



**UNIVERSIDAD
AUTÓNOMA
METROPOLITANA**

CASA ABIERTA ALTIEMPO

UNIDAD IZTAPALAPA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

**“Determinación de la localización sub-celular de la
proteína Bik como respuesta al tratamiento con un
agente antineoplásico y con un agente oxidante en dos
líneas celulares de cáncer de mama”**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
DOCTORA EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

PRESENTA:

M en BE. AGLAÉ TREJO VARGAS

MÉXICO, DF. JULIO 2015

MIEMBROS DEL CÓMITE

Co-directora interna

Dra. María Concepción Gutiérrez Ruiz

Departamento de Ciencias de la Salud
Laboratorio de Bioquímica y Fisiología Celular.
Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa

mcgr@xanum.uam.mx

Co-director externo

Dr. Armando Luna López

Departamento de Investigación Básica
Instituto Nacional de Geriátría

allbioexp@yahoo.com

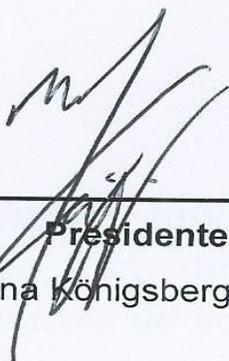
Asesora

Dra. Mina Königsberg Fainstein

Departamento de Ciencias de la Salud
Laboratorio de Bioenergética y Envejecimiento Celular.
Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa

mkf@xanum.uam.mx

Los miembros del jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, abajo firmantes, aprobaron, la tesis titulada “**Determinación de la localización sub-celular de la proteína Bik como respuesta al tratamiento con un agente carcinogénico y con un agente oxidante en dos líneas celulares de cáncer de mama**”, con fecha 10 de JULIO del 2015.



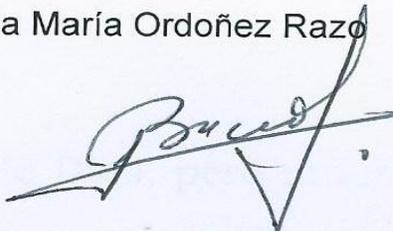
Presidente

Dra. Mina Königsberg Fainstein



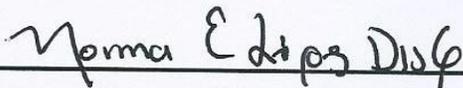
Secretario

Dra. Rosa María Ordoñez Razo



Vocal

Dra. Leticia Bucio Ortiz



Vocal

Dra. Norma Edith López Díaz-Guerrero

“Soy de las que piensan que la ciencia tiene una gran belleza. Un científico en su laboratorio no es sólo un técnico: es también un niño colocado ante fenómenos naturales que le impresionan como un cuento de hadas”

“Marie Curie”

“Un científico es un hombre tan endeble y humano como cualquiera; sin embargo, la búsqueda científica puede ennoblecerle, incluso en contra de su voluntad”

“Isaac Asimov”

“Un poco de ciencia aleja de Dios, pero mucha ciencia devuelve a Él”

“Louis Pasteur”

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis doctoral, si bien ha requerido dedicación y mucho esfuerzo por parte de la autora y su director de tesis, no hubiese sido posible su finalización sin la cooperación desinteresada de todas y cada una de las personas que a continuación citaré y muchas de las cuales han sido un soporte muy fuerte en momentos de angustia y desesperación.

Antes que nada quiero empezar agradeciendo a Dios, la persona más importante en mi vida, quien me ha ayudado en todo momento de la vida, quien me levantó cuando las fuerzas casi se habían agotado, quien estuvo a mi lado cuando sentí que estaba sola y quien me escuchó en cada momento de frustración por el que pasaba.

Agradezco infinitamente a mi Director de Tesis a quien admiro y aprecio profundamente, el Dr. Armando Luna, quien fue un gran apoyo en los momentos difíciles de mi proyecto, porque nunca escatimó esfuerzo ni tiempo para corregir y mejorar este trabajo, por sus valiosos conocimientos, por ser firme en los momentos en que se requería. Por sus múltiples consejos los cuales aprecio mucho. Pero sobre todo porque me demostró en el trayecto de esta tarea que parecía no tener fin, que es un gran profesor y excelente ser humano.

A la Doctora Concepción Gutiérrez quien me brindó su apoyo y confianza en los momentos difíciles, quien siempre creyó en mí aun cuando yo misma no lo hacía. Gracias por sus acertados consejos y por su gran apoyo, simplemente gracias por permitirme ser su alumna y llevarme un poco de su gran conocimiento.

A mi asesora Mina Königsberg Fainstein, quien me albergó de forma incondicional en su lugar de trabajo. Gracias por escucharme y por siempre estar ahí para apoyarme y animarme cuando pensé que todo estaba mal. Gracias por sus acertados consejos y cambios constructivos al proyecto. Simplemente agradezco de corazón haberme dado una oportunidad cuando la mayoría me había cerrado las puertas. Gracias por ser un excelente ser humano.

Asimismo, agradezco a todos mis amigos y compañeros de laboratorio, Luis, Gibrán, Alex, Ula, Angie, Rafa, Pedro, Ismerai, Paola, Sandra Li, Sandra Cázares, Alis, Ady, Rene y Ale, en cada uno de ustedes hay una persona muy especial. He aprendido y disfrutado con ustedes mil horas de estudio, gracias por la ayuda cuando en ocasiones me he sentido perdida y por esa amistad sincera. Los voy a extrañar mucho chicos.

A la Dra. Viri y a la Dra. Norma, por siempre tener el tiempo para contestar mis dudas y por el apoyo incondicional cuando en su momento lo necesito muchas gracias por todo

A la Dra. Rosa Ordoñez, durante una de las etapas más difícil de este periodo. Muchísimas gracias por todo su apoyo y sus consejos, por su ánimo y por su gran conocimiento que no escatimó en compartir conmigo.

A mi querida amiga, la licenciada Violeta quien me dio la oportunidad de ser su amiga, a quien admiro en gran medida y a quien le agradezco de corazón cada uno de sus consejos. Gracias viole por todo el apoyo incondicional que siempre obtuve de ti, gracias por todo tu tiempo que siempre estuviste dispuesta a regalarme, por todo te esto agradezco infinitamente por ser parte de mi vida.

Agradezco infinitamente a Elisa, una gran amiga, confidente y hermana quien tiene un lugar muy especial en mi corazón. Siempre ha sido un brazo que me ha sostenido en los momentos más difíciles, quien me alentó y acompañó en toda esta travesía y quien siempre ha estado cuando más lo he necesitado, gracias por cada momento feliz que has pasado conmigo desde el momento que entraste a mi vida, gracias por tus consejos y por los regaños que bien merecidos me das cuando me equivoco, por compartir conmigo los momentos difíciles, porque has llorado y reído a mi lado. En las buenas y en las malas gracias por todo amiga.

Gracias a Stefi por permitir conocerte y más aún porque me regalaste tu amistad la cual aprecio muchísimo, gracias amiga por estar ahí apoyándome y porque el tiempo a tu lado fue una gran aventura, te quiero mucho.

Amiga Mirna gracias por escucharme y apoyarme en esta travesía, agradezco tu amistad y valoro todo lo que has hecho por mí.

A mi querida amiga Hilda quien desde el inicio de mi estancia en la Universidad me regaló su amistad, siempre has sido un apoyo en los momentos difíciles en los que has estado a mi lado. Gracias por todo amiga pero sobre todo por tu valiosa amistad.

Gracias a mi mami, por todo el esfuerzo y sacrificio, por brindarme todo el amor, la comprensión, apoyo incondicional y confianza en cada momento de mi vida, tú eres la persona que siempre me ha levantado los ánimos tanto en los momentos difíciles de mi vida académica como en lo personal. Gracias por tu paciencia y las palabras sabias que siempre tienes para mí, por ser mi amiga y ayudarme a cumplir mis sueños, te quiero mucho.

A mis hermanos Ángel y Sergio quienes han sido el motor para lograr mis objetivos y por quienes me esfuerzo para tener un mejor mañana. A mí cuñada Nayelli, porque desde que entraste en nuestras vidas me has dado el mejor regalo de todos, el amor incondicional de tres maravillosos seres humanos a quienes amo con todo mi corazón mis tres hermosos sobrinos, Ivanna, Santiago y Elías ustedes son mi fuerza y motor para ser mejor cada día, sus risas y ocurrencias son el motor de mi vida, siempre los llevo conmigo, los amo.

Gracias de igual forma, a mí amada abuelita Vicky y a mí querido papá Jesús porque siempre me han cuidado, aconsejándome y más aun ayudándome a salir adelante, gracias por confiar en mí y por amarme como lo han hecho.

Agradezco a mi mejor amigo, mi amado Mau quien ha sido mi impulso durante todo el tiempo que ha estado en mi vida, gracias por tu apoyo constante y amor incondicional, has sido mi compañero inseparable, fuente de calma y consejo en todo momento. Gracias

por confiar en mí y porque sé que siempre estarás ahí para darme ánimo. Simplemente gracias por amarme como sólo tú puedes hacer, Te amo!!!

Agradezco de forma muy especial a la Universidad Autónoma Metropolitana quien es mi *alma mater* y a quien debo mi formación y desarrollo, durante 13 años de mi vida.

Agradezco al Doctorado en Biología Experimental el cual se encuentra inscrito dentro del Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) con el número de registro 0904-0.

Hago mi extenso agradecimiento al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por haberme otorgado una beca para realizar mis estudios de Doctorado y por el apoyo económico brindado.

Agradezco al Centro Médico Nacional Siglo XXI (IMSS) por su apoyo y patrocinio para la realización de este proyecto, los cuales sin su apoyo nada de esto hubiera sido posible.

1. ÍNDICE GENERAL

| | Página |
|--|---------------|
| 1. Índice general..... | 7 |
| 2. Lista de figuras..... | 8 |
| 3. Lista de tablas..... | 10 |
| 4. Lista de gráficas..... | 11 |
| 5. Abreviaturas..... | 12 |
| 6. Resumen..... | 14 |
| 7. Introducción..... | 15 |
| 7.1 Cáncer..... | 15 |
| 7.2 Epidemiología del cáncer de mama..... | 15 |
| 7.3 Progresión del cáncer de mama..... | 16 |
| 7.4 Cáncer de mama (CaM)..... | 17 |
| 7.5 Aspectos moleculares del cáncer de mama..... | 18 |
| 7.6 Apoptosis..... | 20 |
| 7.7 La familia BCL-2..... | 22 |
| 7.8 BIK (Bcl2-Interacting Killer)..... | 25 |
| 7.9 Otras funciones de la familia BCL-2..... | 29 |
| 7.10 Apoptosis y estrés oxidante..... | 31 |
| 7.11 Estrés oxidante y radical libres..... | 32 |
| 7.12 Producción de ROS por la cadena de transporte de electrones (Cadena Respiratoria)..... | 36 |
| 7.13 Peróxido de hidrógeno..... | 38 |
| 7.14 Daño oxidante al ADN..... | 39 |
| 7.15 Cisplatino..... | 40 |
| 7.16 Mecanismo de generación de ROS mediante cisplatino a nivel mitocondrial..... | 42 |
| 7.17 Mecanismo de generación de ROS mediante cisplatino a nivel nuclear..... | 45 |

| | | |
|-----|--|----|
| 8. | Antecedentes..... | 49 |
| 9. | Pregunta de investigación..... | 51 |
| 10. | Justificación..... | 52 |
| 11. | Objetivos..... | 53 |
| | 11.1 General..... | 53 |
| | 11.2 Particulares..... | 53 |
| 12. | Hipótesis..... | 53 |
| 13. | Estrategia Experimental..... | 54 |
| 14. | Material y Métodos..... | 55 |
| | 14.1 Cultivo celular..... | 55 |
| | 14.2 Viabilidad celular y tratamiento oxidante..... | 55 |
| | 14.3 Inmunofluorescencia..... | 56 |
| | 14.4 Análisis estadístico..... | 57 |
| 15. | Resultados..... | 58 |
| | 15.1 Efecto del cisplatino sobre la viabilidad celular en las líneas celulares de mama..... | 58 |
| | 15.2 Efecto del peróxido de hidrógeno (H ₂ O ₂) sobre la viabilidad celular en líneas celulares de mama..... | 63 |
| | 15.3 Localización subcelular de Bik después del tratamiento con cisplatino..... | 67 |
| | 15.4 Localización subcelular de Bik después del tratamiento con H ₂ O ₂ | 73 |
| 16. | Discusión de resultados..... | 78 |
| 17. | Conclusiones..... | 83 |
| 18. | Perspectivas..... | 84 |
| 19. | Anexos..... | 85 |
| 20. | Bibliografía..... | 86 |

2. LISTA DE FIGURAS

| | Página |
|--|---------------|
| Figura 1. Representación esquemática de la progresión del cáncer..... | 16 |
| Figura 2. Estructura de la glándula mamaria..... | 18 |
| Figura 3. Ruta de señalización de inducción de apoptosis..... | 22 |
| Figura 4. Estructura de los miembros de la familia BCL-2..... | 24 |
| Figura 5. Estructura secundaria de la proteína BIK..... | 26 |
| Figura 6. Mecanismo de apoptosis mediado por BIK..... | 27 |
| Figura 7. Formación de las especies de oxígeno reactivo..... | 33 |
| Figura 8. Representación esquemática de las vías celulares de apoptosis..... | 35 |
| Figura 9. Modelo esquemático de la cadena de transporte electrónico mitocondrial..... | 37 |
| Figura 10. Estructura química del cisplatino..... | 40 |
| Figura 11. Aductos formados entre el cisplatino y las bases del ADN..... | 41 |
| Figura 12. Efecto del cisplatino sobre la mitocondria..... | 44 |
| Figura 13. Efecto del cisplatino sobre el núcleo..... | 46 |
| Figura 14. Modelo para los principales componentes de la citotoxicidad inducida por cisplatino..... | 48 |
| Figura 15. Localización subcelular de BIK durante el tratamiento con cisplatino en la línea celular MCF-7..... | 69 |
| Figura 16. Localización subcelular de BIK durante el tratamiento con cisplatino en la línea celular MDA-MB-231..... | 70 |
| Figura 17. Localización subcelular de BIK durante el tratamiento con cisplatino en la línea celular MCF-10A..... | 71 |
| Figura 18. Localización subcelular de BIK durante el tratamiento con H ₂ O ₂ en la línea celular MCF-7..... | 74 |
| Figura 19. Localización subcelular de BIK durante el tratamiento con H ₂ O ₂ en la línea celular MDA-MB-231..... | 75 |
| Figura 20. Localización subcelular de BIK durante el tratamiento con H ₂ O ₂ en la línea celular MCF-10A..... | 76 |

3. LISTA DE TABLAS

| | Página |
|---|---------------|
| Tabla 1. Especies reactivas de oxígeno (ROS) y de nitrógeno (RNS)..... | 34 |
| Tabla 2. Características de las líneas celulares de mama..... | 56 |

4. LISTA DE GRÁFICAS

| | Página |
|---|---------------|
| Gráfica 1. Determinación de la viabilidad en la línea celular MCF-7 después del tratamiento con cisplatino..... | 59 |
| Gráfica 2. Determinación de la viabilidad en la línea celular MDA-MB-231 después del tratamiento con cisplatino..... | 60 |
| Gráfica 3. Determinación de la viabilidad en la línea celular MCF-10A después del tratamiento con cisplatino..... | 61 |
| Gráfica 4. Comparación entre las líneas celulares durante el tratamiento con 6 μ M de CP..... | 62 |
| Gráfica 5. Determinación de la viabilidad en la línea celular MCF-7 después del tratamiento con H ₂ O ₂ | 63 |
| Gráfica 6. Determinación de la viabilidad en la línea celular MDA-MB-231 después del tratamiento con H ₂ O ₂ | 64 |
| Gráfica 7. Determinación de la viabilidad en la línea celular MCF-10A después del tratamiento con H ₂ O ₂ | 65 |
| Gráfica 8. Comparación entre las líneas celulares durante el tratamiento con 200 μ M de H ₂ O ₂ | 66 |
| Gráfica 9. Co-localización de BIK después del tratamiento con cisplatino..... | 67 |
| Gráfica 10. Co-localización de BIK después del tratamiento con H ₂ O ₂ | 77 |

5. ABREVIATURAS

A continuación se recoge la relación de abreviaturas que aparecen en el texto. En ocasiones se ha mantenido la correspondiente abreviatura y definición en inglés debido a su mayor uso en el lenguaje científico:

| | |
|-------------------------------|--|
| ADN | Ácido Desoxirribonucleico |
| ADNm | Ácido Desoxirribonucleico mitocondrial |
| ADNn | Ácido Desoxirribonucleico nuclear |
| AIF | Factor inductor de apoptosis |
| ARN | Ácido Ribonucleico |
| ATP | Adenosin trifosfato |
| BCL-2 | B-cell lymphoma 2 |
| BH | Dominio de Homología a BCL-2 |
| BIK | Bcl2-Interacting Killer |
| BRCA | Breast Cancer tipo 1 y 2 |
| Ca ²⁺ | Calcio |
| CaM | Cáncer de Mama |
| CoQ | Coenzima Q |
| CO ₂ | Dióxido de Carbono |
| CP | Cisplatino |
| CTE | Cadena de transporte electrónico mitocondrial |
| DISC | Complejo de señalización inductor de muerte |
| FADD | Dominio de Muerte asociado a Fas |
| FANCA-N | Anemia de Fanconi, grupo de complemento A |
| H ₂ O ₂ | Peróxido de Hidrógeno |
| Her2 | Receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano |
| IARC | International Agency for Research on Cancer |
| INEGI | Instituto Nacional de Estadística y Geografía |
| IFN γ | Interferón gamma |
| MOM | Membrana Interna Mitocondrial |
| NADPH | Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato (reducida) |
| NO \bullet | Óxido Nítrico |
| NOD | Unión de nucleótidos |
| O ₂ \bullet | Radical superóxido |
| OH \bullet | Radical Hidroxilo |
| OMS | Organización Mundial de la Salud |
| ONOO \bullet | Radical Peroxinitrito |
| p53 | Proteína de 53 kD |
| Pi | Fosfato inorgánico |
| PBS | Amortiguador Salino de Fosfatos |

| | |
|----------------|--|
| PTEN | Fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa |
| RE | Retículo Endoplásmico |
| Re α | Receptor de Estrógeno alfa |
| RL | Radicales Libres |
| RNS | Especies Reactivas de Nitrógeno |
| ROS | Especies Reactivas de Oxígeno |
| RP | Receptor de Progesterona |
| Ser | Serina |
| SOD | Superóxido dismutasa |
| tBID | Bid truncado |
| TM | Dominio Transmembranal |
| TNF-R | Receptor de Factor de Necrosis Tumoral |
| Thr | Treonina |
| VDAC | Canal anión dependiente de calcio |
| WHO | World Health Organization |
| $^1\text{O}_2$ | Oxígeno singlete |
| μM | Micromolar |

6. RESUMEN

El cáncer de mama es el cáncer más frecuente en mujeres de acuerdo a la OMS (GLOBOCAN, 2012) y para combatirlo la quimioterapia es la terapia más usada a pesar de sus efectos secundarios. En particular, uno de los propósitos al usar quimioterapia es la inducción de apoptosis.

La apoptosis generada por la vía mitocondrial es regulada principalmente por la familia de proteínas BCL-2. La mayoría de las cuales se localizan en el retículo endoplásmico o la mitocondria. Recientemente, algunas proteínas de esta familia han sido localizadas en sitios diferentes realizando funciones diferentes a las canónicas, sin embargo muchas de estas funciones permanecen aún sin comprenderse. BIK, un miembro pro-apoptótico de esta familia se ha encontrado desregulado en cáncer lo que ha causado gran interés en los últimos años y podría ser susceptible al estrés oxidante.

Debido a que la apoptosis se asocia con la generación de estrés oxidante, el objetivo de este trabajo fue determinar si la localización subcelular de la proteína BIK se ve afectada tras un insulto oxidante inducido directamente por el tratamiento con H_2O_2 o indirectamente por el cisplatino el cual es un agente antineoplásico.

Para ello, se realizaron experimentos en dos líneas celulares transformadas de cáncer de mama, MCF-7 y MDA-MB-231 y una línea celular epitelial de mama, MCF-10A. Los resultados mostraron que en la línea celular MCF-7, BIK se localiza dentro del citosol y después del tratamiento para inducir estrés oxidante la proteína se transloca al interior del núcleo. Sin embargo, en la línea celular MDA-MB-231, BIK se localiza en el interior del núcleo y posteriormente se transloca al citosol. De manera interesante, en la línea celular MCF-10A no hay cambio en la localización de dicha proteína después de los tratamientos, además esta línea celular mostró ser más resistente al cisplatino que las líneas celulares transformadas.

Con estos resultados se concluye que la proteína BIK se localiza en diferentes compartimentos celulares dependiendo del estadio de cáncer y ésta tiene la capacidad de cambiar su localización subcelular en respuesta al estrés oxidante. Ello se asocia con una mayor sensibilidad ante la exposición a agentes tóxicos, creando así nuevas oportunidades para estudiar nuevas blancos terapéuticos que permitan el desarrollo de agentes más activos y menos dañinos.

7. INTRODUCCIÓN

7.1 CÁNCER

Cáncer es el término genérico que agrupa un conjunto de células alteradas con diferentes factores de riesgo, características patológicas y respuestas al tratamiento, que puede afectar cualquier parte del cuerpo. La principal característica del cáncer es el crecimiento descontrolado de células que se han transformado, adquiriendo características que les permiten diferenciarse fenotípica y genotípicamente de una célula normal (WHO, 2015).

El cáncer figura entre las principales causas de morbilidad y mortalidad en todo el mundo, aproximadamente 14 millones de nuevos casos y 8.2 millones de muertes se presentaron en el año 2012 (World Cancer Report, 2014). Las causas más comunes de muerte por cáncer son:

- * Cáncer de Pulmón (1.59 millones de muertes)
- * Cáncer de Hígado (745 000 muertes)
- * Cáncer de Estómago (723 000 muertes)
- * Cáncer de Colon y Recto (694 000 muertes)
- * Cáncer de Mama (521 000 muertes)
- * Cáncer de Esófago (400 000 muertes)

7.2 EPIDEMIOLOGÍA DEL CÁNCER DE MAMA

El cáncer de mama es el segundo tipo de cáncer más común en el mundo, por mucho es el cáncer más frecuente en mujeres. Se han estimado 1.67 millones de nuevos casos diagnosticados tan solo en el año 2012 (25% de todos los canceres).

El cáncer de mama se ubica como la quinta causa de muerte por cáncer en general (522.000 muertes), 15.4% después de cáncer de pulmón (GLOBOCAN, 2012).

En México el cáncer de mama es la segunda causa de muerte por cáncer en mujeres de 20 años y más (15.38 de cada 100,000 mujeres de esta edad) (INEGI, 2014). De esta forma el cáncer es un serio problema de salud pública en México y en el mundo.

7.3 PROGRESIÓN DEL CÁNCER DE MAMA

El cáncer de mama puede originarse con la transformación de una célula (neoplasia) al presentar anomalías genéticas o epigenéticas, iniciándose un proceso de proliferación descontrolada de las células, dando origen al estado de hiperplasia. Cuando las células proliferan en forma desmedida se genera un tumor (displasia) que puede convertirse en cáncer (Figura 1). Las células cancerosas, pueden proliferar lentamente, sin invadir ni infiltrarse a tejidos adyacentes llegando a formar un tumor prominente que desplaza estructuras vecinas, alcanzando un gran tamaño, pero sin desplazarse del lugar de origen (cáncer *in situ*). Este tipo de cáncer con frecuencia se convierte en infiltrante cuando se rompe la membrana basal y se vuelve invasivo (metástasis). El hecho de detectar un tumor en estadios tempranos (antes de ser infiltrante) es importante debido a que su diagnóstico precoz garantiza un mayor tiempo de sobrevivencia, que cuando el cáncer ha comenzado a invadir los tejidos vecinos e inicia su diseminación (Paweletz *et al.*, 2001).

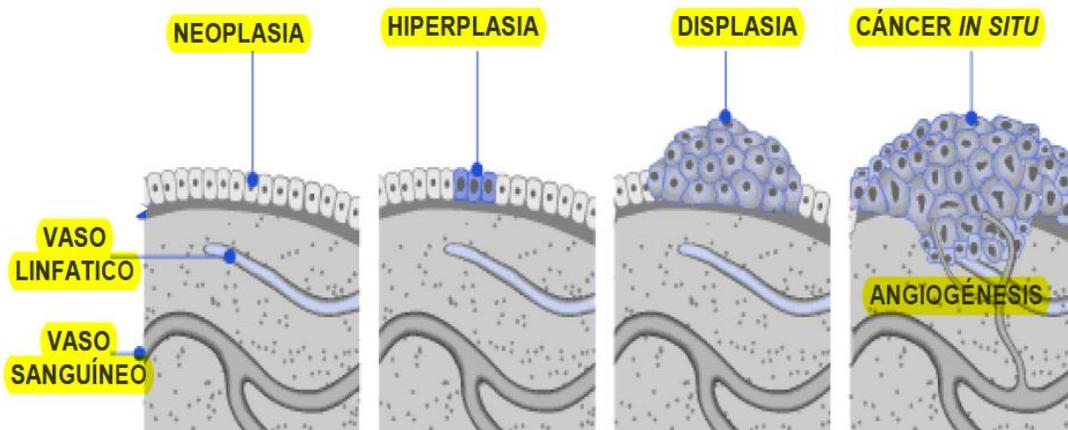


Figura 1. Representación esquemática de la progresión del cáncer. Etapas del cáncer: neoplasia (modificaciones en la expresión génica); hiperplasia (aumento de tamaño y número de células); displasia, (formación de un tumor); cáncer *in situ* y metástasis debido a la formación de nuevos vasos sanguíneos (Tomada de http://www.cancervic.org.au/about-cancer/what_is_cancer.gif).

En el caso del cáncer de mama el siguiente paso es la invasión hacia los ganglios, la mayoría de los casos afectan ganglios axilares, siendo la primera estación de paso linfática hacia otros órganos. En la mayoría de los casos, este ganglio está situado en la región axilar del mismo lado que la glándula mamaria afectada; sin embargo, aunque poco inusual, también puede extenderse a la cadena de ganglios del lado de la vena mamaria interna, que se sitúa a lo largo del borde del esternón; independientemente de cual sea el tipo de evolución local, la progresión por la vía del sistema sanguíneo o linfático, puede dar origen al desprendimiento de células metastásicas, las cuales pueden ser solitarias y migrar a sitios cercanos a la lesión (ganglios axilares) o producirse múltiples metástasis, donde los principales tejidos a donde viajan son hígado, pulmones, huesos y cerebro (Paweletz *et al.*, 2001).

7.4 CÁNCER DE MAMA (CaM)

El cáncer de mama es una enfermedad heterogénea que comprende diferentes características biológicas y comportamientos clínicos (Weigelt *et al.*, 2010, Weigelt y Reis-Filho, 2009; Reis-Filho y Lakhani, 2008; Simpson *et al.*, 2005; Vargo-Gogola y Rosen, 2007). Existen diferentes evidencias que indican que el CaM es de hecho una colección de diferentes enfermedades con diferentes factores de riesgo, presentaciones clínicas, características patológicas y respuesta global al tratamiento. Diversos factores de riesgo han sido asociados al desarrollo de esta neoplasia, tales como nuliparidad, embarazo después de los treinta años, inicio temprano de la menarquia, menopausia a edades tempranas e historia familiar de CaM. En contraste, el embarazo a temprana edad, la menopausia a edades avanzadas y largos periodos de lactancia proveen un efecto protector contra el cáncer de mama (Henderson, Ross y Pike, 1993).

El CaM anatómicamente se origina en los ductos mamarios o conductos galactóforos de la glándula mamaria (Figura 2). A este tipo de cáncer se le conoce como **carcinoma ductal** y suele presentarse en dos formas clínicamente distintas: una es el carcinoma ductal *in situ* cuya lesión se encuentra confinada exclusivamente a los ductos mamarios y el carcinoma ductal invasivo donde se presenta infiltración a otras regiones de la glándula mamaria con proliferación anormal de células neoplásicas. Al tipo de cáncer

que llega a originarse en lobulillos mamarios que secretan la leche a los conductos galactóforos se le conoce como **carcinoma lobulillar** y de igual manera se reconocen dos subtipos; el carcinoma lobulillar *in situ* reconocido como una lesión pre-maligna que incrementa considerablemente el riesgo de cáncer y el carcinoma lobulillar invasivo, el cual presenta infiltración de células neoplásicas en otras partes de la glándula mamaria con el potencial de hacer metástasis a otras regiones del cuerpo (Afonso y Bouwman, 2008).

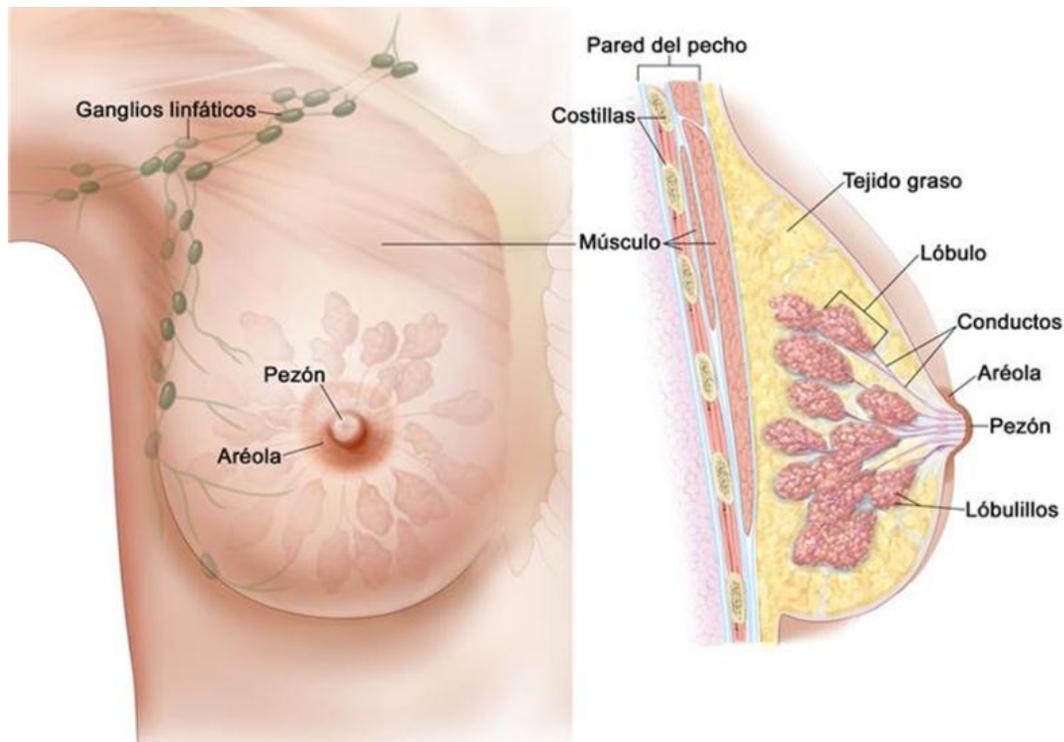


Figura 2. Estructura de la glándula mamaria. El esquema representa la estructura de la glándula mamaria y el sistema de conductos lactíferos (Tomado y modificado de National Cancer Institute, 2015).

7.5 ASPECTOS MOLECULARES DEL CÁNCER DE MAMA

Aunque la histología provee importante información, sin embargo, la heterogeneidad en el CaM ha hecho que esa labor sea realmente difícil (Weigelt y Reis-Filho, 2009; Scarff y Torloni, 1968; Azzopardi *et al.*, 1979; Azzopardi *et al.*, 1982; Huvos *et al.*, 1973; Tavassoli, 1999; Rosen, 2001; Page y Anderson, 1987). Esto ha provocado que la histología sea reemplazada por pruebas moleculares de alta tecnología para el

diagnóstico, pronóstico y predicción del cáncer, ayudando a determinar múltiples subtipos moleculares en la neoplasia (Perou *et al.*, 2000; Sorlie *et al.*, 2001; Sorlie *et al.*, 2003; Hu *et al.*, 2006), los cuales permiten determinar el rumbo que tomará la enfermedad dependiendo de la expresión de determinados genes. Tal es el caso del estrógeno el cual contribuye al desarrollo de esta enfermedad debido a su efecto mitogénico mediado por el receptor de estrógenos alfa (RE α) (Palmieri *et al.*, 2002), la mayoría de los cánceres de seno RE α -positivos son también receptor de progesterona (RP) positivos (Dunnwald *et al.*, 2007). La terapia endocrina impide la unión del estrógeno al RE α , y de la progesterona al RP, reduciendo la mortalidad por CaM. Actualmente, es el principal tratamiento para esta neoplasia (Ariazi *et al.*, 2006; Cleator *et al.*, 2009). Otro factor asociado al CaM es el receptor HER2/neu, una proteína que se encuentra sobreexpresada en algunos tipos de células cancerosas, como las de mama y ovarios (National Cancer Institute, 2015). Asimismo, están implicados un gran número mutaciones en genes, como son los complejos de Fanconi (FANCA-N), PTEN, ATM, BRCA1, BRCA2, CHEK2 y p53 entre otros (Walsh *et al.*, 2006).

De todas las mujeres con CaM, entre el 5-10% presentan una mutación de los genes BRCA1 y BRCA2 en la línea germinal (Blackwood y Weber, 1998). El cálculo de riesgo vitalicio de presentar CaM para las mujeres con mutaciones en estos genes oscila entre el 40-85%. Los hombres portadores de mutaciones del gen BRCA2 también tienen mayor riesgo de presentar cáncer de mama (Peto *et al.*, 1999). Ahora se dispone de pruebas genéticas para detectar mutaciones en miembros de familias con antecedentes de mutación en estos genes, ya que poseen más probabilidad de ser receptores de estrógeno negativos y de tener células cancerosas con alto grado de proliferación, estas dos características implican que la quimioterapia sea más eficaz que la terapia endocrina para tratar este tipo de cáncer (Foulkes, 2006).

