



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD IZTAPALAPA

Maestría en Biología de la Reproducción Animal

**DETERMINACIÓN DE LA LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE BIK EN
RESPUESTA AL CAMBIO EN EL ESTADO REDOX**

TESIS

Que para obtener el grado de Maestra en Biología de la Reproducción Animal

PRESENTA

Bióloga Experimental Elisa Hernández Mercado

COMITÉ TUTORAL

Dra. Mina Königsberg Fainstein

Dr. Diego Julio Arenas Aranda

Dr. Miguel Ángel Velázquez Flores

19 DE JUNIO DE 2014

Este trabajo fue realizado en el laboratorio de Bionergética y Envejecimiento Celular, perteneciente al departamento de Ciencias de la Salud, de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, bajo la dirección de la Dra. Mina Königsberg Fainstein.

La Maestría en Biología de la Reproducción Animal, de la Unidad Iztapalapa, Universidad Autónoma Metropolitana está en el Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNCP) del CONACYT, en el Nivel de Consolidación de Reciente Creación número de referencia 003797.

MIEMBROS DEL CÓMITE

Co-directora

Dra. Mina Königsberg Fainstein
Departamento de Ciencias de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana
mkf@xanum.uam.mx

Co-director

Dr. Diego Julio Arenas Aranda
Unidad de Investigación Médica en Genética Humana
Centro Médico Nacional Siglo XXI
arenasdi@gmail.com

Asesor

Dr. Miguel Ángel Velázquez Flores
Unidad de Investigación Médica en Genética Humana
Centro Médico Nacional Siglo XXI
dr.velazquez.imss@gmail.com

MIEMBROS DEL JURADO

Presidente

Dr. Pablo Gustavo Damián Matzumura
Departamento de Biología de la Reproducción
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa
pgdm@xanum.uam.mx

Secretaria

Dra. Norma Edith López Díaz Guerrero
Departamento de Ciencias de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa
norm@xanum.uam.mx


Vocal

Dr. Armando Luna López
Departamento de Investigación Básica
Instituto Nacional de Geriátría
allbioexp@yahoo.com

Vocal

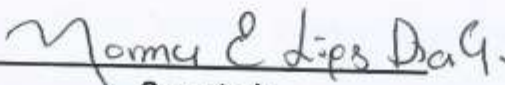
Dra. Viridiana Yazmín González Puertos
Departamento de Ciencias de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana- Iztapalapa
ygp@xanum.uam.mx

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 subcelular de Bik en respuesta al cambio en el estado redox*", con fecha 10 de junio del 2014.



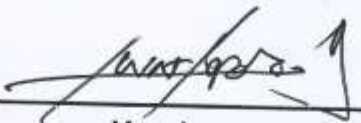
Presidente

Dr. Pablo Gustavo Damián Matzumura
Departamento de Biología de la Reproducción Animal
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa




Secretaria

Dra. Norma Edith López Díaz Guerrero
Departamento de Ciencias de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa



Vocal

Dr. Armando Luna López
Departamento de Investigación Básica
Instituto Nacional de Geriatria



Vocal

Dra. Viridiana Yazmín González Puertos
Departamento de Ciencias de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

AGRADECIMIENTOS

A mis padres y hermanas. Mis padres, por estar siempre pendientes de mí, si había dormido lo suficiente, si había comido bien, si había llegado a casa, agradezco que me escuchen y me den consejos siempre que los necesité y estén para mí incondicionalmente. A mis hermanas porque son un ejemplo, mujeres fuertes, inteligentes y ambiciosas; por hacerme reír y por demostrar que la distancia no existe, siempre estaremos unidas por el amor. Como mi familia su apoyo y compañía es indispensable para mi felicidad los amo.

A mí pequeño sobrino. Por ser paciente y entender que no siempre podía jugar con él o pasar un día completo juntos cómo lo deseabas. Te quiero mucho.

A mí querido Enrique. Agradezco su paciencia, soportar mi estrés, mi enojo, mis lágrimas, por tener con quien compartir los logros y las alegrías, por enseñarme que la vida no solo son obligaciones hay que disfrutarla. Te amo. Gracias.

A la Dra. Mina y al Dr. Pablo. Por haberme apoyado en la realización de este proyecto. Gracias por brindarme un ambiente de trabajo tranquilo y saludable en el que pude aprender mucho de mis compañeros. Por ser los mejores guías, comprometidos a dar todo por sus alumnos aunque signifique faltar en casa. Toda esa dedicación espero haya valido la pena para ustedes. Muchas gracias.

A la Dra. Viridiana, el Dr. Armando y la Dra. Norma. Porque me enseñaron y resolvieron todas mis dudas. Porque son unos guías estupendos y son el mejor ejemplo de la calidad de alumnos que egresan de nuestra amada universidad. Gracias por su apoyo.

A mis estimados amigos Aglaé, Alex, Mirna y Stephanie. Por formar un grupo tan unido de amigos con el que podía pasar todo el día trabajando y aprendiendo. Por quedarse hasta muy tarde conmigo esperando que terminara de trabajar aunque estuvieran muy cansados para irnos juntos. Por esas platicas tan amenas acompañadas de café y sonrisas. Los estimo tanto y les agradezco su amistad. Gracias.

A mis compañeros de laboratorio. Alice, Adriana, Carlos, Gibrán, Luis, Pao, Pedro, Rafa, Rene, Sandra Li., Sandra Caos, porque desde el primer día que llegue al laboratorio me hicieron sentir como en casa, compartieron logros, sonrisas y platicas. El laboratorio siempre fue divertido gracias a ustedes son unos compañeros excelentes pero son mejores como amigos. Gracias.

A mis compañeros de maestría. Cindy, Isa, Jany, Jesus, Lore, Luis y Ramón. Fuimos la primera generación de una maestría que nos puso un estándar muy alto de alcanzar y aun así lo logramos. Pasamos días de desvelo, malas comidas y trabajo interminable pero este es el fin del camino y valió la pena. Gracias por haberme brindado su compañía, su experiencia y su conocimiento pero sobre todo gracias por su amistad, son personas excelentes y merecen todo por lo que se esforzaron. Gracias.

GLOSARIO DE ABREVIATURAS

Abreviatura	Nombre
CaM	Cáncer de mama
ER α	Receptor de estrógenos alfa
Her2	Receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano
FANCA-N	Anemia de Fanconi, grupo de complemento A
PTEN	Homólogo de la fosfatasa y tensina
ATM	Ataxia telangiectasia mutado
BRCA1	Cáncer de mama 1
BRCA2	Cáncer de mama 2
CHEK2	Punto de control 2
p53	Proteína de 53 kDa
ERO	Especies reactivas de oxígeno
ERN	Especies reactivas de nitrógeno
RL	Radical libre
SOD	Súper óxido dismutasa
GPx	Glutación peroxidasa
CAT	Catalasa
OH	Hidróxido
Fe	Hierro
Cu	Cobre
ADN	Ácido desoxirribonucleico
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
8-OHdG	8-hidroxi-2' desoxi-guanina
ATP	Adenosín trifosfato
TNF α	Factor de necrosis tumoral alfa
CAD	Carbonil-fosfatasa sintetasa 2
TM	Transmembranal
Thr	Tirosina
Ser	Serina

ÍNDICE

1. Introducción	12
1.1 Cáncer.....	12
1.2 Cáncer de mama (CaM).....	12
1.3 Etiología y terapia del cáncer de mama	13
1.4 Oxígeno y especies reactivas de oxígeno.....	15
1.5 Estrés oxidante	17
1.6 Peróxido de hidrógeno	19
1.7 Antioxidantes	20
1.7.1 Antioxidantes no enzimáticos.....	20
1.7.2 Antioxidantes enzimáticos	22
1.8 Estrés oxidante y apoptosis.....	24
1.9 Apoptosis	26
1.10 La familia de Bcl-2.....	31
1.11 Bik (<i>Bcl2-Interacting Killer</i>)	34

2. ANTECEDENTES.....	38
3. JUSTIFICACIÓN	41
4. HIPÓTESIS.....	42
5. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	43
6. OBJETIVO GENERAL	44
6.1 Objetivos específicos	44
7. MATERIAL Y METODOS	45
7.1 Cultivo Celular.....	45
7.2 Inmunocitoquímica	46
7.3 Curva Dosis-Respuesta de H₂O₂.....	47
7.4 Western Blot	48
7.5 Curva de viabilidad	49
7.6 Inmunofluorescencia	49
7.7 Análisis estadístico.....	50
8. RESULTADOS	51

8.1 Determinación de la presencia de Bik.....	51
8.2 Inducción de la expresión de Bik mediante un reto oxidante	52
8.3 Viabilidad celular posterior al reto oxidante	53
8.4 Localización de Bik posterior al reto oxidante	55
9. DISCUSIÓN.....	60
10. CONCLUSIÓN.....	69
11. REFERENCIAS	69

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Cáncer

El término cáncer se relaciona con más de 100 tipos de enfermedades, y se pueden presentar en casi todos los tejidos del cuerpo humano, en donde tienen características únicas; sin embargo, los procesos básicos que lo producen parecen ser muy similares (Weinberg, 1996). El cáncer consiste en el crecimiento no controlado de células que se han transformado y han adquirido una serie de características que les permiten diferenciarse fenotípica y genotípicamente de una célula histológicamente normal.

Al cáncer lo antecede una lesión pre-cancerosa que se desarrolla hasta un tumor maligno, como resultado de la interacción de los factores genéticos del paciente y de agentes externos como carcinógenos físicos, químicos y biológicos (OMS, 2013).

1.2 Cáncer de mama (CaM)

Anatómicamente, el CaM se origina en los ductos mamarios o conductos galactóforos de la glándula mamaria **Figura 1**. 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 otra el carcinoma ductal invasivo donde se presenta infiltración a otras regiones de la glándula mamaria con proliferación anormal de células neoplásicas (Afonso y Bouwman, 2008). El

carcinoma ductal invasivo es el principal tipo histopatológico asociado al CaM, con una frecuencia de 70-80% (breastcancer.org/2013).

