, 2012).

El nimbolide es lactona terpenoide derivado del árbol de *Neem* que muestra una variedad de actividades biológicas que incluyen la actividad contra la malaria y el cáncer.

Recientemente también se ha demostrado que nimbolide sensibiliza a las células de cáncer de colon a la apoptosis inducida por TRAIL a través de tres mecanismos distintos: las especies reactivas de oxígeno y de ERK mediada por la regulación de DR5 y DR4, regulación a la baja de las proteínas de supervivencia celular, y la regulación de la pro-apoptóticas proteínas p53 y Bax. Se ha visto que inhibe la proliferación e induce la apoptosis de células de cáncer de mama (Elumalai *et al.*, 2012).

Esta hipótesis está apoyada por trabajos realizados donde se afirmó que la reducción en la proliferación por el extracto de hoja de Neem e inducción de apoptosis en el cáncer de mama (MCF-7 y MDA-MB-231) las líneas celulares cáncer de próstata (Elumalai *et al.*, 2012) y (PC-3) línea celular (Gunadharini *et al.*, 2011). En la investigación de Elumalai P *et al.*, 2012 tuvo como objetivo investigar los mecanismos subyacentes de nimbolide la proliferación y su papel en la apoptosis de ER positivo (MCF-7) y ER-negativo (MDA-MB-231 células de cáncer de mama). En estos estudios observaron que desencadena la vía apoptótica a través del receptor fas-FasL y un aumento en la expresión de la proteína Bcl-2 que activa la vía de las caspasas llevando a la célula a la apoptosis. Suponemos que el efecto observado en la disminución de la viabilidad celular de las fracciones proteicas con respecto al extracto completo es mejor, debido a que al ser pasado por la columna, se eliminan diferentes componentes que pudieran estar saturando al sistema, cuando se utiliza el extracto completo, y que el efecto reportado por las fracciones con una concentración baja en proteínas reduce en mayor medida la viabilidad celular porque permite que el nimbolide al no tener competencia con otras moléculas ejerza mejor su efecto.

Por lo que las fracciones no solo estimulan la proliferación y activación de los linfocitos sino que disminuye la viabilidad de células tumorales por lo que podría ser utilizado como un buen adyuvante para la terapéutica contra el cáncer, teniendo un campo abierto para continuar con las investigaciones para el conocimiento de sus efectos.

Conclusiones

- Las fracciones proteicas del extracto acuoso de hoja del neem estimulan la proliferación y activación de los linfocitos e induce una reducción en la viabilidad de células tumorales
- Las fracciones desencadenan dos clases de respuesta inmunológica Th1 y Th2
- Podría funcionar como un buen adyuvante ya que no solo induce una respuesta inmunológica si no que produce una disminución en la viabilidad de células tumorales.

Anexos

Anexo 1

Consentimiento informado

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPAR EN PROTOCOLOS DE INVESTIGACIÓN

Lugar y Fecha: _____

Por medio de la presente acepto participar en el protocolo de investigación titulado:

Estudio de las propiedades estimuladoras e inductoras de apoptosis de proteínas aisladas de extracto acuoso de *A. indica* en linfocitos de sujetos normales y líneas celulares de cáncer de mama

Registrado ante el Comité de ética de la Universidad Autónoma de Puebla.

El objetivo del estudio es: Estudiar in vitro la respuesta inmunológica de las proteínas presentes en el extracto acuoso de hojas de *Azadirachta Indica* en linfocitos de sujetos sanos.

Se me ha explicado que mi participación consistirá en: Una toma de muestra de sangre no mayor a 450 ml por punción venosa que será utilizada para realizar el cultivo celular de linfocitos el cual nos permitirá evaluar las propiedades inmunogénicas de las proteínas del extracto acuoso del *Neem*. Declaro que se me ha informado ampliamente sobre mi participación en el estudio, así como los datos que serán tomados de mi expediente.

El investigador responsable se ha comprometido a darme información oportuna de la investigación así como a responder cualquier pregunta y aclarar cualquier duda que le plantee acerca de los procedimientos que se llevarán a cabo, los riesgos, beneficios o cualquier otro asunto relacionado con la investigación.

Entiendo que conservo el derecho de retirarme del estudio en cualquier momento en que lo considere conveniente, sin que ello afecte la atención médica que recibo en el Instituto.

El investigador responsable mantendrá la confidencialidad de los datos y si lo deseo se me informará los resultados de la investigación.