En la actualidad, la quimioterapia ha llegado a ser una poderosa herramienta usada como terapia neoadyuvante o adyuvante (Carlson *et al.*, 2006; Arowolo *et al.*, 2013; Jiang *et al.*, 2014). Otras terapias en contra del cáncer incluyen el uso de radiación o agentes biológicos; sin embargo, un gran número de pacientes aún son resistentes a las terapias usadas provocando la progresión de la enfermedad, recaída del cáncer y reducción de supervivencia (Jemal *et al.*, 2007; Victorino *et al.*, 2014). Por lo tanto, es importante

desarrollar nuevos productos quimioterapéuticos que se adapten a las necesidades de cada paciente y aunque existen diferentes mecanismos de acción a cada tratamiento uno de los resultados esperados al usar quimioterapia entre otras cosas es la inducción de apoptosis.

7.6 APOPTOSIS

La apoptosis es un tipo de muerte celular programada el cual juega un importante papel en la homeostasis de tejidos. Se caracteriza por cambios morfológicos tales como la formación de vesículas apoptóticas, contracción celular, condensación nuclear, fragmentación ordenada del ADN genómico, etc. Aunque hay una amplia variedad de estímulos y condiciones tanto fisiológicas como patológicas que pueden desencadenar la apoptosis, no todas las células morirán forzosamente en respuesta al mismo estímulo (Burgess, 2013).

La apoptosis ocurre normalmente durante el desarrollo como un mecanismo homeostático para mantener la población celular en los tejidos. La apoptosis también ocurre como un mecanismo de defensa tal como en las reacciones inmunitarias o cuando las células son dañadas por agentes patógenos o nocivos (Norbury y Hickson, 2001). En organismos multicelulares, el número total de células es el resultado entre los efectos mitóticos que generarán más células y la muerte celular que es inducida a través de la apoptosis. La idea de que el desarrollo y progresión tumoral puede ser influenciada por la apoptosis se remonta al trabajo de Kerr, Wyllie y Currie en el año de 1972 donde demuestran que la tasa de crecimiento de los tumores es menor que la predicha, esto como resultado de los altos niveles de apoptosis dentro de algunas células del tumor (Kerr, Wyllie y Currie, 1972).

Existen dos rutas principales a través de las cuales se puede inducir apoptosis en la célula: i) la ruta extrínseca que se basa en los receptores de muerte, en la que participan determinados miembros de la familia de receptores del factor de necrosis tumoral (TNF-R) y otros, y ii) la intrínseca, inducida por diferentes formas de estrés celular, como puede ser la privación de factores de crecimiento en el medio, pérdida de adhesión, daño al ADN, estrés en el RE, activación de oncogenes, infección viral, radiaciones ionizantes, radiaciones ultravioleta, etc. (Figura 3).

La **vía extrínseca** se inicia por la unión de ligandos de muerte como el ligando Fas (FasL), el ligando inductor de apoptosis relacionado a TNF (TRAIL) y TNF α , a receptores de la superfamilia de receptores TNF o receptores FAS. Esta interacción es seguida por el ensamble del complejo de señalización inductor de muerte (DISC) el cual consiste del dominio de muerte asociado a la proteína FAS (FADD) o bien del dominio de muerte asociado al receptor de TNF y a su vez a la procaspasa 8/10. DISC activa efectores cascada abajo (caspasas 3, 6 y 7) o directamente induce la muerte celular mediante escindir al miembro de la familia BCL-2, Bid convirtiéndolo en Bid truncado (tBid) para activar la vía intrínseca mitocondrial (Verbrugge *et al.*, 2010).

La **vía intrínseca** puede ser vía mitocondrial o bien vía del retículo endoplásmico. En el caso de la vía mitocondrial, es activada por varios estímulos intracelulares ya mencionados. La familia de genes BCL-2 es una de las que preferentemente participa y regula esta vía. Dicha familia de genes es un grupo heterogéneo, que codifica para una serie de proteínas que gobiernan la permeabilidad de la membrana mitocondrial externa, permitiendo así el paso de moléculas solubles que difunden al citosol. Estas moléculas tienen como fin provocar una cascada de señalización que induce a la célula entrar en apoptosis. Esta familia ha sido ampliamente estudiada y sus miembros han sido clasificados en anti-apoptóticos y pro-apoptóticos (Yang y Korsmeyer, 1996; Chipuk *et al.*, 2010; Czabotar *et al.*, 2014). Así mismo, es bien sabido que algunos miembros de esta familia cambian su expresión directamente o indirectamente por agentes antineoplásicos (Kontos *et al.*, 2014). De las moléculas mitocondriales que salen al citosol, la más estudiada es el citocromo c, que forma el complejo llamado apoptosoma, que es un heptámero compuesto de siete moléculas de cada uno de los siguientes componentes: la procaspasa 9, APAF-1 (Apoptosis protease-activating factor-1) y citocromo c, que a su vez activa a la caspasa efectora 3 para que lleve a cabo el programa de muerte.

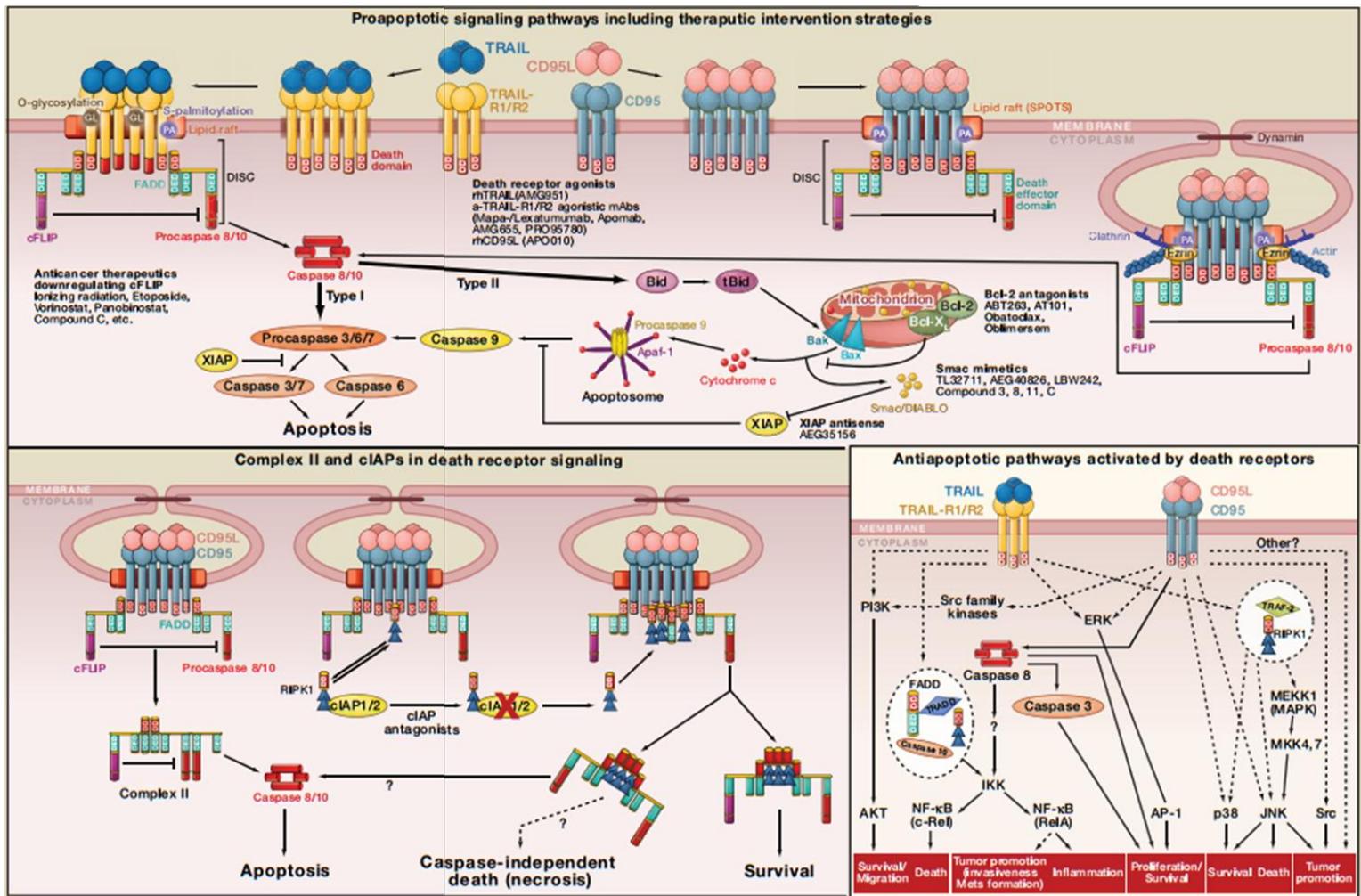


Figura 3. Ruta de señalización de inducción de apoptosis. Cascada de señalización de las dos vías de inducción a apoptosis. Vía extrínseca o de receptores de muerte y la vía intrínseca o mitocondrial (Tomado de Verbrugge *et al.*, 2010).

7.7 LA FAMILIA BCL-2

Las proteínas de la familia Bcl-2 son los principales reguladores de la apoptosis vía mitocondrial y son esenciales en la homeostasis tisular y la maduración de las células sanguíneas (Strasser *et al.*, 2011). Esta familia se clasifica de acuerdo a su funcionalidad como pro-apoptóticas o anti-apoptóticas; sin embargo, también son clasificadas con base en el número de dominios BH (Dominio de homología a BCL-2) que comparten.

La subfamilia de proteínas anti-apoptóticas incluye a miembros como BCL-2, BCL-xL, BCL-w, MCL-1 y A1/BFL-1, las cuales inhiben la muerte celular a través de interacción directa con los miembros pro-apoptóticos; este grupo de miembros posee cuatro dominios del tipo BH (BH 1-4) (Chipuk *et al.*, 2010). Por su parte, el grupo de las proteínas

pro-apoptóticas pueden subdividirse en dos grupos; el primero incluye a las proteínas Bax, Bak y Bok conteniendo tres dominios BH 1-3. Este grupo de proteínas pro-apoptóticas también conocidas como ejecutores presentan la capacidad de formar heterodímeros con el grupo de proteínas anti-apoptóticas y participan directamente en la permeabilización de la membrana interna mitocondrial (MOM) dejando salir a moléculas como el citocromo c. Esto sugiere que uno de los mecanismos por el cual los miembros de la familia BCL-2 regulan la apoptosis puede ser mediante la formación de heterodímeros con las proteínas anti-apoptóticas (Giam, Huang y Bouillet, 2009). De esta manera al formarse estos complejos las propiedades de ambas proteínas se antagonizan.

El segundo subgrupo de las proteínas pro-apoptóticas son los encargados de detectar los diferentes tipos de estrés en la células e iniciar la apoptosis. Las proteínas BH3-only se han clasificado como sensibilizadores/derepresores, tales como Noxa, Bid, Bad, BNIP3, Bmf, Bim, EG1-1 y Bik, todas estas se caracterizan por poseer un solo dominio del tipo BH3, por lo que se les ha llamado “BH3 Only” (Figura 4). Estas proteínas únicamente pueden interactuar con miembros pro-supervivencia y antagonizar su función al igual que con los activadores directos tales como Bid y Bim los cuales adicionalmente tienen la habilidad para directamente activar a Bax y Bak. Bajo condiciones normales, las proteínas BH3-only están inactivas o en bajas concentraciones en la célula y en presencia de un estímulo apoptótico son activadas por modificaciones post-traduccionales o su expresión es incrementada para inducir apoptosis (Shamas *et al.*, 2011). Como resultado de la estimulación de BH3-only, Bax y Bak se activan. Se ha observado que después de su activación durante la apoptosis, Bak se transloca del citosol a la membrana MOM (Hsu *et al.*, 1997). Una vez ahí, Bax y Bak, que están constitutivamente unidos a la MOM, cambian su conformación insertándose a la membrana interna, se oligomerizan e inducen la liberación de citocromo c (Lovell *et al.*, 2008; Eskes *et al.*, 2000; Korsmeyer *et al.*, 2000; Llambi *et al.*, 2011). Cabe destacar que algunos miembros anti-apoptóticos se trasladan e insertan en la MOM bajo estimulación apoptótica (Hsu *et al.*, 1997; Dlugosz *et al.*, 2006). En este escenario, la proteína Bcl-2 inhibe la permeabilización de la MOM por interacciones directas con los miembros pro-apoptóticos.

Las proteínas BH-3 han sido ampliamente estudiadas debido a las funciones fisiológicas y patológicas en las que se han visto involucradas enfermedades tales como, desordenes autoinmunes, infecciosas, neurodegenerativas y cáncer.

Algunos miembros de esta familia también son capaces de modificar su localización subcelular al responder de forma directa o indirecta a agentes antineoplásicos lo cual les confiere funciones adicionales en otros procesos celulares tales como morfología mitocondrial y metabolismo, los cuales permaneces sin explorar a la totalidad (Martinou y Youle, 2011; Lin *et al.*, 2004; Kontos *et al.*, 2014). Asimismo, se ha descrito que BCL-2 incrementa su expresión como respuesta a la inducción de estrés oxidante (Luna-López *et al.*, 2010). Uno de los miembros de esta familia, Bik el cual tiene función anti-apoptótica, se ha reportado sobre-expresado en cáncer de pulmón y mama (García *et al.*, 2005; Lu *et al.*, 2006). La inducción de la expresión de Bik por el factor de transcripción p53 o por el factor embrionario tirotrófico (TEF) en respuesta al estrés oxidativo ha sido reportado (Ritchie *et al.*, 2009). De tal forma que es importante determinar si BIK es susceptible a cambiar su localización debido a la exposición de estrés oxidante inducido por quimioterapia.

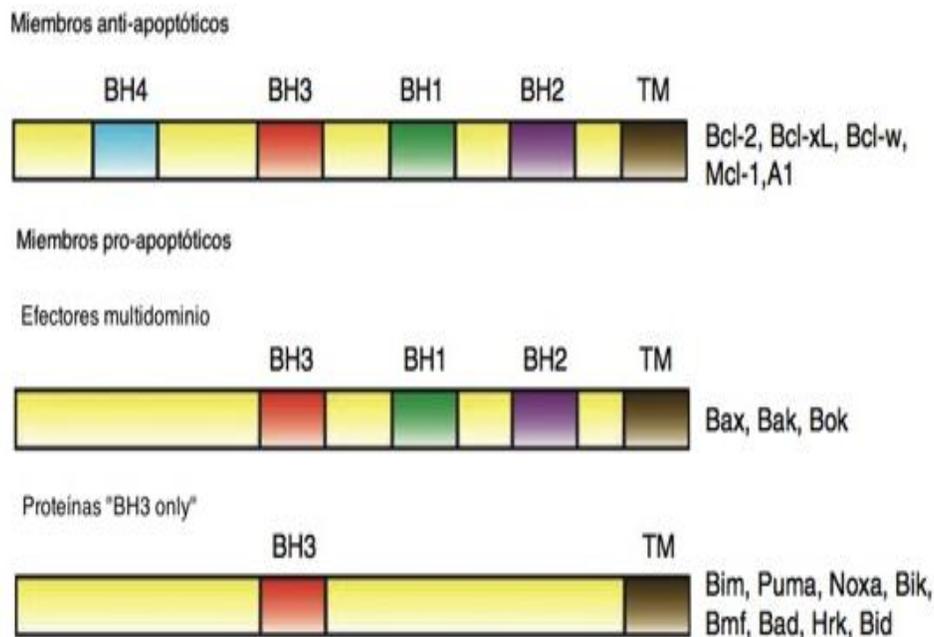


Figura 4. Estructura de los miembros de la familia BCL-2. Los diferentes dominios BH 1-4 están marcados con un color diferente, mientras que el dominio transmembranal (TM) se encuentra en color café (Tomado y modificado de Giam, Huang y Bouillet, 2009).

7.8 BIK(Bcl2-Interacting Killer)

BIK, acrónimo de BCL-2 interacting killer, fue el primer miembro descubierto de las proteínas pro-apoptóticas “BH3 only” (Boyd *et al.*, 1994). El gen que en humanos codifica para la proteína BIK se encuentra ubicado en el cromosoma 22q13.3, consta de 5 exones y 4 intrones extendiéndose aproximadamente por 19 kb. La proteína humana BIK está conformada de aproximadamente 160 residuos de aminoácidos, contiene un dominio N-terminal transmembranal y un dominio del tipo BH3 (McDonnell *et al.*, 1999). El análisis de la secuencia del genoma ha predicho la existencia de una isoforma más larga de aproximadamente 202 aminoácidos. Sin embargo, la existencia de dicha isoforma sigue sin confirmarse hasta la fecha. El modelaje computacional de la estructura secundaria de la proteína sugiere que BIK está compuesta de seis alfa hélices con su respectivo dominio BH3 expuesto (McDonnell *et al.*, 1999). Estudios de mutagénesis sitio-dirigida han demostrado que este dominio tipo BH3 es crucial para la actividad apoptótica de la proteína (Figura 5) (Chittenden *et al.*, 1995). En cuanto al dominio transmembranal que presenta la proteína, ha mostrado ser dispensable para la actividad apoptótica al menos en condiciones de sobreexpresión transitoria de BIK en modelos celulares (Elangovan y Chinnadurai, 1997). Se ha reportado fosforilaciones en la proteína humana BIK en los residuos de Thr(33) y Ser(35) por la acción de una casein-cinasa tipo II. En experimentos donde se reprime la fosforilación en estos sitios se observa una disminución en la apoptosis y también en la interacción de BIK con otras proteínas anti-apoptóticas (Verma, 2000) lo que indica que estas modificaciones postraduccionales potencian la actividad pro-apoptótica de BIK.

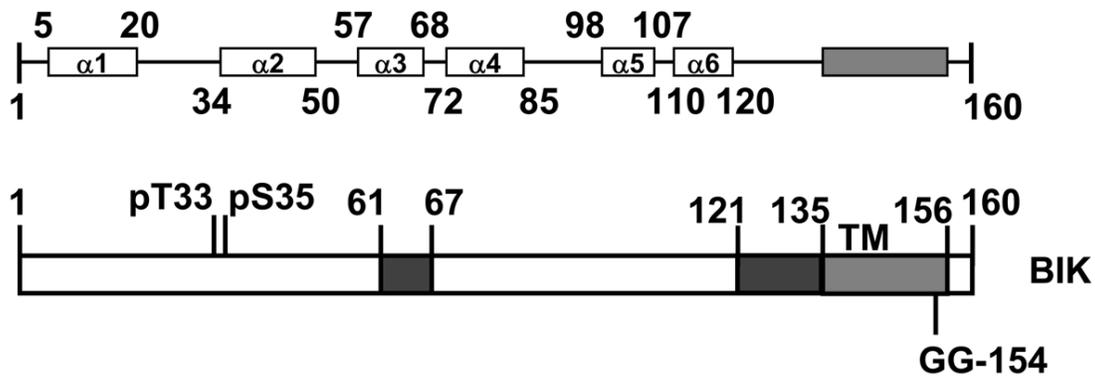


Figura 5. Estructura secundaria de la proteína Bik. La región $\alpha 3$ abarca el dominio BH3, El dominio C-terminal es requerido para su máxima actividad pro-apoptótica además de la fosforilación en los sitios Thr(33) y Ser(35) (Imagen modificada de Chinnadurai *et al.*, 2008)

Su localización celular se ha reportado principalmente a nivel del RE, sin embargo también se ha detectado presencia de BIK en mitocondria (Han, Sabbatini y White, 1996). En cuanto a la regulación a nivel de proteína, se sabe que la degradación vía proteosoma es el método más común para controlar los niveles de la proteína (Zhu *et al.*, 2005). La expresión de BIK conduce a la apoptosis en una gran variedad de células de mamífero, el mecanismo mediante el cual induce la apoptosis ha sido investigado principalmente en células tumorales de origen epitelial por diversos grupos. Sobreexpresión de la proteína humana BIK mediante vectores de adenovirus ha revelado que la apoptosis mediada por BIK involucra la activación de la caspasa 9 y liberación de citocromo c por parte de la mitocondria (Tong *et al.*, 2001). El mecanismo de muerte en células epiteliales normales se ha refinado gracias a una serie de experimentos que han mostrado que la proteína BIK presente en el RE induce la apoptosis mediante la liberación de Calcio²⁺ (Ca²⁺). El mecanismo consiste en la respuesta a un estímulo como puede ser estrés genotóxico, radiaciones, infecciones virales y sobreexpresión de algunos genes como p53 y E2F entre otros la célula activa la transcripción del gen BIK. Cuando los niveles de proteína BIK son lo suficientemente elevados esta proteína forma dímeros con proteínas anti-apoptóticas como BCL-2 y BCL-xL. Estas últimas dos proteínas se caracterizan por inhibir a las proteínas efectoras de la apoptosis BAX y BAK las cuales una vez liberadas gracias a la proteína BIK inducen un aumento en la concentración de Ca²⁺ intracelular ya son capaces de insertarse en la membrana del RE y la mitocondria formando poros y alterando la

permeabilidad de ambos organelos. La proteína BIK, también promueve el reclutamiento de la proteína DRP1 desde el citosol a la mitocondria, así como el remodelamiento de las crestas de la membrana mitocondrial interna (Figura 6) (Germain *et al.*, 2005), y la fisión mitocondrial, lo que provoca la liberación de citocromo c al espacio citoplasmático y termina por activar a la caspasa-9 y formando el apoptosoma, estableciendo las bases moleculares para que se desencadene el resto apoptótico MCL-1 por parte de NOXA (Willis y Adams, 2005).

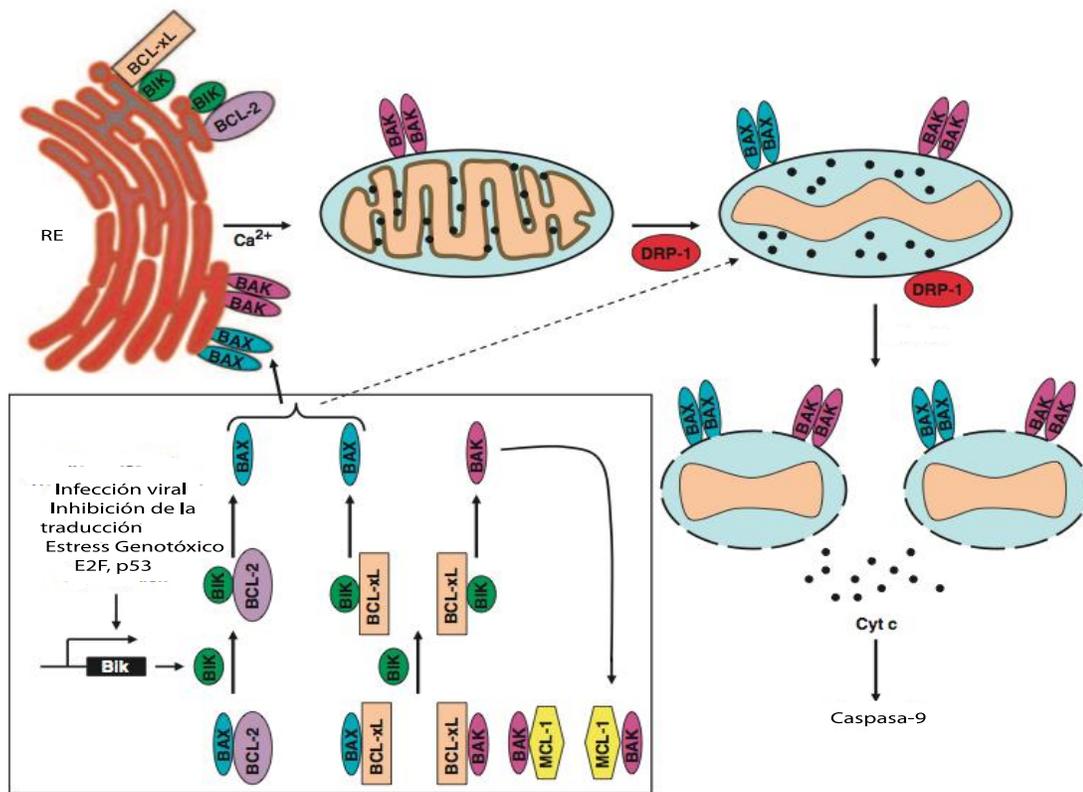


Figura 6. Mecanismo de apoptosis mediado por BIK (Tomado y modificado de Chinnadurai, Vijayalingam y Rashmi, 2008).

Se ha reportado que BIK está involucrado en etapas del desarrollo como la formación testicular y la espermatogénesis en donde la apoptosis juega un papel muy importante (Coultas *et al.*, 2005). Las propiedades pro-apoptóticas de esta proteína se han relacionado a homeostasis tisular, inmunidad y supresión tumoral al igual que otros miembros de la familia Bcl-2 que comparten el dominio BH3 (Willis y Adams, 2005). Se

ha reportado de igual forma que la proteína BIK es capaz de inhibir la translocación de las cinasas activas ERK1/2 desde el citoplasma al núcleo en cultivos de células de epitelio de ratón cuando éstas son inducidas a apoptosis por medio de Interferón gamma (IFN γ) (Mebratu *et al.*, 2008). Lo anterior demuestra que BIK tiene más de un mecanismo para promover la apoptosis. Existen diversos reportes que sugieren que *bik* podría servir como un gen supresor de tumores en tejidos específicos. *Bik* ha mostrado tener una alta expresión en tejido epitelial de riñón sano, mientras que en carcinomas renales la expresión del gen *bik* ha sido inactivada por pérdida de la heterocigosidad en el locus de *bik* o por silenciamiento epigenético de su promotor a través de metilación (Sturm *et al.*, 2005). Análisis genómicos en gliomas humanos han identificado un segmento deletado en el cromosoma 22q que abarca el locus de *bik* (Bredel *et al.*, 2005). Pequeñas deleciones cromosómicas en la región del locus *bik* también han sido documentadas en casos de cáncer colorrectal (Castells *et al.*, 1999) y en cánceres de cabeza y cuello (Reis *et al.*, 2002). El gen *bik* se ha encontrado frecuentemente mutado en linfomas de células B (Arena *et al.*, 2003). Un estudio de microarreglos mostró un cambio en la expresión de ARNm de *bik* entre 350 genes relacionados a apoptosis en líneas celulares humanas cancerosas de pulmón, próstata y riñón que fueron tratadas con un inhibidor de la DNTM1 la 5'-Aza-2'-Deoxicidina y un inhibidor de las desacetilasas de histonas el depsipeptido (Dai *et al.*, 2006). Diversos reportes han mostrado que en células cancerosas que expresan constitutivamente ARNm de *bik*, la proteína es marcada activamente y degradada por la maquinaria del proteosoma (Marshansky *et al.*, 2001).

Las evidencias aquí expuestas reforzarían la idea de que *bik* posee una actividad de supresor de tumores. Sin embargo, paradójicamente se ha observado la sobre-expresión de *bik* en adenocarcinomas mamarios (García *et al.*, 2005) y también un mal pronóstico en cáncer de pulmón de células no pequeñas se ha relacionado con la alta expresión de *bik* (Lu *et al.*, 2006). Debido a la controversia que supone que *bik* esté sobreexpresado en algunos cánceres mientras que en otros modelos se suprime su actividad apoptótica, ha dado pie a que se estudie más a como está regulado tanto el gen como la proteína.

7.9 OTRAS FUNCIONES DE LA FAMILIA BCL-2.

La familia de los reguladores de la muerte celular, BCL-2 constituyen un punto crítico en la regulación de la apoptosis (Danial *et al.*, 2008; Youle y Strasser, 2008). A pesar de que estas proteínas son conocidas por su control en la apoptosis, algunos miembros de esta familia tienen papeles fisiológicos diferentes a la apoptosis, incluyendo funciones en el metabolismo de nutrientes.

Hay fuerte evidencia que sugiere que las proteínas con el dominio BH3 están involucradas en funciones vitales celulares más allá de su papel en la apoptosis (Hetz y Glimcher, 2008). El mejor ejemplo de esto es BAD, el cual fue reportado por jugar un papel en la progresión del ciclo celular a través de la dimerización con BCL-xL evitando el arresto de la transición G0/G1 (Chattopadhyay *et al.*, 2001). En otro estudio diferente, la sobreexpresión de BAD se asoció al aumento de la progresión del ciclo celular y la producción de interleucina 2 después de la activación de células T, como consecuencia de la regulación de Akt/BAD en células T primarias (Mok *et al.*, 1999).

Danial *et al.*, (2008), informaron un nuevo papel fisiológico de la proteína pro-apoptótica BAD. Esta proteína reside en un complejo que contiene la enzima glucocinasa la cual regula la glucosa impulsada por la respiración mitocondrial. Hay evidencia genética de otro papel fisiológico de BAD en la secreción de insulina estimulada por la glucosa por parte de las células β -pancreáticas. Esta nueva función depende específicamente de la fosforilación de su secuencia BH3, previamente definida como un dominio de muerte esencial. El dominio BH3 alterna entre la función apoptótica y metabólica dependiendo del estado de fosforilación. La fosforilación en la Ser155 inactiva la función pro-apoptótica de BAD y es requerida para su control en la secreción de insulina estimulada por glucosa (Danial *et al.*, 2008). En el cerebro, BAD está presente en varias localizaciones anatómicas, incluyendo áreas que son fundamentales para detectar nutrientes y la regulación de la glucosa (Bu y Lephart, 2005). Usando una combinación de herramientas genéticas, incluyendo ratones deficientes de BAD y experimentos de ARN de interferencia, se determinó el papel de BAD en el control de las respuestas hormonales reguladoras y la respuesta a la privación de alimento. Esto sugiere que la función de BAD en el cerebro es requerida para la detección de la hipoglucemia y el inicio de la respuesta hormonal a partir

de la privación de alimento y la iniciación de respuesta hormonal (Osundiji *et al.*, 2011).

Otro ejemplo de esto es la proteína pro-apoptótica BID, a la que se le ha descubierto otra función fisiológica como mediador crítico de la inflamación e inmunidad innata. La inmunidad innata es una respuesta de defensa fundamental que depende de receptores con patrones de reconocimiento conservados para detectar señales de peligro o infecciones (Garrett, Gordon y Glimcher, 2010; Takeuchi y Akira, 2010). Proteínas con dominios de oligomerización y unión a nucleótidos (NOD), son receptores con patrones de reconocimiento citosólicos de suma importancia en el intestino, y su desregulación es asociada con inflamación del intestino. Yeretssian y cols. (2011) usaron datos de experimentos de RNA de interferencia y buscaron en todo el genoma para identificar genes candidatos que modulan la respuesta inflamatoria en células epiteliales del intestino. Sus resultados revelaron una correlación significativa entre la inmunidad innata y la apoptosis, identificando a la proteína BID como un componente crítico en la respuesta inflamatoria. Colonocitos con BID deletado o macrófagos de ratón con *bid* *-/-* fueron marcadamente defectuosos en la producción de citocinas en respuesta a la activación de NOD, demostrando cómo es que esta proteína es el centro de la decisión celular para inducir respuesta inmune innata (y sobrevivir) o por inducir muerte celular por apoptosis. Ellos anticiparon que el desarrollo de pequeñas moléculas blanco sería el escenario para emerger nuevas estrategias en el tratamiento de enfermedades inflamatorias (Yeretssian *et al.*, 2011).

Asimismo, BID puede estar implicado en la transferencia de lípidos entre la mitocondria y otras membranas celulares sugiriendo que BID puede estar involucrado en el transporte y reciclaje de los fosfolípidos mitocondriales (Esposti *et al.*, 2001). BNIP1 mostró participación en la organización y biogénesis del RE mediante la fusión de la membrana como un componente del complejo del receptor de proteínas SNAP (SNARE) (Nakajima *et al.*, 2004). De manera interesante, el dominio BH3 de la proteína pro-apoptótica BNIP1 fue importante para la unión a SNAP- α , un adaptador que sirve de unión entre la chaperona ATPasa, NSF y SNAREs (Nakajima *et al.*, 2004).

Por otro lado, las caspasas son proteasas de cisteína que median la apoptosis. En el sistema nervioso maduro, las caspasas no solo están involucradas en la mediación de la muerte celular sino también en eventos reguladores que son importantes para las funciones

neurales, tales como la poda de los axones y la eliminación de las sinapsis, los cuales son necesarios para refinar la maduración de circuitos neuronales. Más aún, las caspasas pueden ser reactivadas para causar muerte celular así como también numerosos cambios no letales en las neuronas durante numerosos procesos patológicos. Así, aunque una activación global de caspasas conduce a apoptosis, una activación restringida y localizada activación controlar la fisiología normal y la patofisiología en las neuronas vivas (Hyman y Yuan, 2012).

7.10 APOPTOSIS Y ESTRÉS OXIDANTE

Una de las causas para desencadenar la muerte celular es el estrés oxidante, esto ha sido relacionado desde el momento que fue posible evaluar la presencia de metabolitos oxidados. El estrés oxidante ahora se reconoce como el disparador de la muerte celular, en particular la muerte por apoptosis. En algunos casos incluso, ha mostrado ser un elemento indispensable durante la fase de activación del programa de muerte. En especial los sistemas que generan (NO^\bullet) y las NADPH oxidasa que generan superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2) forman parte del repertorio de señales responsables de iniciar y/o modular positivamente la activación de diversos procesos de muerte celular como lo es la apoptosis (Königsberg *et al.*, 2008). Mientras que pequeñas fluctuaciones en la concentración de radicales libres juegan un importante papel en la señalización intracelular en la fisiología normal de la célula (Drogue, 2002), el incremento descontrolado en la generación de radicales libres excede la capacidad del mecanismo antioxidante para defender en contra de ellos lo cual resulta en daño a lípidos, proteínas y ADN producido por estrés oxidante (Bayir y Kagan, 2008). El estrés conduce la activación de miembros pro-apoptóticos como BAX o BAK (Brunelle y Letai, 2009; Lalier *et al.*, 2007; Chipuk y Green, 2008; Khoury y Greenwood, 2008). La translocación de BAX/BAK causa producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) en la mitocondria (Jiang *et al.*, 2008; Kirkland *et al.*, 2001). Una vez que Bax activo es reclutado a la mitocondria forma poros que permiten liberar citocromo c, el cual conduce a la formación del apoptosoma. Esto sirve para iniciar la cascada de señalización apoptótica, la permeabilización de la membrana externa mitocondrial es considerada el punto de no retorno para la muerte

celular programada debido a la liberación de ambas caspasas, iniciadoras y efectoras además de liberación de citocromo c (Figura 7) (Pourova *et al.*, 2010; Orrenius *et al.*, 2007).