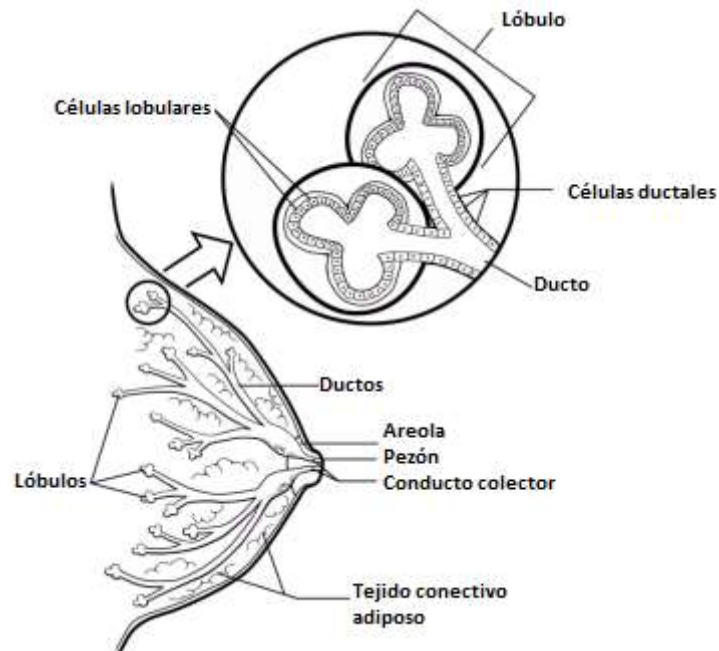


Figura 1. Anatomía de la mama femenina. La mayoría de los cánceres de seno comienzan en las células que recubren los conductos (cáncer ductal). Algunos comienzan en las células que recubren los lobulillos (cáncer lobular), mientras que un pequeño número se inician en otros tejidos. Imagen modificada de American Cancer Society.

1.3 Etiología y terapia del cáncer de mama

El CaM es una afección en la que se forman células cancerosas en los tejidos de la mama. Algunos de los factores de riesgo incluyen nuliparidad, embarazo después de los treinta años, inicio de la menarquia a edades tempranas, menopausia a edades tempranas e historia familiar de cáncer de mama (Henderson, 1993). En contraste, el embarazo a temprana edad, la menopausia

a edades avanzadas y largos periodos de lactancia, proveen un efecto protector contra el CaM (Henderson, 1993).

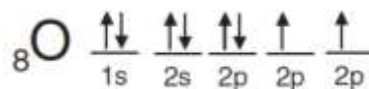
Entre otros factores de riesgo el más estudiado es el estrógeno, que contribuye al desarrollo de esta enfermedad debido a su efecto mitogénico mediado por el receptor de estrógenos alfa (RE α) (Palmieri *et al.*, 2002). La mayoría de los cánceres de mama positivos para el RE α lo son también para el receptor de progesterona (RP) (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 y actualmente, es el principal tratamiento (Ariazi *et al.*, 2006; Cleator *et al.*, 2009). Otro factor asociado al CaM es el receptor HER2/neu, una proteína que se encuentra sobre expresada en algunos tipos de células cancerosas, como las de mama y ovarios (NCI-NIH, 2012). 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).

1.4 Oxígeno y especies reactivas de oxígeno

Los radicales libres (RL) son átomos o moléculas con uno o más electrones desapareados, por lo que son sumamente inestables. Los RL forman parte importante de las especies reactivas de oxígeno (ERO) y las especies reactivas de nitrógeno (ERN). Existen varias fuentes capaces de producirlas, las mitocondrias constituyen las más importantes, aunque existen otras como los peroxisomas, los leucocitos polimorfonucleares (cuando se activan por diversas proteínas que actúan sobre ellos), etc (Turnes, 1994; Freeman y Crapo, 1982; Canas, 1999). Ambas especies reactivas involucran al oxígeno.

El oxígeno (O) posee $8e^-$, 2 se encuentran en su primer nivel de energía, en el subnivel s ($1s^2$) y 6 están en su último nivel de energía (nivel 2). Los últimos 2 se localizan en el subnivel s ($2s^2$) y 4 en el subnivel p ($2p^4$). Los e^- deben estar apareados en los orbitales, por lo tanto cada átomo de O necesita $2e^-$ más para completar su octeto (Hansberg, 2002; Hermes, 2004):



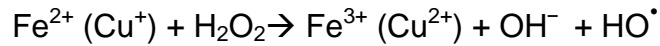
Sin embargo, los dos orbitales p incompletos del oxígeno tienen distintas características. Uno de ellos es un orbital Pi de unión (π), y el otro es un orbital Pi de antiunión (π^*). Esto significa que cuando se unen dos átomos de O para formar O_2 , sólo son capaces de formar un primer enlace covalente entre ellos, dejando a los e^- de los orbitales π^* de antiunión desapareados. Esto forma un radical libre con dos e^- desapareados en orbitales distintos, llamado dioxígeno

O_2 , que se representa de la siguiente manera: $\bullet O-O\bullet$ (Hansberg, 2002; Hermes, 2004).

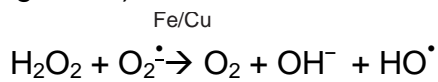
Para que el O_2 oxide a otra molécula y acepte $2e^-$ en las vacantes de los orbitales, éstos deben ser de *spin* o giro, contrarios al del e^- que ya está ocupando el orbital. Esto impone una restricción para el O_2 , ya que solo podrá aceptar un electrón a la vez, además las reacciones serán muy lentas (Hansberg, 2002; Hermes, 2004; Konigsberg, 2007). Condiciones, como altas temperaturas o la luz solar, puede aumentar la reactividad del oxígeno mitigando dicha restricción, permitiendo que el oxígeno pueda recibir un e^- , y se produzca el radical superóxido ($O_2\bullet$). La adición de un segundo e^- al $O_2\bullet$ da lugar al anión peróxido (O_2^{-2}), pero éste no es un radical libre porque no tiene electrones desapareados. En las células, esta reacción ocurre por la dismutación de dos moléculas de superóxido, catalizada por la enzima superóxido dismutasa (SOD) como parte de los mecanismos de defensa antioxidante, que posteriormente degradarán al peróxido de hidrógeno (H_2O_2) convirtiéndolo en agua, por acción de enzimas como la glutatión peroxidasa (GPx) o la catalasa (CAT) (Hansberg, 2002; Hermes, 2004; Konigsberg, 2007).

El rompimiento homolítico del enlace covalente entre los dos átomos de oxígeno del H_2O_2 , produce un anión (OH^-) y un radical hidroxilo ($HO\bullet$). Los catalizadores de esta reacción son metales de transición como el hierro (Fe) y el cobre (Cu), aunque también pueden ser radiaciones ionizantes u otros

agentes. La reacción que involucra al Cu o al Fe es llamada reacción de Fenton:



Otra manera en que se genera el radical hidroxilo es mediante la reacción de Haber-Weiss, también catalizada por los mismos metales (Hansberg, 2002; Hermes, 2004; Konigsberg, 2007):



Debido a que los seres vivos han estado expuestos a las ERO por dos mil millones de años, se han seleccionado mecanismos para contender con ellos y también mecanismos que los utilizan en múltiples funciones. El H_2O_2 y otras especies reactivas, funcionan como señales que determinan respuestas fisiológicas de adaptación al medio ambiente. Es muy importante señalar que las ERO son indispensables para la diferenciación celular y para la muerte celular programada (Konigsberg, 2007).

1.5 Estrés oxidante

El estrés oxidante se define como una alteración en el equilibrio entre la producción de ERO y ERN y las defensas antioxidantes (Betteredge, 2000), favoreciendo a las especies reactivas, generando un ambiente celular en el cuál se propicia el daño oxidante a las biomoléculas (lípidos, proteínas y ADN) (Sies,

1991; Poderoso *et al.*, 2000; Boveris *et al.*, 2008). Cabe mencionar que el estado redox celular descrito como el balance entre el estado oxidado y reducido es un evento dinámico, que puede cambiar dependiendo de las necesidades fisiológicas de la célula, sin llegar a alcanzar un estado de estrés oxidante.

Las especies reactivas de oxígeno más importantes son (González y Morera, 2001):

- $O_2^{\cdot-}$ Anión superóxido.
- H_2O_2 Peróxido de Hidrógeno.
- HO^{\cdot} Radical hidróxido.
- 1O_2 Oxígeno singulete.

Mientras que las especies reactivas de nitrógeno más importantes son:

- NO óxido nítrico
- $ONOO^-$ anión peroxinitrito

Las ERO/ERN pueden reaccionar con estructuras y moléculas celulares alterando su función biológica. Las ERO/ERN son neutralizadas por antioxidantes enzimáticos o no enzimáticos deteniendo la formación inicial de radicales o transformandolas en moléculas no reactivas. La acumulación de ERO/ERN resulta en estrés oxidante que contribuye al desarrollo de procesos patológicos típicos de diferentes cánceres, enfermedades neurodegenerativas, inflamatorias o tóxicas, etc. (Rutkowski *et al.*, 2007).

1.6 Peróxido de hidrógeno

La mayoría del H_2O_2 producido en las células es producto de la dismutación del O_2^\bullet proveniente de la fuga de electrones de la cadena respiratoria mitocondrial (Lambeth, 2002; Loschen *et al.*, 1974; Forman y Kennedy 1974) la biotransformación de xenobióticos (McCord y Fridovich, 1970) y otras flavoproteínas (Massey *et al.*, 1961). Otro sitio importante 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). El H_2O_2 puede ser producido principalmente por algunas enzimas oxidoreductasas, como es el caso de la glucosa oxidasa (Massey *et al.*, 1961) y la NADPH oxidasa (NOX).

Dependiendo de la concentración de H_2O_2 que exista en las células el H_2O_2 puede funcionar como mensajero a nivel celular estimulando el crecimiento y la proliferación, a concentraciones más altas puede promover la detención transitoria del ciclo celular o una respuesta oxidativa y concentración aún mayores, el H_2O_2 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 (Burdon, 1995; Wiese *et al.*, 1995; Pickering *et al.*, 2012).