Nombre y firma del sujeto

Nombre, firma y matrícula del Investigador Responsable Número (s) telefónico (s) a los cuales puede comunicarse en caso de emergencia, dudas o preguntas relacionadas con el estudio: D.C. Ma. Alicia Díaz y Orea Tel: 2295500 Ext. 6075. Miriam Fernández Gallardo Tel: (044) 22 25 50 74 34.

Testigo

Nombre y firma

Anexo 2

Preparación del extracto acuoso de Neem

Podemos definir al extracto acuoso, como: preparación en agua de la sustancia de una planta o un animal que contiene la porción biológicamente activa sin el residuo celular. En este caso, el extracto se preparó a partir de 1 gramo de hojas del Neem en 10 ml de Buffer Salina Fosfato 0.15 M (PBS) con azida de sodio 0.1%, se homogenizan las hojas con el PBS después, se centrifuga a 1500 rpm con una temperatura de 4°C durante 10 min. Se decanta la solución en tubos.

Para la esterilización del extracto, se realizó un proceso de filtración utilizando un filtro con membrana de celulosa de 0.22 micras para retirar los contaminantes, el proceso se realizó en una campana de flujo laminar.

Anexo 3

Electroforesis

La electroforesis en gel es de poliacrilamida-dodecil sulfato de sodio (PAGE-SDS) es el método más común de separación de proteínas en función de su carga y masa molecular. El SDS, además de desnaturalizar las proteínas, las recubre de carga negativa, por lo que solamente el tamaño de la proteína afecta su desplazamiento en una matriz de poliacrilamida (acrilamida-bisacrilamida) aplicando un campo eléctrico. La separación electroforética de las proteínas requiere de un gel de dos fases, la primera fase, se denomina de empaquetamiento (staging) y la segunda, de separación (running). La fase de "staging" (poliacrilamida al 3%) cumple la función de alinear y concentrar las proteínas de la muestra antes de ser separadas, mientras que la fase de "running" (poliacrilamida al 10%) las separa por su masa molecular. Las muestras (20 µg/carril) se aplicaron por duplicado junto con un marcador de peso molecular (Fermentas Labs). Se utilizó el sistema de electroforesis Mini-Protean de BioRad, para geles de 10x10 cm. y se corrió la electroforesis a 100 V / 120 mA durante 3 horas.

Anexo 4

Cromatografía de exclusión

La característica que distingue a la cromatografía de la mayoría de los métodos físicos y químicos de separación, es que se ponen en contacto dos fases mutuamente inmiscibles. La fase estacionaria (Sephadex G-200) y la móvil (PBS). Un mililitro del extracto acuoso se adiciono a la fase móvil, la cual es transportada a lo largo de la columna que contiene el Sephadex G-200 (fase estacionaria). Aquellas moléculas con un tamaño mayor que el diámetro de los poros de las partículas, sólo podrán moverse en su camino, a través de la fase estacionaria, en el espacio que queda entre las partículas; y por lo tanto, no se verán retrasadas en su descenso. En cambio, aquellas moléculas capaces de penetrar en las partículas se verán retrasadas por la fase estacionaria; en mayor medida, cuanto menor sea su tamaño. Por lo tanto, las moléculas eluyen en este tipo de cromatografía por orden decreciente de tamaño molecular. Así, se obtuvieron 60 tubos de muestra de 1 ml cada uno, posteriormente, se leyó cada uno de los tubos en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 280 nm, con el fin de identificar los patrones de las fracciones proteicas así como la concentración proteica. Una vez obtenidos los patrones de las fracciones proteicas, se juntaron los volúmenes correspondientes, siendo éstas empleadas para el tratamiento de los linfocitos y células tumorales de mama.

Anexo 5

Determinación de proteínas por Nano Drop 200

Thermo Scientific™ NanoDrop 2000 son espectrofotómetros de amplio espectro de luz UV-Vis utilizados para cuantificar y evaluar la pureza del ADN, ARN, proteínas y más. El NanoDrop 2000 y son los únicos espectrofotómetros microvolumen con la tecnología patentada de retención de la muestra que miden los volúmenes de muestra tan pequeños como 0.5µL.

Anexo 6

Separación de linfocitos

Las técnicas de centrifugación en gradientes, es un método basado en la centrifugación de la muestra sobre un gradiente de densidad discontinuo, cuyo medio original consiste en una mezcla de ficoll y metrizoato de sodio, con densidad de 1,077 g/ml. Este método es rápido y simple, por lo que se utiliza comúnmente para obtener preparaciones enriquecidas de linfocitos sanguíneos. Aunque estrictamente esta técnica resulta en la separación de los leucocitos mononucleares, que incluyen tanto a los linfocitos como a los monocitos, los primeros superan ampliamente en número a los segundos, cuando se trabaja con muestras de sangre periférica.