7.11 ESTRÉS OXIDANTE Y RADICALES LIBRES

El término “estrés oxidante”, popularizado por Helmut Sies se define como una alteración en el balance pro-oxidante/antioxidante a favor de los primeros, dando lugar a posible daño a biomoléculas (Sies H y Cadenas E, 1985). El estrés oxidante, o más bien el exceso de radicales libres (RL), en relación con las defensas antioxidantes está involucrado en mayor o menor grado en la patogénesis de múltiples enfermedades y en el envejecimiento (de Murcia *et al.*, 1997; Ritcher *et al.*, 1995; Ames *et al.*, 1983).

Los radicales libres (RL) (Tabla 1) pueden ser definidos como especies químicas, moléculas o átomos, capaces de existir independientemente, con uno o más electrones desapareados en su última capa u orbital electrónico, es decir, con un número impar de electrones (Halliwell *et al.*, 1992; Cheeseman *et al.*, 1993). La existencia del electrón desapareado, es lo que le confiere la alta reactividad con gran cantidad de moléculas biológicas (lípidos, proteínas, ácidos nucleicos, etc.), ya que tiende rápidamente a ganar un electrón para conseguir así una conformación estable y esto hace que su vida media sea muy corta. Como consecuencia de la formación continua de RL, debe existir en el organismo un adecuado sistema no sólo de defensa antioxidante sino también de reparación estrecha con algunas patologías tales como diabetes, artritis reumatoide, cáncer, etc.

Todos los microorganismos aerobios utilizan el oxígeno molecular (dioxígeno) durante la respiración para la obtención de energía, sin embargo el oxígeno molecular tiene una configuración electrónica única y es por sí mismo considerado un radical, por lo que los RL derivados del oxígeno son considerados los radicales producidos por los seres vivos más importantes (Miller *et al.*, 1990). Las especies reactivas de oxígeno (ROS) son ubicuas, altamente reactivas, de tiempo de vida media muy corto, son generadas constantemente dentro de las células de mamíferos, por efectos exógenos y endógenos, como por ejemplo durante la respiración en específico durante la cadena respiratoria mitocondrial.

Las ROS incluyen al radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), al radical hidroxilo (OH^{\bullet}) y al peróxido de hidrógeno (H_2O_2). El superóxido es generado dentro de la mitocondria y subsecuentemente reducido a peróxido de hidrógeno, pero también puede formarse radical hidroxilo vía la reacción de Fenton (Figura 9). Las ROS dañan al ADN produciendo mutaciones que inician tumores y sostienen la progresión del cáncer (Wiseman y Halliwell, 1996). El papel de las ROS en cáncer de mama no se limita únicamente a mutaciones tempranas. Las células tumorales se encuentran persistentemente bajo estrés oxidante (Szatrowski y Nathan, 1991).

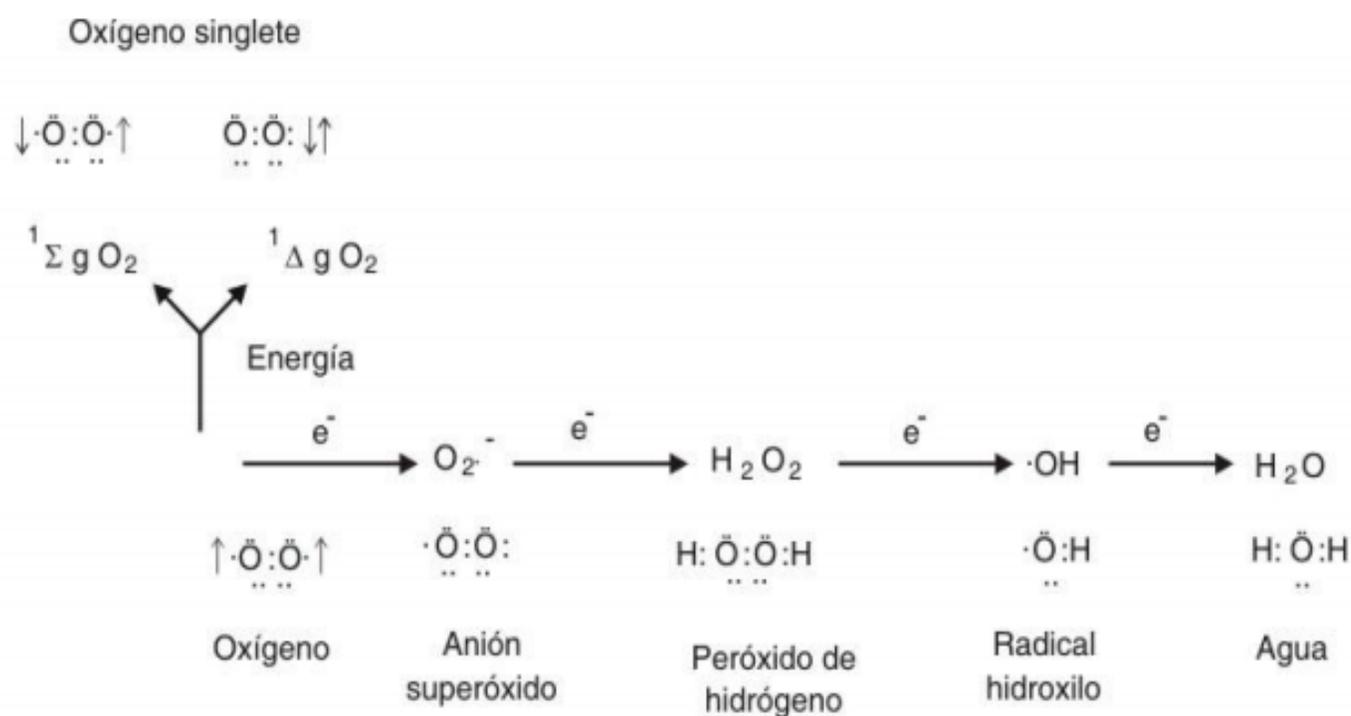


Figura 7. Formación de las especies de oxígeno reactivo.

Además habría que considerar entre las ROS a las especies reactivas de nitrógeno (RNS), que poseen tanto átomos de oxígeno como de nitrógeno, e incluyen al óxido nítrico (NO) y al radical peroxinitrito ($ONOO^{\bullet}$) entre las más importantes. Las ROS también participan en diferentes procesos biológicos como en el funcionamiento de los tejidos vasculares. Las ROS/RNS han sido consideradas dañinas por su reactividad, sin embargo,

bajos niveles de estas son necesarias para que se lleven a cabo diferentes procesos bioquímicos, entre los que se encuentran la señalización intracelular, la diferenciación, el control del ciclo, la apoptosis, el sistema inmune, la defensa contra los microorganismos, etc. (Ghosh, 1998; Tohyama y Yamamura, 2004; Bae *et al.*, 1997; Lee *et al.*, 1998).

Tabla 1. Especies reactivas de oxígeno (ROS) y de nitrógeno (RNS) (Tomado de Kandaswami y Middleton, 1994).

| Especies reactivas de oxígeno (ROS) | Radicales | Norradicales |
|---------------------------------------|---|---|
| Especies reactivas de nitrógeno (RNS) | <ul style="list-style-type: none"> ▪ Superóxido ($O_2^{\cdot-}$) ▪ Hidroxilo (OH^{\cdot}) ▪ Peroxilo (RO_2^{\cdot}) ▪ Alcoxilo (RO^{\cdot}) ▪ Hidroperoxilo (HO_2^{\cdot}) | <ul style="list-style-type: none"> ▪ Peróxido de Hidrógeno (H_2O_2) ▪ Ácido hipocloroso ($HOCl$) ▪ Ozono (O_3) ▪ Oxígeno singlete (1O_2) |
| | <ul style="list-style-type: none"> ▪ Óxido nítrico (NO^{\cdot}) ▪ Dióxido de nitrógeno (NO_2) ▪ Anión nitroxilo (NO^-) ▪ Peroxinitrito ($ONOOH$) ▪ Alquil peroxinitrito ($ROONO$) | <ul style="list-style-type: none"> ▪ Ácido nitroso (HNO_2) ▪ Catión nitrosilo (NO^+) |

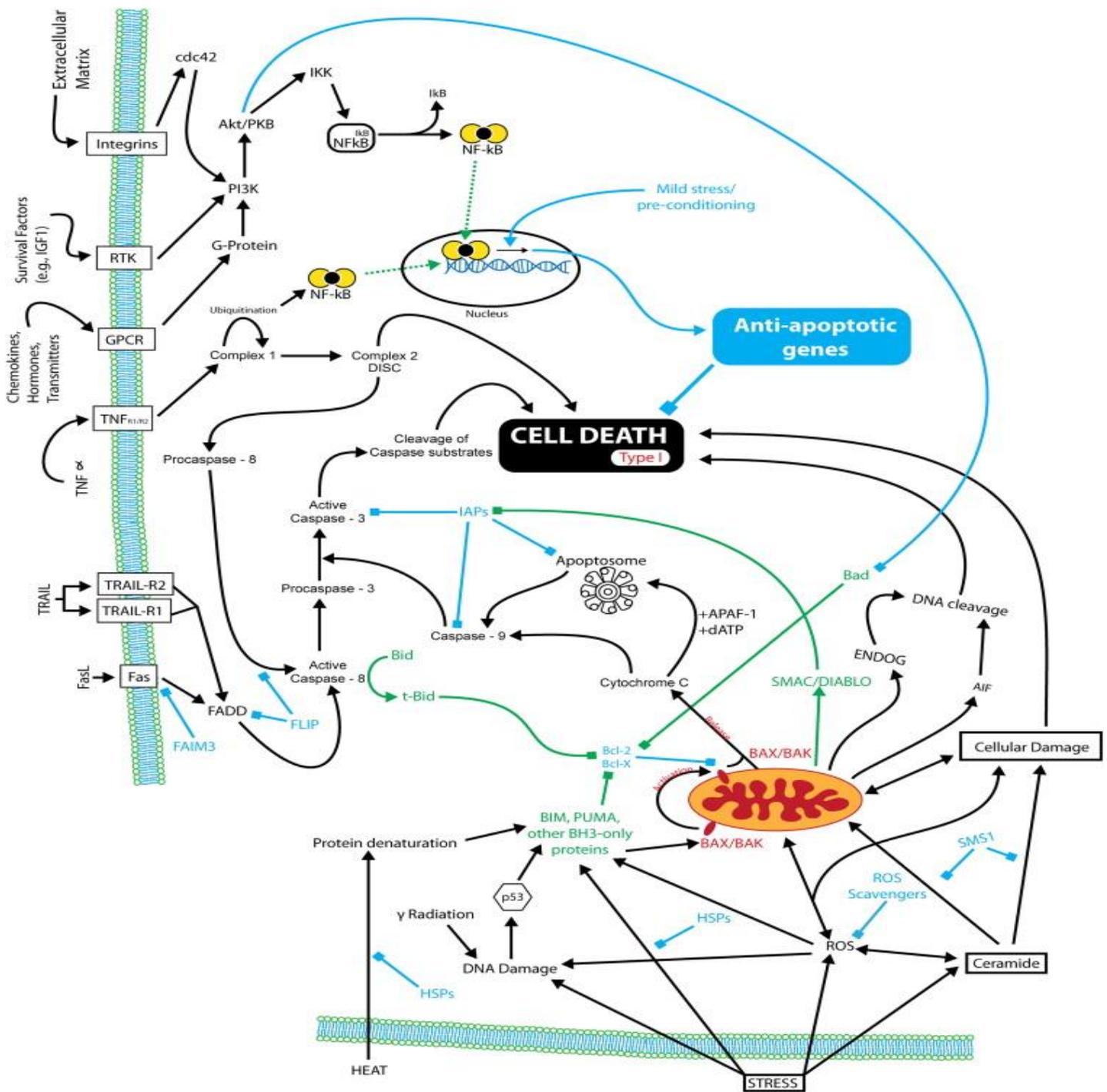


Figura 8. Representación esquemática de las vías celulares de apoptosis. Se muestra en azul las proteínas que promueven la sobrevivencia. El óvalo vacío representa el núcleo. La muerte celular y los genes anti-apoptóticos se muestran en los recuadros negros y azules respectivamente. La vía intrínseca es desencadenada por una variedad de estímulos incluyendo el estrés, el cual conduce a la activación de Bax (vía activación de proteína BH3 only), la activación de ROS sirve como segundos mensajeros que converge en la mitocondria. Esto conduce a la liberación de citocromo c, endonucleasa G (Endo G) y factor inductor de apoptosis (AIF). El citocromo c se combina con la pro-caspasa 9, APAF-1 y dATP para formar el apoptosoma que conduce a la muerte celular vía activación de la cascada de caspasas. La vía extrínseca es debido a la activación de la misma cascada de caspasas que la forma intrínseca pero en este caso son activadas por TNF, TRAIL y FasL. La unión entre estas dos vías se da mediante la activación de la proteína BH3, Bid en la forma activa, Bid truncado (Bidt) (Tomado y modificado de Portt *et al.*, 2011).

7.12 PRODUCCIÓN DE ROS POR LA CADENA DE TRANSPORTE DE ELECTRONES (CADENA RESPIRATORIA)

La generación de ROS a nivel mitocondrial es una consecuencia del proceso conocido como fosforilación oxidativa, mecanismo que permite la generación del ATP necesario para la mayoría de los procesos celulares de forma acoplada al consumo de oxígeno y a la producción de CO₂ (Saraste, 1999). Este proceso tiene lugar mediante el transporte de electrones desde el NADH o el FADH₂ al oxígeno molecular a través de una serie de transportadores situados en la membrana mitocondrial interna que constituyen lo que se conoce como cadena de transporte electrónico mitocondrial (CTE). En la Figura 8 se muestra un esquema del flujo de electrones a través de la CTE. El NADH y el FADH₂ procedentes del metabolismo celular donan electrones derivados de la oxidación de distintos sustratos al complejo I ó II de la CTE, respectivamente. A continuación los electrones pasan al siguiente aceptor, la coenzima Q (CoQ), que a su vez los dona al citocromo b en el complejo III. De allí se transfieren sucesivamente al citocromo c1 y al citocromo c. Éste a su vez reduce al citocromo a₃ (citocromo oxidasa) en el complejo IV, que finalmente reduce el oxígeno molecular para formar agua. Durante este proceso, y a medida que los electrones se mueven a lo largo de la CTE, un determinado número de protones (≈ 10 H⁺ por cada 2 electrones que se transfieren del NADH al oxígeno) son eyectados desde la matriz mitocondrial al espacio intermembrana por los componentes I, III y IV de la cadena de transporte electrónico, lo que establece un gradiente de protones a través de la membrana mitocondrial interna. La energía conservada en este gradiente es utilizada por la ATP sintasa situada en dicha membrana para sintetizar ATP a partir de ADP y fosfato inorgánico (P_i) al tiempo que se disipa el gradiente generado, volviendo los protones a la matriz mitocondrial desde el espacio intermembrana (Balaban *et al.*, 2005; Krauss *et al.*, 2005).

En distintos puntos de la cadena de transporte electrónico electrones derivados del NADH o el FADH₂ pueden reaccionar directamente con el oxígeno molecular generando anión superóxido. Por acción de las enzimas superóxido dismutasas, este radical libre puede dar lugar a peróxido de hidrógeno, que a su vez, y en presencia de metales de transición reducidos, puede convertirse vía reacción de Fenton en anión hidroxilo, un potente oxidante

(Giulivi *et al.*, 1995). Asimismo, las ROS generadas pueden reaccionar con el óxido nítrico dando lugar a las especies reactivas de nitrógeno (RNS) (Brown y Borutaite, 2001). Se cree que la generación de ROS en la CTE se localiza fundamentalmente a nivel de los complejos I (Kushnareva *et al.*, 2002) y III (Chen *et al.*, 2003). La producción neta de ROS es extremadamente variable, siendo sensible al potencial de membrana, al estado redox de los complejos transportadores, y a la tensión de oxígeno, entre otros factores. Se ha estimado que entre un 0,2 y 2% del total de moléculas de oxígeno consumidas son convertidas por la mitocondria en especies reactivas de oxígeno (Chance *et al.*, 1979; StPierre *et al.*, 2002; Staniek y Nohl, 2000).

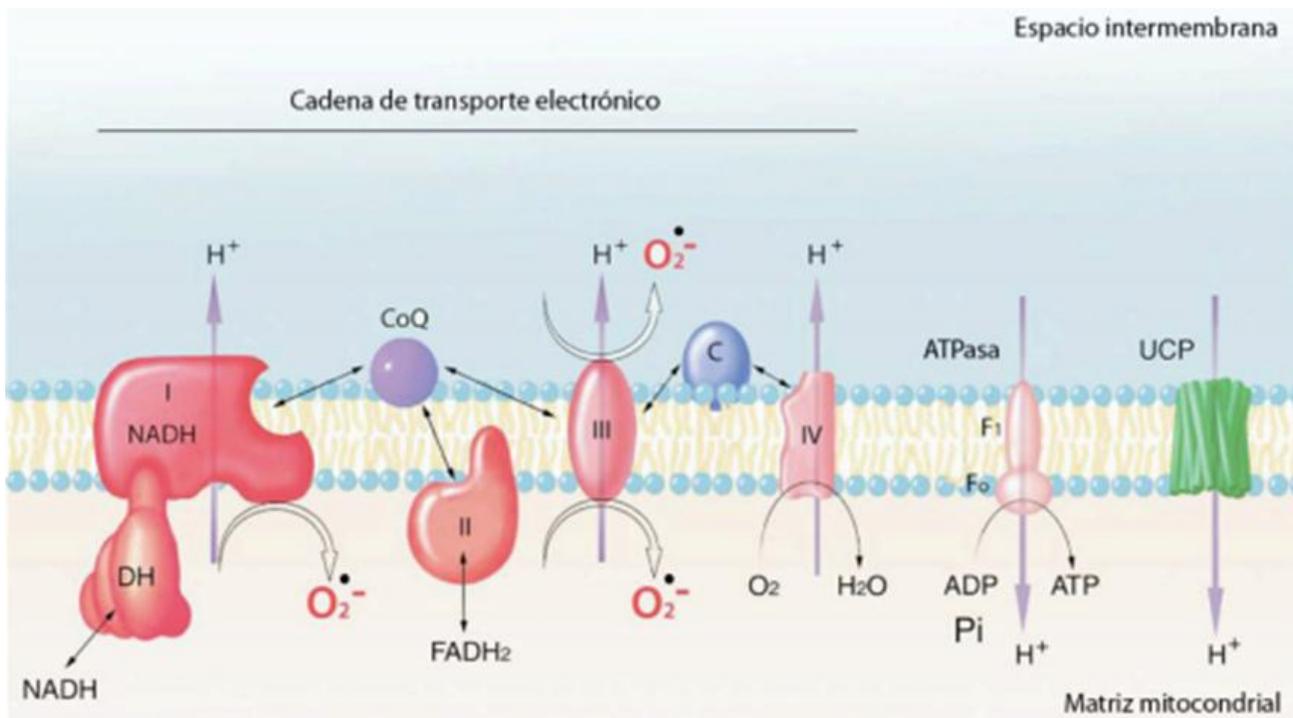


Figura 9. Modelo esquemático de la cadena de transporte electrónico mitocondrial. Se señalan los principales sitios de producción de aniones superóxido a nivel de los complejos I y III. Las flechas representan el flujo de electrones cedidos por el NADH y/o el FADH₂ (en los complejos I y II respectivamente) hasta el aceptor final (O₂). El bombeo de protones hacia el espacio intermembranal genera un gradiente de voltaje que será utilizado por la ATPasa F₁-F₀ para generar ATP. La familia de proteínas desacoplantes (UCP), representada en color verde, reduce el potencial de membrana total. DH: deshidrogenasas; CoQ: coenzima Q; C: citocromo c (Tomado y adaptado de Balaban *et al.*, 2005).

7.13 PERÓXIDO DE HIDRÓGENO

El peróxido de hidrógeno (H_2O_2) es la forma menos reactiva y más estable de las ROS, puede ser producido directamente en las células principalmente por algunas enzimas oxido-reductasas, como es el caso de la glucosa oxidasa (Massey *et al.*, 1969) y la NADPH oxidasa. Sin embargo, la mayoría del H_2O_2 es producto de la dismutación del $O_2\cdot$ (Lambeth, 2002), proveniente de la fuga de electrones de la cadena de transporte de electrones mitocondrial (Loschen *et al.*, 1974; Forman y Kennedy, 1974) la biotransformación de xenobioticos (McCord y Fridovich, 1970) y otras flavoproteínas (Massey *et al.*, 1969). Otro importante sitio de producción del H_2O_2 son los peroxisomas en donde se presentan diferentes reacciones de biotransformación en donde el oxígeno es reducido a H_2O_2 por los electrones provenientes de las moléculas a detoxificar, el H_2O_2 es posteriormente convertido en agua en los propios peroxisomas (De Duve y Baudhuin, 1969). Sin embargo, el proceso bioquímico que produce más H_2O_2 en los peroxisomas es la β -oxidación de ácidos grasos, debido a las reacciones enzimáticas de las flavin oxidasas. Se ha estimado que el 35% de todo el H_2O_2 formado en el hígado de ratas es producido por estas reacciones (Boveris *et al.*, 1977). El H_2O_2 es una ROS muy importante ya que al igual que el $O_2\cdot$ puede dar origen a otras ROS secundarias.

Por mucho tiempo se consideró a las ROS como moléculas que potencialmente podrían generar daños a las biomoléculas, pero en los últimos años se ha venido postulando a los RL y ROS como moléculas transductoras de señales: el caso particular del H_2O_2 es uno de los más importantes, ya que se ha considerado un segundo mensajero modulado por enzimas como las oxido reductasas y en especial la NADPH oxidasa y la DuOXs que incrementan sus niveles celulares (Antunes y Cadenas, 2000). El H_2O_2 es una molécula altamente utilizada en la investigación porque es un potencial segundo mensajero ya que sus propiedades fisicoquímicas que le permiten difundir fácilmente al interior de la célula.

7.14 DAÑO OXIDANTE AL ADN

El daño oxidativo producido por las ROS intracelulares resulta en modificaciones en diversas biomoléculas. Las ROS tienen una gran capacidad de reacción con moléculas de todo tipo, tanto radical como no radical, esto justifica su implicación en una amplia variedad de procesos fisiológicos y patológicos. Los RL pueden causar daño oxidante celular dando lugar a nuevas especies reactivas capaces de continuar la acción oxidante, uno de los más afectados es el ADN. Las alteraciones al ADN, como consecuencia de la interacción con los RL son importantes en diversas patologías incluyendo el cáncer, en las que el estrés oxidante está elevado y puede producir un mayor número de mutaciones, entrecruzamientos, rupturas espontáneas en las cromátidas y pérdida de fragmentos cromosómicos, llegando incluso a la pérdida total de determinados cromosomas (Girard y Boiteux, 1997).

Los principales agentes involucrados en el daño directo son los radicales OH[·] (Aruoma, Halliwell y Dizdaroglu, 1989; de Mello Filho, Meneghini, 1985). Dentro de las alteraciones más frecuentes en las bases púricas, destaca la formación de la 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina (8OHdG), con un alto efecto mutagénico. Respecto a las bases pirimidínicas, se encuentran los glicoles de timina (T) y citosina (C), además de los hidratos de pirimidina, los cuales dan lugar a fragmentación.

El ADN mitocondrial presenta una mayor tasa de mutación pro-modificaciones oxidativas de sus bases que son responsables del mal funcionamiento de los complejos CTE, principal fuente de ROS mitocondriales, incrementando su producción y produciendo así un círculo vicioso (Fukui y Moraes, 2009).

Una de las características comunes asociadas a las células de cáncer es el incremento en la producción de ROS. Aunque muchas células de cáncer exhiben elevado estrés oxidativo con un incremento en la actividad metabólica y producción de ROS (Szatrowski y Nathan, 1991; Trachootham *et al.*, 2006), el mecanismo de acción de muchas drogas quimioterapéuticas para el cáncer involucra la inducción de apoptosis mediante ROS. Por ejemplo, el cisplatino quien es la clásica droga antitumoral parece producir ROS en excesivo niveles resultando en daño al DNA y muerte celular (Klaunig *et al.*, 2010).

7.15 CISPLATINO

El cis-diamino-dicloroplatino (II) o cisplatino es un agente quimioterapéutico con peso molecular de 300 Da. La molécula de cisplatino fue descubierta inesperadamente en 1969 por Rosenberg *et al.*, (1965) durante sus estudios del efecto de la corriente eléctrica sobre *Escherichia coli* (Rosenberg *et al.*, 1965). Mientras realizaban sus experimentos, pudieron observar que la división celular no se inhibía por la corriente eléctrica aplicada sino por la producción de cisplatino procedente de los electrodos de platino que empleaban para generar la corriente. Desde entonces y hasta ahora ha sido una de las moléculas más usadas en el tratamiento de diferentes tipos de tumores sólidos tales como el de cabeza y cuello, testículo, ovario, vejiga, esófago o pulmón (O'Dwyer *et al.*, 2000; Prestayko *et al.*, 1979; Rosenberg *et al.*, 1999)

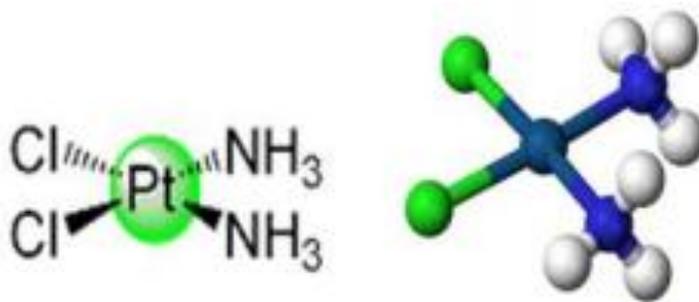


Figura 10. Estructura química del cisplatino. Complejo de platino neutro que contiene dos grupos amino terminal (NH₃) y dos ligandos cloruro en geometría cis.

El cisplatino es una molécula altamente reactiva que se une al ARN, ADN y proteínas formando diferentes tipos de aductos (Alazard, Germanier y Johnson, 1982; Pinto y Lippard, 1985), entre estos se encuentran los aductos formados con el ADN nuclear (ADNn) los cuales son considerados como las principales lesiones mediante el efecto citotóxico del cisplatino (Marullo *et al.*, 2013). La molécula de cisplatino actúa preferentemente sobre las bases del ADN, en particular sobre el nitrógeno en posición 7 de guanina y adenina (Chen *et al.*, 2010). La unión a guanina es más frecuente, probablemente debido a la alta nucleofilia del anillo imidazol situado en posición N7, que queda expuesto en el surco mayor de la doble hélice, ya que no está implicado en el apareamiento de bases guanina-citosina (Johnson *et al.*, 1980). La unión de cisplatino al ADN nuclear (DNAn)

genera una marcada curvatura de la doble hélice hacia el surco mayor, lo que se traduce en un desenrollamiento parcial de la molécula de ADN, impidiendo una correcta progresión del ciclo celular (Zamble y Lippard, 1995). Estas uniones generan además aductos covalentes impidiendo la mitosis y replicación del ADN (Sorenson y Eastman, 1988; Saris *et al.*, 1996), siendo los más frecuentes:

- 1,2-d(GpG) intracatenarios entre guaninas adyacentes (47-50%).
- 1,2-d(ApG) intracatenarios entre adeninas y guaninas adyacentes (23-28%).
- d(GNG) intracatenarios, entre guaninas separadas por un número N de bases.
- d(ANG) intracatenarios, entre adeninas y guaninas separadas por un número N de bases.
- Aductos intercatenarios, como por ejemplo G-Pt-G, que unen las dos hebras de la doble hélice de ADN.
- Aductos monofuncionales como Pt(G) y Pt(A).
- Entrecruzamientos proteína-ADN, donde el cisplatino coordina la unión entre una base del ADN y una proteína, como por ejemplo las metalotioneínas (Figura 11) (Pil, y Lippard, 1997).

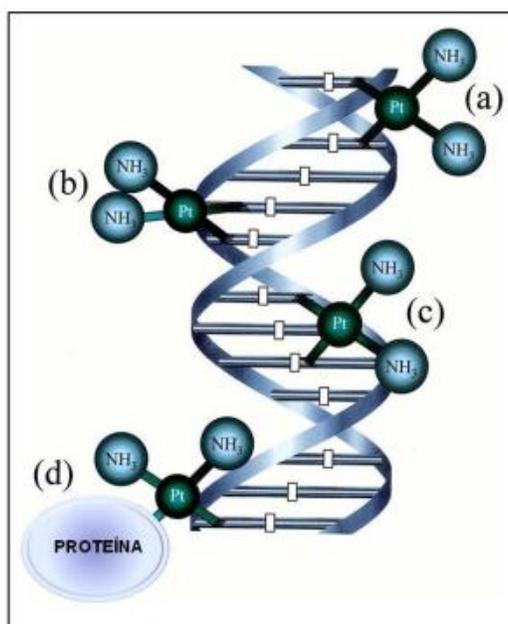


Figura 11. Aductos formados entre el cisplatino y las bases del ADN. (a) Unión intercatenaria; (b) unión 1,2 intracatenaria; (c) unión 1,3 intracatenaria; (d) entrecruzamiento proteína-ADN.

El daño en el ADN inducido por la formación de aductos causa muerte celular por apoptosis y por procesos no apoptóticos tales como necrosis (Sato *et al.*, 2001; Price *et al.*, 2004; Cepeda *et al.*, 2007). El modo de muerte celular ha sido unida a la concentración de cisplatino usada. En tumores (Guchelaar *et al.*, 1998; Sancho-Martínez *et al.*, 2011) y en células no tumorigénicas (Lieberthal *et al.*, 1996; Sancho-Martínez *et al.*, 2011), bajas concentraciones de cisplatino induce muerte celular por apoptosis mientras que altas concentraciones causa necrosis.

7.16 MECANISMO DE GENERACIÓN DE ROS MEDIANTE CISPLATINO A NIVEL MITOCONDRIAL

El cisplatino puede conducir a la generación de ROS o puede inducir la liberación de moléculas normalmente secuestradas dentro de la mitocondria que puede desencadenar varios mecanismos apoptóticos. El daño mediado por las ROS pueden ocurrir como consecuencia de una depleción antioxidante e incremento de la peroxidación lipídica (Rybak *et al.*, 1999).

Diferentes estudios han mostrado que el cisplatino interactúa directamente con la mitocondria y la activa para apoptosis (Cullen *et al.*, 2007). Incubación de mitocondrias aisladas con cisplatino causa rápida liberación de citocromo c en pocos minutos (Yang *et al.*, 2006). Custodio *et al.*, (2009) reportaron que en mitocondrias aisladas el cisplatino induce la formación de vesículas mitocondriales dependientes de calcio, depolarización del potencial de membrana mitocondrial, liberación de calcio y decaimiento de NAD(P). Estos efectos fueron prevenidos por ciclosporina A un potente inhibidor del poro de transición de la permeabilidad mitocondrial (MTP).

Santandreu *et al.*, (2010) demostraron además que el cisplatino deprime la respiración y aumenta la producción de ROS en mitocondrias aisladas, lo que es una característica de desacoplamiento respiratoria parcial (Stökl *et al.*, 2007). El mecanismo por el cual es cisplatino causa todos estos efectos no es completamente entendido. Varias posibilidades son planteadas, i) El cisplatino puede actuar directamente o indirectamente sobre los poros de la membrana mitocondrial, independientemente de la cadena respiratoria y la producción de ROS. En este sentido. El poro MPT es un complejo multiprotéico el cual

involucra ambas proteínas de la membrana interna y externa incluyendo, respectivamente, el translocador de nucleótidos de adenina (ANT) y el canal anión dependiente de calcio (VDAC) (Loeffler y Kroemer, 2000). El cisplatino se une con alta eficiencia al VDAC más que al ANT o a otros extractos proteicos celulares (Cullen *et al.*, 2007). Sin embargo, las consecuencias de esta unión son desconocidas. En todo caso, el poro MPT abierto ha mostrado incrementar la producción de ROS a nivel del complejo I de la cadena respiratoria (Batandier *et al.*, 2004), ii) Alternativamente, estos eventos pueden ocurrir a la inversa: La permeabilidad de la membrana mitocondrial podría ser el resultado de la depresión respiratoria y el incremento de la producción de ROS (Kowaltowski *et al.*, 1998; Ka *et al.*, 2003; Rajesh *et al.*, 2003; Oliveira *et al.*, 2004) y, a su vez, el aumento de la producción de ROS puede resultar en el desacoplamiento de la cadena respiratoria (Valko *et al.*, 2007; Hamanaka *et al.*, 2010; Sanz *et al.*, 2010), pero también viceversa puede tener lugar (Paradies *et al.*, 2001). En el caso del cisplatino, algunas evidencias sugieren que a pesar de deprimir la respiración, este fármaco no afecta directamente la cadena respiratoria (Tacka *et al.*, 2004; Custodio *et al.*, 2009). Interesantemente, el cisplatino se une al ADN mitocondrial (ADNm) con más eficiencia que al ADN nuclear (ADNn) (Murata *et al.*, 1990; Olivero *et al.*, 1995). Esto puede ser debido a diferencias internas en la distribución subcelular, pero también ha sido descrita la baja eficiencia en la reparación del ADNm en la mitocondria (Singh y Maniccia-Bozzo, 1990; Preston *et al.*, 2001). Es importante destacar que, células privadas de ADNm muestran una significativa resistencia al cisplatino (Preston *et al.*, 2001; Yang *et al.*, 2006; Cullen *et al.*, 2007); mientras que la apoptosis puede ser activada en células sin núcleo nucleadas. Cómo es que el cisplatino se une al ADNm y provoca la muerte celular no es del todo bien entendido. Recientes evidencias sugieren que mutaciones en el ADNm afectan la actividad de los componentes de la cadena respiratoria mitocondrial los cuales son vinculados a la apertura del poro MPT (Porcelli *et al.*, 2009). Esta unión puede ser proporcionada por el estrés oxidante. De hecho, cuando la cadena respiratoria esta desacoplada, la producción de ROS, principalmente del complejo III (Hamanaka *et al.*, 2010), se incrementa. El espacio intermembrana está normalmente dotado con una defensa antioxidante eficiente formada por glutatión (GSH) y enzimas tales como superóxido dismutasa (SOD) y glutatión peroxidasa (Inoue *et al.*, 2003). Cuando la producción excesiva de ROS vence la defensa antioxidante, el nivel de BCL-2 disminuye.