1.7 Antioxidantes

Las reacciones de oxidación involucran la transferencia de electrones que producen RL y ERO/ERN. Esta situación es incompatible con la vida pero, existen mecanismos de defensa celular conocidos como antioxidantes que neutralizan a los RL. Se considera como un antioxidante a cualquier sustancia que en concentraciones normales posee una alta afinidad para interaccionar con un RL (Mayor, 2010).

Los antioxidante ceden un electrón a los RL oxidándose y transformándose a su vez en RL, pero más débiles y menos reactivos (Turnes, 1994; Rodríguez *et al.*, 1994, 1995; Montero 1996). No todos los antioxidantes actúan de esta manera, los llamados enzimáticos catalizan o aceleran reacciones químicas que utilizan sustratos que reaccionan con los RL.

1.7.1 Antioxidantes no enzimáticos

Los antioxidantes no enzimáticos se refieren preferentemente a las vitaminas, y poseen el mecanismo de acción antes mencionado. Cada antioxidante no enzimático posee afinidad hacia un determinado RL o hacia varios (Deal, 1995), y su característica es tener enlaces dobles conjugados. En particular la vitamina E (α -tocoferol) neutraliza al oxígeno singulete, captura radicales hidroxilo, captura anión superóxido y neutraliza peróxidos; la vitamina C (ácido ascórbico), cuenta con las mismas funciones de la vitamina E y adicionalmente puede regenerar la forma oxidada de la vitamina E y la vitamina A (β -caroteno),

neutraliza el oxígeno singlete. Una particularidad interesante del funcionamiento de las vitaminas es que, en muchos casos deben actuar en conjunto con el glutatión, para poder eliminar a los ERO **Figura 2** (Jiménez, 2000; Parker, 1994; Fridovich, 1975).

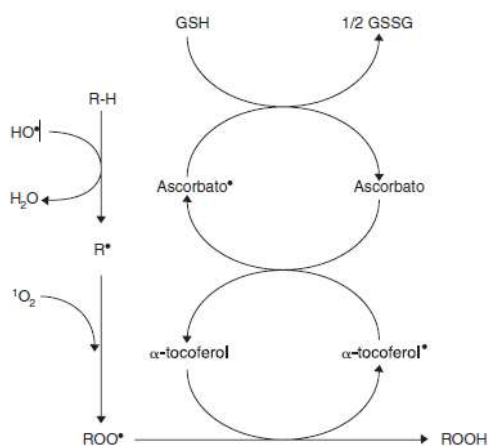


Figura 2. Mecanismo de acción de las vitaminas como atrapadores de electrones. Imagen tomada de Bioquímica de Laguna, 2006.

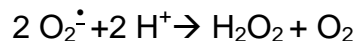
Otro antioxidante no enzimático importante no vitamínico es el glutatión (GSH), que es uno de los tioles no proteínicos más estudiados a nivel intracelular debido al papel crítico que juega en la fisiología y bioquímica celular (Lademan, 2011). El H₂O₂ producido de manera endógena se reduce por el GSH en presencia de la GSH-peroxidasa (GPx) dependiente de selenio. Como resultado el GSH se oxida a GSSG, por lo que para volver a tener actividad antioxidante, este debe volver a reducirse otra vez a GSH, lo que se lleva a cabo por la enzima GSSG reductasa a expensas de NADPH, en lo que se conoce como un ciclo redox (DeLeve y Kaplowitz, 1991), enzimas de las que se hablará en el siguiente apartado.

1.7.2 Antioxidantes enzimáticos

El sistema de antioxidantes enzimáticos incluye a las enzimas como la superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GPx), tiorridoxina reductasa y glutatión reductasa.

La superóxido dismutasa (SOD) se encuentra presente en todos los tipos celulares y se ha demostrado tiene un papel muy importante en la protección de las células y tejidos contra el estrés oxidante.

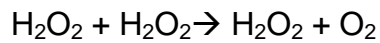
La SOD dismuta al anión superóxido en peróxido de hidrógeno, cuya acumulación se evita por el sistema de CAT/GPx, transformándolo en oxígeno molecular, agua y glutatión oxidado (Robbins, 2011).



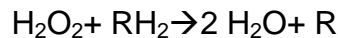
Existen varios tipos de SOD, pero los más importantes son la SOD tipo 1, que tiene como cofactores al cobre y al zinc (CuZn-SOD o SOD1) y que se encuentra de manera constitutiva en el citosol. La SOD tipo 2, posee al Mn como cofactor (Mn-SOD o SOD2), y es una isoforma inducible que está presente en el interior de las mitocondrias. Finalmente, existe un tercer tipo de SOD que se localiza fuera de la célula y está asociada a la matriz extracelular, al igual que la SOD1, tiene asociado cobre y zinc, y se conoce como SOD3 o EC-SOD. Si bien las tres realizan la misma actividad catalítica, guardan grandes diferencias en cuanto a su estructura y organización. Las tres variantes de esta enzima se encuentran en diferentes localizaciones subcelulares demostrando la

dificultad que tiene el $O_2^{\cdot -}$ para atravesar las membranas lipídicas y resalta la importancia fisiológica de mantener un nivel controlado de dichas especies.

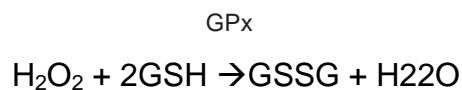
La catalasa (CAT) es una enzima que se encuentra principalmente en los peroxisomas, y protege a la célula de la acumulación de H_2O_2 degradándolo para convertirlo en agua. Para llevar a cabo su función, la CAT emplea una segunda molécula de H_2O_2 como agente reductor, por lo que no necesita de ningún otro sustrato (Fridovich y Freeman, 1986):



Además, se sabe que la CAT también puede actuar como una peroxidasa utilizando un agente reductor (RH₂):



La glutatión peroxidasa (GPx). Esta enzima requiere de la participación del glutatión reducido (GSH) como agente reductor (Halliwell y Gutteridge, 1989):



La GPx también cataliza la reducción dependiente del GSH de los hidroperóxidos de los ácidos grasos. En todos estos casos el grupo peróxido (ROOH) es reducido a alcohol (ROH):



La GPx es una selenoproteína. El selenio (Se) es un elemento esencial que participa en muchos procesos biológicos y es también un micronutriente fundamental para el mantenimiento óptimo del sistema inmunitario, por lo que muchas enfermedades están asociadas con su deficiencia como, cáncer,

esclerosis, distrofia muscular y principalmente las enfermedad de Keshan (debilitamiento del corazón) y Kashin-Beck (degeneración osteoarticular) (Johnson *et al.*, 2000).

Las tiorredoxinas (Trx) son una familia de proteínas pequeñas (12 kDa) que se encuentran altamente conservadas en la escala evolutiva. Están implicadas en un gran número de funciones celulares, entre la que se destaca su actividad antioxidante. De manera similar al GSH, las proteínas de la familia de las Trx presentan en su sitio catalítico dos cisteínas con grupos sulfhidrilo reducidos (-SH), por lo que a la enzima reducida se le representa como: Trx-[SH]₂. Estas cisteínas son capaces de transferir sus equivalentes reductores y, por tanto, oxidarse de manera reversible, para generar la especie oxidada de la enzima (Trx-S-S-Trx). La reacción para regenerar a la Trx reducida (Trx-[SH]₂), es catalizada por la enzima Trx reductasa (Trx-R), que es una flavoproteína dependiente de NADPH.

Como parte de los antioxidantes enzimáticos destacan ciertos oligoelementos cuya incorporación al organismo es necesaria por constituir parte del núcleo activo de las enzimas antioxidantes. Estos oligoelementos son: cobre, zinc, selenio, magnesio y hierro (Parker, 1994; Fridovich, 1975).

1.8 Estrés oxidante y apoptosis

La muerte celular y el estrés oxidante han estado relacionados desde el momento en que fue posible evaluar la presencia de metabolitos oxidados. El estrés oxidante ahora se reconoce como disparador de la muerte celular, en

particular la muerte por apoptosis. En algunos casos es un elemento indispensable durante la fase de activación del programa de muerte celular. Los sistemas que generan NO^\bullet y la NOX que genera $\text{O}_2^{\bullet -}$ y H_2O_2 forman parte de las señales responsables de iniciar y/o modular positivamente la activación de diversos procesos de muerte celular como la apoptosis (Zentella, 2008). Sin embargo, aún se desconocen las reacciones específicas de oxidación implicadas y los sustratos oxidados que participan en las vías de señalización que activan la apoptosis. Se ha descrito una estrecha relación entre la muerte celular y la aparición de evidencia bioquímica de estrés oxidante, que van desde la presencia de especies que reaccionan con el ácido tiobarbitúrico hasta la detección de aductos oxidados de ADN como la 8-hidroxi-2, desoxi-guanina (8-OHdG). Los conocimientos de bioenergética reconocen que una célula sana mantiene ambientes oxidantes y reductores separados dentro de la célula. Por un lado, la célula realiza múltiples reacciones de oxidación de sustratos asociadas al ciclo de Krebs, al del glioxalato o la oxidación de xenobióticos por citocromos P_{450} , mismas que se realizan dentro de compartimentos subcelulares como la matriz mitocondrial, la matriz del peroxisoma o dentro de la luz del retículo endoplásmico. Por el otro lado, la célula mantiene un ambiente reductor del citoplasma, gracias a la actividad de la vía de las pentosas. Bajo esta perspectiva, el estrés oxidante es un resultado natural que se presenta en la interfase de estos dos compartimentos, por ejemplo cuando la ubiquinona, en lugar de ceder sus electrones a los componentes de la cadena respiratoria, los cede al oxígeno en forma prematura generando superóxido

(Zentella, 2008). Si la célula pierde el control sobre esta compartimentalización o no produce suficiente poder reductor, los procesos oxidantes pierden su regulación, generando así estrés oxidante, que de no ser neutralizado, conduce a un incremento de ERO, metabolitos y moléculas oxidadas e inevitablemente la célula muere por necrosis. Bajo los graves niveles de estrés oxidante que causa la necrosis, el daño produce agotamiento de ATP impidiendo la muerte celular por apoptosis controlada, provocando que la célula simplemente se desmorone. La necrosis suele presentarse como consecuencia de eventos accidentales o patológicos como traumatismos, intoxicación o isquemia, entre otros; y se caracteriza por la pérdida de la organización del citoesqueleto, del tráfico vesicular y los procesos biosintéticos y de generación de energía. Todo esto resulta en la pérdida de la organización subcelular, hinchamiento y eventual ruptura de la membrana, con consecuente derrame del contenido intracelular al medio intersticial (Zentella, 2008).