Las muestras sanguíneas fueron diluidas 1:2 con SSI estéril, se estratificaron sobre un volumen de ficoll-Hypaque, de la tercera parte de la dilución sanguínea y se centrifugo 20 min. A 2500 rpm.

Durante la centrifugación se formaron varias capas, el sedimento que está formado principalmente por granulocitos y eritrocitos que migraron a través del gradiente de densidad que es mayor al del Ficoll hypaque, encima estaba otra capa que sería el Ficoll hypaque que es menos denso, y encima un anillo blanquecino, que son los linfocitos, finalmente sobre esa capa estaban las plaquetas y el plasma. Se separó el anillo de linfocitos, se lavaron con Solución Salina y ajustaron a una concentración de 1×10^6 células/ml., para ser cultivados.

Anexo 7

Cultivo celular de linfocitos

El cultivo celular se realizó a partir de 30 paquetes globulares.

La curva dosis-respuesta se ajustó la población de linfocitos a 1×10^6 células por mililitro en cajas de cultivo de 96 pozos se depositaron 100 mil células en 200 μ l por pozo, la determinación, se realizó por triplicado, para cada fracción, utilizando, diferentes concentraciones de las fracciones obtenidas de la cromatografía de exclusión. Al realizar los cultivos celulares se tuvo un control negativo de la técnica, que sólo contenía medio

RMPI y células, que fue el control negativo, un control positivo que fue células más 3µl de Con A (que es un que es mitógeno de células T capaz de inducir la proliferación de una gran cantidad de clones de linfocitos T, de modo inespecífico (por lo que también se denominan activadores policlonales). Los problemas, fueron células (linfocitos obtenidos de los pacientes tratados con una concentración de proteínas de 10 µg/µl. la placa de cultivo, fue incubada a 37°C, con una atmosfera de 5% de CO₂ y 95% de humedad, por 5 días.

Al quinto día se agregó Azul de Tetrasodio por 5 horas que lo redujo a formazán por la presencia de las deshidrogenasas mitocondriales de las células vivas; después de las 5 hrs., se le colocó 50 µl de fijador y se leyó en un lector de Elisa a 570nm (kit Non radioactive cell proliferation *Promega*), con los valores controles y los problema, se obtuvo los índices de estimulación y por los índices de estimulación positiva, se determinó la concentración adecuada de proteína, para utilizar en esta técnica.

Anexo 8

Cultivo de líneas celulares

Las células MDA-MB 231 independientes hormonas, estrógenos, progesterona y Her 2 fueron cultivadas en frascos de cultivo que contienen DMEM suplementado con 5% de FBS y 1% de antibióticos (100 U / ml de penicilina y 100 U/ml de estreptomina). Las células se mantuvieron a 37° C en una atmósfera humidificada que contiene 5% de CO₂. Al alcanzar la confluencia, las células se tripsinizaron y se sembraron 5000 células por pozo en placas de 96 pozos.

Anexo 9

Evaluación de la viabilidad celular

La viabilidad celular se evaluó usando una técnica colorimétrica modificado que se basa en la capacidad de las células vivas para convertir MTT, un compuesto purpura de tetrazolio en cristales de formazán por reductasas mitocondriales (Mosmann, 1983). Se sembraron, 5000 células por pozo en una placa de 96 pozos expuestos a diferentes concentraciones

de las fracciones proteicas y del extracto completo de Neem en un periodo de 48h. Al final del tratamiento, se añadió a cada pozo 37µl de una solución stock de MTT 0.5 mg/ml y se incubó a 37 °C durante cuatro horas. A continuación, los cristales de formazano formados se disolvieron en dimetil sulfóxido y se mantuvieron en agitación a 475 rpm durante 15 minutos. A continuación, la intensidad del color desarrollado se midió usando un lector de placas de micro ELISA a 570 nm. El número de células viables se expresó como porcentaje de células de control cultivadas en suero libre de medio. La viabilidad celular en medio de control sin ningún tratamiento fue representado como 100%. La viabilidad celular se calcula utilizando la fórmula: $\text{viabilidad celular\%} = [\text{A570 nm de las células tratadas} / \text{A570 nm de las células de control}] \times 100$.