Debido a que BCL-2 mantiene a los poros del MPT cerrados; bajo circunstancias oxidantes el poro está abierto (Chen y Lesnefsky, 2011). Además, otras acciones del cisplatino son asociadas a la sobre producción de ROS. Tratamiento con cisplatino inhibe las enzimas antioxidantes, incluyendo superóxido dismutasa (SOD, catalasa, glutatión peroxidasa, glutatión S-transferasa (Antunes *et al.*, 2000; Sadzuka *et al.*, 1992; Hannemann *et al.*, 1991) y glutatión reductasa reductasa (Kadikoylu *et al.*, 2004) en los tejidos renales lo que puede explicar la disminución del GSH observado en este tejido. Estudios *en vivo* y celulares revelaron que el cisplatino es metabolizado a través de GSH conjugado.

Excesiva ROS causa estrés oxidativo celular y mitocondrial. A través de la célula, las ROS dañan principales macromoléculas incluyendo el ADN, proteínas y lípidos, lo cual se asocia a muerte celular (Valko *et al.*, 2007; Quinzii *et al.*, 2010; Masgras *et al.*, 2012). Dentro de la mitocondria el estrés oxidante conduce a la permeabilización de la células y disfunción mitocondrial a través de la peroxidación lipídica (Santos *et al.*, 2007). La Figura 12 muestra los efectos del cisplatino más importantes en la mitocondria.

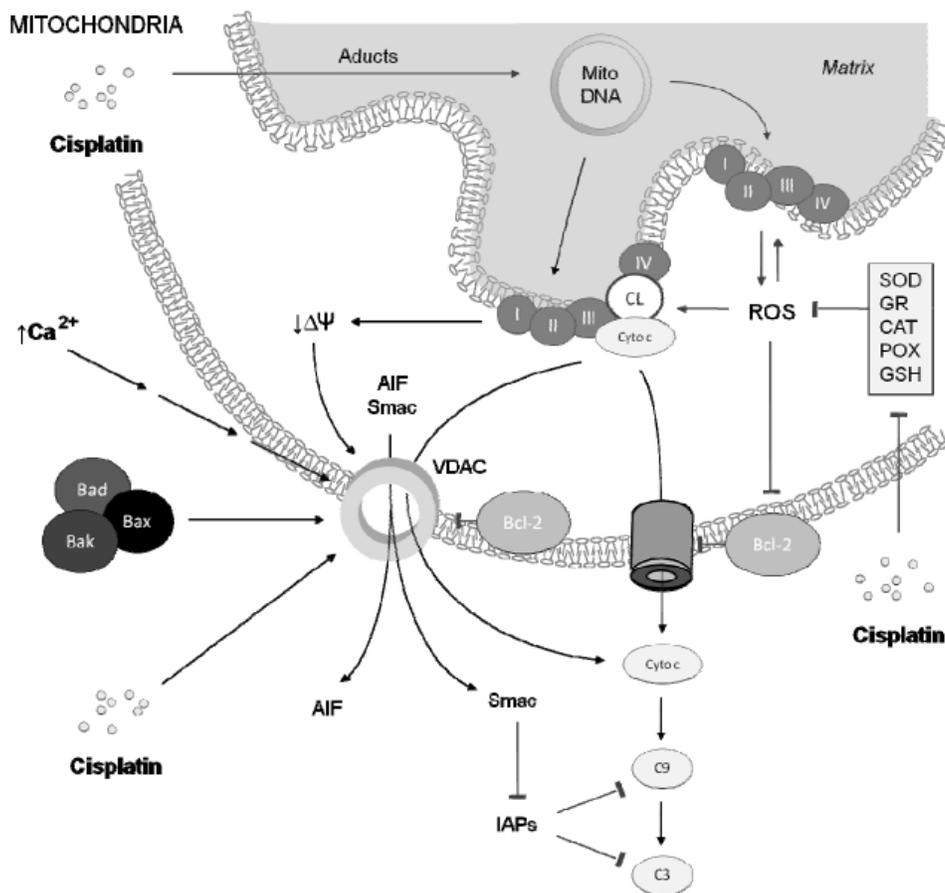


Figura 12. Efecto del cisplatino sobre la mitocondria (Tomado de Sancho-Martínez *et al.*, 2012).

7.17 MECANISMO DE GENERACIÓN DE ROS MEDIANTE CISPLATINO A NIVEL NUCLEAR

Las ROS generadas en la mitocondria provoca daño en el ADN y activa la respuesta a estrés genotóxico (Hamanaka *et al.*, 2010; Masgras *et al.*, 2012). No es totalmente claro si la muerte celular inducida por cisplatino es debido a los efectos directos, los efectos indirectos (a través de ROS) o ambos. Cullen *et al.*, (2007) defienden que la unión del cisplatino al ADN no es crucial para desencadenar apoptosis y sugieren que la mitocondrial puede ser el principal y suficiente blanco del cisplatino para inducir citotoxicidad. De acuerdo a esto las células enucleadas mantienen la apoptosis inducida por cisplatino (Cullen *et al.*, 2007; Mandic *et al.*, 2003; Gourdiér *et al.*, 2004). El escenario global con participación de eventos nucleares y vías de señalización después de la citotoxicidad del cisplatino es mostrado en la figura 13.

Dentro del núcleo, el cisplatino reacciona y forma aductos con el ADN. Varios estudios han mostrado que mecanismos bioquímicos de la citotoxicidad del cisplatino son relacionados a las propiedades de unión con el ADN (Jamieson y Lippard, 1999). Más comúnmente el cisplatino construye enlaces covalentes 1,2 o 1,3 con la cadena interna del ADN entre los átomos N7 de guaninas y adeninas adyacentes en el surco mayor de la doble hélice, los sitios nucleofílicos más accesibles y reactivos (Pérez, 1998; Giaccone, 2000; Basu y Krishnamurthy, 2010). La formación de aductos con el cisplatino y el ADN rompe la estructura del ADN e interfiere con la replicación y transcripción del ADN. Daño al ADN conduce arresto del ciclo celular y activación de la maquinaria de reparación del ADN. Cuando el daño sobrepasa la capacidad de reparación celular la apoptosis es activada (Cvitkovic, 1998). La eficacia de las drogas depende no únicamente de la habilidad para inducir daño sino también de la habilidad de detectar y responder al daño en el ADN (Kerr *et al.*, 1994). El daño al ADN inducido por cisplatino activa la vía del supresor de tumores p53 (Vakifahmetoglu *et al.*, 2008; Kandioler *et al.*, 2008). p53 es considerado el “guardián del genoma” y facilita la reparación del ADN antes de la replicación. Cuando el daño no es reparado, p53 activa la transcripción de proteínas pro-apoptóticas tales como BAX y BAK y reprimen a las proteínas anti-apoptóticas tal como BCL-2 (Eastmann y Rigas, 1999), para inducir la apoptosis y prevenir mutaciones no deseables que pudieran integrarse al genoma.

De hecho, p53 es necesaria para activar a BAK y BAX en células de cáncer de mama (Kutuk *et al.*, 2009); con una activación jerárquica de BAX por BAK (Tajeddine *et al.*, 2008). El cisplatino induce el desequilibrio entre los factores proapoptóticos (Jones *et al.*, 1998) y antiapoptóticos (Henkels y Turchi, 1999). La vía de p53 parece ser muy importante en la acción de cisplatino, pero no siempre es necesaria para desencadenar la muerte celular (Zamble *et al.*, 1998). Hay estudios que muestran que incluso 50% de la apoptosis inducida por cisplatino en células renales está mediada por mecanismos independientes de p53 adicionales (Cummings y Schnellmann, 2002).

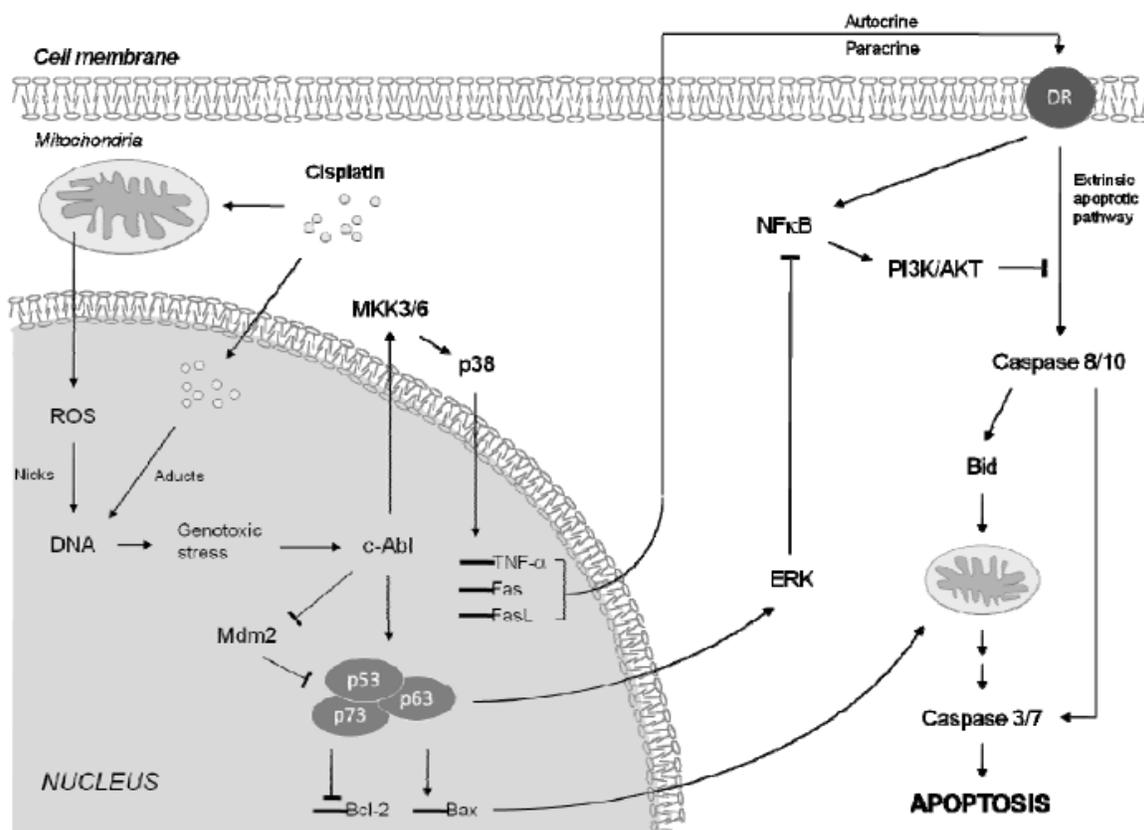


Figura 13. Efecto del cisplatino sobre el núcleo (Tomado de Sancho-Martínez *et al.*, 2012).

Marullo *et al.*, (2013) revelan que la citotoxicidad inducida por el cisplatino es llevada a cabo por al menos dos componentes generales cuyas contribuciones en causar muerte celular puede depender de la proliferación celular, el estado redox y la actividad metabólica (Figura 14). Aunque algunos grupos de investigación han reportado que la exposición del cisplatino a las células con cáncer resulta en daño mitocondrial y

desequilibrio energético (Martins *et al.*, 2008; Santandreu, Roca y Oliver, 2010) en células con cáncer, el mecanismo de deterioro mitocondrial inducido por cisplatino y la posterior generación de ROS no se ha caracterizado aún. La exposición al cisplatino resulta en la activación de caspasas aún en células con cáncer sin núcleo (Yang *et al.*, 2006), sugiriendo que el cisplatino puede matar a las células con cáncer por un mecanismo independiente al daño al ADN y mediada por el daño a otros orgánulos o macromoléculas intracelulares. Una limitación importante en la eficacia terapéutica del cisplatino es el desarrollo de resistencia. Marullo y cols. (2013) demostraron que el incremento en eliminación de ROS mitocondrial reduce la sensibilidad celular a cisplatino, ya que aproximadamente tres veces más de la dosis de cisplatino es requerida para matar el mismo porcentaje de células que expresan catalasa mitocondrial comparadas con las células control (Marullo *et al.*, 2013). El saber esto puede servir de marco para descubrir nuevos mecanismos de resistencia al cisplatino en las células cancerosas.

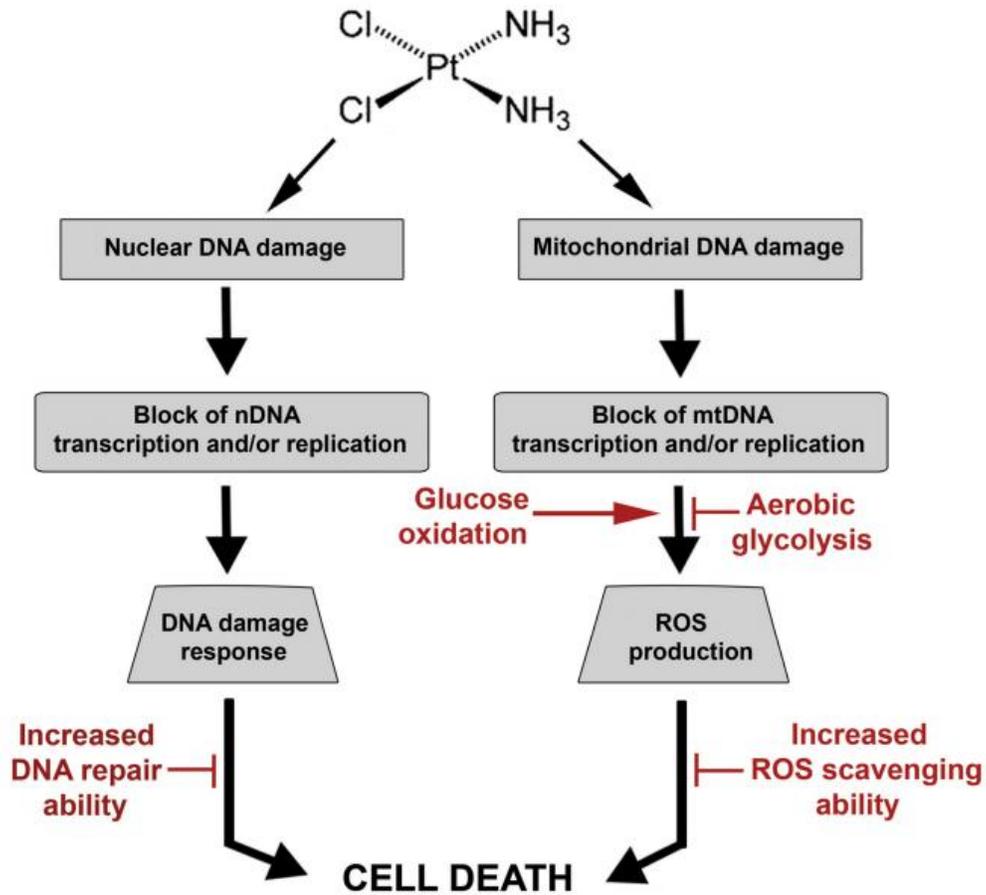


Figura 14. Modelo para los principales componentes de la citotoxicidad inducida por cisplatino. La exposición celular al cisplatino causa daño directo a ADNmt resultando en una reducción de la síntesis de proteína mitocondrial, deterioro de la función de la cadena de transporte de electrones, y posteriormente, el aumento de los niveles de ROS intracelulares. Las ROS en última instancia, promueven la muerte celular, lo que resulta en una mejora significativa del efecto citotóxico ejercido por el cisplatino a través de la generación de daños al ADNn. La disfunción mitocondrial, aumenta la capacidad de producir ROS y el metabolismo glucolítico reduce la sensibilidad celular al componente mitocondrial - ROS mediada citotoxicidad cisplatino. Reducción sensibilidad celular al cisplatino también se puede lograr por el aumento de la capacidad de reparación del ADN. (Tomado de Marullo *et al.*, 2013).

8. ANTECEDENTES

Uno de los tratamientos comúnmente usado para el tratamiento del cáncer de mama es el cisplatino sin embargo, sus efectos secundarios pueden generar estrés oxidante. Las líneas celulares tumorales humanas *in vitro* producen en gran tasa de ROS en comparación con las líneas celulares no transformadas y se han detectado marcadores de estrés oxidante en muestras *in vivo* de cáncer de mama (Toyokuni *et al.*, 1995; Portakal *et al.*, 2000). El estrés oxidante severo conduce a la apoptosis. Inversamente el estrés oxidante persistente, a dosis subletales puede causar resistencia a la apoptosis. La inducción de la apoptosis mediada por ROS es dependiente de p53 en ratones y líneas celulares (Yin *et al.*, 1999). El estrés oxidante constitutivo dentro de las células tumorales de cáncer de mama puede acelerar la selección de clonas que tienen silenciada la expresión de p53, lo cual les otorga un fenotipo resistente a la apoptosis. Miembros de la familia Bcl-2 son críticos para la regulación de la apoptosis, la relación entre los miembros pro-sobrevivencia y pro-apoptóticos determina el destino de una célula después de un estímulo apoptótico. Las proteínas pro-apoptóticas “BH3-only” son los mediadores apicales de la muerte celular y su actividad pro-apoptótica está regulada por mecanismo transcripcionales y post-transcripcionales (Puthalakath y Strasser, 2002). Las proteínas “BH3-only” pueden ser subdivididas en dos grupos: las sensoras que incluyen a las proteínas Bmf, Bik, Bad, Noxa y las activadoras: Bid, Bim y Puma (Letai *et al.*, 2002). Las proteínas activadoras pueden activar a Bax y Bak, mientras que el rol de las sensoras es unirse a las proteínas antiapoptóticas de la familia Bcl-2. Dependiendo del contexto celular, Bik puede ser un pro-apoptótico muy poderoso cuando es transfectado a varias líneas celulares (Han *et al.*, 1996) o puede sensibilizar a las células tumorales a la apoptosis mediada por agentes terapéuticos o por Fas (Daniel *et al.*, 1999). En el 2009, Ritchie y sus colaboradores demostraron que el factor embrionario tirotrófico (TEF) participa en la respuesta al estrés oxidante a través del control transcripcional de Bik y en el 2010 Bodet y colaboradores señalaron que la expresión de Bik correlaciona con la expresión de TEF independientemente de los niveles de p53 en múltiple mieloma y la expresión de Bik se asocia con la activación de las caspasas 3 y 9, sugiriendo que Bik promueve la apoptosis a

través de la vía mitocondrial (Ritchie *et al.*, 2009; Bodet *et al.*, 2010). Otro estudio demuestra que la expresión transitoria de Bik sensibiliza a las células de mieloma al estrés oxidante, mientras que el silenciamiento de Bik aumenta la resistencia a este agente (Blatt *et al.*, 2009). Hasta el momento, se ha reportado la localización de Bik en el RE en humanos y en murinos la proteína homóloga de Bik (BIK) se localizó en la membrana mitocondrial. En la línea MCF-7 la transfección con la forma murina de Bik se inmunolocalizó en la membrana mitocondrial, esto se correlaciona con lo antes reportado por Han en 1996 pues además de localizar a Bik en la periferia nuclear también se halló en el citoplasma celular de la línea celular AN1 (Han *et al.*, 1996; Hedge *et al.*, 1998).

9. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

Es bien sabido que los miembros de la familia BCL-2 participan en la regulación de la supervivencia celular y han sido clasificados como pro-apoptóticos o anti-apoptóticos dependiendo de la función que realizan en dicho proceso (Chipuk *et al.*, 2010; Czabotar *et al.*, 2014; Yang y Korsmeyer, 1996). Así mismo, es conocido que algunos miembros de esta familia cambian su expresión causado directa o indirectamente por agente antineoplásicos (Kontos *et al.*, 2014). Luna-López *et al.*, (2010) describieron como BCL-2 incrementa su expresión tras inducir estrés oxidante moderado (Luna-López *et al.*, 2010). De tal forma, que se ha demostrado que algunas miembros de esta familia cambian su localización celular y modifican su función (Lin *et al.*, 2004), esto podría sugerido que la proteína pro-apoptótica BIK tiene ambas funciones tanto en la inducción de apoptosis como en la de sensibilización al estrés oxidativo (Bodet *et al.*, 2010). Así mismo, es interesante el que Bik ha demostrado estar sobreexpresado en algunos tipos de cáncer (García *et al.*, 2005; Lu *et al.*, 2006). Además como respuesta al estrés oxidante la expresión de *bik* está regulada por el factor de transcripción p53 y el factor tirotrófico embrionario (Ritchie *et al.*, 2009). De tal forma que es importante estudiar si la proteína BIK es susceptible a cambiar su localización subcelular después de la exposición a estrés oxidante inducido por quimioterapia.

Con lo anterior podemos formular la siguiente pregunta de investigación: ¿Habrá cambios en la localización subcelular de la proteína Bik como respuesta al estrés provocado por un cisplatino o bien por peróxido de hidrógeno en líneas celulares de mama?

10. JUSTIFICACIÓN

El cáncer de mama es la principal causa de muerte por cáncer en mujeres en México y a nivel mundial. Actualmente, este tipo de cáncer es un grave problema de salud debido a que el número de nuevos casos aumenta cada año a nivel mundial. En 2012, la IARC estimó 1.67 millones de nuevos casos en todo el mundo, lo que representa el 25% de todos los cánceres (GLOBOCAN, 2012). El cáncer presenta una compleja heterogeneidad fenotípica y funcional causada por los cambios genéticos lo que hace difícil el estudio de esta neoplasia puesto que las terapias usadas para combatir esta aún son ineficientes en algunos casos (Meacham y Morrison, 2013). Existen diferentes mecanismos por los cuales se hace difícil el entendimiento de esta neoplasia, tal es el caso del estrés oxidante quien es uno de los responsables del daño al ADN, lípidos y proteínas el cual tiene un papel importante en el desarrollo y progresión de múltiples enfermedades, entre ellas el cáncer de mama. La comprensión de los mecanismos mediante una proteína como BIK que puede responder ante el estrés oxidante podrá dar a luz nuevos posibles elementos involucrados en este padecimiento ya que podría ayudarnos a entender cómo esta proteína funciona y participa en la resistencia o susceptibilidad del tumor y así proponer nuevas herramientas para el tratamiento y diagnóstico de la enfermedad.

11. OBJETIVOS

11.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar la localización sub-celular de la proteína BIK como respuesta al tratamiento con un agente antineoplásico (cisplatino) y con un agente oxidante (H_2O_2) en las líneas celulares de cáncer de mama MCF-7 y MDA-MB-231 y línea celular epitelial no tumorigénica MCF-10A.

11.2 OBJETIVOS PARTICULARES

Inducir estrés oxidante mediante el uso de cisplatino y peróxido de hidrógeno en las líneas celulares de estudio (MCF-7, MDA-MB-231 y MCF-10A)

Determinar la localización de BIK posterior a la inducción de estrés oxidante en las líneas celulares MCF-7, MDA-MB-231 y MCF-10A.

12. HIPÓTESIS

Las proteínas de la familia Bcl-2 son susceptibles a modificar su localización en función de cambios en el estado redox, de tal forma que la localización de la proteína BIK se verá modificada después del estrés oxidante generado por un agente neoplásico y uno oxidante.

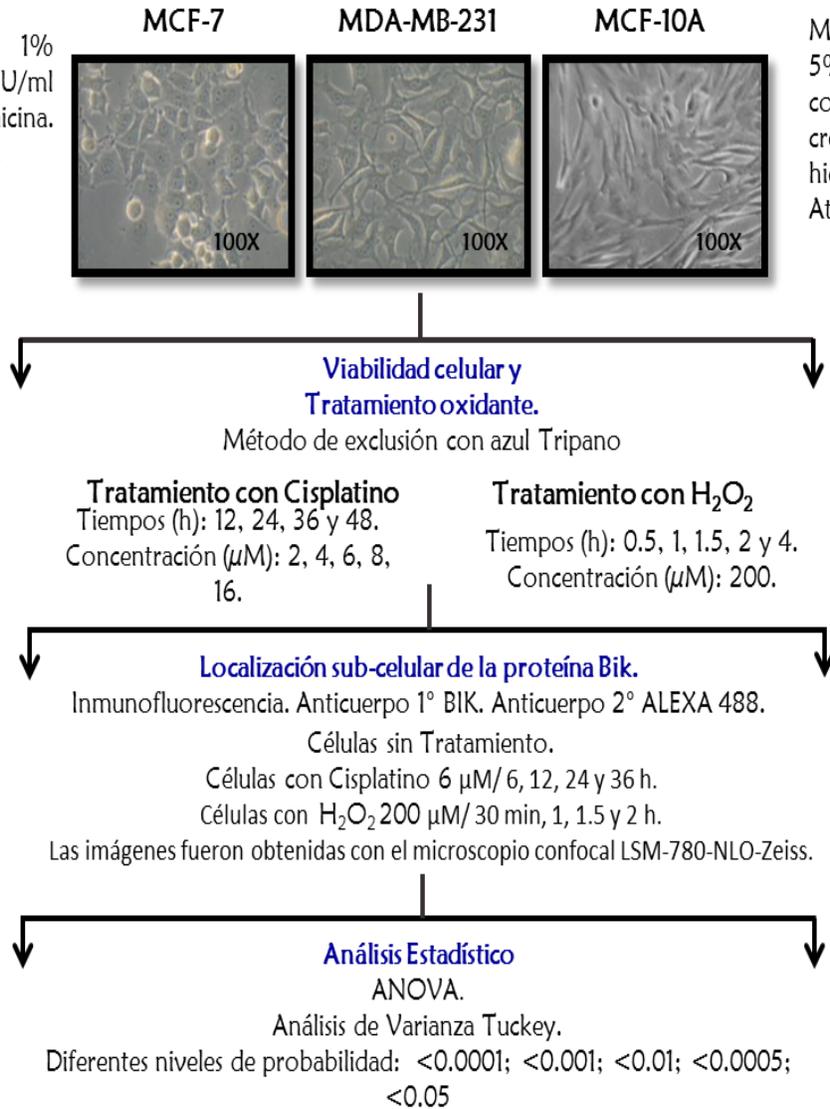
13. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Cultivo celular: MCF-7 y MDA-MB-231

Medio RPMI-1640, SFB 10%, 1% aminoácidos no esenciales, 100 U/ml penicilina y 100 µg/ml estreptomicina. Atmósfera de 5% de CO₂ a 37°C.

Cultivo celular: MCF-10A

Medio DMEM/F12, Suero de caballo 5%, insulina 10 mg/ml, toxina colérica 100 ng/ml, factor de crecimiento epidermal 20 ng/ml e hidrocortisona 500 ng/ml. Atmósfera de 5% de CO₂ a 37°C.



14. MATERIALES Y MÉTODOS

14.1 Cultivo Celular

Las líneas celulares de cáncer de mama MCF-7 (ATCC no. HTB-22) y MDA-MB-231 (ATCC no. HTB-26D) fueron cultivadas en medio RPMI-1640 (GIBCO) suplementado con 10% de suero fetal bovino (GIBCO), 1% de aminoácidos no esenciales, 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomicina (GIBCO). La línea celular epitelial no tumorigénica MCF-10A (ATCC no. CRL-10317) fue cultivada en medio DMEM/F12 (GIBCO) suplementado con 5% de suero de caballo, 10 mg/ml insulina, 100 ng/ml toxina colérica, 20 ng/ml de factor de crecimiento epidermal y 500 ng/ml de hidrocortisona (Invitrogen). Las células fueron tripsinizadas al llegar a confluencia y sembradas para continuar con el cultivo. Las células fueron crecidas en una atmósfera a 37°C y con 5% de CO₂ en cajas de 60 mm de diámetro (Corning).

La tabla 2 muestra las características principales de las líneas celulares de mama MCF-10A, MCF-7 y MDA-MB-231 empleadas para la realización del presente proyecto.

14.2 Viabilidad celular y tratamiento oxidante

Se sembraron 1×10^5 células por pozo en placas de 24 pozos (Corning, Acton MA, USA), después de 24 horas las células fueron tratadas con 2, 4, 6, 8 y 16 µM de cisplatino a diferentes tiempos 12, 24, 36 y 48 horas. Otro grupo de células a la misma densidad fue tratado con 200 µM de H₂O₂ por 0.5, 1, 1.5 y 2 horas, después del tiempo de tratamiento las células fueron tripsinizadas y una alícuota de 20 µl de la mezcla de célula La viabilidad fue determinada por el método de exclusión con azul tripano. Para determinar la viabilidad celular las células fueron tripsinizadas y una alícuota de 50 µL fue teñida con el mismo volumen de una solución fisiológica de azul tripano a 0.4% (test de exclusión con azul tripano). El número de células vivas en 10 µL de esta suspensión fue contado en cinco campos del hematocitómetro, bajo un microscopio óptico de contraste de fases.

Tabla 2. Características de las líneas celulares de mama (Tomado y modificado de Neve *et al.*, 2006).

| LÍNEA CELULAR | MCF-7 | MDA-MB-231 | MCF-10A |
|----------------|---|---|---|
| ÓRGANO | Glándula mamaria | Epitelial Adherente | Glándula mamaria |
| SITIO DERIVADO | Efusión Pleural | Efusión pleural | Cultivo primario de mama |
| MORFOLOGÍA | Epitelial | Epitelial | Epitelial |
| RECEPTORES | ER ⁺ PR ⁺ HER2 ⁻ | ER ⁻ PR ⁻ HER2 ⁻ | ER ⁻ PR ⁻ HER2 ⁻ |
| SUBTIPO | Luminal | Basal B | Basal B |
| TIPO | Carcinoma ductal invasivo | Adenocarcinoma metastásico | Enfermedad fibroquística |
| p53 | Wild type +/- | Mutante +/+ | Wild type +/- |
| AGRESIVIDAD | Alto índice proliferativo Poca capacidad Metastásica | Bajo índice Proliferativo Alta invasividad | ----- |
| ESTADIO | III (Pre-metastásico) | IV (Metastásico) | ----- |

14.3 Inmunofluorescencia

Se sembraron 2×10^4 células de cada línea celular en cubreobjetos dentro de placas de 6 pozos (Corning, Acton MA, USA) bajo las condiciones de crecimiento propias de cada línea celular, las células fueron tratadas a las concentraciones y tiempos anteriormente mencionados, después de los tratamientos las células fueron lavadas 2 veces con PBS y fueron fijadas con formalina neutra (Sigma-Aldrich ®) 4% por 30 min. Inmediatamente después las células fueron lavadas dos veces con 250 μ L de buffer salino de fosfatos (PBS) 1X. El PBS fue desechado y se agregó a cada pozo 250 μ L de bloqueador de proteínas

(GeneTex™) por 10 min, después de ese tiempo las células fueron lavadas dos veces con PBS-Tween 2%, posteriormente las células fueron incubadas durante 1 hora con el anticuerpo primario anti-Bik (dilución 1:500 en PBS-Tween 2%) (ab52182) (Abcam, Cambridge, MA, USA). Después de ese tiempo las células fueron lavadas 3 veces con PBS-Tween 2% y fueron incubadas con el anticuerpo secundario (ALEXA 488 dilución 1:200 en PBS-Tween 2%). Después del tiempo de incubación con el anticuerpo secundario, las células fueron lavadas 3 veces con PBS-Tween 2%. Finalmente, las células fueron incubadas con 40 µL de DAPI (10µg/ml) disuelto en medio de montaje el cuál sirvió para teñir el ADN y marcar el núcleo. Se obtuvieron imágenes planas a 40X con el microscopio confocal LSM-780-NLO-Zeiss con el láser diodo a 405 nm para DAPI y and Ar/ML 458/488/514 nm para ALEXA FLUOR-488. El análisis de localización fue realizado usando la versión ZEN 2010 6.0 (Carl Zeiss). Imágenes Ortho e imágenes 3D fueron obtenidas para corroborar los datos.

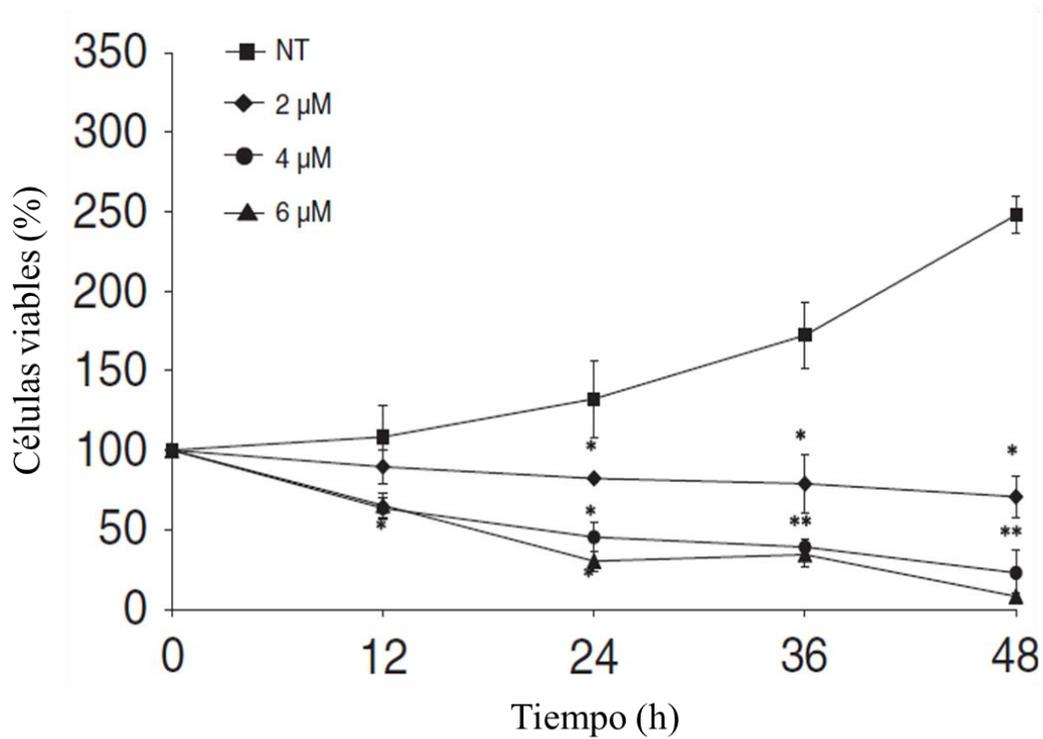
14.4 Análisis estadístico

Los datos se presentan como la media \pm SD en al menos tres experimentos independientes realizados por triplicado. La prueba de ANOVA seguido del análisis por el análisis de Tukey-Kramer fueron usados para comparar los datos. Se usaron diferentes niveles de probabilidad estadísticamente significativos (<0.0001 ; <0.001 ; <0.01 ; <0.0005 ; <0.05).