1.9 Apoptosis

En los organismos multicelulares, el número total de células es el resultado del balance entre la generación celular por efecto de la mitosis y la muerte celular inducida a través de la apoptosis (Cotter, 2009). La disrupción de este balance puede conducir al desarrollo del cáncer o la apoptosis.

Morfológicamente, las células apoptóticas se caracterizan por la contracción de sus núcleos y picnosis que eventualmente termina en un fraccionamiento del núcleo y en fagocitosis de la células apoptóticas (Cummings, 1997).

Bioquímicamente el resultado de un proceso apoptótico es la fragmentación del ADN por endonucleasas activadas por caspasas que producen fragmentos de aproximadamente 180-pb, los cuales son fácilmente detectados en una electroforesis de agarosa en un patrón de “escalera”.

Todos los estímulos que conducen a la apoptosis parece que lo hacen mediante el inicio de eventos que culminan con la activación de las caspasas, aunque de manera un tanto diferente (Nicholson, 1999; Creagh, *et al.*, 2003; Stennicke, *et al.*, 1998; Stennicke y Salvesen, 1998).

Hasta la fecha las investigaciones indican que hay tres vías principales de apoptosis establecidas en mamíferos (Creagh, *et al.*, 2003; Adrain y Martin, 2001): 1) La vía extrínseca o de receptores de muerte, 2) La vía intrínseca mitocondrial y 3) La vía intrínseca del retículo endoplásmico **Figura 3**. Sin embargo, ahora hay pruebas de que las tres vías están vinculadas y que las moléculas de una vía puede influir en la otra (Igney y Krammer, 2002) y todos los caminos conducen a la activación de las caspasas efectoras 6, 7 y 3, que tienen como resultado la fragmentación del ADN, la degradación de las proteínas del citoesqueleto y el núcleo, la reticulación de proteínas, la formación de cuerpos apoptóticos, etc. (Martinvalet *et al.*, 2005); estas enzimas realizan la

mayor parte de la proteólisis que se observa durante la fase de demolición de la apoptosis (Taylor, *et al.*, 2008).

1) La vía extrínseca, implica la unión de ligandos de muerte extracelular (como FasL o el factor de necrosis tumoral- α (TNF α) (Taylor, *et al.*, 2008) a receptores de muerte transmembranales (Locksley *et al.*, 2001). La unión de los receptores de muerte con sus ligandos, provoca el reclutamiento de proteínas adaptadoras como la proteína de muerte asociada al dominio Fas (FADD), que a su vez recluta y agrega a varias moléculas a la caspasa 8, promoviendo su autoprosesamiento y activación. Mediante procesos proteolíticos la caspasa 8 activa a las caspasas 3 y 7 provocando nuevos eventos de activación de caspasas, que culminan con la proteólisis de sustratos y la muerte celular. En algunas ocasiones la vía extrínseca puede cruzarse con la vía intrínseca a través de la caspasa 8 mediante la proteólisis de la proteína BID-“BH3-only”. BID truncado (tBID) puede promover la liberación de citocromo c de la mitocondria y el montaje del apoptosoma (compuesto de ~7 moléculas del factor de activación 1 (APAF-1) y el mismo número de homodímeros de la caspasa 9 y del citocromo c) (Taylor, *et al.*, 2008; Chinnaiyan, 1999; Hill *et al.*, 2004).

2) La vía mitocondrial es estimulada por el estrés celular o daños que activan a uno o más miembros de la familia “BH3-only”. Las proteínas “BH3-only” actúan como sensores específicos para varios estímulos y son reguladas de maneras distintas. La familia de proteínas Bcl-2 controla la permeabilidad de la

membrana mitocondrial y pueden tener efecto pro-apoptótico o anti-apoptótico. La activación de las proteínas “BH3-only” por encima de un umbral crucial supera el efecto anti-apoptótico de los miembros de la familia Bcl-2 y promueve el montaje de los oligómeros Bak-Bax (proteínas pro-apoptóticas) dentro de la membrana mitocondrial externa. Estos oligómeros permiten la salida de proteínas del espacio intermembranal, como el citocromo c al citosol (Saelens *et al.*, 2004). La liberación de citocromo c de la mitocondria puede conducir el ensamblaje del apoptosoma (Chinnaiyan, 1999; Hill *et al.*, 2004).

3) La vía intrínseca del retículo endoplásmico, el retículo es altamente sensible al estrés, esto puede perturbar los niveles de energía, el estado redox y la concentración de Ca^{2+} . El estrés resulta en una acumulación de proteínas y agregados mal plegados, una condición definida como estrés en el retículo (Kaufman, 2002). Este estrés es combatido mediante una respuesta a las proteínas mal plegadas (UPR). Esta respuesta celular es mediada por tres receptores transmembranales del RE: La cinasa pancreática del RE (PKR)- como cinasa del RE (PERK), el factor activador de la transcripción 6 (ATF6) y la enzima requerida por el inositol 1 (IRE1). En el resto de las células los tres receptores se encuentran asociados a la chaperona GRP78. La acumulación de proteínas mal plegadas, provoca la disrupción de GRP78 de los receptores lo que provoca su activación y la UPR. Sin embargo, cuando se siguen acumulando proteínas mal plegadas y el estrés persiste las señales pasan de pro-sobrevivencia a pro-apoptóticas (Schoder y Kaufman, 2005). Además, el RE es altamente sensible a cambios en los niveles de energía, el estado redox y la

concentración de Ca^{2+} . La caspasa 12 ha sido propuesta como mediadora de la apoptosis por estrés en el RE en ratones, en humanos se ha propuesto a la caspasa 4 como la que lleva la misma función que la caspasa 12 (Szegezdi *et al.*, 2003).

Las vías extrínseca e intrínseca convergen a la vez en el punto final de la fase de ejecución, considerada la vía final de la apoptosis. Esta es la activación de las caspasas de ejecución quienes comienzan esta fase de la apoptosis. Las caspasas 3, 6 y 7 coordinan la demolición de las principales estructuras celulares y orgánulos, organizan el desmantelamiento de diversas estructuras celulares a través de la descomposición de sustratos específicos (**Figura 3**) (Slee *et al.*, 2001).

La caspasa 3 se considera la más importante de las caspasas ejecutoras y se activa por cualquiera de las caspasas iniciadoras 8, 9 o 12. La caspasa 3 activa específicamente a la endonucleasa CAD. En las células proliferantes CAD está en un complejo con su inhibidor ICAD. En las células apoptóticas, la caspasa 3 activa se unirá a ICAD para liberar CAD. CAD entonces degrada el ADN cromosómico dentro del núcleo y hace que la cromatina se condense. La caspasa 3 también induce la reorganización del citoesqueleto y la desintegración de la célula en cuerpos apoptóticos (Sakahira *et al.*, 1998).

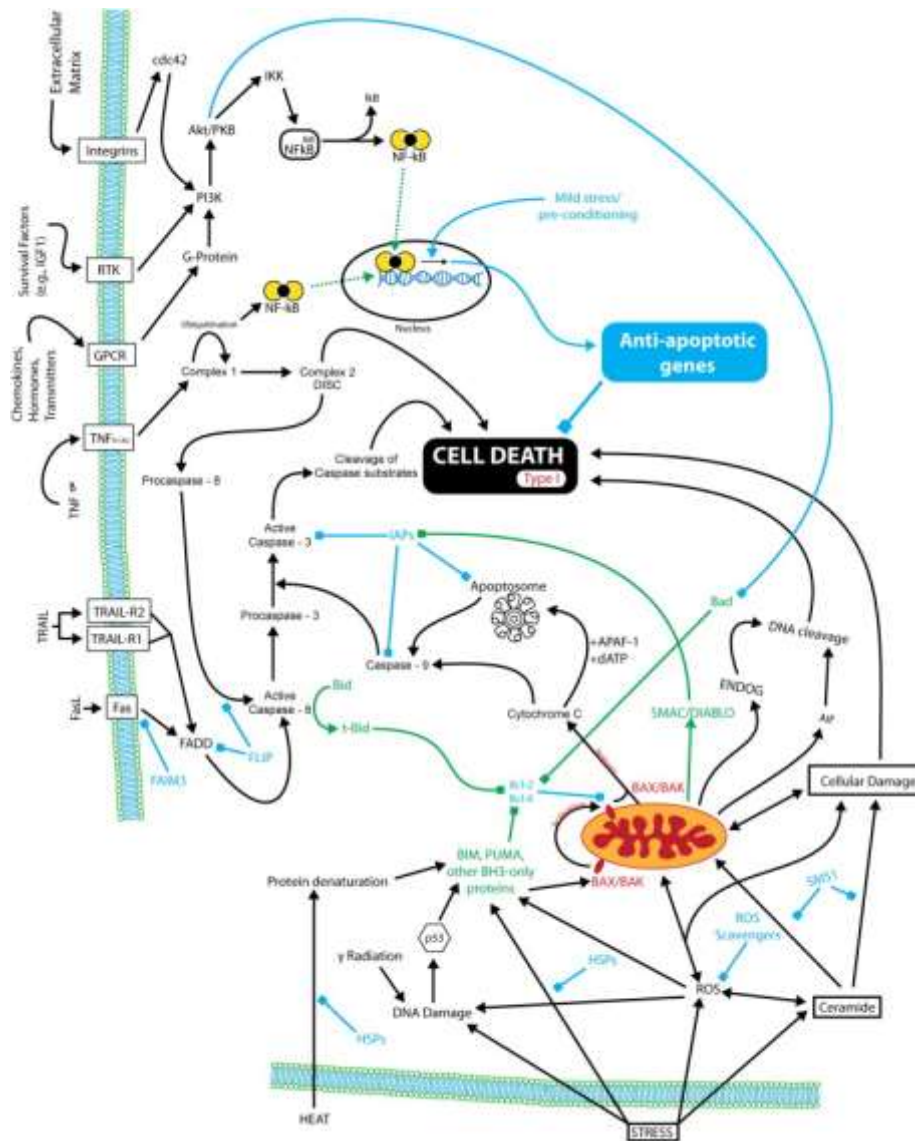


Figura 3. Representación esquemática de las vías celulares de apoptosis. Se muestra en azul las proteínas que promueven la supervivencia. El óvalo vacío representa el núcleo. La muerte celular y los genes anti-apoptóticos se muestran en los recuadros negros y azules respectivamente. Imagen tomada de Liam *et al.*, 2011.