Anexo 10

ELISA

La técnica de ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) permite la cuantificación de proteínas solubles presentes en el medio de cultivo. El principio del ELISA se basa en el reconocimiento específico de una proteína con su anticuerpo primario. El ensayo de detección es indirecto, ya que al complejo proteína-anticuerpo, se une un anticuerpo secundario acoplado a una enzima, la peroxidasa de rábano (HRP), que al ponerla en contacto con su sustrato, induce una reacción química que genera cambio de color, la intensidad del color es directamente proporcional a la concentración de la proteína, y se mide en un espectrofotómetro en unidades arbitrarias de absorbancia.

Los linfocitos fueron expuestos por 72 horas a las diferentes fracciones proteicas a una concentración de 10µg, obtenidas a partir del extracto acuoso de las hojas de Neem. Se recuperó el medio de cultivo y se almacenó en crioviales a -80 °C hasta realizar el ELISA. Se realizaron ELISA para las siguientes citosinas: IL-2, IL-4, siguiendo las indicaciones de proveedor (eBioscience). La placa fue leída en un lector de microplacas de ELISA, First Marx Devices, a una longitud de onda de 600-620 nm.

Anexo 11

Citometría de flujo

La citometría de flujo es una técnica que mide y analiza simultáneamente múltiples características físicas de partículas individuales, por lo general células, haciéndoles incidir un haz de luz polarizada. Las propiedades medidas de una célula pueden ser el tamaño, la granularidad relativa o complejidad interna, y la intensidad de fluorescencia relativa asociada con la presencia de proteínas específicas.

Estas propiedades se determinan usando un sistema de acoplamiento óptico-electrónico capaz de registrar como una célula dispersa la luz láser incidente y emite fluorescencia.

Un citómetro de flujo se compone de tres sistemas principales: fluidos, óptica y electrónica.

- El sistema de fluidos transporta partículas en una corriente al rayo láser para analizarlas.
- El sistema de óptica consta de rayos láser para iluminar las partículas en la corriente de la muestra y filtros de luz para dirigir las señales luminosas resultantes de los detectores apropiados.
- El sistema de la electrónica convierte las señales de luz detectadas en señales electrónicas que pueden ser procesados por la computadora.

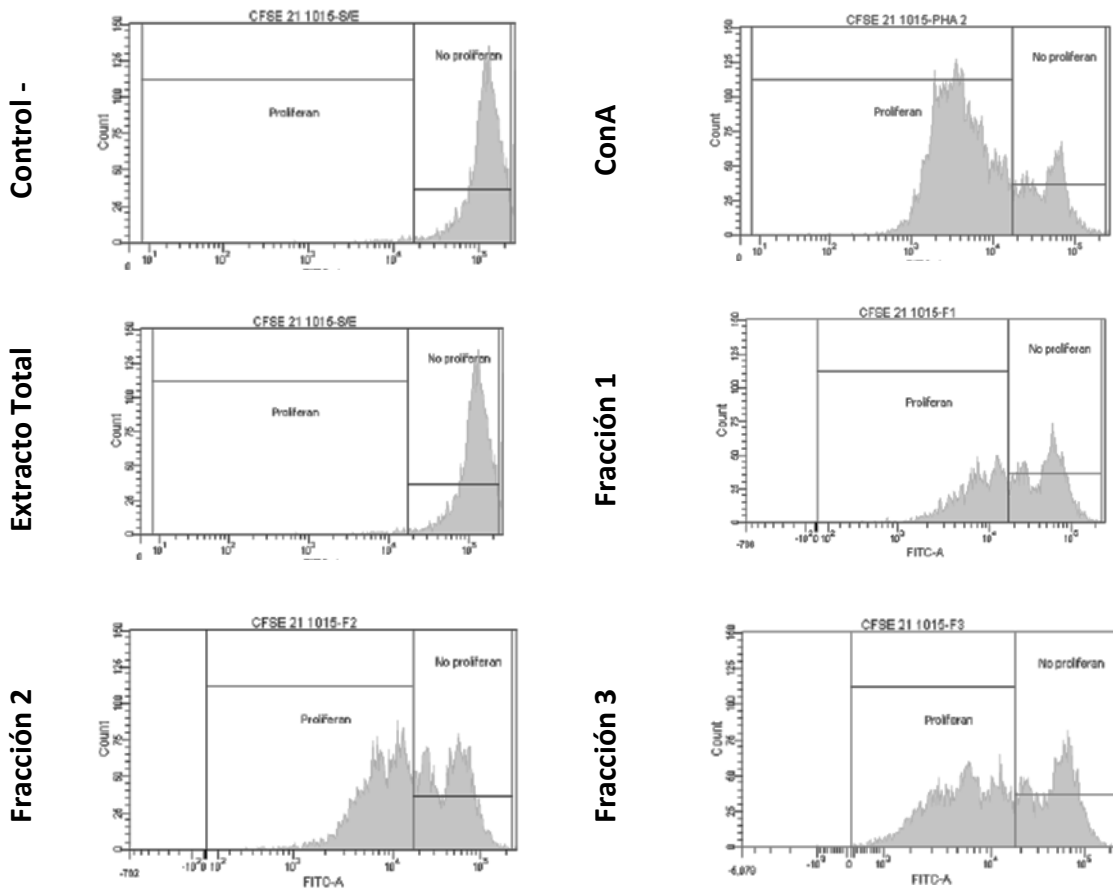
En el citómetro de flujo, las células son llevadas a la intersección de láser en una corriente de fluido. Las células en suspensión de 0.2-150 micrómetros de tamaño son adecuadas para el análisis.