15. RESULTADOS

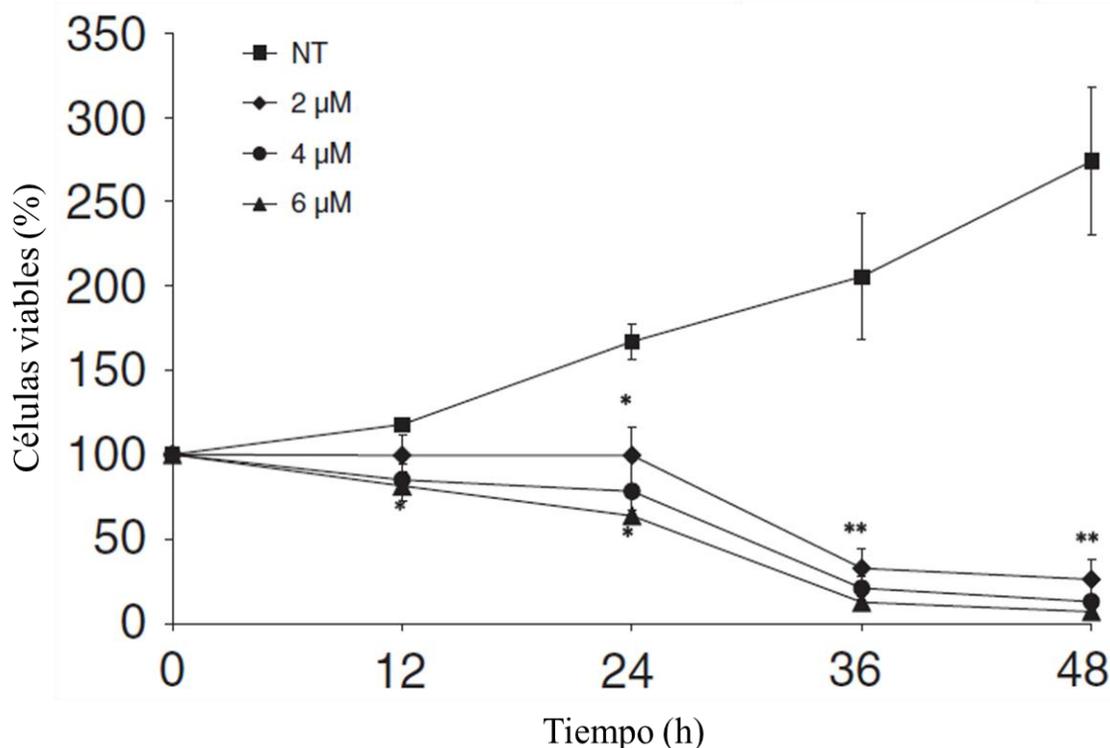
15.1 Efecto del cisplatino sobre la viabilidad celular en las líneas celulares de mama

Para determinar la concentración de la exposición del cisplatino (CP) que sería posteriormente utilizada para evaluar la localización celular de BIK en las líneas celulares MCF-7, MDA-MB-231 y MCF-10A, se determinó la viabilidad celular en cada línea después del tratamiento con cisplatino a diferentes concentraciones (0, 2, 4, 6, 8 y 16 μM) y a diferentes tiempos (12, 24, 36 y 48 h). La concentración de 8 y 16 μM redujo la viabilidad celular a más del 50% durante las primeras 12 h y esas mismas concentraciones fueron letales en las tres líneas celulares a las 48 h, de tal forma que los resultados no se incluyeron en las figuras. Como se muestra en la Gráfica 1, la viabilidad de la línea celular **MCF-7** disminuyó 10 % al ser tratada con 2 μM de CP durante 12 h, y volvió a disminuir hasta un 30 % a las 48 h. Con la concentración 4 μM de CP la viabilidad disminuyó un 37 % después de 12h de tratamiento con una reducción máxima del 77 % después de las 48 h. A la concentración 6 μM de CP durante 12 h disminuyó 35 % y 48 % a las 24 h, se observó un decline a más del 70 % de viabilidad en el tiempo siguiente. Los cambios en la viabilidad durante todos los tratamientos estudiados fueron estadísticamente diferentes comparados con el control ($p < 0.0001$) con excepción de 2 μM de CP a las 12 h.



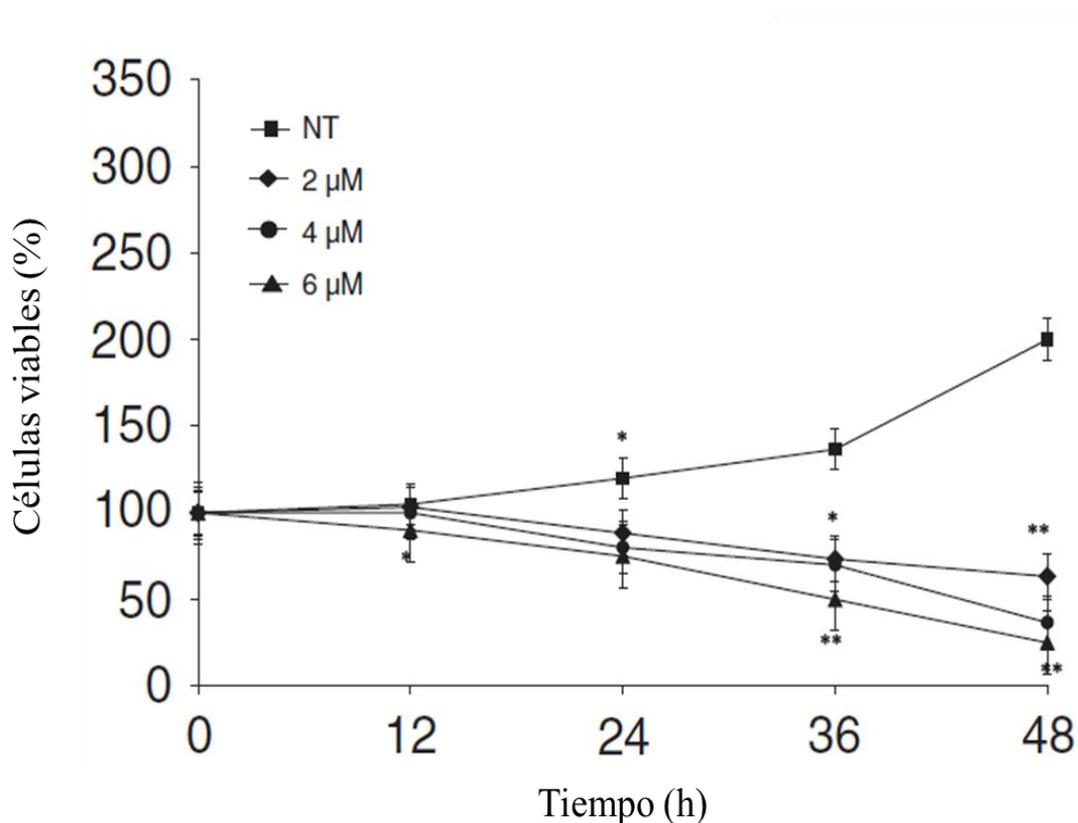
Gráfica 1. Determinación de la viabilidad en la línea celular MCF-7 después del tratamiento con cisplatino. El efecto del cisplatino (CP) fue evaluado en la línea celular MCF-7. Las células fueron tratadas a diferentes concentraciones 0, 2, 4 y 6 μM por 12, 24, 36 y 48 h. Diferencias estadísticamente significativas fueron observadas con respecto a las células no tratadas (*) $p < 0.05$, (**) $p < 0.01$.

El efecto del tratamiento con CP sobre la viabilidad en la línea celular **MDA-MB-231** se muestra en la Gráfica 2. Con la concentración de 2 μM de CP durante las primeras 24 h no se observó ningún efecto, sin embargo la viabilidad disminuyó drásticamente (66 %) a las 36 h de tratamiento y 74% a las 48 h. Con la concentración de 4 μM la viabilidad disminuyó 13%, 21%, 78% y 85 % respectivamente. Con 6 μM de CP se observó el mismo escenario, poco efecto durante las primeras 24 h y una drástica disminución (87 %) a las 36 h y a las 48 h (93 %). El CP inhibió la viabilidad celular en la línea celular MDA-MB-231 de forma dosis y tiempo dependiente.



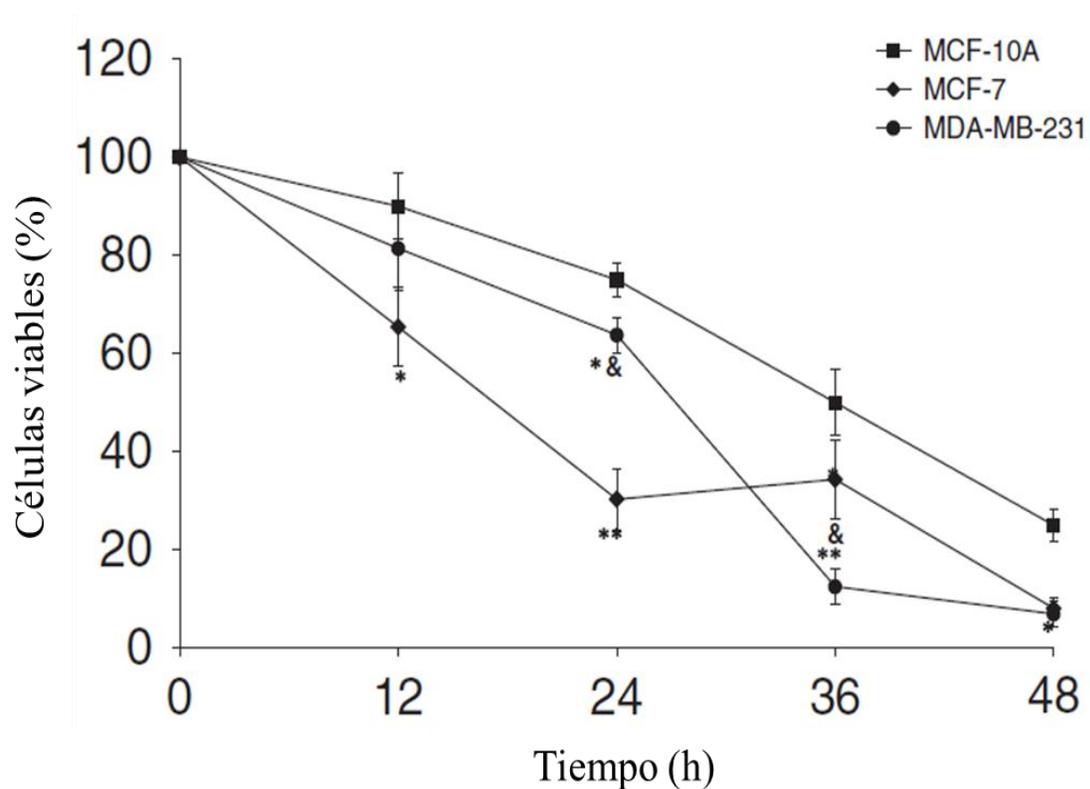
Gráfica 2. Determinación de la viabilidad en la línea celular MDA-MB-231 después del tratamiento con cisplatino. El efecto del cisplatino (CP) fue evaluado en la línea celular MDA-MB-231. Las células fueron tratadas a diferentes concentraciones 0, 2, 4 y 6 μM por 12, 24, 36 y 48 h. Diferencias estadísticamente significativas fueron observadas con respecto a las células no tratadas (*) $p < 0.05$, (**) $p < 0.01$.

En la línea celular MCF-10A (Gráfica 3), la viabilidad celular únicamente disminuyó 20 % durante las primeras 24 h con 2µM y 4µM de CP y disminuyó 25 % con 6 µM de CP. La disminución más notable fue observada a las 36 h (50%) y 48 h (75%)(Gráfica 3).



Gráfica 3. Determinación de la viabilidad en la línea celular MCF-10A después del tratamiento con cisplatino. El efecto del cisplatino (CP) fue evaluado en la línea celular epitelial normal MCF-10A. Las células fueron tratadas a diferentes concentraciones 0, 2, 4 y 6 µM por 12, 24, 36 y 48 h. Diferencias estadísticamente significativas fueron observadas con respecto a las células no tratadas (*) $p < 0.05$, (**) $p < 0.01$.

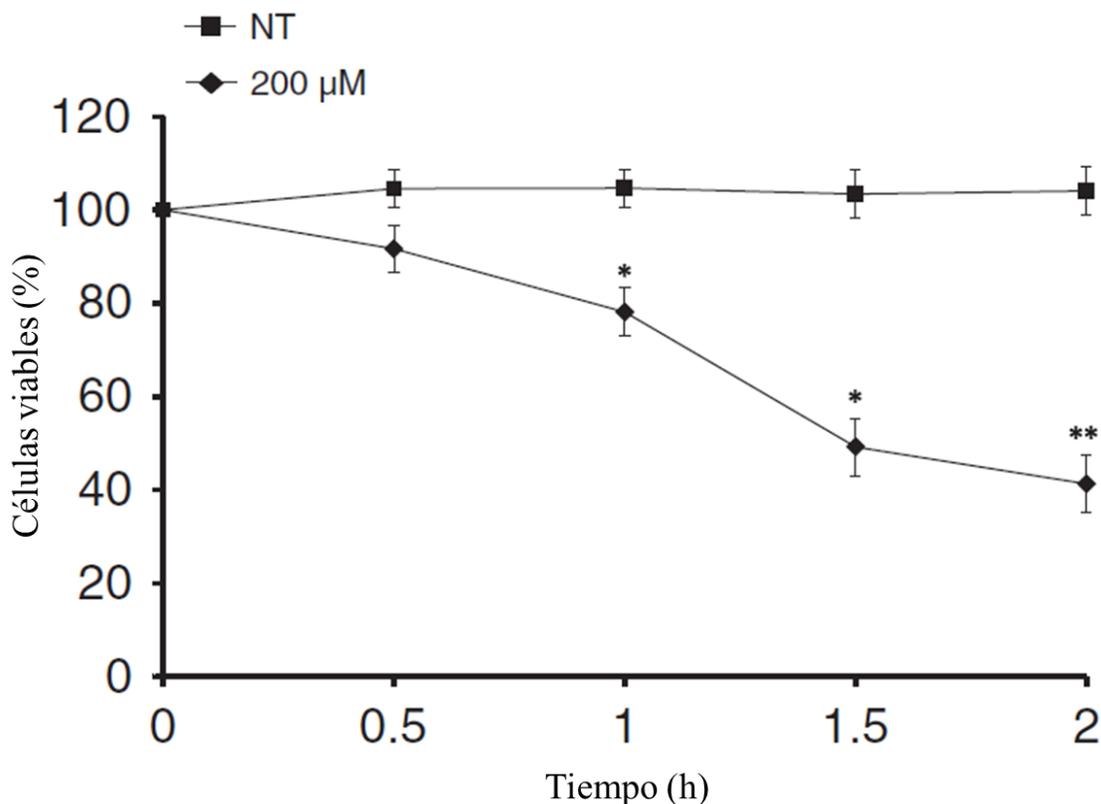
Tomando en consideración todos los experimentos antes mencionados, se eligió la concentración de 6 μM durante 24 h como las condiciones de tratamiento para realizar los siguientes experimentos, debido a que con estas condiciones se mantiene el 50% de células viables en cada línea celular. Las diferencias entre las tres líneas se observan en la gráfica 4.



Gráfica 4. Comparación entre las líneas celulares durante el tratamiento con 6 μM de CP. Diferencias estadísticamente significativas fueron observadas con respecto a las células MCF-10A (*) $p < 0.05$; (**) $p < 0.01$ y (&) $p < 0.05$ con respecto a las células MCF-7. Cada punto representa la media \pm S.D. de 9 determinaciones hechas en tres experimentos independientes.

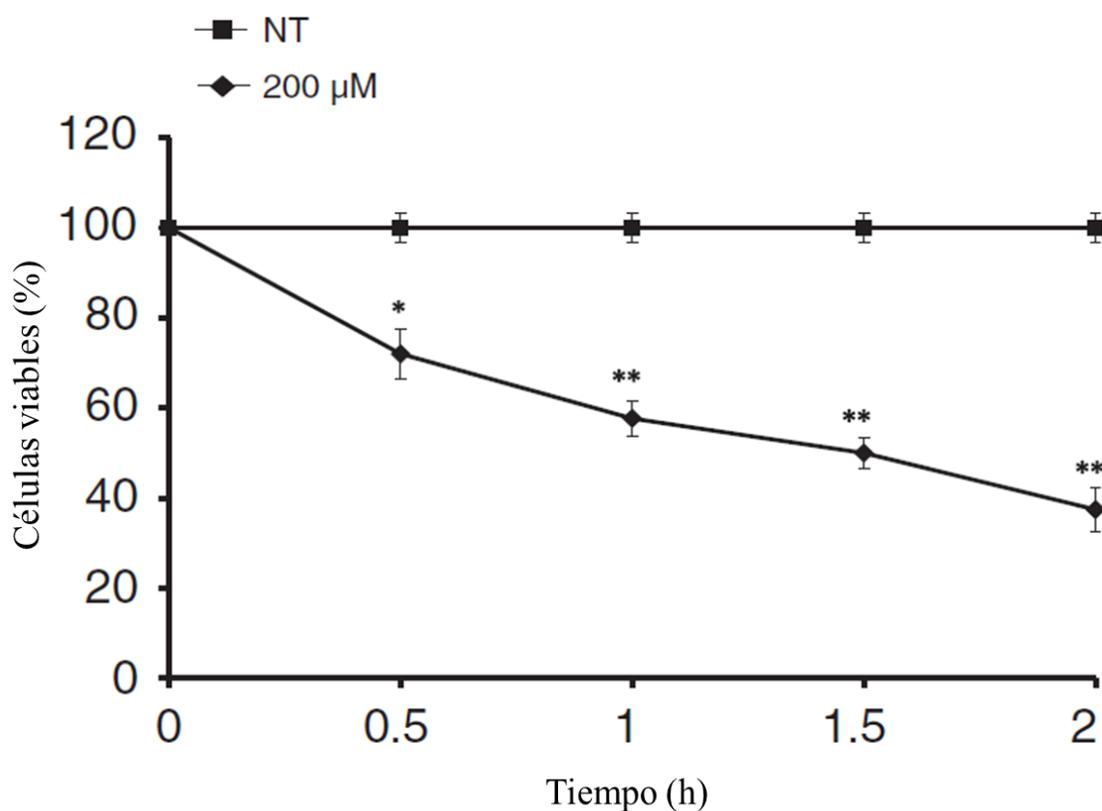
15.2 Efecto del peróxido de hidrógeno (H₂O₂) sobre la viabilidad celular en líneas celulares de mama

Datos previos de nuestro laboratorio y otros más (Burdon, 1995; Wiese *et al.*, 1995; Luna-López *et al.*, 2010; Pickering *et al.*, 2012) ya han reportado que la concentración 200 μ M de H₂O₂ es una dosis efectiva capaz de inducir daño celular agudo a cortos tiempos sin matar a las células. Sin embargo, con el fin de determinar el mejor tiempo para inducir daño, cada línea celular fue tratada con la dosis mencionada por diferentes cortos tiempos 0.5, 1, 1.5 y 2 h (Gráfica 5). Todos los datos fueron estadísticamente significativos respecto al control ($p < 0.005$). La viabilidad celular de las células MCF-7 después de 30 min con H₂O₂ disminuyó 10 % aproximadamente, después de 1h de tratamiento la viabilidad celular disminuyó 23 % y después de 2 h la viabilidad disminuyó 55 % (Gráfica 5). Todos los datos fueron estadísticamente significativos respecto al control ($p < 0.005$).



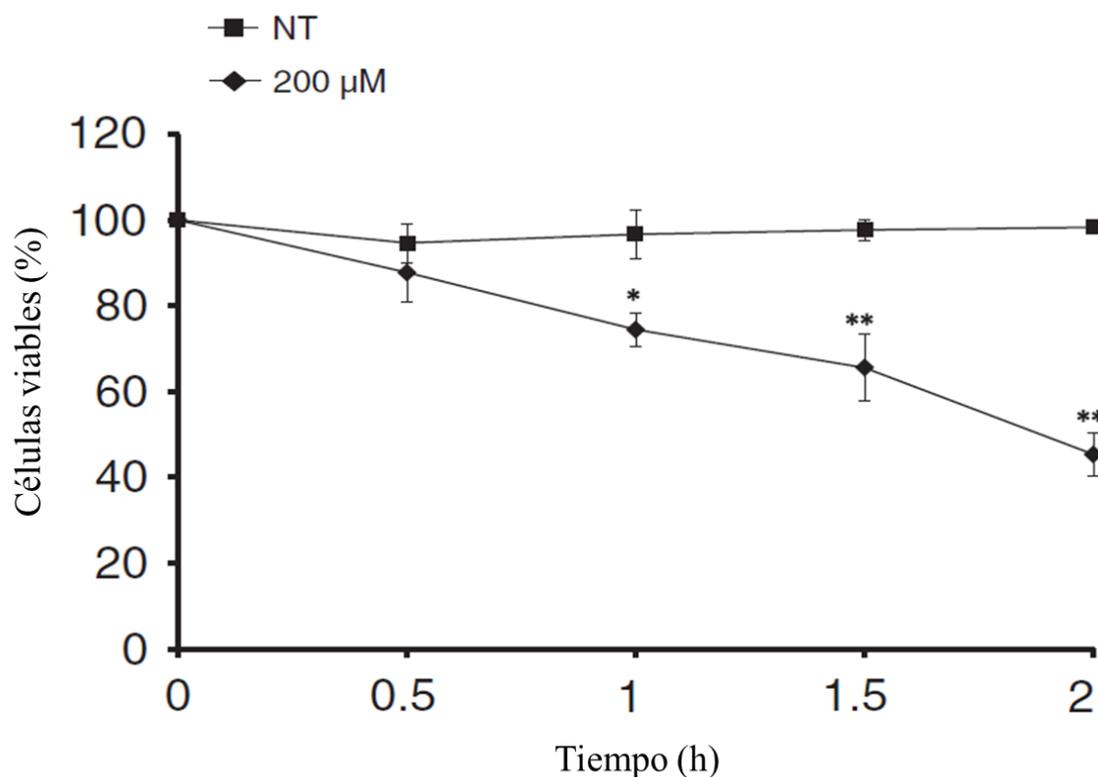
Gráfica 5. Determinación de la viabilidad en la línea celular MCF-7 después del tratamiento con H₂O₂. La línea celular MCF-7 fue tratada con 200 μ M de H₂O₂ durante 0.5, 1, 1.5 y 2 h. Diferencias estadísticamente significativas fueron observadas con respecto a las células no tratadas (*) $p < 0.05$, (**) $p < 0.01$.

La línea celular **MDA-MB-231** tratada con H_2O_2 en mostró el mismo comportamiento (Gráfica 6). Se observó una disminución del 28 % después de 30 min de tratamiento mientras que después de 1h la viabilidad disminuyó 42 % y 58 % a las 2 h de tratamiento. Todos estos datos fueron estadísticamente significativos respecto al control, por lo tanto en la línea celular MDA-MB-231 el tiempo escogido fue las 2 h de tratamiento.



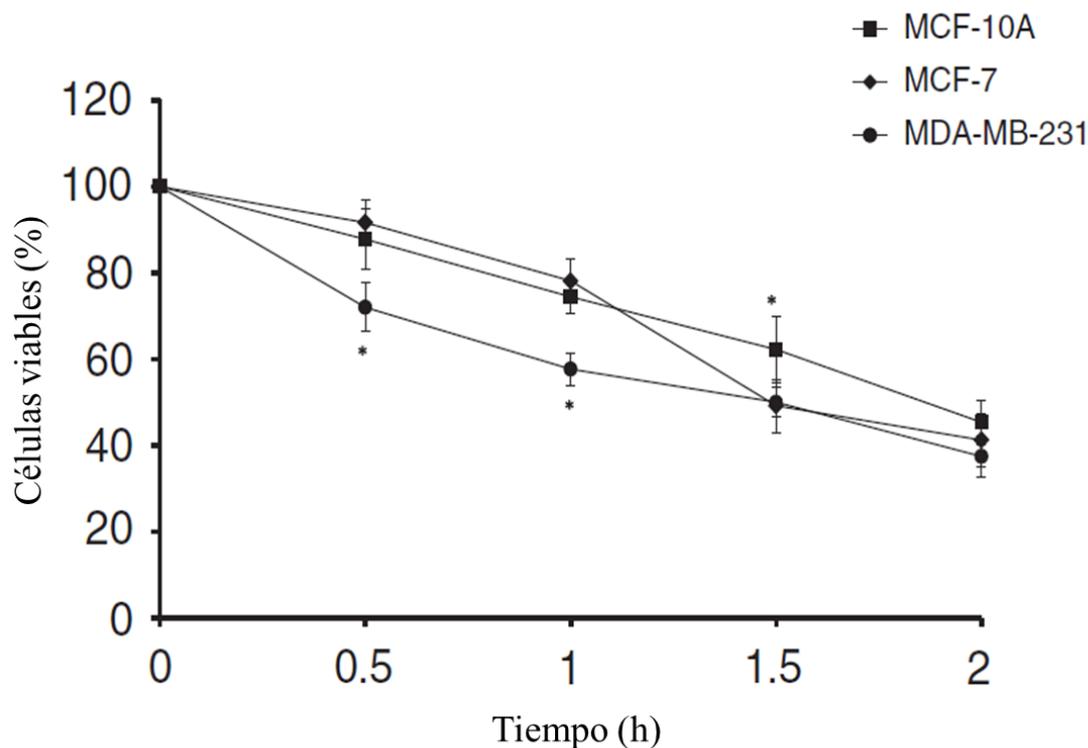
Gráfica 6. Determinación de la viabilidad en la línea celular MDA-MB-231 después del tratamiento con H_2O_2 . La línea celular MDA-MB-231 fue tratada con 200 μM de H_2O_2 durante 0.5, 1, 1.5 y 2 h. Diferencias estadísticamente significativas fueron observadas con respecto a las células no tratadas (*) $p < 0.05$, (**) $p < 0.01$.

De manera interesante la línea celular **MCF-10A** fue la más resistente al tratamiento con CP, fue la más susceptible al H_2O_2 , especialmente a periodos cortos de tiempo. La viabilidad en esta línea celular disminuyó 25 % después de 30 min de tratamiento; 42 % después de 1 h y 60 % a las 2 h de tratamiento (Gráfica 7). Dos horas de tratamiento fue escogida para los siguientes experimentos, debido a que aproximadamente el 50 % de la viabilidad celular fue preservada.



Gráfica 7. Determinación de la viabilidad en la línea celular MCF-10A después del tratamiento con H_2O_2 . La línea celular MCF-10A fue tratada con 200 μM de H_2O_2 durante 0.5, 1, 1.5 y 2 h. Diferencias estadísticamente significativas fueron observadas con respecto a las células no tratadas (*) $p < 0.05$, (**) $p < 0.01$.

Tomando en consideración todos los tiempos de tratamiento con cada línea celular, a la concentración 200 μM , el tiempo 24 h fue escogida para ser usada en cada experimento, debido a que con estas condiciones se mantiene una viabilidad del 50 % y diferencias estadísticas se observaron entre cada línea celular (Gráfica 8).



Gráfica 8. Comparación entre las líneas celulares durante el tratamiento con 200 μM de H_2O_2 . Diferencias estadísticamente significativas fueron observadas con respecto a las células MCF-10A (*) $p < 0.05$; (**) $p < 0.01$. Cada punto representa la media \pm S.D. de 9 determinaciones hechas en tres experimentos independientes.

15.3 Localización subcelular de Bik después del tratamiento con cisplatino

La localización subcelular de BIK fue evaluada después del tratamiento con CP 6 μM mediante inmunofluorescencia en células **MCF-7** de 6 a 36 h. La Figura 13 muestra que la localización de la proteína BIK se localiza en el citosol de las células no tratadas y después de las 6 a las 12 h los niveles incrementan. Después de las 24 h de tratamiento hasta las 36 h, los cambios en la localización de BIK se observan principalmente en el núcleo de las células; esto fue corroborado por la co-localización con el marcador fluorescente DAPI, el cual se adhiere a regiones ricas de adenina y timina en el ADN, esto sugiere que BIK se transloca al núcleo en respuesta al tratamiento con CP en las células **MCF-7**. Se realizaron dos videos que se presentan como material suplementario, en los que se muestra que BIK está prominentemente fuera del núcleo en células **MCF-7** no tratadas.

La inmunofluorescencia en las células **MDA-MB-231** reveló un escenario diferente. La Figura 14 muestra que en este caso, la proteína BIK se localiza en el núcleo en células no tratadas, pero a partir de las 6 h de tratamiento hasta las 12 h hay un incremento en la señal fluorescente que se observa tanto en el núcleo como en el citosol, lo cual sugiere una mayor expresión de la proteína y cambio en la localización celular. A las 24 h la señal de BIK se presenta únicamente en el núcleo y a las 36 h la señal desaparece en ambos sitios.

En la línea celular **MCF-10A** la señal de BIK incrementa con el tiempo especialmente a las 24 y 36 h (Figura 15), implicando nuevamente un aumento en la expresión, sin embargo la señal siempre permanece en el citosol y no se transloca al núcleo. Con todo lo anterior se obtuvieron imágenes en 3D mediante el análisis de Z-stack usando el programa Zen 2010 versión 6.0 (Carl Zeiss), también se obtuvieron imágenes Ortho que sirvieron para determinar y cuantificar la localización nuclear y citoplasmática de la proteína BIK, una reconstrucción de imágenes generó un video en el que claramente muestra el comportamiento de BIK (ANEXOS). Estos resultados confirman que en **MDA-MB-231**, BIK tiene un comportamiento dinámico y se transloca al núcleo después del tratamiento con cisplatino (6h), pero vuelve a entrar repetidamente en las horas

subsecuentes. En las células MCF-7, BIK se transloca lentamente al núcleo logrando su máximo punto a las 24 h. De manera interesante, no se detectó a BIK en el núcleo de las células MCF-10A durante ningún tiempo del tratamiento con cisplatino (Figura 16; Figura 17).

MCF-7

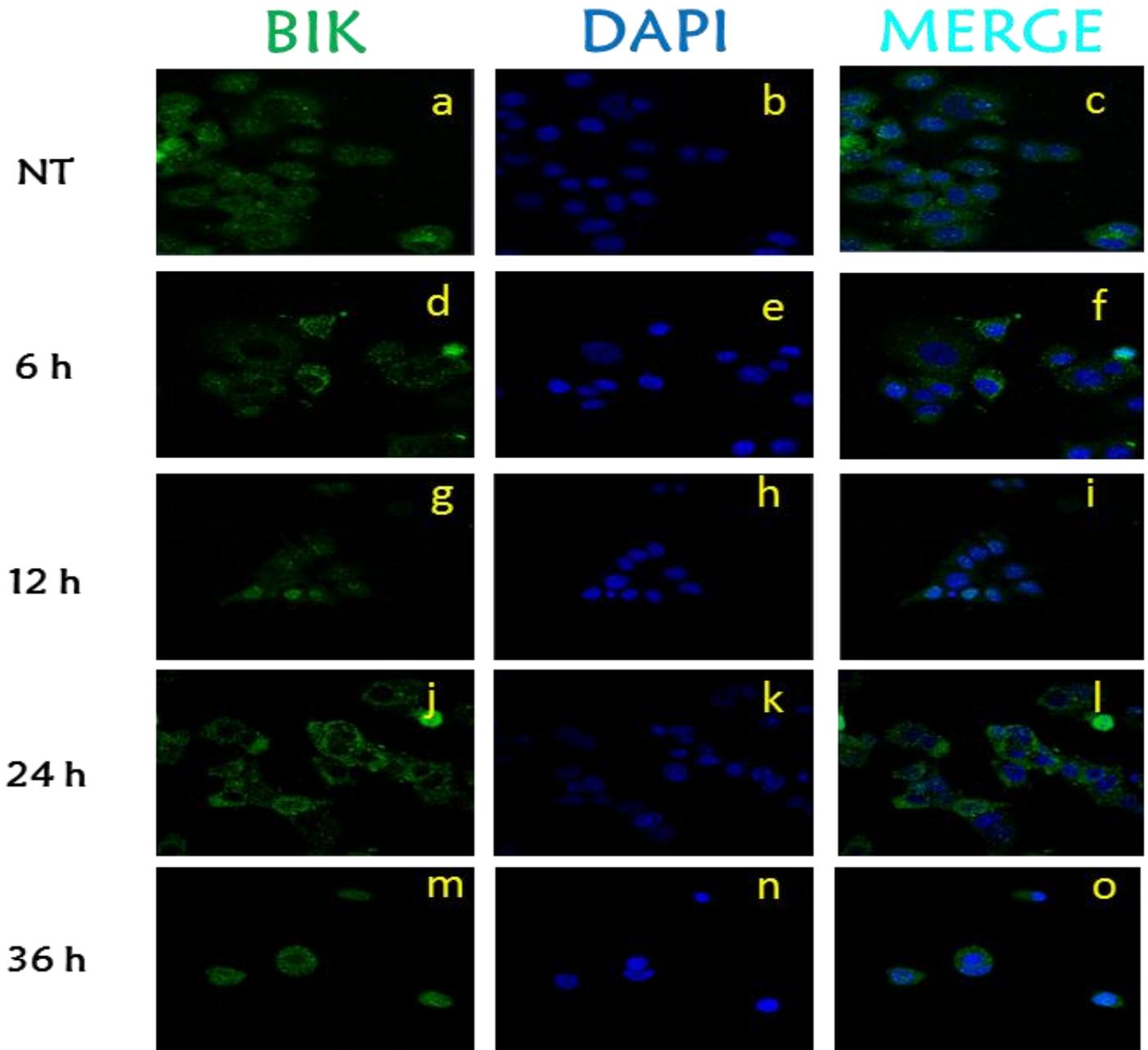


Figura 15. Localización subcelular de BIK durante el tratamiento con cisplatino en la línea celular MCF-7. La línea celular de cáncer mamario MCF-7 fue tratada con 6 μM de cisplatino. Imágenes fueron obtenidas mediante microscopía confocal como se describió en material y métodos. La inmunofluorescencia fue evaluada a 6, 12, 24 y 36 h. En a, d, g, j y m, inmunotinción de BIK (verde); en b, e, h, k y n, tinción con DAPI (azul); en c, f, i, l y o, merge. Imágenes planas fueron obtenidas con el microscopio confocal LSM-780-NLO-Zeiss a 400X con el láser diodo 405 nm para DAPI y Ar/ML 458/488/514 nm para ALEXA FLUOR-488. El análisis de la localización citoplasmática o nuclear de la proteína fue particularmente realizado usando el programa ZEN2010 versión 6.0 (Carl Zeiss). La localización de la proteína BIK en la línea celular MCF-7 es citoplasmática, mientras que al ser tratadas con 6 μM de cisplatino al transcurrir el tiempo la localización de la proteína cambia translocándose al núcleo de la célula gradualmente.