1.10 La familia de Bcl-2

La proteína Bcl-2 se considera como el principal representante del grupo de proteínas relacionadas con la supervivencia celular y da nombre a la familia. Bcl-

2 fue descrita en un modelo de leucemias de células B (*B-cell leukemia gene 2: Bcl-2*). Posterior al descubrimiento de este gen, la familia se fue ampliando y se dividió en dos subgrupos proteínas anti-apoptóticas y pro-apoptóticas. Los niveles de cada subgrupo son los que determinan si la célula muere o sobrevive (Oltvai *et al.*, 1993). Una característica adicional es que pueden formar homodímeros y heterodímeros entre miembros y otra de importancia funcional es su capacidad de convertirse en proteínas integrales de membrana (Cory y Adams, 1998; Kelekar y Thompson, 1998; Reed, 1998).

Por medio de alineamientos múltiples de los genes relacionados a Bcl-2, se han identificado cuatro regiones conservadas en la región codificante, denominadas regiones de homología a Bcl-2: BH1, BH2, BH3 y BH4 **Figura 4**. Los miembros de la familia se catalogan en tres subfamilias: la subfamilia de Bcl-2, cuyos miembros actúan como inhibidores de apoptosis, que contienen los cuatro dominios de BH1 a BH4. Su característica distintiva es la presencia del dominio BH4, necesario para su función anti-apoptótica. Algunos miembros de este grupo son Bcl-2, Bcl-X_L, Al, Boo, Bcl-w y Mcl-1.

La subfamilia Bax actúa como promotora de la apoptosis y sus miembros presentan solo los dominios BH1 a BH3. Carecen del dominio BH4. El dominio BH3 es esencial para promover la muerte, pues mutaciones que remueven este dominio eliminan la actividad pro-apoptótica. La tercera subfamilia está compuesta por genes cuya única similitud en secuencia con la familia Bcl-2 es la presencia del dominio BH3, siendo completamente diferentes en el resto de las secuencias. Esta subfamilia también es proapoptótica, y el dominio BH3 es

indispensable para su función, esta es la llamada “BH3 only”. Algunos miembros de esta familia son Bim, Bik, Bad, Bid, Harakiri y Noxa (Cory y Adams, 2001).

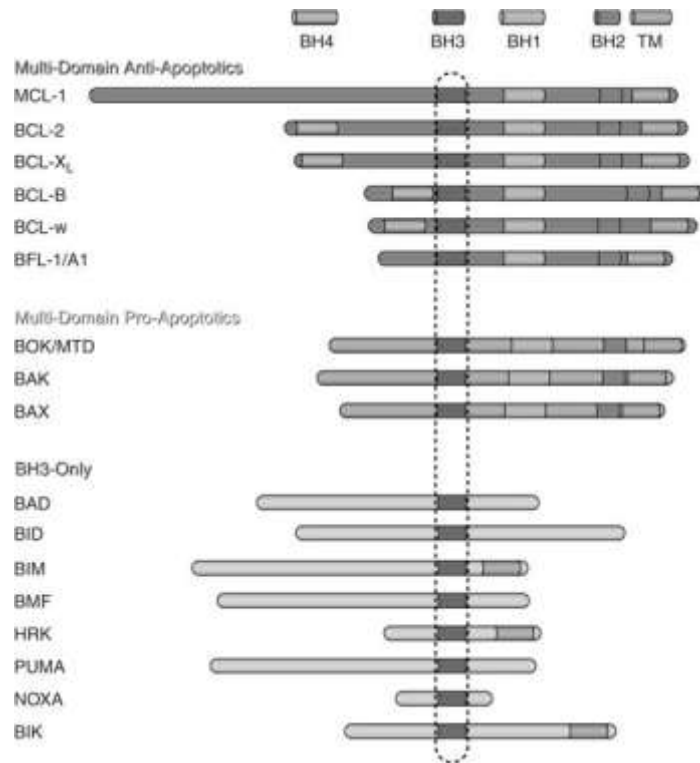


Figura 4. Miembros de la familia de Bcl-2. Los miembros de la familia de Bcl-2 poseen hasta cuatro dominios de homología (denominados desde BH1 hasta BH4). Parte de los miembros se anclan a membranas a través de un dominio transmembranal (TM). Los miembros de esta familia se pueden subdividir en dos grandes grupos: anti-apoptóticos y pro-apoptóticos. Se observa como los primeros se caracterizan por conservar los cuatro dominios BH. Por el contrario, los pro-apoptóticos se dividen en los que conservan la mayoría de los dominios BH (multidominio) y los que sólo conservan el dominio BH3, junto con la región TM o no.

Los experimentos de mutagénesis en los dominios BH1- BH4 indican que éstos se requieren para la interacción entre distintos miembros de la familia Bcl-2 u otras proteínas que tienen efectos funcionales importantes. Por ejemplo, BH1 y BH2 son fundamentales para la mayoría de las interacciones entre miembros de

esta familia; la región BH3 de Bax, por otro lado, es suficiente para inducir la muerte, mientras que la región BH4 de Bcl-2 es indispensable para proteger, aun cuando no se requiere para dimerizar con Bax o Bcl-2 mismo (Hanada *et al.*, 1995). A pesar de la homología de la secuencia de los dominios BH1 y BH2, éstos confieren una especificidad de interacción, ya que no todas las combinaciones de heterodímeros entre las moléculas identificadas es posible. Hay una preferencia de interacción entre los miembros anti-apoptóticos con los miembros pro-apoptóticos. Los miembros de la subfamilia BH3 no homodimerizan, lo que sugiere que su función es competir por los protectores de muerte Bcl-2, quizá aumentando las concentraciones de la subfamilia Bax y permaneciendo asociada a Bcl-X_L (Yang *et al.*, 1995). En este contexto, Bad funcionaría como un inductor de muerte al liberar a las proteínas Bax y Bak, que homodimerizan y matan. Experimentos de mutagénesis apoyan esta noción, ya que siguen teniendo la capacidad de homodimerizar, también pierde la habilidad de bloquear la muerte (Yin *et al.*, 1994). La subfamilia BH3 parece ser guardiana del daño celular y crítica para desencadenar la apoptosis.

1.11 Bik (*Bcl2-Interacting Killer*)

El gen *Bik* es codificado en el cromosoma 22q13.3, abarca una región de alrededor de 19 kb y se compone de 5 exones (Verma *et al.*, 2000). Bik fue el primer miembro de la familia de proteínas pro-apoptóticas "BH3-only" en ser descubierta (Boyd *et al.*, 1995). Está constituida por 160 aminoácidos y consta

de dos dominios, el dominio “BH3-only” y un dominio transmembranal **Figura 5**. Mutaciones específicas en el dominio BH3 disminuyen su actividad apoptótica, debido a que por medio de este dominio interacciona con otros miembros de la familia Bcl-2 para conservar su función pro-apoptótica (Boyd *et al.*, 1995; Chittenden *et al.*, 1995; Elangovan y Chinnadurai, 1997; Mathai *et al.*, 2002). En cuanto al dominio transmembranal de la proteína, éste ha mostrado no ser indispensable para la actividad apoptótica, al menos en condiciones de sobreexpresión transitoria en modelos celulares (Elangovan y Chinnadurai, 1997). Se han reportado fosforilaciones, en la proteína humana Bik, en los residuos treonina Thr (33) y serina Ser (35) por acción de la caseína cinasa tipo II (Verma, 2002). En experimentos donde se inhibe la fosforilación de estos sitios, se observa una disminución en la apoptosis y también en la interacción de Bik con otras proteínas anti-apoptóticas, lo que indica que estas modificaciones postraduccionales potencian la actividad pro-apoptótica de Blik (Verma, 2000). Bik es una proteína que se encuentra en el RE (Germain *et al.*, 2002).

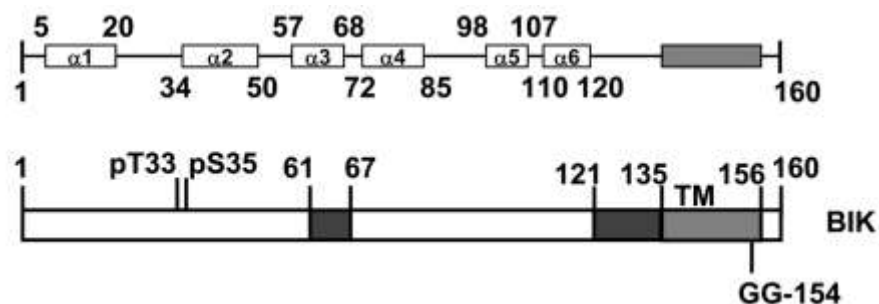


Figura 5. Estructura secundaria de la proteína Bik. La región $\alpha 3$ abarca el dominio BH3, El dominio C-terminal es requerido para su máxima actividad pro-apoptótica además de la fosforilación en los sitios Thr (33) y Ser (35). Imagen modificada de Channadurai *et al.*, 2008.

Cuando los niveles de la proteína Bik son lo suficientemente elevados, esta proteína forma dímeros con las proteínas anti-apoptóticas Bcl-2 y Bcl-xL, que se caracterizan por inhibir a las proteínas efectoras de la apoptosis Bax y Bak. Una vez liberadas estas proteínas, inducen apoptosis a través de la vía intrínseca o mitocondrial por movilización de calcio Ca^{2+} del RE a la mitocondria, lo cual tienen como consecuencia el remodelamiento de las crestas mitocondriales. Este cambio mitocondrial induce la liberación del citocromo c y la activación de la caspasa 9 **Figura 6** (Tong *et al.*, 2001). Todos estos cambios pueden ocurrir en respuesta a estímulos como el estrés genotóxico, radiaciones, infecciones virales y la sobreexpresión de algunos genes como p53 y E2F, entre otros (Germain *et al.*, 2005).