Cuando las células pasan a través de la intersección con láser, dispersan la luz y emiten fluorescencia la cual es captada por lentes especializados y dirigida a los tubos fotomultiplicadores, quienes generan una señal electrónica la cual es procesada para ser presentada al usuario.

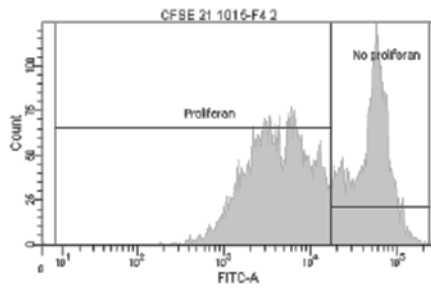
Anexo 12

Fotos de la citometría de flujo

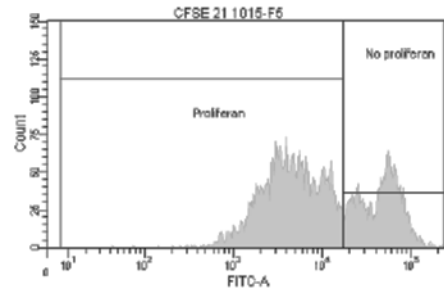
Se evaluó el efecto de todas las fracciones proteicas en los linfocitos por medio de la citometría de flujo, observando que todas las fracciones inducen la proliferación de los linfocitos ya que debido a las características de CFSE el cual fue el colorante usado, es una sal que se va introducir en el núcleo de la célula y al dividirse el colorante va ir pasando a cada célula hija disminuyendo su intensidad, la intensidad del colorante lo podemos observar del lado derecho de la gráfica cuando no existe proliferación, al proliferar las células se desplaza a la izquierda observado en cada una de las gráficas de las fracciones.