MDA-MB-231

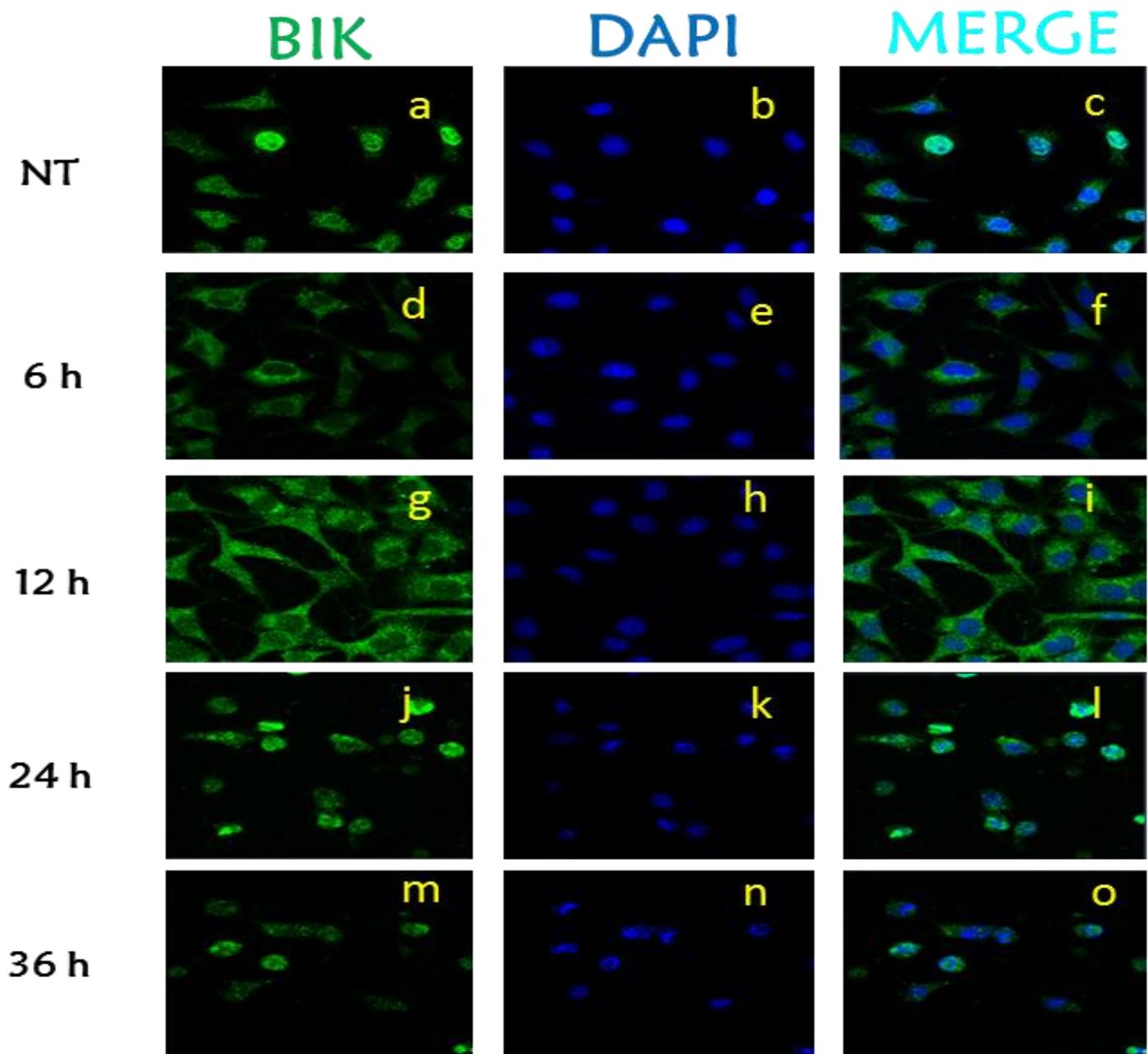


Figura 16. Localización subcelular de BIK durante el tratamiento con cisplatino en la línea celular MDA-MB-231. La línea celular de cáncer mamario MDA-MB-231 fue tratada con 6 μM de cisplatino. Imágenes fueron obtenidas mediante microscopía confocal como se describió en material y métodos. La inmunofluorescencia fue evaluada a 6, 12, 24 y 36 h. En a, d, g, j y m, inmunotinción de BIK (verde); en b, e, h, k y n, tinción con DAPI (azul); en c, f, i, l y o, merge. Imágenes planas fueron obtenidas con el microscopio confocal LSM-780-NLO-Zeiss a 400X con el láser diodo 405 nm para DAPI y Ar/ML 458/488/514 nm para ALEXA FLUOR-488. El análisis de la localización citoplasmática o nuclear de la proteína fue particularmente realizado usando el programa ZEN2010 versión 6.0 (Carl Zeiss). La localización de la proteína BIK en la línea celular MDA-MB-231 es nuclear, mientras que al ser tratadas con 6 μM de cisplatino al transcurrir el tiempo la localización de la proteína cambia translocándose al citoplasma de la célula gradualmente.

MCF-10A

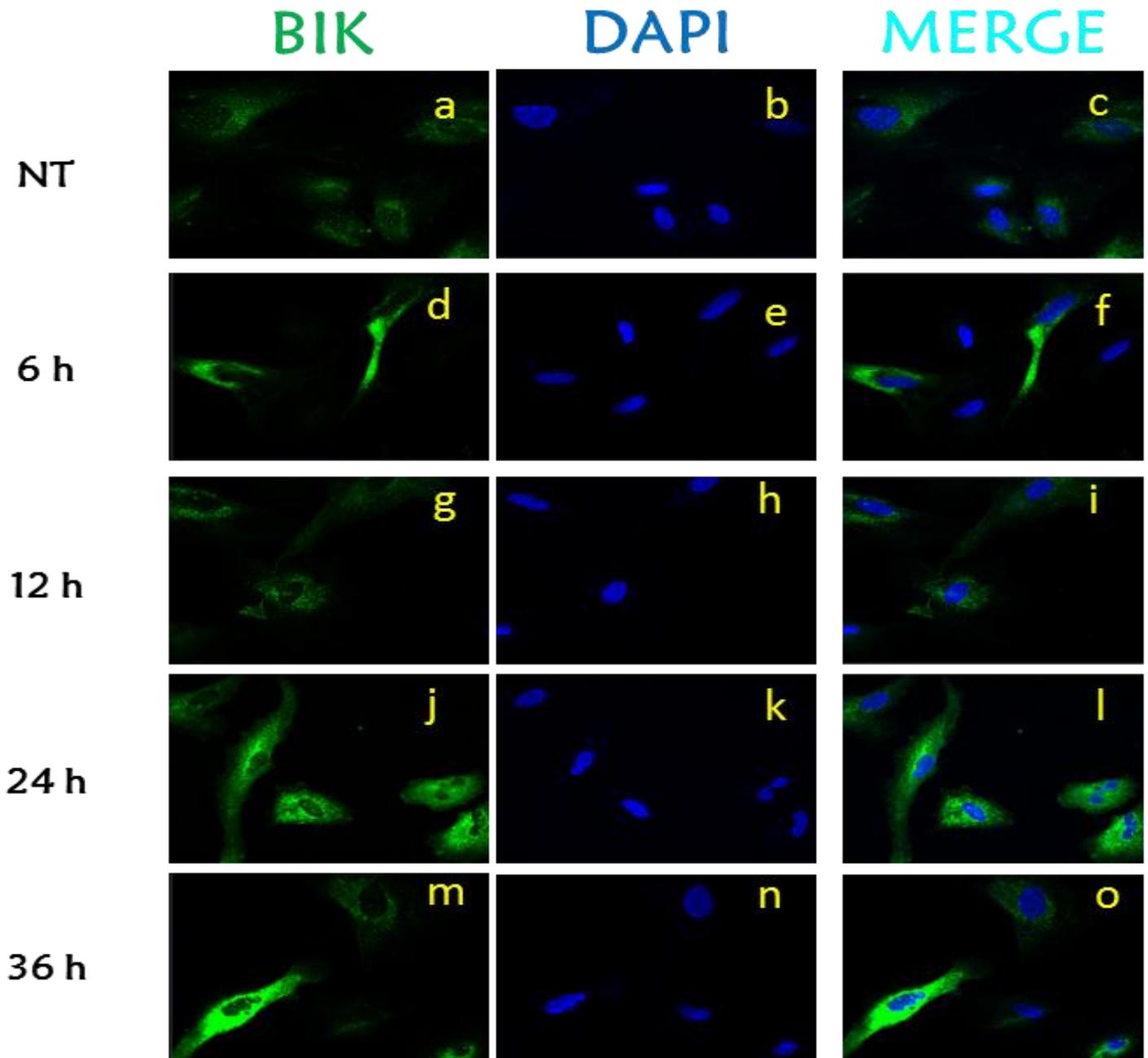
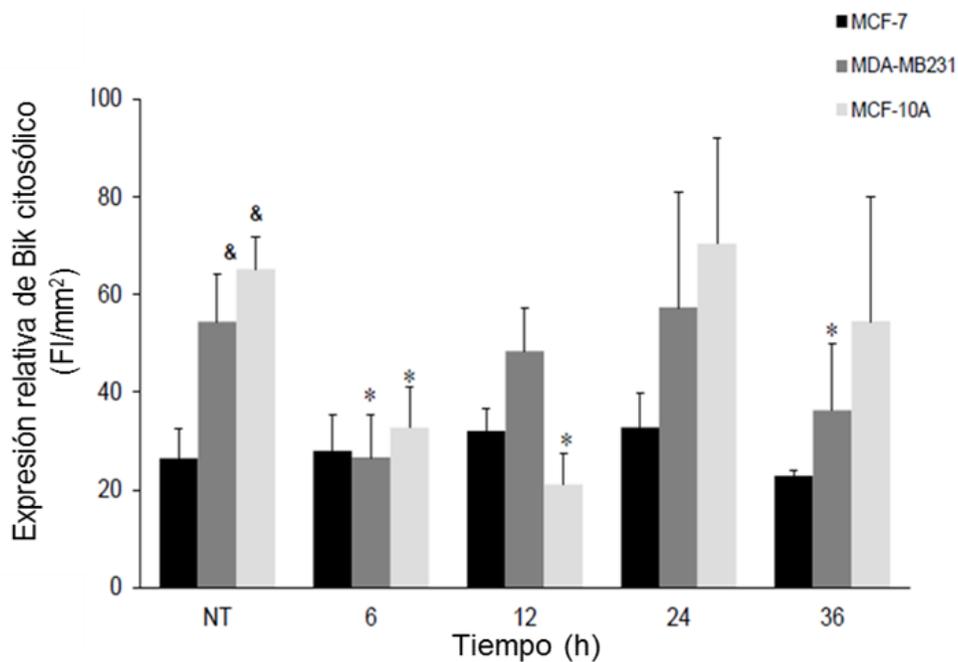
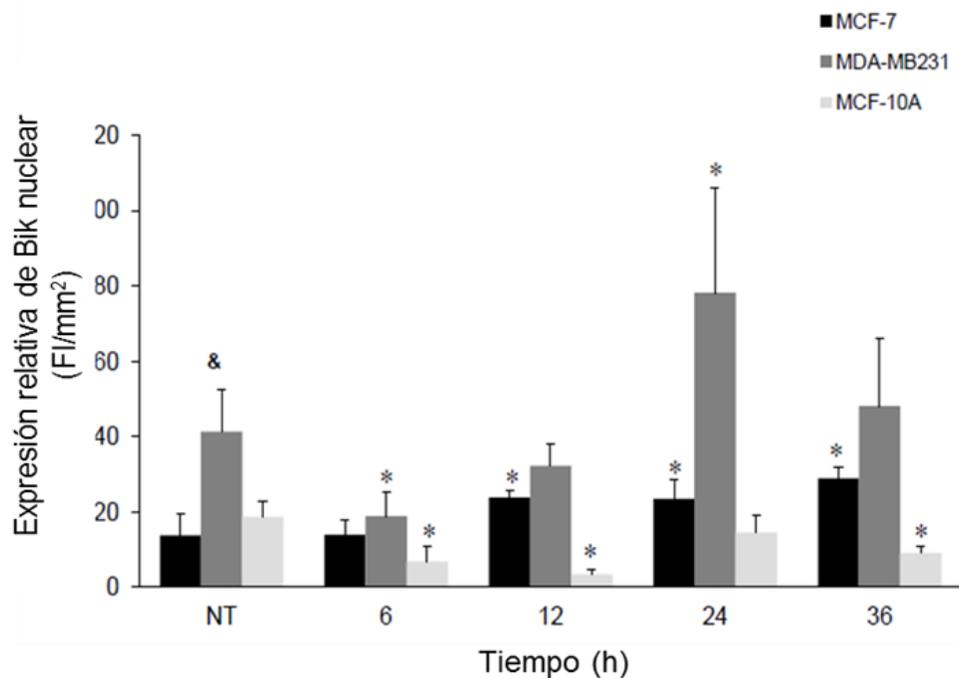


Figura 15. Localización subcelular de BIK durante el tratamiento con cisplatino en la línea celular MCF-10A. La línea celular epitelial de mama MCF-10A fue tratada con 6 μ M de cisplatino. Imágenes fueron obtenidas mediante microscopía confocal como se describió en material y métodos. La inmunofluorescencia fue evaluada a 6, 12, 24 y 36 h. En a, d, g, j y m, inmunotinción de BIK (verde); en b, e, h, k y n, tinción con DAPI (azul); en c, f, i, l y o, merge. Imágenes planas fueron obtenidas con el microscopio confocal LSM-780-NLO-Zeiss a 400X con el láser diodo 405 nm para DAPI y Ar/ML 458/488/514 nm para ALEXA FLUOR-488. El análisis de la localización citoplasmática o nuclear de la proteína fue particularmente realizado usando el programa ZEN2010 versión 6.0 (Carl Zeiss). La localización de la proteína BIK en la línea celular MCF-10A es citoplasmática, mientras que al ser tratadas con 6 μ M de cisplatino al transcurrir el tiempo la localización de la proteína no cambia en la célula.



Gráfica 9. Co-localización de Bik después del tratamiento con cisplatino. La co-localización fue determinada usando el programa Zen 2010 versión 6.0. Cada punto representa la media \pm S.D de 3 determinaciones realizadas en tres experimentos independientes. MCF-7 (barras negras), MDA-MB-231 (barras grises) y MCF-10A (barras blancas). Significancia estadística con respecto a su control no tratado (NT): *($p < 0.05$), fueron considerados. & ($p < 0.05$) con respecto a MCF-7.

15.4 Localización subcelular de Bik después del tratamiento con H₂O₂

La localización subcelular de la proteína BIK después del tratamiento con H₂O₂ mostró el mismo comportamiento a lo antes observado con el tratamiento de CP. En las células **MCF-7** no tratadas y después del incubar a tiempos cortos de 0.5 y 1 h, la señal aparece en el citosol de las células (Figura 17); sin embargo a 2 h de tratamiento, Bik co-localiza con DAPI en el núcleo, lo cual concuerda con los resultados previos donde BIK se transloca al núcleo después de una agresión oxidante.

En las células **MDA-MB-231** (Figura 18), BIK se observa nuevamente en el núcleo de las células no tratadas, después de 2 h de tratamiento con H₂O₂ la señal de fluorescencia incrementa en el citosol de las células, mientras que en el núcleo la señal disminuye, esto sugiere la salida de BIK al núcleo, observándose el mismo efecto con el tratamiento de CP.

En la línea celular MCF-10A la señal fluorescente gradualmente incrementa después del tratamiento con H₂O₂, pero la señal siempre se observó en el citosol (Figura 19), sugiriendo que la proteína Bik en ningún momento se translocó al núcleo. La Figura 4D muestra la localización nuclear realizada con el análisis Z-stack mostrando imágenes ortho y 3D. La figura muestra que la proteína BIK en la línea celular MDA-MB-231, que originalmente se encontraba localizada en el núcleo lentamente se transloca al citosol. En la línea celular MCF-7 la máxima acumulación de BIK en el núcleo se observó a las 24 h de tratamiento, mientras que Bik no fue detectado en el núcleo de las células MCF-10A en ningún tiempo durante el tratamiento con H₂O₂. Es interesante el hecho que haya una diferencia estadísticamente significativa entre la intensidad de la señal nuclear en la línea celular MDA-MB-231 en comparación a las células MCF-7, esto confirma que esta proteína antiapoptótica tiene diferente localización celular en ambas líneas celulares antes de cualquier tratamiento, esto puede estar relacionado al estadio de cáncer y a las propiedades inherentes en cada línea celular (Figura 20).

MCF-7

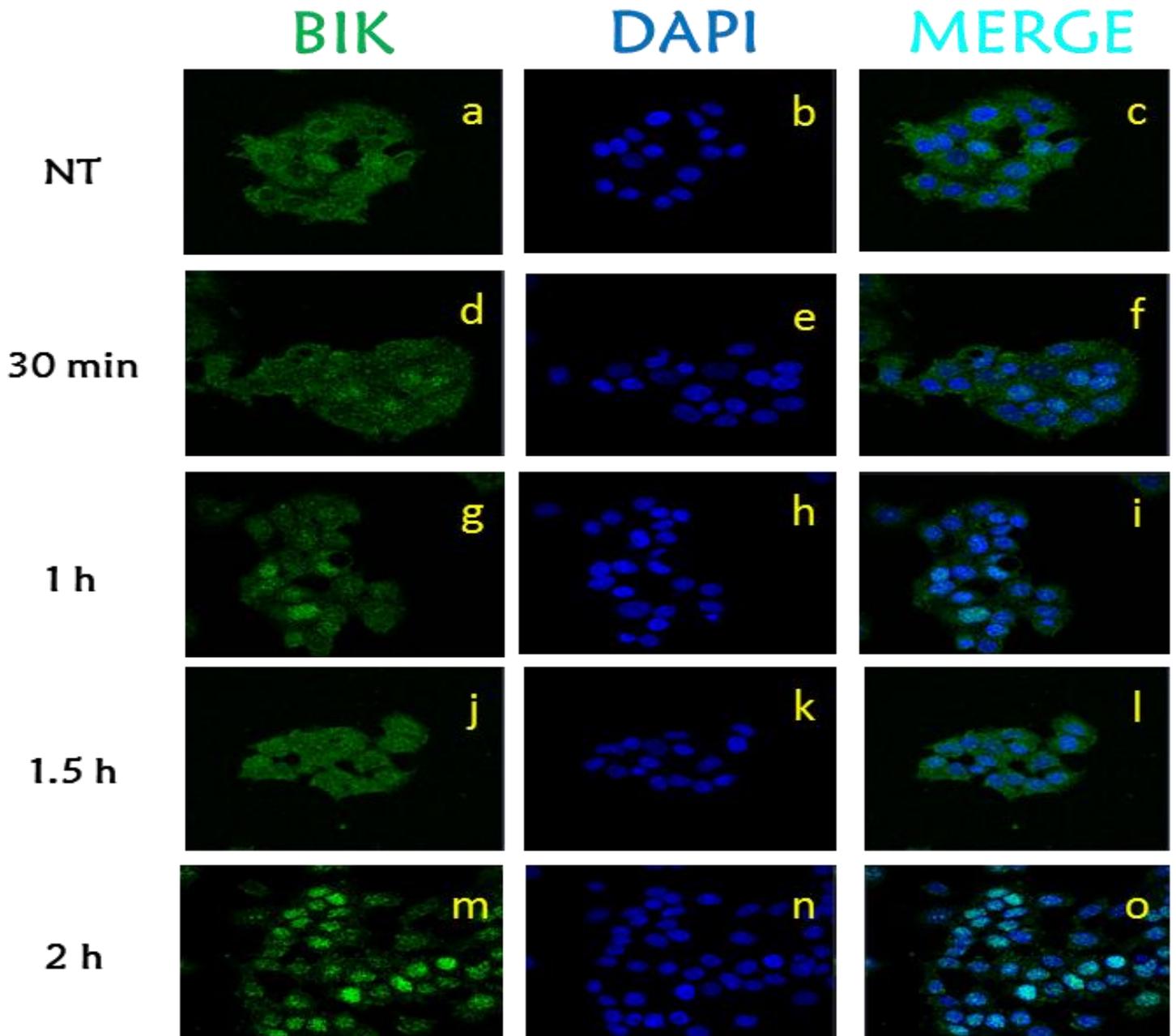


Figura 18. Localización subcelular de BIK durante el tratamiento con H_2O_2 en la línea celular MCF-7. La línea celular de cáncer mamario MCF-7 fue tratada con 200 μM de H_2O_2 . Imágenes fueron obtenidas mediante microscopía confocal como se describió en material y métodos. La inmunofluorescencia fue evaluada a 30 min, 1 h, 1.5 h y 2 h. En a, d, g, j y m, inmunotinción de BIK (verde); en b, e, h, k y n, tinción con DAPI (azul); en c, f, i, l y o, merge. Imágenes planas fueron obtenidas con el microscopio confocal LSM-780-NLO-Zeiss a 400X con el láser diodo 405 nm para DAPI y Ar/ML 458/488/514 nm para ALEXA FLUOR-488. El análisis de la localización citoplasmática o nuclear de la proteína fue particularmente realizado usando el programa ZEN2010 versión 6.0 (Carl Zeiss). La localización de la proteína BIK en la línea celular MCF-7 es citoplasmática, mientras que al ser tratadas con 200 μM de H_2O_2 al transcurrir el tiempo la localización de la proteína cambia translocándose al núcleo de la célula gradualmente.

MDA-MB-231

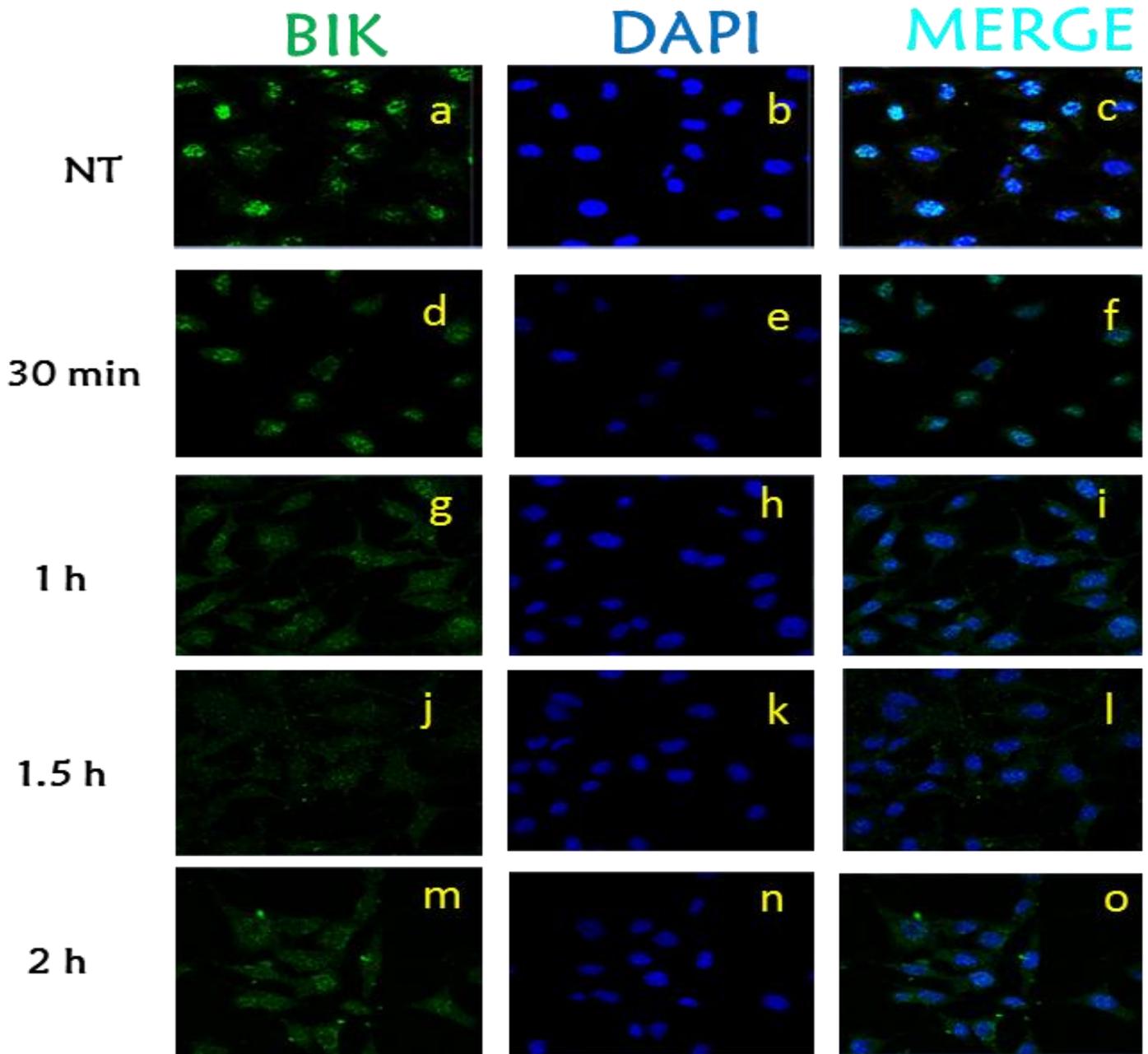


Figura 19. Localización subcelular de BIK durante el tratamiento con H_2O_2 en la línea celular MDA-MB-231. La línea celular de cáncer mamario MCF-7 fue tratada con 200 de H_2O_2 . Imágenes fueron obtenidas mediante microscopía confocal como se describió en material y métodos. La inmunofluorescencia fue evaluada a 30 min, 1 h, 1.5 h y 2 h. En a, d, g, j y m, inmunotinción de BIK (verde); en b, e, h, k y n, tinción con DAPI (azul); en c, f, i, l y o, merge. Imágenes planas fueron obtenidas con el microscopio confocal LSM-780-NLO-Zeiss a 400X con el láser diodo 405 nm para DAPI y Ar/ML 458/488/514 nm para ALEXA FLUOR-488. El análisis de la localización citoplasmática o nuclear de la proteína fue particularmente realizado usando el programa ZEN2010 versión 6.0 (Carl Zeiss). La localización de la proteína BIK en la línea celular MDA-MB-231 es nuclear, mientras que al ser tratadas con 200 μM de H_2O_2 al transcurrir el tiempo la localización de la proteína cambia translocándose al citosol de la célula gradualmente.

MCF-10A

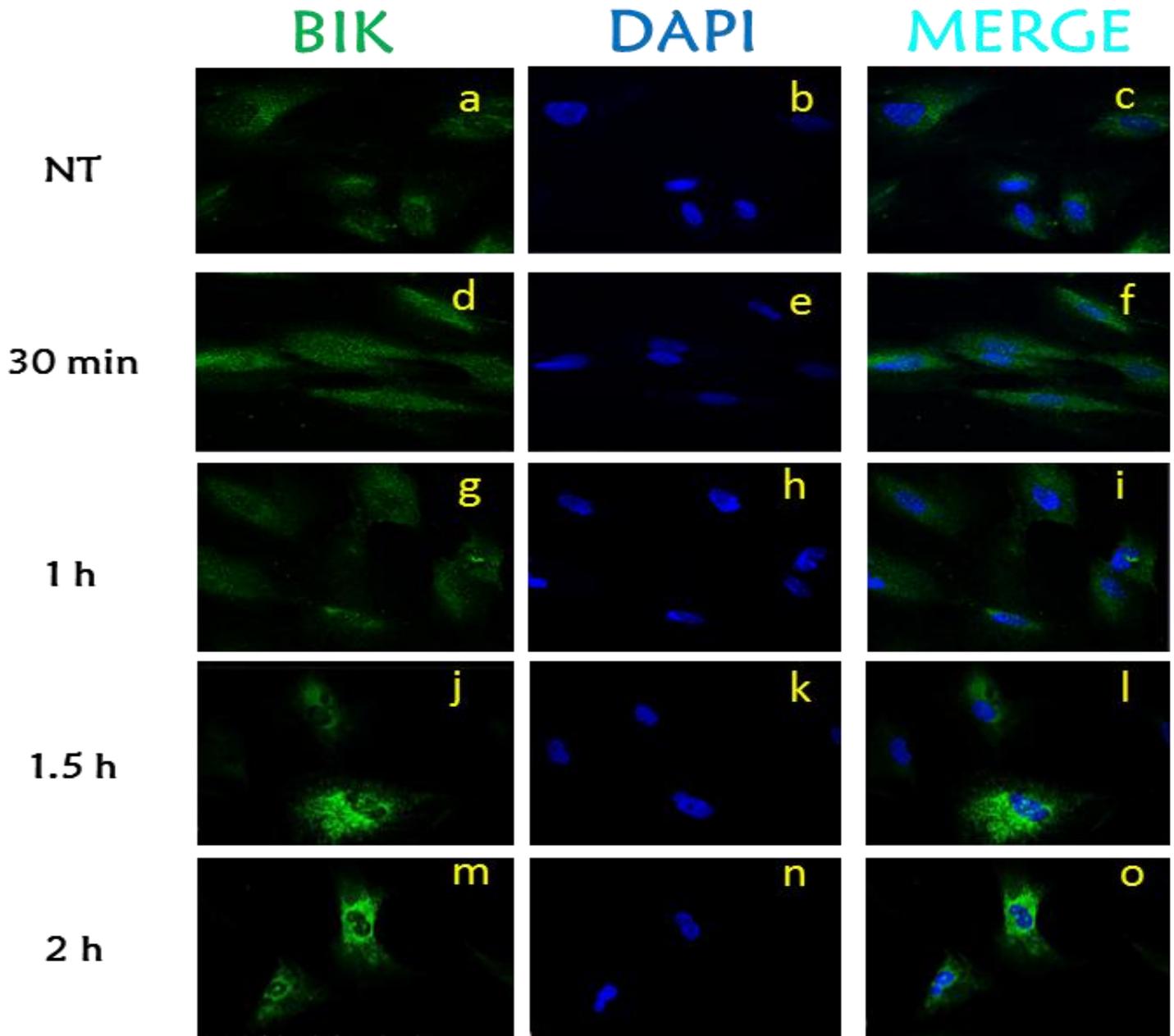
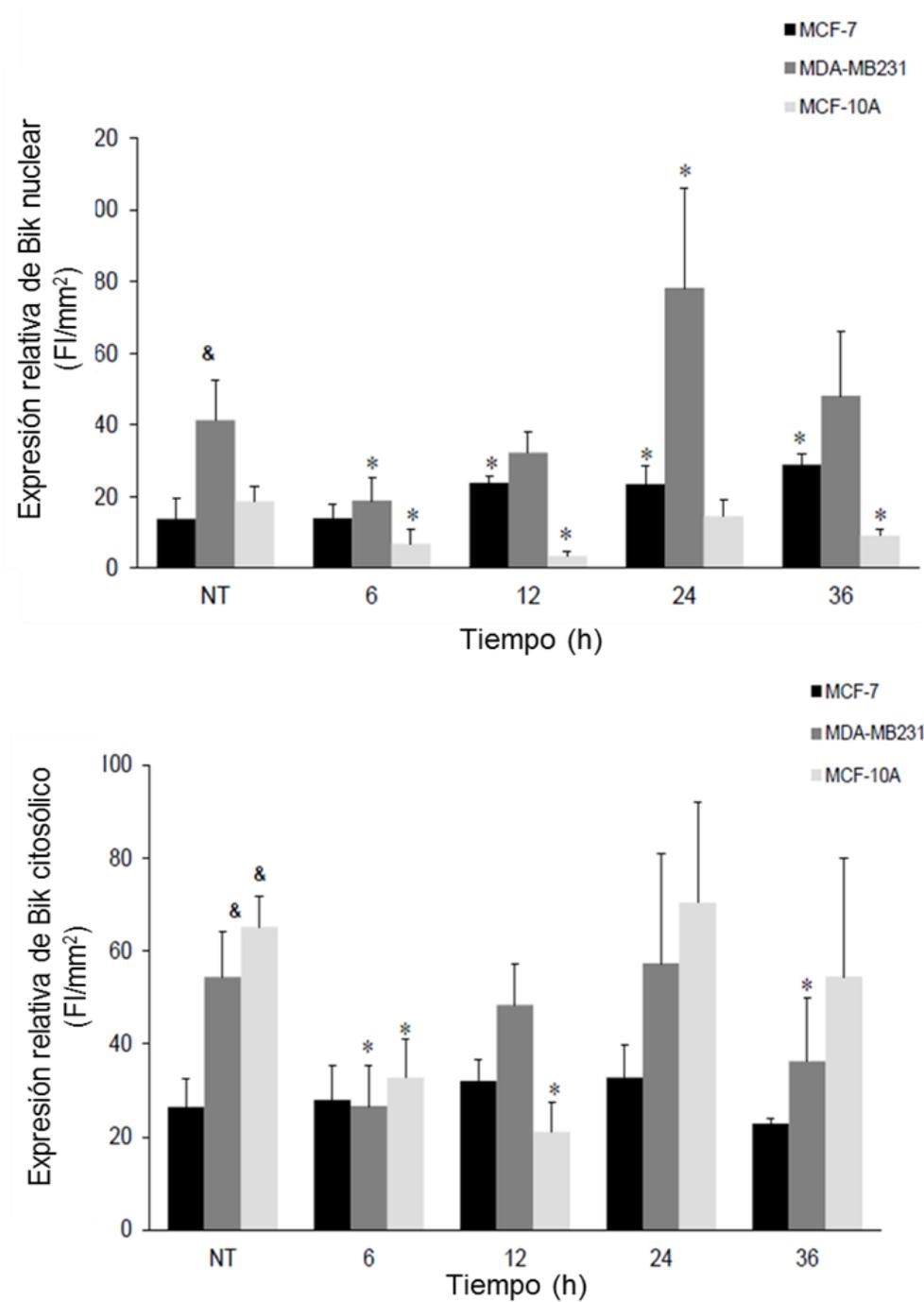


Figura 20. Localización subcelular de BIK durante el tratamiento con H_2O_2 en la línea celular epitelial MCF-10A. La línea celular de epitelial MCF-10A fue tratada con 200 de H_2O_2 . Imágenes fueron obtenidas mediante microscopía confocal como se describió en material y métodos. La inmunofluorescencia fue evaluada a 30 min, 1 h, 1.5 h y 2 h. En a, d, g, j y m, inmunotinción de BIK (verde); en b, e, h, k y n, tinción con DAPI (azul); en c, f, i, l y o, merge. Imágenes planas fueron obtenidas con el microscopio confocal LSM-780-NLO-Zeiss a 400X con el láser diodo 405 nm para DAPI y Ar/ML 458/488/514 nm para ALEXA FLUOR-488. El análisis de la localización citoplasmática o nuclear de la proteína fue particularmente realizado usando el programa ZEN2010 versión 6.0 (Carl Zeiss). La localización de la proteína BIK en la línea celular MCF-10A es citoplasmática, mientras que al ser tratadas con 6 μM de H_2O_2 al transcurrir el tiempo la localización de la proteína no cambia en la célula.