También se ha observado cooperación entre Bik y la proteína NOXA que es otro miembro de la familia “BH3-only” para la inducción de apoptosis. La expresión de NOXA por sí sola no parece ser suficiente para provocar la salida del citocromo c de la mitocondria, sin embargo, la co-expresión de Bik y NOXA ha mostrado inducir la activación conformacional de la proteína Bax y acelerar la liberación de citocromo c. Aunque el mecanismo de cooperación entre estas dos proteínas “BH3-only”, localizadas en diferentes orgánulos, no es conocido, es posible que esté relacionado con la activación cooperativa de la proteína Bax por Bik y la liberación de la proteínas Bak del complejo que forma con el miembro anti-apoptótico MCL-1 por parte de NOXA (Willis, 2005).

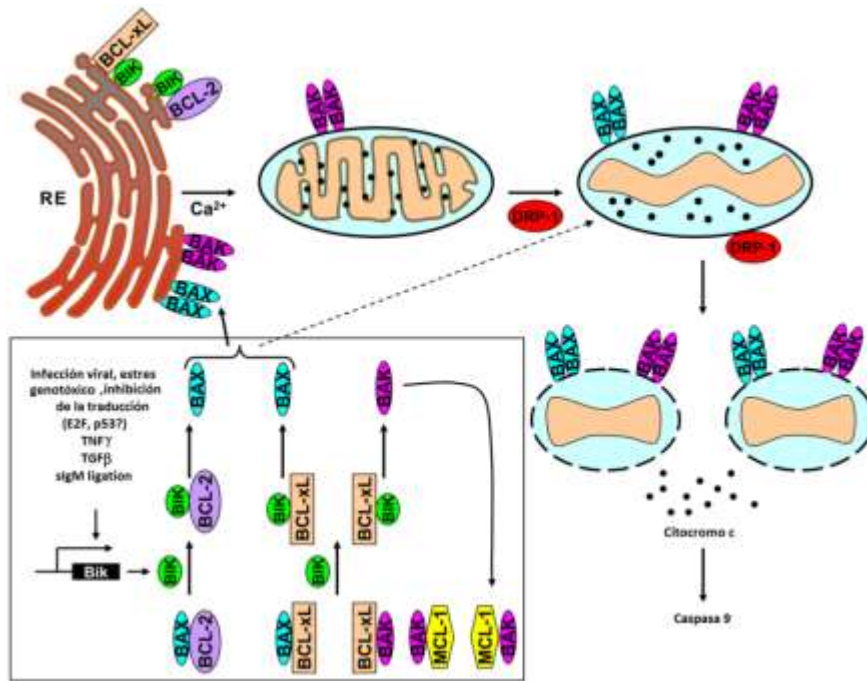


Figura 6. Modelo de la inducción de apoptosis por BIK en células epiteliales cancerosas. Imagen modificada de Channadurai *et al.*, 2008.

2. ANTECEDENTES

El cáncer de mama es la primera causa de muerte por tumores malignos en mujeres de México y el mundo (Globocan, 2008; IARC, 2010). El estudio molecular del cáncer de mama ha permitido el desarrollo de nuevas herramientas de predicción y respuesta a tratamientos (Hidalgo y Jiménez, 2009). Se ha establecido que algunos agentes quimioterapéuticos y la terapia de radiación generan ERO en los pacientes durante la terapia contra el cáncer. Las ERO dañan al ADN produciendo mutaciones que inician tumores y sostienen la progresión cancerígena (Wiseman y Halliwell, 1996). El papel de las ERO en cáncer de mama no se limita únicamente a mutaciones tempranas. Las células tumorales se encuentran persistentemente bajo estrés oxidante (Szatrowski y Nathan, 1991). Las líneas celulares tumorales humanas *in vitro* producen en gran tasa de ERO 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 ERO 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 clones 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 mecanismos 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 anti-apoptóticas de la familia Bcl-2. Se ha reportado un aumento en los niveles de las proteínas Bax y Bcl-2 y un cambio en la localización ante el estrés oxidante. La localización nuclear de Bax en biopsias de pacientes con cáncer de mama (Vargas, 2008) y en cultivo de células de cáncer de mama (Hoetelmans *et al.*, 2000 y 2004). La presencia de las proteínas Bcl-2 y Bax en el núcleo se ha relacionado con un aumento de la apoptosis y la inhibición de factores de crecimiento y proteínas del ciclo celular respectivamente (Hoetelmans *et al.*, 2004).

En el 2005 García y colaboradores reportaron la sobreexpresión del mensajero de Bik en biopsias de tumores de mama. 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 tirotrópico (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. 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).

3. JUSTIFICACIÓN

El cáncer de mama es la primera causa de muerte por tumores malignos en mujeres en el mundo. Algunas terapias contra el cáncer incrementan la generación de ERO aumentando el estrés oxidante. Se ha reportado que ante este estrés algunos miembros de la familia Bcl-2 se pueden modificar sus niveles de expresión y cambiar de localización subcelular. La movilización al núcleo de proteínas como Bax y Bcl-2, se ha asociado con la apoptosis y la inhibición de proteínas del ciclo celular y factores de transcripción, funciones que no habían sido descritas para estas proteínas.

Puesto que se ha reportado un incremento del mensajero de Bik (otro miembro de la familia Bcl-2) en biopsias de tumores de cáncer de mama, resulta importante investigar si la proteína Bik cambia su expresión y localización subcelular en respuesta ante un reto oxidante, lo cual nos permitiría entender si dicha proteína tiene otras funciones celulares y si ello tiene relación con los niveles de agresividad de las líneas celulares de cáncer de mama MDA-MB-231 y MCF-7

4. HIPÓTESIS

Puesto que se sabe que las proteínas de la familia Bcl-2 son susceptibles a modificar su expresión y localización en función de cambios en el estado redox, se espera que la expresión y localización subcelular de la proteína Bik cambie después de del tratamiento con H₂O₂.

5. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Habrá cambios en la expresión y localización de Bik como respuesta a un reto oxidante?

6. OBJETIVO GENERAL

Determinar los niveles proteínicos de Bik y su localización subcelular en respuesta a un reto oxidante en las líneas MDA-MB-231 y MCF-7.

6.1 Objetivos específicos

- Establecer la concentración de H_2O_2 necesaria para la inducción de la expresión de Bik en las líneas celulares.
- Determinar los niveles de la proteína Bik posterior al reto oxidante.
- Cuantificar la viabilidad de las células MDA-MB-231 y MCF-7 posterior al reto oxidante.
- Identificar la localización de Bik en las células MDA-MB-231 y MCF-7 posterior al reto oxidante.

7. MATERIAL Y MÉTODOS

7.1 Cultivo Celular

El cultivo de las líneas MDA-MB-231 y MCF-7 (ATCC®) se realizó en cajas Petri en medio DMEM/F12 (1:1) suplementado con suero fetal bovino al 10% (Gibco®, Grand Island, NY, EUA) y Antibiótico/Antimicótico 1% (Gibco®, Grand Island, NY, EUA), se incubaron hasta que el cultivo llegó a un 70% de confluencia, en una atmósfera de CO₂ al 5% y una temperatura de 37°C.

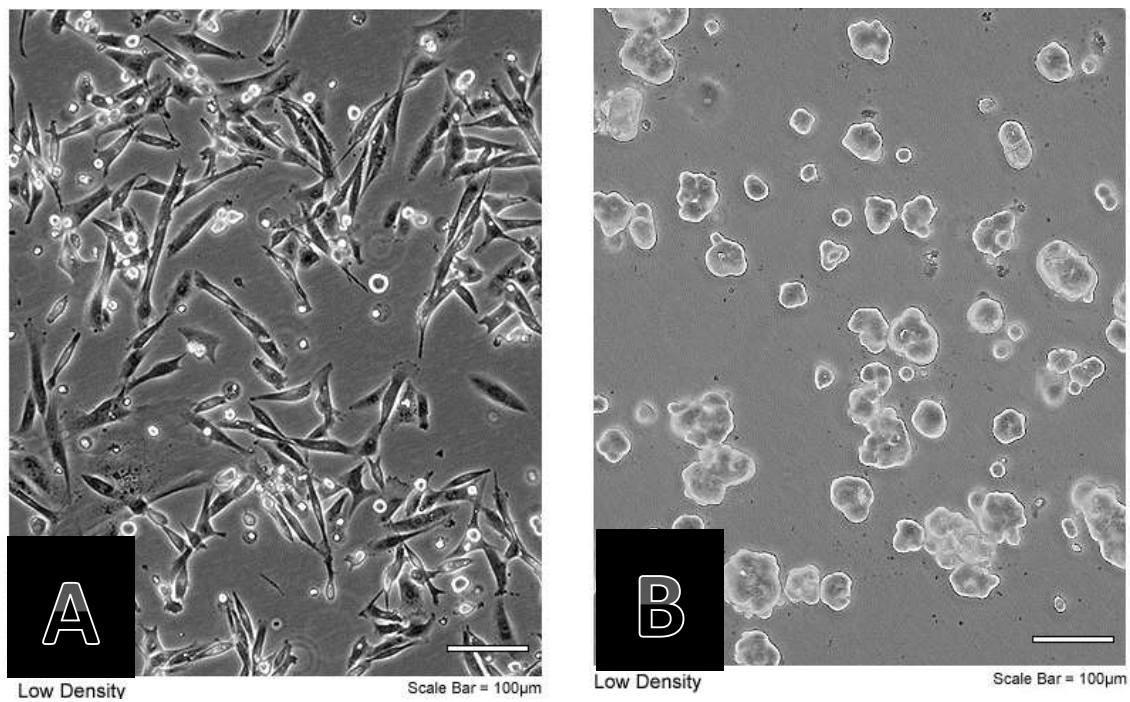


Figura 1. Morfología de las líneas celulares de cáncer de mama. A) Cultivo celular de de las células MDA-MB-231. B) Cultivo celular de las células MCF-7. Cultivos celulares a baja densidad de crecimiento).