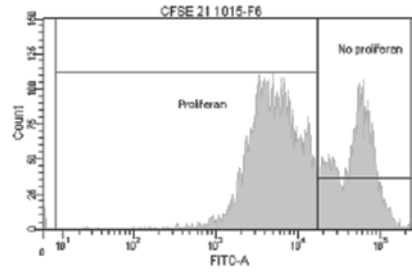
Fracción 4



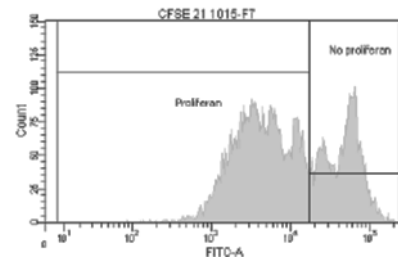
Fracción 5



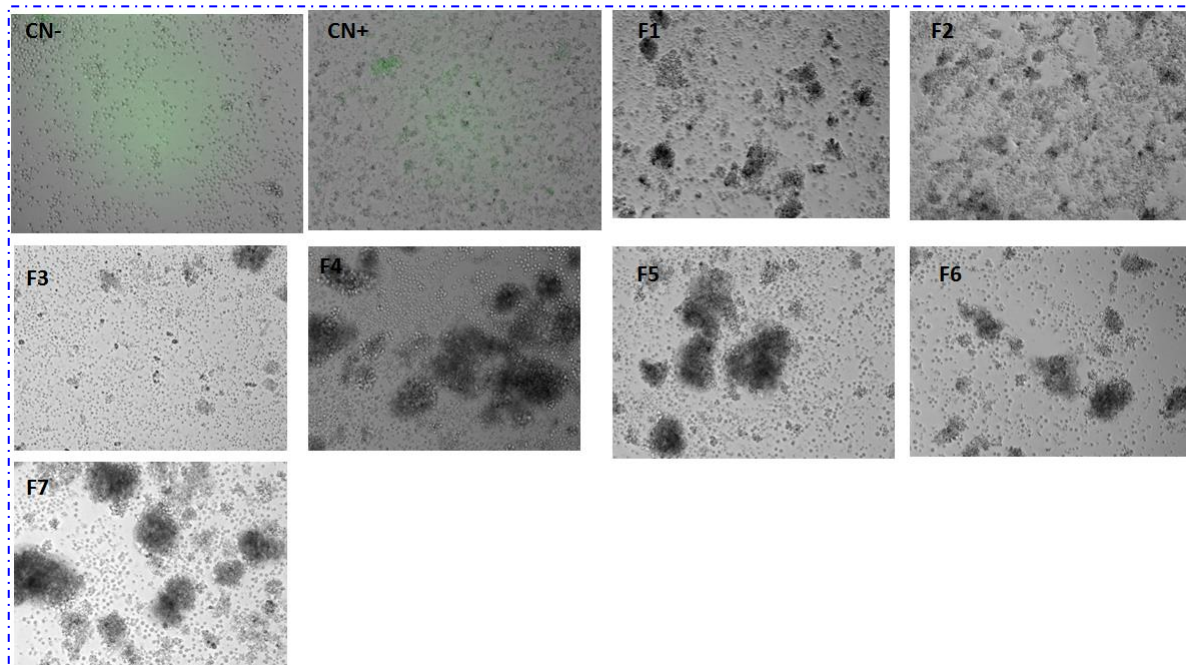
Fracción 6



Fracción 7



También se realizó microscopia en campo claro para observar cómo se veían los linfocitos estimulados con las fracciones.



Bibliografía

Arumugam, A. Argullo, P. Boopalan, T. Nandy, S. Lopez, R. Gutierrez, C. Noragan, M. Rajkumar, L. (2014). Neem leaf extract inhibits mammary carcinogenesis by altering cell proliferation, apoptosis, and angiogenesis. *Canc bio & ther*, 15(1):26-34.

Balkwill, F. & Mantovani, A. (2001). Inflammation and cancer: Back to Virchow?. *The Lancet*, 357:539-545.

Ban, K. A. & Godellas, C. V. (2014). Epidemiology of Breast Cancer. *Surg Oncol Clin N AM*,23:409-422.

Baral, R. & Chattopadhyay, U. (2004). Neem (*Azadirachta indica*) leaf mediated immune activation causes prophylactic growth inhibition of murine Ehrlich carcinoma and B16 melanoma. *Int immunopharmacol*, 4:355-366.

Baral, R., Mandal, I. & Chattopadhyay, U. (2005). Immunostimulatory neem leaf preparation acts as an adjuvant to enhance the efficacy of poorly immunogenic B16 melanoma surface antigen vaccine. *Int Immunopharmacol*, 5:1343-1352.

Beuth J, Schneidder y KO HL. (2006). Enhancement of immune Response to Neem Leaf Extract (*Azadirachta indica*) Correlates with Antineoplastic activity in BALB/c mice. *In vivo*. 20:247-252.

Biswas, Chattopadhyay I, Banerjee RK, Bandyopadhyay U. (2002). Biological activities and medicinal properties of neem (*Azadirachta indica*). *Curr Sci*. 82:1336-1345.

Bodduluru, L.N., Kasala, E.R., Thota, N., Borua, C.C., Sistla, R. (2014). Chemopreventive and therapeutic effects of nimbolide in cancer: the underlying mechanisms. *Toxicol. In vitro*. 28:1026-1035.

Bose, A. Baral, R. (2007). Natural Killer cell mediated cytotoxicity of tumors cell initiated by neem leaf is associated with CD40-CD40L mediated endogenous production of interleukin 12. *Hum Immunol*, 68:823-831.

Bose, A., Haque, E. & Baral, R. (2007). Neem Leaf preparation induce apoptosis of tumor cells by releasing cytotoxic cytokines from human peripheral blood mononuclear cells. *Phytother Res*, 21:914-920.

Brahmachari G. (2004). Neem- an omnipotent plant: a retrospective. *Chem Biochem*. 5:408-421.

Coates A, Abraham S, Kaye SB, Sowerbutts T, Frewin C, Fox RM. (1983). On the receiving end-patient perception of the side-effects of cancer chemotherapy. *Oncology*, 203-208.

De Visser, K, Eichten, A, Caussens, L. (2006). Paradoxical roles of the immune system during cancer development. *Nat Rev Cancer*, 6:24-37.

Dunn, G, Old, L, Schreiber, R. (2004). The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *immunity*, 21:137-148.

Elansary H. (2014). Natural Antioxidants and their role against Human Cancer. *Plant Biochemistry y Physiology*, 2:2.