Gráfica 10. Co-localización de Bik después del tratamiento con H₂O₂. La co-localización fue determinada usando el programa Zen 2010 versión 6.0. Cada punto representa la media \pm S.D de 3 determinaciones realizadas en tres experimentos independientes. MCF-7 (barras negras), MDA-MB-231 (barras grises) y MCF-10A (barras blancas). Significancia estadística con respecto a su control no tratado (NT): *(p<0.05), & (p<0.05) con respecto a MCF-7.

16. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

El cáncer de mama es un serio problema de salud a nivel mundial, debido a la heterogeneidad a nivel clínico, histológico y molecular es difícil determinar el rumbo que tomará la enfermedad, de tal forma que nuevos blancos farmacéuticos y estrategias terapéuticas podrían llegar a ser de mucha utilidad para entender y facilitar su tratamiento.

En los últimos años el papel de las proteínas de la familia BCL-2 ha sido reevaluado debido a que la expresión de estas proteínas han cambiado directa o indirectamente por agentes antineoplásicos (Kontos *et al.*, 2014; Safaeian *et al.*, 2014). El papel pro-apoptótico de la proteína BIK se encuentra ampliamente documentado (Chinnadurai, Vijayalingam y Rashmi, 2008). Sin embargo, se ha observado sobreexpresión de *bik* en diversas neoplasias, tal es el caso del cáncer de mama y pulmón (García *et al.*, 2005; Lu *et al.*, 2006), estas evidencias nos motivaron a estudiar más a fondo las posibles funciones alternativas de esta proteína.

Actualmente, las drogas quimioterapéuticas usadas como tratamiento contra el cáncer tienen la capacidad de generar especies reactivas de oxígeno (ROS) e inducir estrés oxidante. Esto puede favorecer algunas sub-poblaciones de células permitiéndoles la capacidad de supervivencia y al mismo tiempo generar quimiotoxicidad en células no malignas (Victorino *et al.*, 2014; Mahalingaiah y Singh, 2014). Por lo tanto, es importante explorar si las proteínas pro-apoptóticas son capaces de cambiar su localización subcelular en función de los cambios de estado redox, lo que podría explicar estos efectos contradictorios y permitirá la generación de nuevos agentes quimioterapéuticos con menos efectos secundarios. Basándonos en la evidencia previa, determinamos si la localización subcelular de la proteína BIK cambia en dos líneas celulares de cáncer de mama, MCF-7 y MDA-MB-231, así como, una línea celular epitelial normal de mama, MCF-10A, es modificada después del tratamiento con un agente oxidante y uno quimiotóxico los cuales directa o indirectamente inducen estrés oxidante. El cisplatino es uno de fuertes agentes antitumorígeno usado para combatir tumores sólidos (Worden *et al.*, 2006; Armstrong *et al.*, 2006; Olausson *et al.*, 2006). El efecto tóxico del cisplatino se debe a su interacción con el ADN el cual forma aductos covalentes impidiendo la separación de la cadena, la

replicación, la transcripción y la activación de la vía mitocondrial apoptótica (García *et al.*, 2007), lo que genera ERO mitocondriales (Cardinaal *et al.*, 2004). Por otro lado, el agente oxidante utilizado fue H₂O₂, quien es uno de los inductores de estrés oxidante, capaz de desencadenar la muerte celular apoptótica a dosis adecuadas (Bauer, 2014; Katsube *et al.*, 2014). Las concentraciones de cisplatino y H₂O₂ utilizados en este trabajo se determinaron tomando en cuenta datos anteriores de nuestro grupo y de otros (Sarangi *et al.*, 2013; Luna-López *et al.*, 2010; Mahalingaiah y Sing, 2014) ajustándose a las condiciones particulares de las líneas celulares que utilizamos, ya que en el caso del H₂O₂ existen señales dentro de la célula que dependen de la concentración. A una concentración nanomolar (10⁻⁹) el H₂O₂ funciona como un señalizador o segundo mensajero estimulando el crecimiento y la proliferación celular, mientras que a concentraciones micromolares (10⁻⁶) promueve la detención transitoria del ciclo celular e induce procesos adaptativos protectores mediante la modificación en la expresión de diferentes genes; sin embargo, a concentraciones milimolares (10⁻³) o mayores, el H₂O₂ claramente induce un estado de estrés oxidante que la célula no puede contrarrestar, por lo que se genera la muerte celular, ya sea por procesos apoptóticos o necróticos (Luna-López *et al.*, 2010).

Un interesante hallazgo en nuestro trabajo fue la localización nuclear de la proteína BIK en la línea celular MDA-MB-231, la localización nuclear de esta proteína no ha sido reportada hasta ahora, se ha encontrado principalmente en el retículo endoplásmico y en la mitocondria (Germain *et al.*, 2002; Szegezdi *et al.*, 2009). Por otro lado, en la línea celular MCF-7 la localización de BIK antes de los tratamientos fue en el citoplasma, de acuerdo a lo ya reportado. Sin embargo, después de tratar a las células, BIK cambió su posición en ambas líneas celulares, MCF-7 y MDA-MB-231 de manera opuesta; en la línea celular MCF-7 del citoplasma se movió al núcleo y en las células MDA-MB-231 del núcleo al citoplasma (Figuras 3 y 4). Aunque no evaluamos la función de esta proteína en el núcleo, es un dato importante y relevante debido a las implicaciones que podría tener esta proteína y porque la distribución celular fue diferente en dos líneas celulares las cuales representan dos estadios distintivos de la enfermedad. De igual forma se observó diferencia significativa en la intensidad de la señal de la proteína en las células MDA-MB-231 comparada con las células MCF-7, esto confirma que esta proteína pro-apoptótica tiene una localización subcelular diferente en ambas líneas celulares ante el tratamiento, esto puede

estar relacionado al estadio del cáncer en que se encuentre y las propiedades inherentes en cada línea celular.

En cuanto a la línea celular epitelial normal, MCF-10A, no hubo cambios en la localización subcelular de BIK. Estas células mostraron mayor resistencia al tratamiento con cisplatino que las células transformadas, lo cual sugiere que la translocación de BIK puede estar relacionada con una función particular durante la tumorigénesis, tal vez puede estar relacionada con la promoción o incremento de la proliferación o metástasis, pero no está relacionada a la supervivencia celular. Por otra parte, a fin de obtener la característica tumorigénica las células transformadas pueden probablemente renunciar a varios mecanismos de subsistencia o protección.

Sin embargo, no fue totalmente inesperado que se encontrar a BIK en otro compartimento celular diferente en las líneas celulares transformadas, ya que en los últimos años se han encontrado otros miembros de la familia BCL-2 en posiciones inusuales, realizando funciones diferentes a las ya reportadas canónicamente (Danial *et al.*, 2008; Martinou y Youle, 2011). A pesar de que estas proteínas son conocidas por su participación en la apoptosis, hay fuerte evidencia que sugiere que las proteína BH3 *only* están involucradas en funciones vitales más allá de la muerte celular, incluyendo la función en el metabolismo de nutrientes (Hetz y Glimcher, 2008). El mejor ejemplo es la proteína BAD, la cual tiene diferentes funciones. Ha sido involucrada en la progresión del ciclo celular cuando esta se dimeriza con BCL-xL, evitando el arresto celular en la fase G0/G1 (Chattopadhyay *et al.*, 2001). En otro estudio, sobreexpresión de BAD no solo se asoció con la progresión del ciclo celular sino con la producción de IL-2 después de la activación de las células T como una consecuencia de la regulación de AKT (Mok *et al.*, 1999).

Danial y colaboradores, encontraron otro papel fisiológico de BAD durante la secreción de insulina por las células β -pancreáticas. Este nuevo papel de la fosforilación de BIK en la serina 155, la cual inactiva su función pro-apoptótica y es requerida para su activación durante la secreción de la insulina estimulada por glucosa (Danial *et al.*, 2008). En el cerebro, BAD ha sido encontrada en varias localizaciones anatómicas, incluyendo aquellas involucradas en la regulación de glucosa y nutrientes (Bu y Lephart, 2005).

Otro ejemplo es la proteína pro-apoptótica BID, a la cual se le ha atribuido otra función fisiológica. BID es un mediador crítico durante la inflamación e inmunidad innata

(Garrett *et al.*, 2010; Takeuchi y Akira, 2010). BID también ha sido implicada en la transferencia lipídica entre la membrana mitocondrial y otras membranas celulares, tiene de igual forma un papel en el transporte y reciclaje de fosfolípidos (Esposti *et al.*, 2001). Bid tiene una doble función con respecto a la respuesta al estrés, está involucrada en la respuesta al daño al ADN y su fosforilación puede regular negativamente su función pro-apoptótica (Song *et al.*, 2010).

Todo lo anterior sugiere que BIK puede también estar involucrada en proceso que no necesariamente implica su participación en la apoptosis. Existen reportes en el que se muestra la interacción de BIK con algunos factores de transcripción, como ERK 1/2, independientemente de su dominio BH3 (Mebratu *et al.*, 2008), la interacción directa impide que este se trasladen al núcleo. Un dato interesante es que cuando la apoptosis es estimulada por un inductor oxidante en líneas celulares que expresan p53 de manera silvestre como MCF-7, p53 se transloca al núcleo. Esta translocación no se observa en líneas celulares con p53 mutada o knockout como MDA-MB-231 y SKOV3 (Truong *et al.*, 2014; Xuan *et al.*, 2014). Así que BIK puede estar participando o favoreciendo la translocación nuclear de p53 en respuesta al estrés oxidante en las células MCF-7. Otro estudio asocia a BIK con los niveles de calcio en el RE y la regulación de la autofagia (Leber y Andrews, 2010; Maiuri *et al.*, 2010). Se sabe que BIK forma heterodímeros con miembros anti-apoptóticos como BCL-2 y BCL-xL durante la apoptosis (Chinnadurai *et al.*, 2008), esto demuestra que BIK es capaz de desplazar a L del complejo que forma con el factor 1 de privación de nutrientes de la autofagia (NAF-1). NAF-1 se asocia físicamente con el inositol 1, 4, 5-trifosfato (IP3), se requiere del canal Ca^{2+} para la regulación del canal dependiente L (Chang *et al.*, 2012); el desplazamiento de BIK permite la liberación de Ca^{2+} del RE, esto promueve la autofagia (Maiuri *et al.*, 2010; Szegezdi *et al.*, 2009).

Algunos hechos importantes permanecen sin elucidar, sin embargo la cuestión más importante es entender la función de BIK en el núcleo y si ésta implica cambios en la transcripción de genes. Otra cuestión es cuál proteína o chaperona transloca a BIK y porqué las líneas que representan diferentes estadios del cáncer de mama presentan diferentes localizaciones de la proteína. Sin embargo, el hallazgo de que la localización de la proteína en las células MCF-10A no cambió y fueron más resistentes al tratamiento con cisplatino abre una nueva ventana para estudiar nuevos blancos terapéuticos. Finalmente, la respuesta

a estas preguntas nos conducirá a una mejor comprensión del papel de la proteína BCL-2 en el cáncer y nos permitirá desarrollar mejores terapias con menos efectos secundarios y perjudiciales.

17. CONCLUSIONES

En la línea celular MCF-7, BIK se encontró localizada en el citosol de las células, sin embargo después del cambio de estrés oxidante producido por el tratamiento con cisplatino y H_2O_2 , esta proteína gradualmente se translocó al núcleo de las mismas.

En la línea celular metastásica MDA-MB-231, BIK se localizó en el núcleo de las células sin embargo, después del tratamiento con cisplatino y H_2O_2 la proteína se translocó al citosol de las células.

En la línea celular epitelial la localización subcelular de la proteína BIK antes de los tratamientos fue el citosol de las células y no se observó cambio en la localización después de los tratamientos, por lo que esta línea celular es más resistente comparada con las líneas celulares transformadas de cáncer de mama.

18. PERSPECTIVAS

Determinar la co-localización de Bik y p53 en el núcleo después de inducir la muerte celular en las diferentes líneas celulares estudiadas.

Determinar mediante inmunoprecipitación la interacción de Bik y p53 después de inducir la muerte celular en las diferentes líneas celulares estudiadas.

Determinar la participación de Bik en la migración, la capacidad invasiva y en proliferación celular de las diferentes líneas celulares estudiadas.

Determinar la función de la proteína bik en los tumores quimioresistentes y metastásicos.

Determinar si la proteína Bik tiene regiones de unión al ADN, si funciona como coactivador para factores de transcripción o algún otro mecanismo por el cual pueda ingresar al núcleo.

19. ANEXOS

Los videos fueron generados usando imágenes ortho e imágenes 3D obtenidas con el análisis realizado usando el programa Zen2010 versión 6.0 (Carl Zeiss).

- **Video 1:** MCF-7 control.avi. Muestra a Bik (verde) el cual está principalmente fuera del núcleo (azul).

<https://www.dropbox.com/sc/im8kdx1tinnev6j/AACpLVC45KrqInczmuwiKEKa>

- **Video 2:** MCF-7 Cisplatino a 24h-6 μ M.avi. Muestra a Bik (verde) el cual ha sido incorporado al núcleo (azul).

<https://www.dropbox.com/sc/hj74tgatm8sq9os/AABRrQTIV6NINACfnOw64CQ6a>

- **Video 3:** MDA Control.avi. Muestra que Bik (verde) se localiza en el núcleo de células no tratadas

<https://www.dropbox.com/sc/rclu6lqmqqxpc1h/AAAOcM6QJTqPaXL8F1Cw25s7a>

- **Video 4:** MCF-10A Cisplatino 24h-6 μ M.avi. Muestra que en esta línea celular después del tratamiento la proteína permanece fuera del núcleo, sin ningún cambio aparente en la localización.

<https://www.dropbox.com/sc/adrbttekdwdwzyv/AACppMI9kljzpgwPEkI4Af1oa>

20. BIBLIOGRAFÍA

- Afonso N, Bouwman D. (2008). Lobular carcinoma in situ. *Eur J Cancer Prev.* 17(4):312-6.
- Alazard R, Germanier M, Johnson NP. (1982) Mechanism of toxicity of platinum(II) compounds in repair-deficient strains of *Escherichia coli*. *Mutat Res* 93:327-337.
- Ames BN. (1983). Dietary carcinogens and anticarcinogens. Oxygen radicals and degenerative diseases. *Science.* 23; 221(4617):1256-64.
- Antunes F, Cadenas E. (2000). Estimation of H₂O₂ gradients across biomembranes. *FEBS Lett.* 16; 475(2):121-6.
- Arena V, Martini M, Luongo M, Capelli A, Larocca LM. (2003). Mutations of the BIK gene in human peripheral B-cell lymphomas. *Genes Chromosomes Cancer.* 38;1:91-6.
- Ariazi E, Ariazi J, Cordera F, Jordan V. (2006). Estrogen receptors as therapeutic targets in breast cancer. *Curr Top Med Chem.* 6;3:181-202.
- Armstrong KD, Bundy B, Wenzel L, Huang HQ, Baergen R, Lele S, Copeland LJ, Walker JL, Burger RA. (2006). Intraperitoneal Cisplatin and Paclitaxel in ovarian cancer. *N Engl J Med.* 5;354(1):34-43.
- Arowolo OA, Njiaju UO, Ogundiran TO, Abidoye O, Lawal OO, Obajimi M, Adetiloye AV, Im HK, Akinkuolie AA, Oluwasola A, Adelusola K, Kayode AA, Agbakwuru AE, Oduntan H, Babalola CP, Fleming G, Olopade OC, Falusi AG, Durosinni MA, Olopade OI. (2013). Neo-adjuvant capecitabine chemotherapy in women with newly diagnosed locally advanced breast cancer in a resource-poor setting (Nigeria): efficacy and safety. *Breast J.* 19(5):470-7.
- Aruoma OI, Halliwell B, Dizdaroglu M. (1989). Iron ion-dependent modification of bases in DNA by the superoxide radical-generating system hypoxanthine/xanthine oxidase. *J Biol Chem.* 5;264(22):13024-8.
- Azzopardi, JG, Ahmed A, Millis RR. 1979. *Problems in Breast Pathology.* W.B. Saunders Company Ltd, London.

- Azzopardi JG, Chepick OF, Hartmann WH, Jafarey NA, Llombart-Bosch A, Ozzello AL, Rilke F, Sasano N, Sobin LH, Sommers SC, Stalsberg H, Sugar J, Williams AO. (1982). The world health organization histological typing of breast tumors e second edition. The World Organization. *Am J Clin Pathol.* 78(6):806-16.
- Balaban RS, Nemoto S, Finkel T. (2005). Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell* 120: 483-95.
- Basu A, Krishnamurthy S. (2010). Cellular responses to Cisplatin-induced DNA damage. *J Nucleic Acids.* 8.
- Batandier C, Leverve X, Fontaine, E. (2004). Opening of the mitochondrial permeability transition pore induces reactive oxygen species production at the level of the respiratory chain complex I. *J Biol Chem,* 279, 17197-17204.
- Bauer G. (2014). Targeting extracellular ROS signaling of tumor cells. *Anticancer Res.* 34(4):1467-82.
- Bayir H, Kagan VE. (2008). Bench-to-bedside review: Mitochondrial injury, oxidative stress and apoptosis -there is nothing more practical than a good theory-. *Crit Care.* 12(1):206.
- Blackwood MA, Weber BL. (1998). BRCA1 and BRCA2: from molecular genetics to clinical medicine. *J Clin Oncol.* 16(5):1969-77.
- Blatt N, Boitano A, Lyssiotis C, Opipari Jr A, Glick G. (2009). Bz-423 superoxide signals B cell apoptosis via Mcl-1, Bak, and Bax. *Biochem Pharmacol* 78: 966– 973.
- Bodet L, Ménoret E, Descamps G, Pellat-Deceunynck C, Bataille R, Le Gouill S, Moreau P, Amiot M, Gomez-Bougie P. (2010). BH3-only protein Bik is involved in both apoptosis induction and sensitivity to oxidative stress in multiple myeloma. *Br J Cancer.* 7;103(12):1808-14.
- Boveris A, Stoppani AO. (1977). Hydrogen peroxide generation in *Trypanosoma cruzi*. *Experientia.* 15;33(10):1306-8.
- Boyd JM, Malstrom Subramanian T, Venkatesh LK, Schaeper U, Elangovan B, D'Sa-Eipper C, Chinnadurai G. (1994). Adenovirus E1B 19 kDa and Bcl-2 proteins interact with a common set of cellular proteins. *Cell.* 79(2):341–351.

- Bredel M, Juric D, Harsh GR, Vogel H, Recht LD, Sikic BI. (2005). High resolution genome-wide mapping of genetic alterations in human glial brain tumors. *Cancer Res.* 65(10):4088–4096.
- Brown GC, Borutaite V. (2001). Nitric oxide, mitochondria, and cell death. *IUBMB Life.* 52(3-5):189-95.
- Brunelle JK, Letai A. (2009). Control of mitochondrial apoptosis by the Bcl-2 family. *J. Cell Sci.* 12:437–441.
- Bu L, Lephart ED. (2005). Soy isoflavones modulate the expression of BAD and neuron-specific beta III tubulin in male rat brain. *Neurosci. Lett.* 385: 153–157.
- Burdon R. (1995). Superoxide and hydrogen peroxide in relation to mammalian cell proliferation. *Free Radic. Biol. Med.* 18: 775–794.
- Burgess DJ. (2013). Apoptosis: Refined and lethal. *Nat Rev Cancer.* 2013 Feb;13(2):79.
- Cardinaal RM, De Groot JC, Huizing EH, Smoorenburg GF, Veldman JE. (2004). Ultrastructural changes in the albino guinea pig cochlea at different survival times following cessation of 8-day cisplatin administration. *Acta Otolaryngol.* 124: 144–154.
- Carlson RW, Carlson MD, Brown E, Burstein HJ, Gradishar WJ, Hudis CA, Loprinzi C, Mamounas EP, Perez EA, Pritchard K, Ravdin P, Recht A, Somlo G, Theriault RL, Winer EP, Wolff AC. (2006). National Comprehensive Cancer Network. NCCN Task Force Report: Adjuvant Therapy for Breast Cancer Task Force. *J. Natl. Compr. Cancer Netw.* 4:S1–S26.
- Castells A, Ino Y, Louis DN, Ramesh V, Gusella JF, Rustgi AK. (1999). Mapping of a target region of allelic loss to a 0.5-cM interval on chromosome 22q13 in human colorectal cancer. *Gastroenterology.* 117(4):831–837.
- Cepeda V, Fuertes MA, Castilla J, Alonso C, Quevedo C, Perez JM. (2007). Biochemical mechanisms of cisplatin cytotoxicity. *Anticancer Agents Med Chem.* 7(1):3-18.
- Chance B, Sies H, Boveris A. (1979). Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev* 59: 527-605

- Chang NC, Nguyen M, Bourdon J, Risse PA, Martin J, Danialou G, Rizzuto R, Petrof BJ, Shore GC. 2012. Bcl-2-associated autophagy regulator Naf-1 required for maintenance of skeletal muscle. *Hum. Mol. Genet.* 21:2277–2287.
- Chattopadhyay A, Chiang CW, Yang E. (2001). BAD/BCL-[X(L)] heterodimerization leads to bypass of G0/G1 arrest. *Oncogene* 20: 4507–4518.
- Chinnadurai G, Vijayalingam S, Rashmi R. (2008). BIK, the founding member of the BH3-only family proteins: mechanisms of cell death and role in cancer and pathogenic processes. *Oncogene.* 27:S20–S29.
- Chipuk JE, Moldoveanu T, Llambi F, Parsons MJ, Green DR. (2010). The BCL-2 Family Reunion. *Mol. Cell.* 37: 299–310.
- Chittenden T, Flemington C, Houghton AB, Ebb RG, Gallo GJ, Elangovan B, Chinnadurai G, Lutz RJ. (1995). A conserved domain in Bak, distinct from BH1 and BH2, mediates cell death and protein binding functions. *EMBO J.* 14(22):5589–5596.
- Chen Q, Vazquez EJ, Moghaddas S, Hoppel CL, Lesnefsky EJ. (2003). Production of reactive oxygen species by mitochondria: central role of complex III. *J Biol Chem* 278: 36027-31.
- Chen J, Emara N, Solomides C, Parekh H, Simpkins H. (2010). Resistance to platinum-based chemotherapy in lung cancer cell lines. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 66, 1103-1111.
- Chen Q, Lesnefsky EJ. (2011). Blockade of electron transport during ischemia preserves bcl-2 and inhibits opening of the mitochondrial permeability transition pore. *FEBS Lett,* 585, 921-926.
- Cheeseman K, Slater T. (1993). An introduction to free radical biochemistry. *British Medical Bulletin.* 49(3):481-93.
- Chipuk JE, Green DR. (2008). How do BCL-2 proteins induce mitochondrial outer membrane permeabilization?. *Trends Cell Biol.* 18:157–164.
- Cleator S, Ahamed E, Coombes R, Palmieri C. (2009). A update on the treatment of patients with hormone receptor-positive breast cancer. *Clin Breast Cancer.Suppl* 1:S6-S17.

- Coultas L, Bouillet P, Loveland KL, Meachem S, Perlman H, Adams JM, Strasser A. (2005). Concomitant loss of proapoptotic BH3-only Bcl-2 antagonists Bik and Bim arrests spermatogenesis. *EMBO J.* 24(22):3963–3973.
 - Cullen KJ, Yang Z, Schumaker L, Guo Z. (2007). Mitochondria as a critical target of the chemotherapeutic agent cisplatin in head and neck cancer. *J Bioenerg Biomembr*, 39, 43-50.
 - Cummings BS, Schnellmann RG. (2002). Cisplatin-induced renal cell apoptosis: caspase 3-dependent and -independent pathways. *J Pharmacol Exp Ther.* 302, 8-17.
 - Custodio JB, Cardoso CM, Santos MS, Almeida LM, Vicente JA, Fernandes, MA. (2009). Cisplatin impairs rat liver mitochondrial functions by inducing changes on membrane ion permeability: prevention by thiol group protecting agents. *Toxicology*, 259, 18-24.
- Cvitkovic E. (1998). Cumulative toxicities from cisplatin therapy and current cytoprotective measures. *Cancer Treat Rev*, 24, 265-281.
- Czabotar PE, Lessene G, Strasser A, Adams JM. (2014). Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 15: 49-63.
 - Dai Z, Liu S, Marcucci G, Sadee W. (2006). 5-Aza-2'-deoxycytidine and depsipeptide synergistically induce expression of BIK (BCL2-interacting killer). *Biochem Biophys Res Commun.* 351:455–461.
 - Danial NN, Walensky LD, Zhang CY, Choi CS, Fisher JK, Molina AJ, Datta SR, Pitter KL, Bird GH, Wikstrom JD, Deeney JT, Robertson K, Morash J, Kulkarni A, Neschen S, Kim S, Greenberg ME, Corkey BE, Shirihai OS, Shulman GI, Lowell BB, Korsmeyer SJ. (2008). Dual role of proapoptotic BAD in insulin secretion and beta cell survival. *Nat. Med.* 14: 144–153.
 - Daniel PT, Pun KT, Ritschel S, Sturm I, Holler J, Dörken B, Brown R. (1999). Expression of the death gene Bik/Nbk promotes sensitivity to drug-induced apoptosis in corticosteroid-resistant T-cell lymphoma and prevents tumor growth in severe combined immunodeficient mice. *Blood* 94: 1100–1107.
 - De Duve C, Baudhuin P. (1969). Peroxisomes microbodies and related particles. *Physiol Rev.* 46:323–357.

- De Mello Filho AC, Meneghini R. (1985). Protection of mammalian cells by o-phenanthroline from lethal and DNA-damaging effects produced by active oxygen species. *Biochim Biophys Acta.* 30;847(1):82-9.
- De Murcia JM, Niedergang C, Trucco C, Ricoul M, Dutrillaux B, Mark M, Oliver FJ, Masson M, Dierich A, LeMeur M, Walztinger C, Chambon P, de Murcia G. (1997). Requirement of poly(ADP-ribose) polymerase in recovery from DNA damage in mice and in cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 8;94(14):7303-7.
- Dlugosz PJ, Billen LP, Annis MG, Zhu W, Zhang Z, Lin J, Leber B, Andrews DW. (2006). Bcl-2 changes conformation to inhibit Bax oligomerization. *EMBO J* 25: 2287–2296.
- Dunnwald LK, Rossing MA, Li CI. (2007). Hormone receptor status, tumor characteristics, and prognosis: a prospective cohort of breast cancer patients *Breast Cancer Research* 9:R6
- Eastman A, Rigas JR. (1999). Modulation of apoptosis signaling pathways and cell cycle regulation. *Semin Oncol.* 26(5 Suppl 16):7-16; discussion 41-2.
- Elangovan B, Chinnadurai G. (1997). Functional dissection of the pro-apoptotic protein Bik. Heterodimerization with anti-apoptosis proteins is insufficient for induction of cell death. *J Biol Chem.* 272(39):24494–24498.
- Eskes R, Desagher S, Antonsson B, Martinou JC. (2000). Bid Induces the Oligomerization and Insertion of Bax into the Outer Mitochondrial Membrane. *Molecular and Cellular Biology,* 20(3), 929–935.
- Esposti MD, Erler JT, Hickman JA, Dive C. (2001). Bid, a widely expressed proapoptotic protein of the Bcl-2 family, displays lipid transfer activity. *Mol. Cell. Biol.* 21: 7268–7276.
- Foulkes WD. (2006). BRCA1 and BRCA2: chemosensitivity, treatment outcomes and prognosis. *Fam Cancer.* 5(2):135-42.
- Forman H, Kennedy J. (1974). Role of superoxide radical in mitochondrial dehydrogenase reactions. *Biochem Biophys Res Commun.* 60:1044–1050.
- Fukui H, Moraes CT. (2009). Mechanisms of formation and accumulation of mitochondrial DNA deletions in aging neurons. *Hum Mol Genet.* 15;18(6):1028-36.

- García N, Salamanca F, Astudillo-de la Vega H, Curiel-Quesada E, Alvarado I, Peñaloza R, Arenas D. (2005). A molecular analysis by gene expression profiling reveals Bik/NBK overexpression in sporadic breast tumor samples of Mexican females. *BMC Cancer* 1: 93.
- García BJR, Nevado J, Ramírez CR, Sanz R, González GJA, Sánchez RC, Cantos B, España P, Verdaguer JM, Trinidad CA. (2007). The anticancer drug cisplatin induces an intrinsic apoptotic pathway inside the inner ear. *Br. J. Pharmacol.* 152: 1012–1020.
- Garrett WS, Gordon JI, Glimcher LH. (2010). Homeostasis and inflammation in the intestine. *Cell.* 140(6):859–870.
- Germain M, Mathai JP, Shore GC. (2002). BH-3-only BIK functions at the endoplasmic reticulum to stimulate cytochrome c release from mitochondria. *J. Biol. Chem.* 277: 18053–18060.
- Germain M, Mathai JP, McBride HM, Shore GC. (2005). Endoplasmic reticulum BIK initiates DRP1-regulated remodelling of mitochondrial cristae during apoptosis. *EMBO J.* 24(8):1546–1556.
- Giaccone G. (2000). Clinical perspectives on platinum resistance. *Drugs*, 59 Suppl 4, 9-17; 86 discussion 37-18.
- Giam M, Huang DC, Bouillet P. (2008). BH3-only proteins and their roles in programmed cell death. *Oncogene.* 27 Suppl 1:S128-36.
- Girard PM, Boiteux S. (1997) Repair of oxidized DNA bases in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimie.* 79, 559–566.
- Giulivi C, Boveris A, Cadenas E. (1995). Hydroxyl radical generation during mitochondrial electron transfer and the formation of 8-hydroxydesoxyguanosine in mitochondrial DNA. *Arch Biochem Biophys.* 1;316(2):909-16.
- GLOBOCAN 2012 http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx (visto el 13 de junio del 2015).
- Guchelaar HJ, Vermes I, Koopmans RP, Reutelingsperger CP, Haanen C. (1998). Apoptosis- and necrosis-inducing potential of cladribine, cytarabine, cisplatin, and 5-fluorouracil in vitro: a quantitative pharmacodynamic model. *Cancer Chemother Pharmacol.* 42(1):77-83.