La tabla 1 muestra las características principales de las líneas celulares de cáncer de mama MCF-7 y MDA-MB-231, empleadas para la realización del presente proyecto (ATCC™, 2014).

CARACTERÍSTICAS DE LAS LÍNEAS CELULARES		
LÍNEA CELULAR	MCF-7	MDA-MB-231
ORGANO	Cáncer de Mama: glándula mamaria	Cáncer de Mama: glándula mamaria
PROVIENE	Efusión Pleural	Efusión pleural
MORFOLOGÍA	Epitelial	Epitelial
RECEPTORES	Estrógeno + Progesterona + HER2 -	Estrógeno - Progesterona - HER2 -
TIPO DE CÁNCER	Adenocarcinoma metastásico	Adenocarcinoma metastásico
SUBTIPO	Luminal	Basal
ESTADO p53	Mutante/Salvaje	Mutante
AGRESIVIDAD	No invasiva, metastásica	Invasora y metastásica
ORIGEN	Mujer caucásica, 69 años	Mujer caucásica, 51 años

Tabla 1. Características de las células MCF-7 y MDA-MB-231.

7.2 Inmunocitoquímica

Para la realización de la inmunocitoquímica, se sembraron 2×10^4 células MDA-MB-231 y 2×10^4 células MCF-7, en cubreobjetos o laminillas dentro de placas multipozos de 4 pozos uno de los pozos correspondientes a cada línea funcionó como control de la inmunocitoquímica. Las células fueron incubadas 24 h y posteriormente se lavaron dos veces con 250 μ L de solución salina de fosfatos (PBS) 1X. El PBS 1X fue decantado y la células fueron fijadas con formalina neutra al 10% (Sigma-Aldrich ®) por 15 min. Las células fijadas fueron lavadas dos veces con 250 μ L PBS 1X y posteriormente se añadió 250 μ L de bloqueador de proteínas (Power Block™ BioGenex) en cada pozo por 10 min. A continuación, las laminillas fueron lavadas dos veces con PBS-Tween 2% y consecutivamente se decantó este, cada pozo excepto el pozo control contenía sobre su superficie 150 μ L de anticuerpo primario BIK (ABCAM®), en una dilución 1:150 en Tris amortiguador salino (TBS)-Tween 20 (Tween) 2% y se incubó por 1 h. Después de haber transcurrido el tiempo de incubación, se lavaron los pozos de la laminilla tres veces con TBS-Tween 2% por 5 min. Posteriormente, se incubó 1 h con el anticuerpo secundario de conejo (Invitrogen™), en una dilución 1:200 en TBS-Tween 2%. Inmediatamente de haber transcurrido el tiempo de incubación, se lavaron los pozos de la laminilla tres veces con TBS-Tween 2% por 10 min. Finalmente, fueron montadas y observadas en el microscopio (ZEISS, xiovert 40 CFL).

7.3 Curva Dosis-Respuesta de H₂O₂

Se sembraron 4×10^4 células en cajas de Petri (100x15mm) MDA-MB-231 y MCF-7, después de 24 las cajas fueron tratadas con diferentes concentraciones de H₂O₂ por 2 h.

CAJA PETRI	H ₂ O ₂
Caja control	0 μ M
1	50 μ M
2	100 μ M
3	200 μ M
4	400 μ M
5	600 μ M

Posteriormente se extrajeron las proteínas de cada caja para determinar los niveles de BIK por Western Blot, para ello se retiró el medio de cada caja y se lavó dos veces con PBS 1X, se decantó dejando la superficie de la caja Petri completamente seca y se agregaron 200 μ L de buffer de lisis M-PER® (Thermo Scientific) (25 mM Tris-HCl pH 7.4, 150mM NaCl, 1% NP-40, 1mM EDTA, 5% glycerol) con un coctel de antiproteolíticos al 20% (v/v) (Roche®) PMSF 0.1M y DTT 1M. Posteriormente, la muestra se centrifugó a 14,000 g durante 15 min a 4°C; al término se tomó el sobrenadante y almacenó a -20 °C hasta su uso. La

cuantificación de proteínas se realizó por el método de Bradford (Bradford, 1976), utilizando una curva patrón de albúmina.

7.4 Western Blot

Veinte μg de proteína de la muestra se incubaron a 95°C por 5 min y posteriormente la muestra se transfirió a 4°C por 3 min en buffer de carga y se cargó en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 12%. La electroforesis se corrió durante 4 h a 50V. Una vez finalizada la electroforesis, las proteínas se transfirieron a una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF) durante 2 h a 120V y la membrana se tiñó con rojo de Ponceau para corroborar la transferencia y el cargado de la muestra. El exceso del rojo de Ponceau se retiró con H_2O y se bloqueó 1 h con leche al 8% en TBS-Tween 1%. Finalizando el tiempo, la membrana se lavó en repetidas ocasiones con con TBS-Tween 1% para retirar el exceso de leche. La membrana se incubó con el anticuerpo primario respectivamente (Actina 1:1000, o BIK 1:100 (abcam ®)), diluido en TBS-Tween 1% durante 12-15 h a 4°C . El anticuerpo primario se recuperó y almacenó a 4°C , posteriormente se hizo un lavado vigoroso con TBS-Tween 1% y se incubó en agitación suave con TBS-Tween 1% y leche al 8% por 15 min, posteriormente se incubó con el anticuerpo secundario (Santa Cruz Biotechnology) respectivo para cada anticuerpo primario (Actina-anti ratón 1:500 y BIK-anti conejo 1:1000). Finalmente, se recuperó el anticuerpo secundario y se realizaron 2 lavados vigorosos con TBS-Tween 1% y 1 lavado con TBS con el fin de eliminar el excesos de anticuerpo secundario y finalmente

se reveló en un fotodocumentador (Kodak Gel Logic 1500) para visualizar la proteína de interés, la membrana se colocó en un acetato y se adicionó 1 mL de solución; ECL-Detection (Kit Quimiolumincente™ Buffer de Peroxidasa, Solución Potenciadora de Luminol, y Solución Peroxidasa, Millipore). La membrana se expuso 3 veces por 30 seg para conseguir la imagen de la proteína. Todo el proceso de inmunodetección se realizó por triplicado. Las imágenes conseguidas fueron analizadas por densitometría con el equipo Kodak Gel Logic 1500 (Imagen System) y comparadas estadísticamente con el programa GraphPad Prism 6.

7.5 Curva de viabilidad

Se sembraron en placas de 48 pozos 2×10^4 células MDA-MB-231 y 4×10^4 células MCF-7 y se incubaron 24 h, posteriormente se trató a las células con una concentración final 200 μ M de H_2O_2 y se determinó su viabilidad empleando el método de exclusión de azul tripano a los tiempos, 0, 30, 60, 90 y 120 min.

7.6 Inmunofluorescencia

Para la realización de la inmunofluorescencia, se sembraron en cubre objetos 2×10^4 células MDA-MB-231 y MCF7 después de 30 min se adhirieron y se agregó 1 mL de medio DMEM/F12 (1:1) suplementado con suero fetal bovino (ATCC®) al 20% (Gibco®, Grand Island, NY, EUA) y Antibiótico/Antimicótico

1% y se incubó por 18 h. Posterior a la incubación las células fueron lavadas dos veces con 250 μ L de buffer salino de fosfatos (PBS) 1X. El PBS 1X fue decantado y la células fueron fijadas con formalina neutra al 10% (Sigma-Aldrich®) por 15 min. Las células fijadas fueron lavadas dos veces con 250 μ L PBS 1X y posteriormente se añadió en cada pozo 250 μ L de bloqueador de proteínas (GeneTex™) por 10 min. A continuación las laminillas fueron lavadas dos veces con PBS-Tween 2% y consecutivamente se decantó este, cada pozo excepto el pozo control contenía sobre su superficie 150 μ L de anticuerpo primario BIK (ABCAM®), en una dilución 1:150 en TBS-Tween 2% y se incubó por 1 h. Después de haber transcurrido el tiempo de incubación, se lavaron los pozos de la laminilla tres veces con TBS-Tween 2% por 5 min. Posteriormente, se incubó 1 h con el anticuerpo secundario de conejo 488 nm para BIK y ratón 525 nm para p53, 532 nm para COX4 (Invitrogen®), en una dilución 1:200 en TBS-Tween 2%. Inmediatamente de haber transcurrido el tiempo de incubación, se lavaron los pozos de la laminilla tres veces con TBS-Tween 2% por 10 min. Finalmente, fueron montadas con una solución de montaje y DAPI y observadas en el microscopio de fluorescencia.

7.7 Análisis estadístico

Todos los experimentos fueron realizados por triplicado. Los datos fueron comparados mediante un análisis de varianza de una sola vía (ANOVA) seguido de la prueba Tuckey-Kramer. En todas las pruebas se utilizó un nivel de probabilidad de 0.05 ($p < 0.05$) como criterio mínimo de significancia.

8. RESULTADOS

8.1 Determinación de la presencia de Bik

La presencia de la proteína Bik en las líneas celulares MDA-MB-231 y MCF-7 se determinó por un resultado positivo en el estudio de inmunocitoquímica como se muestra (**Imagen 1**).