Elumalai P, Gunadharini DN, Senthilkumar K, Banudevi S, Arunkumar R, Benson CS, Sharmila G, Arunakaran J. (2012). Induction of apoptosis in human breast cancer cells by nimbolide through extrinsic and intrinsic pathway. *Tox letters*, 215:131-142.

Fang, H., Sandeep, K., Neelu, Y. & Dhyan, C. (2014). Neem Components as potential agents for cancer prevention and treatment. *Bioch et Biophysica Acta*, 1846:247-257.

Ferlay, J. Soerjomatoram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray F. (2015). Cancer incidence and mortality worldwide sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int, J Cancer*, 136:E359-E386.

Ganguli S. (2002). Neem: A therapeutic for all seasons. *Curr Sci*. 2:1304.

Ghosh , D., Bose, A., Haque, E. Baral, R. (2009). Neem (*Azadirachta indica*) leaf preparation prevents leukocyte apoptosis mediated by cisplatin plus 5-fluorouracil treatment in Swiss mice.. *Chemotherapy*, 55:137-144.

Ghosh, D., Bose, A., Haque , E. Baral, R. (2006). Pretreatment with neem (*Azadirachta indica*) leaf preparation in Swiss mice diminishes leukopenia and enhances anti-tumor activity of cyclophosphamide. *Phytother Res*, 7:814-818.

Guan F, Ding Y, Zhang Y, Zhou Y, Li M, Wang C. (2016). Curcumin suppresses proliferation and migration of MDA-MB-231 Breast Cancer Cells through Autophagy Dependent Akt Degraton, *Plos One*, 11:11(1): e0146553.

Gunadharini, D.N., Elumalai, P., Arunkumar, R., Senthilkumar, K., Arunakaran, J. (2011). Induction of apoptosis and inhibition of PI3K/Akt pathway in PC-3 and LNCaP prostate cancer cells by ethanolic neem leaf extract. *J Ethnopharmacology*, 134:644–650.

Hadden , J. (1999). Review Article The immunology and immunotherapy of breast cancer: an update. *Inter J of Immunopharmacology*, 21(2):79-101.

Haque, E., Mandal, I., Pal, S. Baral, R. (2006). Prophylactic dose of neem (*Azadirachta indica*) leaf preparation restricting murine tumor growth is nontoxic, hematostimulatory and immunostimulatory. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, 28:33-50.

INEGI 2012. Cáncer en Cifras > Estadísticas de Cáncer de mama. <http://www.infocancer.org.mx/estadisticas-inegi-2014-cancer-de-mama-con892i0.html>.

Jonathan DG, Jones y Jeffery L D. (2006). The plant immune system. *Nature*, 444:323-329.

Karp, G. (2007). *Biología celular y molecular conceptos y experimentos*. Cuarta ed. México: *Mc Graw Hill*.

Kieback, D., Harbeck, N. Bauer, W. (2010). Endometrial effects of exemestane compared to tamoxifen within the tamoxifen exemestane. Adjuvant multicenter (TEAM) trial: results of a prespective gynecological ultrasound. *Gynecologic Oncol*, 119(3):500-505.

Kikuchi, T., Ishii, T., Noto, T., Takahashi, A., Tabata, K., Suzuki, T., Akihisa, T. (2011). Cytotoxic and apoptosis inducing activities of limonoids from the seeds of *Azadirachta indica* (neem). *J.Nat.Prod*, 74:866.

Kindt JT, Goldsby RA, Osborne BA, Palacios Martinez R. (2007). Inmunología de Kuby. México. *Mc Graw Gill*, pp. 1, 9-17, 76-111.

Kumbe, M. (2008). Declining breast cancer incidence and decreased HRT use. *Lancet*, 372:608-610.

Mahapatra S, Young CY, Kahli M, Kanen EW, Klee MW, Holmes DJ, Tindall KV, Donkena. (2012). Antiangiogenic effects and therapeutic targets of *Azadirachta indica* leaf extract in endothelial cells, Evid Based Complement. *Altern Med*, 2012:30319.

Mandal-Ghosh, I., Chattopadhyay, U. Baral, R. (2007). Neem leaf preparation enhances TH1 type immune response and anti-tumor immunity against breast tumor associated antigen. *Cancer Immun*, 7:8-16.

Mbeunkui, F. Johann, D. (2009). Cancer and the tumor microenvironment: a review of an essential relationship. *Cancer Chemothe*, 63:571-582.

Minaker, K. (2011). Common clinical sequelae of aging. In: Goldman L, Schafer AL, En: *Goldman's Cecil Medicine*. Philadelphia: *Elsevier Saunders*, cap.24.