- Gourdier I, Crabbe L, Andreau K, Pau B, Kroemer G. (2004). Oxaliplatin-induced mitochondrial apoptotic response of colon carcinoma cells does not require nuclear DNA. *Oncogene*, 23, 7449-7457.
- Halliwell B, Gutteridge J, Cross CE. (1992). Free radical, antioxidants, and human disease: Where are we now? *J Lab Clin Med*. 119(6):598-620.
- Hamanaka RB, Chandel NS. (2010). Mitochondrial reactive oxygen species regulate cellular signaling and dictate biological outcomes. *Trends Biochem Sci*, 35, 505-513.
- Han J, Sabbatini P, White E. (1996). Induction of apoptosis by human Nbk/Bik, a BH3-containing protein that interacts with E1B 19K. *Mol Cell Biology*. 16(10):5857–5864.
- Hannemann J, Duwe J, Baumann, K. (1991). Iron- and ascorbic acid-induced lipid peroxidation in renal microsomes isolated from rats treated with platinum compounds. *Cancer Chemother Pharmacol*, 28, 427-433.
- Hegde R, Srinivasula SM, Ahmad M, Fernandes-Alnemri T, Alnemri ES. (1998). Bik, a BH3-containing mouse protein that interacts with Bcl-2 and Bcl-xL, is a potent death agonist. *J Biol Chem*. 273(14):7783-6.
- Henderson BE, Ross RK, Pike MC. (1993). Hormonal chemoprevention of cancer in women. *Science*. 259(5095):633–638.
- Henkels KM, Turchi JJ. (1999). Cisplatin induced apoptosis proceeds by caspase-3-dependent and -independent pathways in cisplatin-resistant and -sensitive human ovarian cancer cell lines. *Cancer Res*, 59, 3077-3083.
- Hetz C, Glimcher L. (2008). The daily job of night killers: alternative roles of the BCL-2 family in organelle physiology. *Trends Cell Biol*. 18: 38–44.
- Hu Z, Fan C, Oh DS, Marron JS, He X, Qaqish BF, Livasy C, Care LA, Reynolds E, Dressler L, Nobel A, Parker J, Ewend MG, Sawyer LR, Wu J, Liu Y, Nanda R, Tretiakova M, Ruiz Orrico A, Dreher D, Palazzo JP, Perreard L, Nelson E, Mone M, Hansen H, Mullins M, Quackenbush JF, Ellis MJ, Olopade OI, Bernard PS, Perou CM. (2006). The molecular portraits of breast tumors are conserved across microarray platforms. *BMC Genomics* 7, 96

- http://www.cancervic.org.au/about-cancer/what_is_cancer.gift (visto el 11 de junio del 2015).
- Hsu YT, Youle RJ. (1997). Nonionic detergents induce dimerization among members of the Bcl-2 family. *J Biol Chem* 272: 13829–13834.
- Hyman BT, Yuan J. (2012). Apoptotic and non-apoptotic roles of caspases in neuronal physiology and pathophysiology. *Nat Rev Neurosci.* 13(6): 395–406.
- Huvos AG, Lucas JC, Foote FW. Metaplastic breast carcinoma. Rare form of mammary cancer. *N Y State J Med.* 1973 May 1;73(9):1078-82.
- INEGI, 2014
<http://www.inegi.org.mx/inegi/contenidos/espanol/prensa/Contenidos/estadisticas/2014/cancer0.pdf> (visto el 9 de junio del 2015).
- Inoue M, Sato EF, Nishikawa M, Park AM, Kira Y, Imada I, Utsumi K. (2003). Mitochondrial generation of reactive oxygen species and its role in aerobic life. *Curr Med Chem*, 10, 2495-2505.
- Jamieson ER, Lippard SJ. (1999). Structure, Recognition, and Processing of Cisplatin-DNA Adducts. *Chem Rev*, 99, 2467-2498.
- Jemal A, Siegel R, Ward E, Murray T, Xu J, Thun MJ. (2007). Cancer statistics. *CA. Cancer J. Clin.* 57: 43-66.
- Jiang J, Huang Z, Zhao Q, Feng W, Belikova NA, Kagan VE. (2008). Interplay between bax, reactive oxygen species production, and cardiolipin oxidation during apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun.* 368:145-150
- Jiang YZ, Yu KD, Bao J, Peng WT, Shao ZM. (2014). Favorable Prognostic Impact in Loss of TP53 and PIK3CA Mutations after Neoadjuvant Chemotherapy in Breast Cancer. *Cancer Res.* 74: 3399-3407.
- Jones NA, Turner J, McIlwrath AJ, Brown R, Dive C. (1998). Cisplatin- and paclitaxel -induced apoptosis of ovarian carcinoma cells and the relationship between bax and bak upregulation and the functional status of p53. *Mol Pharmacol*, 53, 819-826.
- Johnson NP, Hoeschele JD, Rahn RO. (1980). Kinetic analysis of the in vitro binding of radioactive cis- and trans-dichlorodiammineplatinum(II) to DNA. *Chem. Biol. Interact.* 30, 151-169.

- Ka H, Park HJ, Jung HJ, Choi JW, Cho KS, Ha J, Lee KT. (2003). Cinnamaldehyde induces apoptosis by ROS mediated mitochondrial permeability transition in human promyelocytic leukemia HL-60 cells. *Cancer Lett*, 196, 143-152.
- Kadikoylu G, Bolaman Z, Demir S, Balkaya M, Akalin N, Enli Y. (2004). The effects of desferrioxamine on cisplatin-induced lipid peroxidation and the activities of antioxidant enzymes in rat kidneys. *Hum Exp Toxicol*, 23, 29-34.
- Kandaswami C, Middleton E. (1994). Free radical scavenging and antioxidant activity of plant flavonoids. *Adv Exp Med Biol*. 366: p. 351-76.
- Kandioler D, Stamatis G, Eberhardt W, Kappel S, Zochbauer-Muller S, Kuhrer I, Mittlbock M, Zwrtek R, Aigner C, Bichler C, Tichy V, Hudec M, Bachleitner T, End A, Muller MR, Roth E, Klepetko W. (2008). Growing clinical evidence for the interaction of the p53 genotype and response to induction chemotherapy in advanced non-small cell lung cancer. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 135, 1036-1041.
- Katsube T, Mori M, Tsuji H, Shiomi T, Wang B, Liu Q, Neno M, Onoda M. (2014). Most hydrogen peroxide-induced histone H2AX phosphorylation is mediated by ATR and is not dependent on DNA double-strand breaks. *J. Biochem*. 156: 85–95.
- Kerr JFR, Willie AH, Currie AR. (1972). Apoptosis: A Basic Biological Phenomenon with Wide-ranging Implications in Tissue Kinetics. *Br J Cancer*. 26(4): 239–257.
- Kerr JF, Winterford CM, Harmon BV. (1994). Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer*, 73, 2013-2026.
- Khoury CM, Greenwood MT. (2008). The pleiotropic effects of heterologous Bax expression in yeast. *Biochim. Biochim Biophys Acta*. 1783(7):1449-65.
- Kirkland RA, Franklin JL. (2001). Evidence for redox regulation of cytochrome C release during programmed neuronal death: antioxidant effects of protein synthesis and caspase inhibition. *J Neurosci*, 21(6):1949-1963.
- Klauning JE, Kamendulis LM, Hocevar BA. (2010). Oxidative Stress and Oxidative Damage in Carcinogenesis. *Toxicologic Pathology*, 38: 96-109.
- Konigsberg M. (2007). Radicales libres y estrés oxidativo. *Aplicaciones médicas*, México: El Manual Moderno México.

- Kontos CK, Christodoulou MI, Scorilas A. (2014). Apoptosis-related BCL2-family members: Key players in chemotherapy. *Anticancer Agents Med Chem.* 14: 353–374.
- Korsmeyer SJ, Wei MC, Saito M, Weiler S, Oh KJ, Schlesinger PH. (2000). Pro-apoptotic cascade activates BID, which oligomerizes BAK or BAX into pores that result in the release of cytochrome c. *Cell Death Differ.* 7(12):1166-73.
- Kowaltowski A. J., Netto, L. E., & Vercesi, A. E. (1998). The thiol-specific antioxidant enzyme prevents mitochondrial permeability transition. Evidence for the participation of reactive oxygen species in this mechanism. *J Biol Chem*, 273, 12766-12769.
- Krauss S, Zhang CY, Lowell BB. (2005). The mitochondrial uncoupling-protein homologues. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6:248-61.
- Kushnareva Y, Murphy AN, Andreyev A. (2002). Complex I-mediated reactive oxygen species generation: modulation by cytochrome c and NAD(P)⁺ oxidation-reduction state. *Biochem J* 368: 545-53
- Kutuk O, Arisan ED, Tezil T, Shoshan MC, Basaga H. (2009). Cisplatin overcomes Bcl-2-mediated resistance to apoptosis via preferential engagement of Bak: critical role of Noxa-mediated lipid peroxidation. *Carcinogenesis.* 30, 1517-1527.
- Lalier L, Cartron PF, Juin P, Nedelkina S, Manon S, Bechinger B, Vallette FM. (2007). Bax activation and mitochondrial insertion during apoptosis. *Apoptosis.* 12(5):887-96.
- Lambeth JD. (2002) Nox/Duox family of nicotinamide adenine dinucleotide (phosphate) oxidases. *Curr Opin Hematol.* 9:11–17.
- Leber B, Andrews DW. (2010). Closing in on the link between apoptosis and autophagy. *F1000 Biol. Rep.* 2: 88.
- Letai A., Bassik M., Walensky L., Sorcinelli M., Weiler S. y Korsmeyer S. (2002). Distinct BH3 domains either sensitize or activate mitochondrial apoptosis, serving as prototype cancer therapeutics. *Cancer Cell.* 2(3):183-92.
 - Lieberthal W, Triaca V, Levine J. (1996). Mechanisms of death induced by cisplatin in proximal tubular epithelial cells: apoptosis vs. necrosis. *Am J Physiol.* 270 (4 Pt 2):F700-8.

- Lin B, Kolluri SK, Lin F, Liu W, Han YH, Cao X, Dawson MI, Reed JC, Zhang XK. (2004). Conversion of Bcl-2 from protector to killer by interaction with nuclear orphan receptor Nur77/TR3. *Cell* 116: 527–540.
- Llambi F, Moldoveanu T, Tait SW, Bouchier-Hayes L, Temirov J, McCormick LL, Dillon CP, Green DR. (2011). A unified model of mammalian BCL-2 protein family interactions at the mitochondria. *Mol Cell* 44: 517–531.
- Loeffler M, Kroemer G. (2000). The mitochondrion in cell death control: certainties and incognita. *Exp Cell Res*, 256, 19-26.
- Loschen G, Azzi A, Richter C, Flohe L. (1974). Superoxide radicals as precursors of mitochondrial hydrogen peroxide. *FEBS Lett.* 42:68.
- Lovell JF, Billen LP, Bindner S, Shamas-Din A, Fradin C, Leber B, Andrews DW. (2008). Membrane binding by tBid initiates an ordered series of events culminating in membrane permeabilization by Bax. *Cell* 135: 1074–1084.
- Lu Y, Lemon W, Liu PY, Yi Y, Morrison C, Yang P, Sun Z, Szoke J, Gerald WL, Watson M, Govindan R, You M. (2006). A gene expression signature predicts survival of patients with stage I non-small cell lung cancer. *PLoS Med.* 3(12):e467.
- Luna-López A, Triana-Martínez F, López-Díaz Guerrero NE, Ventura-Gallegos JL, Gutiérrez-Ruiz MC, Damián-Matsumura P, Zentella A, Gómez-Quiroz LE, Königsberg M. (2010). Bcl-2 sustains hormetic response by inducing Nrf-2 nuclear translocation in L929 mouse fibroblasts. *Free Radic. Biol. Med.* 49: 1192–1204.
- Mandic A, Hansson J, Linder S, Shoshan MC. (2003). Cisplatin induces endoplasmic reticulum stress and nucleus-independent apoptotic signaling. *J Biol Chem*, 278, 9100-9106.
- McCord J, Fridovich I. (1970). The utility of superoxide dismutase in studying free radical reactions. II. The mechanism of the mediation of cytochrome c reduction by a variety of electron carriers. *J Biol Chem.* 245: 1374–1377.
- Mahalingaiah PK, Singh KP. (2014). Chronic oxidative stress increases growth and tumorigenic potential of MCF-7 breast cancer cells. *PLoS One* 9:e93799.
- Maiuri MC, Criollo A, Kroemer G. 2010. Crosstalk between apoptosis and autophagy within the Beclin 1 interactome. *EMBO J.* 29: 515–516.

- Masgras I, Carrera S, de Verdier PJ, Brennan P, Majid A, Makhtar W, Tulchinsky E, Jones GD, Roninson IB, Macip S. (2012). Reactive oxygen species and mitochondrial sensitivity to oxidative stress determine induction of cancer cell death by p21. *J Biol Chem.* 23;287(13):9845-54.
- Marshansky V, Wang X, Bertrand R, Luo H, Duguid W, Chinnadurai G, Kanaan N, Vu MD, Wu J. (2001). Proteasomes modulate balance among proapoptotic and antiapoptotic Bcl-2 family members and compromise functioning of the electron transport chain in leukemic cells. *J Immunol.* 166(5):3130–3142.
- Martinou JC, Youle RJ. (2011). Mitochondria in apoptosis: Bcl-2 family members and mitochondrial dynamics. *Dev. Cell* 21: 92–101.
- Martins NM, Santos NAG, Curti C, Bianchi MLP, Santos AC. (2008). Cisplatin induces mitochondrial oxidative stress with resultant energetic metabolism impairment, membrane rigidification and apoptosis in rat liver. *J Appl Toxicol* 28: 337-344.
- Marullo R, Werner E, Degtyareva N, Moore B, Altavilla G, Ramalingam SS, Doetsch PW. (2013). Cisplatin induces a mitochondrial-ROS response that contributes to cytotoxicity depending on mitochondrial redox status and bioenergetic functions. *PLoS One.* 19;8(11):e81162.
- Massey V, Strickland S, Mayhew S, Howell L, Engel P, Matthews R, Schulman M, Sullivan P. (1961). The production of superoxide anion radicals in the reaction of reduced flavins and flavoproteins with molecular oxygen. *Biochem Biophys Res Commun.* 36:891.
- Masgras I, Carrera S, de Verdier PJ, Brennan P, Majid A, Makhtar W, Tulchinsky E, Jones GD, Roninson IB, Macip S. (2012). Reactive oxygen species and mitochondrial sensitivity to oxidative stress determine induction of cancer cell death by p21. *J Biol Chem.* 23;287(13):9845-54.
- McDonnell JM, Fushman D, Milliman CL, Korsmeyer SJ, Cowburn D. (1999). Solution structure of the proapoptotic molecule BID: a structural basis for apoptotic agonists and antagonists. *Cell.* 96(5):625–634.
- Mebratu YA, Dickey BF, Evans C, Tesfaigzi Y. (2008). The BH3-only protein Bik/Blk/Nbk inhibits nuclear translocation of activated ERK1/2 to mediate IFN –induced cell death. *Journal Cell Biol.* 183(3):429–439.

- Meacham CE, Morrison SJ. (2013). Tumour heterogeneity and cancer cell plasticity. *Nature* 19;501(7467):328-37.
- Mok CL, Gil-Gómez G, Williams O, Coles M, Taga S, Tolaini M, Norton T, Kioussis D, Brady HJ. (1999). Bad can act as a key regulator of T cell apoptosis and T cell development. *J. Exp. Med.* 189: 575–586.
- Murata T, Hibasami H, Maekawa S, Tagawa T, Nakashima K. (1990). Preferential binding of cisplatin to mitochondrial DNA and suppression of ATP generation in human malignant melanoma cells. *Biochem Int*, 20, 949-955.
- Nakajima K, Hirose H, Taniguchi M, Kurashina H, Arasaki K, Nagahama M, Tani K, Yamamoto A, Tagaya M. (2004). Involvement of BNIP1 in apoptosis and endoplasmic reticulum membrane fusion. *EMBO J.* 23(16):3216–3226.
- National Cancer Institute, 2015
http://www.cancer.gov/cancertopics/pdq/treatment/breast/Patient/page5#figure_287_e (visto el 13 de junio del 2015).
- Neve RM, Chin K, Fridlyand J, Yeh J, Baehner FL, Fevr T, Clark L, Bayani N, Coppe JP, Tong F, Speed T, Spellman PT, DeVries S, Lapuk A, Wang NJ, Kuo WL, Stilwell JL, Pinkel D, Albertson DG, Waldman FM, McCormick F, Dickson RB, Johnson MD, Lippman M, Ethier S, Gazdar A, Gray JW. (2006). A collection of breast cancer cell lines for the study of functionally distinct cancer subtypes. *Cancer Cell.* 10(6):515-27.
- Norbury CJ, Hickson ID. (2001). Cellular responses to DNA damage. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 41:367-401.
- O'Dwyer PJ, Stevenson JP, Johnson SW. (2000). Clinical pharmacokinetics and administration of established platinum drugs. *Drugs* 59 Suppl 4, 19-27.
- Olaussen KA, Dunant A, Fouret P, Brambilla E, André F, Haddad V, Taranchon E, Filipits M, Pirker R, Popper HH, Stahel R, Sabatier L, Pignon JP, Tursz T, Le Chevalier T, Soria JC. (2006). DNA repair by ERCC1 in nonsmall-cell lung cancer and cisplatin-based adjuvant chemotherapy. *N. Engl. J. Med.* 355: 983–991.
- Oliveira PJ, Esteves T, Rolo AP, Palmeira CM, Moreno AJ. (2004). Carvedilol inhibits the mitochondrial permeability transition by an antioxidant mechanism. *Cardiovasc Toxicol*, 4, 11-20.

- Olivero OA, Semino C, Kassim A, Lopez-Larrazza DM, Poirier MC. (1995). Preferential binding of cisplatin to mitochondrial DNA of Chinese hamster ovary cells. *Mutat Res*, 346, 221-230.
- Orrenius S, Gogvadze V, Zhivotovsky B. (2007). Mitochondrial oxidative stress: implications for cell death. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 47:143-83.
- Osundiji MA, Godes ML, Evans ML, Danial NN. (2011). BAD modulates counterregulatory responses to hypoglycemia and protective glucoprivic feeding. *PLoS ONE*. 6(12):e28016.
- Page DL, Anderson TJ. (1987). *Diagnostic Histopathology of the Breast*. Churchill Livingstone, Edinburgh.
- Palmieri C, Cheng G, Saji S, Zelada M, Wärrri A, Weihua Z, Van Noorden S, Wahlstrom T, Coombes R, Warner M, Gustafsson J. (2002). Estrogen receptor beta in breast cancer. *EndocrRelat Cancer* 9(1):1-13.
- Paradies G, Petrosillo G, Pistolese M, Ruggiero FM. (2001). Reactive oxygen species generated by the mitochondrial respiratory chain affect the complex III activity via cardiolipin peroxidation in beef-heart submitochondrial particles. *Mitochondrion*, 1, 151-159.
- Paweletz CP, Charboneau L, Liotta LA. (2001). Overview of metastasis assays. *Curr Protoc Cell Biol*. 19:19.1.
- Perez RP. (1998). Cellular and molecular determinants of cisplatin resistance. *Eur J Cancer*, 34, 1535-1542.
- Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, Van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, Pollack JR, Ross DT, Johnsen H, Akslen LA, Fluge O, Pergamenschikov A, Williams C, Zhu SX, Lonning PE, Borresen-Dale AL, Brown PO, Botstein D, (2000). Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 406, 747e752.
- Peto J, Collins N, Barfoot R, Seal S, Warren W, Rahman N, Easton DF, Evans C, Deacon J, Stratton MR. (1999). Prevalence of BRCA1 and BRCA2 gene mutations in patients with early-onset breast cancer. *JNCI J Natl Cancer Inst* 91(11): 943-949.
 - Pickering AM, Linder RA, Zhang H, Forman HJ, Davies KJ. (2012). Nrf2-dependent induction of proteasome and Pa28 alpha-beta regulator are required for adaptation to oxidative stress. *J. Biol. Chem.* 287:10021–10031.

- Pil P, Lippard SJ. (1997). Cisplatin and related drugs, en *Encyclopedia of Cancer*, pp. 393-409.
- Porcelli AM, Angelin A, Ghelli A, Mariani E, Martinuzzi A, Carelli V, Petronilli V, Bernardi P, Rugolo M. (2009). Respiratory complex I dysfunction due to mitochondrial DNA mutations shifts the voltage threshold for opening of the permeability transition pore toward resting levels. *J Biol Chem*, 284, 2045-2052.
- Portt L, Norman G, Clapp C, Greenwood M, Greenwood MT. (2011). Anti-apoptosis and cell survival: a review. *Biochim Biophys Acta*. 1813(1):238-59.
- Portakal O, Ozkaya O, Erden Inal M, Bozan B, Koşan M, Sayek I. (2000). Coenzyme Q10 concentrations and antioxidant status in tissues of breast cancer patients. *Clin Biochem*. 33(4):279-84.
- Pourova J, Kottova M, Voprsalova M, Pour M. (2010). Reactive oxygen and nitrogen species in normal physiological processes. *Acta Physiol (Oxf)*. 198(1):15-35.
- Prestayko AW, D'Aoust JC, Issell BF, Crooke ST. (1979). Cisplatin (cisdiamminedichloroplatinum II). *Cancer Treat. Rev*. 6, 17-39.
- Preston TJ, Abadi A, Wilson L, Singh G. (2001). Mitochondrial contributions to cancer cell physiology: potential for drug development. *Adv Drug Deliv Rev*, 49, 45-61.
- Price PM, Safirstein R, Megyesi J. (2004). Protection of renal cells from cisplatin toxicity by cell cycle inhibitors. *Am J Physiol Renal Physiol*. 286: F378-84.
- Puthalakath H. y Strasser A. (2002). Keeping killers on a tight leash: transcriptional and post-translational control of the pro-apoptotic activity of BH3-only proteins. *Cell Death Differ*. 9(5):505-12.
- Quinzii CM, Lopez LC, Gilkerson RW, Dorado B, Coku J, Naini AB, Lagier-Tourenne C, Schuelke M, Salviati L, Carrozzo R, Santorelli F, Rahman S, Tazir M, Koenig M, DiMauro S, Hirano M. (2010). Reactive oxygen species, oxidative stress, and cell death correlate with level of CoQ10 deficiency. *Faseb J*, 24, 3733-3743.
- Rajesh KG, Sasaguri S, Suzuki R, Maeda H. (2003). Antioxidant MCI-186 inhibits mitochondrial permeability transition pore and upregulates Bcl-2 expression. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 285, H2171-2178.

- Reis PP, Rogatto SR, Kowalski LP, Nishimoto IN, Montovani JC, Corpus G, Squire JA y Kamel-Reid S. (2002). Quantitative real-time PCR identifies a critical region of deletion on 22q13 related to prognosis in oral cancer. *Oncogene*. 21(42):6480–6487.
- Reis-Filho JS, Lakhani SR. (2008). Breast cancer special types: why bother? *J. Pathol*. 216, pp. 394–398.
- Ritchie A, Gutiérrez O, Fernández JL. (2009). PAR bZIP-bik is a novel transcriptional pathway that mediates oxidative stress-induced apoptosis in fibroblasts. *Cell Death Differ*. 16: 838–846.
- Rosenberg B, Vancamp L, Krigas T. (1965). Inhibition of cell division in *Escherichia coli* by electrolysis products from a platinum electrode. *Nature* 205, 698-699.
- Rosenberg SA, Yang JC, Schwartzentruber DJ, Hwu P, Marincola FM, Topalian SL, Seipp CA, Einhorn JH, White DE, Steinberg SM. (1999). Prospective randomized trial of the treatment of patients with metastatic melanoma using chemotherapy with cisplatin, dacarbazine, and tamoxifen alone or in combination with interleukin-2 and interferon alfa-2b. *J Clin Oncol*. 17(3):968-75.
- Rybak LP, Mukherjea D, Jajoo S, Ramkumar V. (2009). Cisplatin ototoxicity and protection: clinical and experimental studies. *Tohoku J Exp Med*, 219, 177-186.
- Sadzuka Y, Shoji T, Takino Y. (1992). Mechanism of the increase in lipid peroxide induced by cisplatin in the kidneys of rats. *Toxicol Lett*, 62, 293-300.
- Safaeian L, Abed A, Vaseghi G. (2014). The role of Bcl-2 family proteins in pulmonary fibrosis. *Eur. J. Pharmacol*. 741: 281–289.
- Sancho-Martínez SM, Piedrafita FJ, Cannata-Andía JB, López-Novoa JM, López-Hernández FJ. (2011). Necrotic concentrations of cisplatin activate the apoptotic machinery but inhibit effector caspases and interfere with the execution of apoptosis. *Toxicol Sci*. 122(1):73-85.
- Sancho-Martínez SM, Prieto-García L, Prieto M, López-Novoa JM, López-Hernández FJ. (2012). Subcellular targets of cisplatin cytotoxicity: an integrated view. *Pharmacol Ther*. 136(1):35-55.
- Santandreu FM, Roca P, Oliver J. (2010). Uncoupling protein-2 knockdown mediates the cytotoxic effects of cisplatin. *Free Radic Biol Med* 49: 658-666.

- Santos NA, Catao CS, Martins NM, Curti C, Bianchi ML, Santos AC. (2007). Cisplatin-induced nephrotoxicity is associated with oxidative stress, redox state unbalance, impairment of energetic metabolism and apoptosis in rat kidney mitochondria. *Arch Toxicol*, 81, 495-504.
- Sanz A, Stefanatos R, McIlroy G. (2010) Production of reactive oxygen species by the mitochondrial electron transport chain in *Drosophila melanogaster*. *J Bioenerg Biomembr*, 42, 135-142.
- Sarangi S, Pandey A, Papa AL, Sengupta P, Kopparam J, Dadwal U, Basu S, Sengupta S. (2013). P2Y12 receptor inhibition augments cytotoxic effects of cisplatin in breast cancer. *Med. Oncol.* 30: 567.
- Saraste M. (1999). Oxidative phosphorylation at the fin de siecle. *Science* 283: 1488-93.
- Saris CP, van de Vaart PJ, Rietbroek RC, Blommaert, FA. (1996). In vitro formation of DNA adducts by cisplatin, lobaplatin and oxaliplatin in calf thymus DNA in solution and in cultured human cells. *Carcinogenesis*, 17, 2763-2769.
- Sato K, Kusaka Y, Okada K. (2001). Effect of platinum coordination complex (PtCx) on citrate uptake by rat renal brush border membrane vesicles (BBMV): cisplatin-intoxicated rats. *Ind Health*. 39(4):317-21
- Scarf RW, Torloni H. (1968). Histological typing of breast tumors. *International Histological Classification of Tumours No.2*. World Health Organization. Geneva.
- Shamas-Din A, Brahmabhatt H, Leber B, Andrews DW. (2011). BH3-only proteins: Orchestrators of apoptosis. *Biochim Biophys Acta* 1813: 508–520.
- Sies H, Cadenas E. (1985). Oxidative stress: damage to intact cells and organs. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 17;311(1152):617-31.
- Simpson PT, J.S. Reis-Filho JS, T. Gale T, Lakhani SR. (2005). Molecular evolution of breast cancer. *Pathol.* 205, pp. 248–254.
- Singh G, Maniccia-Bozzo E. (1990). Evidence for lack of mitochondrial DNA repair following cis-dichlorodiammineplatinum treatment. *Cancer Chemother Pharmacol*, 26, 97-100.
- Song G, Chen GG, Hu T, Lai PB. (2010). Bid stands at the crossroad of stressresponse pathways. *Curr. Cancer Drug Targets* 10: 584–592.

- Sorenson C M, Eastman A. (1988). Mechanism of cis-diamminedichloroplatinum (II)-induced cytotoxicity: role of G2 arrest and DNA double-strand breaks. *Cancer Res*, 48, 4484-4488.
- Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R., Aas T, Geisler S, Johnsen H, Hastie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Thorsen T, Quist H, Matese JC, Brown PO, Botstein D, Eystein Lonning P, Borresen-Dale AL. (2001). Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 11;98(19):10869-74.
- Sorlie T, Tibshirani R, Parker J, Hastie T, Marron JS, Nobel A, Deng S, Johnsen H, Pesich R, Geisler S, Demeter J, Perou CM, Lonning PE, Brown PO, BorresenDale A, Botstein D. (2003). Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 8; 100(14):8418-23.
- St-Pierre J, Buckingham JA, Roebuck SJ, Brand MD. (2002). Topology of superoxide production from different sites in the mitochondrial electron transport chain. *J Biol Chem* 277: 44784-90.
- Staniek K, Nohl H. (2000). Are mitochondria a permanent source of reactive oxygen species? *Biochim Biophys Acta* 1460: 268-75.
- Stöckl P, Zankl C, Hütter E, Unterluggauer H, Laun P, Heeren G, Bogengruber E, Herndler-Brandstetter D, Breitenbach M, Jansen-Dürr P. (2007). Partial uncoupling of oxidative phosphorylation induces premature senescence in human fibroblasts and yeast mother cells. *Free radical biology & medicine*. 15;43(6):947-58.
- Strasser A, Cory S, Adams JM. (2011). Deciphering the rules of programmed cell death to improve therapy of cancer and other diseases. *EMBO J*; 30: 3667–3683.
- Sturm I, Stephan C, Gillissen B, Siebert R, Janz M, Radetzki S, Jung K, Loening S, Dörken B, Daniel PT. (2005). Loss of the tissue-specific proapoptotic BH3-only protein Nbk/Bik is a unifying feature of renal cell carcinoma. *Cell Death Differ*.13(4):619–627.
- Szatrowski TP, Nathan CF. (1991). Production of large amounts of hydrogen peroxide by human tumor cells. *Cancer Res* 51, 794–8.
- Szegezdi E, MacDonald DC, Ní Chonghaile T, Gupta S, Samali A. (2009). Bcl-2 family on guard at the ER. *Am. J. Cell Physiol*. 296: C941–C953.

- Tacka KA, Dabrowiak JC, Goodisman J, Penefsky HS, Souid AK. (2004). Effects of cisplatin on mitochondrial function in Jurkat cells. *Chem Res Toxicol*, 17, 1102-1111.
- Tajeddine N, Galluzzi L, Kepp O, Hangen E, Morselli E, Senovilla L, Araujo N, Pinna G, Larochette N, Zamzami N, Modjtahedi N, Harel-Bellan A, Kroemer G. (2008). Hierarchical involvement of Bak, VDAC1 and Bax in cisplatin-induced cell death. *Oncogene*. 27, 4221-4232.
- Takeuchi O, Akira S. (2010). Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell* 140: 805–820.
- Tong Y, Yang Q, Vater C, Venkatesh LK, Custeau D, Chittenden T, Chinnadurai G, Gourdeau H. (2001). The pro-apoptotic protein, Bik, exhibits potent antitumor activity that is dependent on its BH3 domain. *Mol Cancer Ther*. 1(2):95–102.
- Toyokuni S1, Okamoto K, Yodoi J, Hiai H. (1996). Persistent oxidative stress in cancer. *FEBS Lett*. 16; 358(1):1-3.
- Trachootham D, Zhou Y, Zhang H, Demizu Y, Chen Z, Pelicano H, Chiao PJ, Achanta G, Arlinghaus RB, Liu J, Huang P. (2006). Selective killing of oncogenically transformed cells through a ROS-mediated mechanism by beta-phenylethyl isothiocyanate. *Cancer Cell* 10, 241–52.
- Truong Do M, Gyun Kim H, Ho Choi J, Gwang Jeong H. (2014). Metformin induces microRNA-34a to downregulate the Sirt1/Pgc-1 α /Nrf2 pathway, leading to increased susceptibility of wild-type p53 cancer cells to oxidative stress and therapeutic agents. *Free Radic. Biol. Med*. 74:21–34.
- Vakifahmetoglu H, Olsson M, Tamm C, Heidari N, Orrenius S, Zhivotovsky B. (2008). DNA damage induces two distinct modes of cell death in ovarian carcinomas. *Cell Death Differ*, 15, 555-566.
- Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol*, 39, 44-84.
- Vargo-Gogola T, Rosen JM. Modelling breast cancer: one size does not fit all *Nat. Rev. Cancer*, 7 (2007), pp. 659–672.
- Verbrugge I, Johnstone RW, Smyth MJ. (2010). SnapShot: Extrinsic apoptosis pathways. *Cell*. 23;143(7):1192, 1192.e1-2.

- Verma S, Zhao LJ, Chinnadurai G. (2001). Phosphorylation of the pro-apoptotic protein BIK: mapping of phosphorylation sites and effect on apoptosis. *J Biol Chem.* 276(7):4671–4676.
- Victorino VJ, Pizzatti L, Michelletti P, Panis C. (2014). Oxidative Stress, Redox Signaling and Cancer Chemoresistance: Putting Together the Pieces of the Puzzle. *Curr Med Chem.* 21(28):3211-26.
- Walsh T, Casadei S, Coats K, Swisher E, Stray S, Higgins J, Roach K, Mandell J, Lee M, Ciernikova S, Foretova L, Soucek P, King M. (2006). Spectrum of mutations in BRCA1, BRCA2, CHEK2, and TP53 in families at high risk of breast cancer. *JAMA.* 295(12):1379-88.
- Weigelt B, Reis-Filho JS. (2009). Histological and molecular types of breast cancer: is there a unifying taxonomy? *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 6, pp. 718–730.
- Weigelt B, Baehner FL, Reis-Filho JS. (2010). The contribution of gene expression profiling to breast cancer classification, prognostication and prediction: a retrospective of the last decade. *J. Pathol.*, 220, pp. 263–280.
- WHO, 2015 <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/> (visto el 13 de junio del 2015).
- Wiese AG, Pacifici RE, Davies KJA. (1995). Transient adaptation of oxidative stress in mammalian cells. *Arch. Biochem. Biophys.* 318: 231–240.
- Willis SN, Adams JM. (2005). Life in the balance: how BH3-only proteins induce apoptosis. *Curr Opin Cell Biol.* 17(6):617–625.
- Wiseman H, Halliwell B. (1996). Damage to DNA by reactive oxygen species and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer. *Biochem. J.* 313, 17-29.
- Worden FP, Moon J, Samlowski W, Clark JI, Dakhil SR, Williamson S, Urba SG, Ensley J, Hussain MH. (2006). A phase II evaluation of a 3-hour infusion of paclitaxel, cisplatin, and 5-fluorouracil in patients with advanced or recurrent squamous cell carcinoma of the head and neck: Southwest Oncology Group study 0007. *Cancer.* 15; 107(2):319-27.
- World Cancer Report, 2014. <http://es.scribd.com/doc/249125578/World-Cancer-Report-2014#scribd> (visto el 15 de junio del 2015).

- Xuan H, Li Z, Yan H, Sang Q, Wang K, He Q, Wang Y, Hu F. (2014). Antitumor activity of Chinese propolis in human breast cancer MCF-7 and MDAMB-231 Cells. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* 2014: 280120.
- Yang E, Korsmeyer SJ. (1996). Molecular thanatopsis: a discourse on the BCL2 family and cell death. *Blood* 88: 386–401.
- Yang Z, Schumaker LM, Egorin MJ, Zuhowski EG, Guo Z, Cullen KJ. (2006). Cisplatin Preferentially Binds Mitochondrial DNA and VoltageDependent Anion Channel Protein in the Mitochondrial Membrane of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: Possible Role in Apoptosis. *Clin Cancer Res.* 1;12(19):5817-25.
- Yeretssian G, Correa RG, Doiron K, Fitzgerald P, Dillon CP, Green DR, Reed JC, Saleh M. (2011). Non-apoptotic role of BID in inflammation and innate immunity. *Nature.* 474(7349):96–99.
- Yin Y, Solomon G, Deng C, Barrett JC. (1999). Differential regulation of p21 by p53 and Rb in cellular response to oxidative stress. *Mol Carcinog.* 24(1):15-24.
- Youle RJ, Strasser A. (2008). The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nature Rev Mol Cell Biol.* 9(1):47–59.
- Zamble DB, Lippard SJ. (1995). Cisplatin and DNA repair in cancer chemotherapy. *Trends Biochem. Sci.* 20, 435-439.
- Zamble DB, Jacks T, Lippard SJ. (1998). p53-Dependent and -independent responses to cisplatin in mouse testicular teratocarcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 26;95(11):6163-8.
- Zhu H, Zhang L, Dong F, Guo W, Wu S, Teraishi F, Davis JJ, Chiao PJ, Fang B. (2005). Bik/NBK accumulation correlates with apoptosis-induction by bortezomib (PS-341, Velcade) and other proteasome inhibitors. *Oncogene* 24(31):4993–4999.