Mittendorf EA, Peoples GE. (2016). Injecting Hope-A Review of Breast Cancer Vaccin. *Oncolo (Williston Park)*, 30:5.

Morgan, E.D. (2009). Azadirachtin, a scientific gold mine. *Bioorg.Med.Chem*, 17:4096-4105.

Morris Quevedo, H. J., Martinez Manrique, C., Abdala Díaz, R. Campos Orama, D. (1999). Adyuvantes inmunológicos. *Cuba InvestBiomed*, 180(2):130-137.

Murzin Alexey G, Brenner SE, Hubbard T, Chothia C. (1995). SCOP: structural classification of proteins database for the investigation of sequence and structures. *J Mol Biol*, 247:536-540.

Nemec M. (2001). Immunology. Lymphocyte development. *Curr Opin Immunol*. 13(2):129.

Pichard Bahena, R., Ávila Vázquez, R. & Muñoz Hernandez, B. A. (2007). Estudio Descriptivo de la frecuencia de los casos de carcinoma de mama por tipo histológico en Médica Sur comparados con los datos de la literatura mundial. *Medigraphic*, 14(3):103-108.

Puri HS. (1999). Plant sources. In: Hardman R (ed) *Neem. The divine tree. Azadirachta indica*. Harwood Academic Publishers Singapore. 9-21.

Rajkumar P, Muran P, Nand KS. (2011). Anticancer biology of *Azadirachta indica* (neem): A mini review. *Cancer Biology & Therapy*, 12(6):467-476.

Raleigh, J. (1998). Hypoxia and vascular endothelial growth factor expression in human squamous cell carcinomas using pimonidazole as a hypoxia marker. *Cancer Res*, 58:3765-3768.

Ricci, F., Berodi, V., Risuleo, G. (2008). Differential cytotoxicity of MEX: a component of neem oil whose action is exerted at the cell membrane level. *Molecules*, 14:122-132.

Sarkar K, Bose A, Haque E, Chakraborty K, Chakraborty T, Goswami S. (2009). Induction of type 1 cytokines during neem leaf glycoprotein assisted carcinoembryonic antigen vaccination is associated with nitric oxide production. *Int Immunopharmacol*, 9:753-60.

Segeal, BH., Wang XY, Dennis CG, Youn R, Repasky EA, Manjili MH, Subjeck JR. (2006). Heat shock proteins as vaccine adjuvants in infections and cancer. *Drug Discovery Today*, 11-12:534-540

Siegel, R., Deppa, N. Ahmedin, J. (2014). Cancer Statistics. *American Cancer Society*, 63:10-29.

Skolov, A., Paull EO., Stuart, JM. (2016). One- Class detection of cell states in tumor subtypes. *Pac Symp Biocomput*, 21:405-416.

Sun, K. Duan, X, Cai H, Liu X, Yang Y, Li M, Zhang X, Wang J. (2016). Curcumin inhiits LPA-induceinvasion by altenuating RhoA/Rock/MMPs phathway in MCF-/ breast cancer cells. *Clin Exp Med*, 16(1):37-47.

Thurman JM, Nester CM. (2016). All things Complement. *Clin J Am Soc Nephrol*, En impresión.

Vaupel, P., Kallinowski , F. Okunieff, P. (1989). Blood flow oxygen and nutrient supply, and metabolic microenviroment of human tumors: A review. *Cancer Res*, 49:6449-6465.

Veitch GE, Bayer A, Ley SV. (2008). The azadirachtin story. *Angew Chem, Int Ed Engl*, 47:9402-9429.

Whiteside, T. (2006). Inmune suppression in cancer: Effects on inmune cells, mechanism and future therapeutic intervention. *Semin Cancer Biol*, 16:3-15.

Wilson , B. Tellechea, G. (2000). Estudio de los factores de riesgo para cáncer de mama y cuello uterino. *Rev Med Uruguay*, 16:103-113.

Witz, I. (2009). The tumor-microenvironment interactions the making of a paradigm. *Cancer microenviron*, 2: 9-17.

Yasui, Y. Potter, J. D. (1999). the shape of age-incidence curves of female breast cancer by hormone-receptor status. *cancer causes control*, 10:431-437.

Zeichner SB, Ambros T, Zaravinos J, Montero AJ, Mahtani RL, Ahn ER, Mani A, Markward NJ, Vogel CL. (2015) Defining the survival benchmark for breast cancer patients with systemic relapse. *Breast Cancer (Auckl)*, 9():9-17.