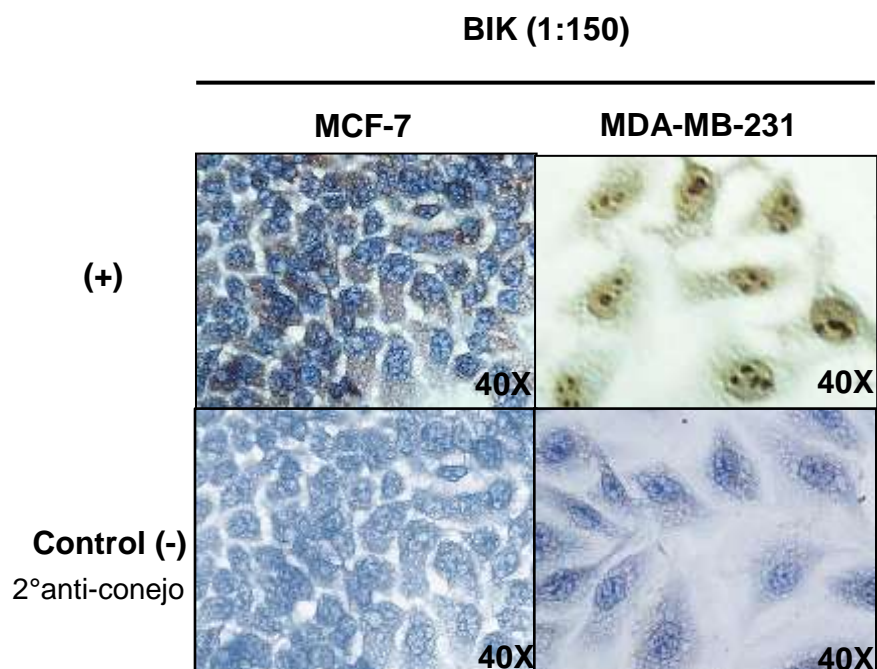


Imagen. 1 Presencia de la proteína Bik en las líneas celulares de cáncer de mama, MCF-7 (panel izquierdo), presencia de Bik en el citoplasma y MDA-MB-231 (panel derecho) presencia de Bik en núcleo y citoplasma.

Después de constatar por inmunocitoquímica la presencia de Bik en las líneas celulares, se trató con H_2O_2 para ver si habían cambios en la expresión la proteína Bik.

8.2 Inducción de la expresión de Bik mediante un reto oxidante

Se realizó una curva de concentraciones de H_2O_2 desde 50 hasta 600 μM durante 2 h en las 2 líneas celulares de cáncer de mama, permitiendo observar cambios en los niveles de expresión de la proteína Bik. En particular, se encontró un incremento de 45% cuando se usó la concentración de 200 μM (Figura 1).

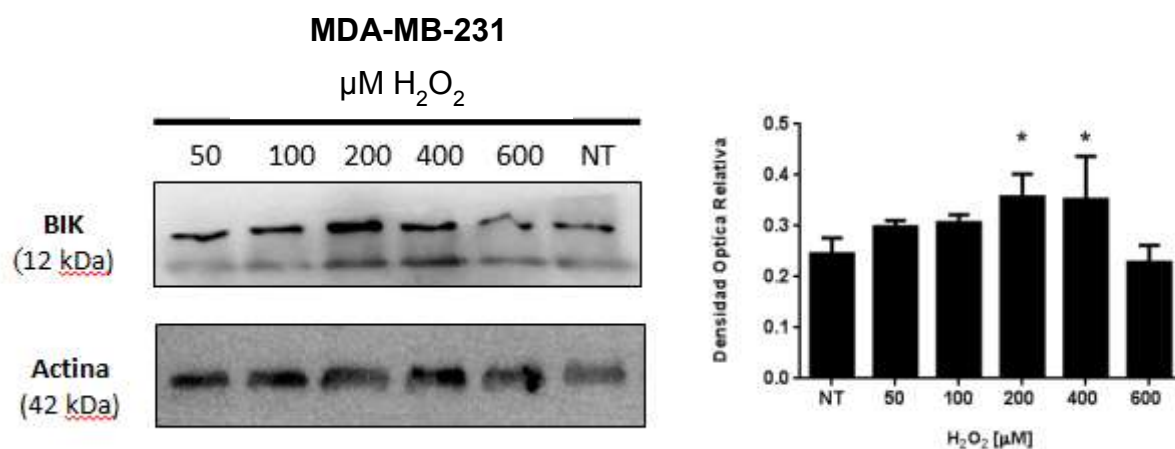


Figura 1. Western blot de la expresión de Bik ante las diferentes concentraciones de H_2O_2 en la línea celular MDA-MB-231. Las concentraciones 200 y 400 μM fueron diferentes estadísticamente. $n=3$ Tukey-Kramer $\pm DE$ *($p < 0.05$).

Ensayos previos en el laboratorio reportaron un cambio en el estado redox en la línea celular MCF-7 cuando fue tratada con 200 μM de H_2O_2 por lo que se corroboró una vez más por western blot **Figura 2**.

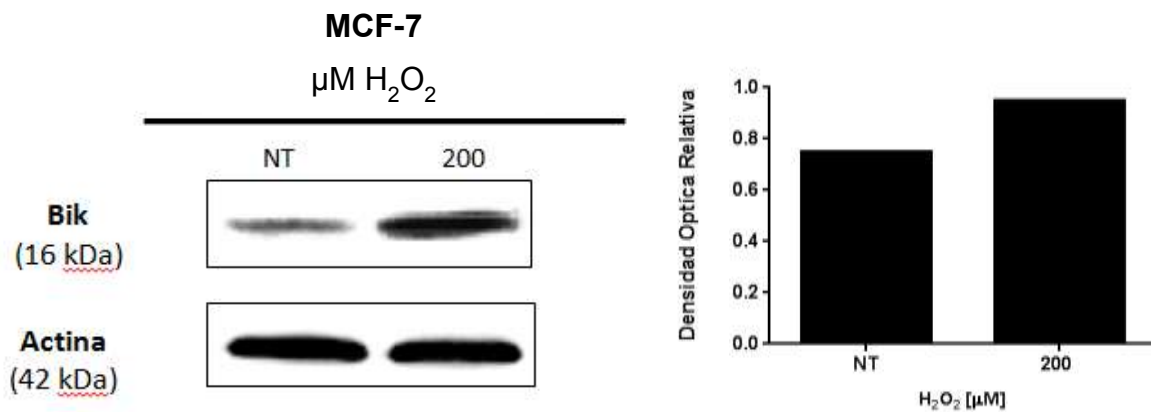
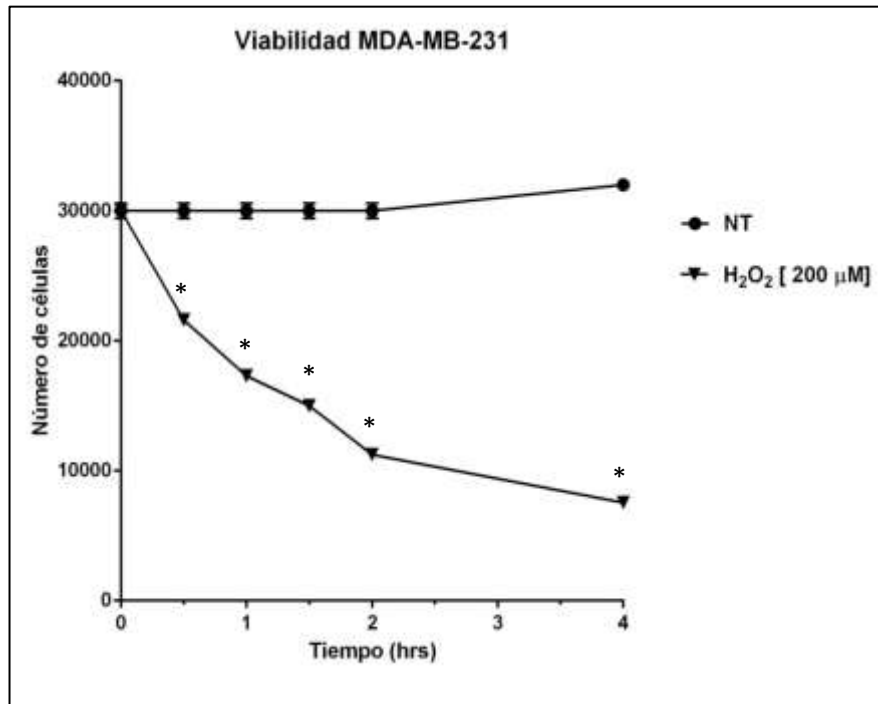


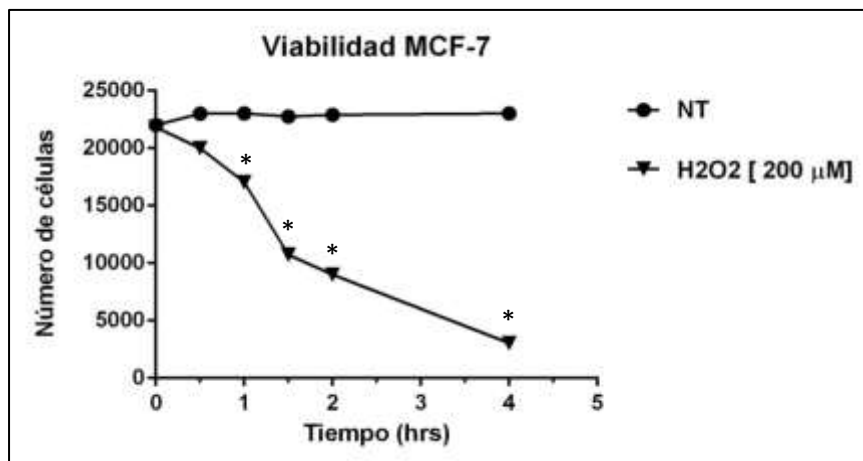
Figura 2. Western blot de la expresión de Bik ante las concentraciones de H_2O_2 200 μM en la línea celular MCF-7. n=1.

8.3 Viabilidad celular posterior al reto oxidante

Para poder evaluar la respuesta ante la exposición de un cambio en el estado redox inducido con H_2O_2 , se determinaron los límites de sobrevivencia de las líneas celulares frente a tratamiento. El primer paso fue incubar a las células con 200 μM de H_2O_2 y evaluar la viabilidad celular a distintos tiempos desde 30 min hasta 4 h. Como se puede observar en las curvas de las gráficas 1 y 2 (**Gráfica 1 y 2**), la viabilidad fue disminuyendo en función del tiempo en ambas líneas celulares.



Grafica 1. Viabilidad de las células MDA-MB-231 en función del tiempo posterior al tratamiento con H₂O₂ concentración 200 μM a 2h. n=3. ANOVA ± EE. *(p< 0.05).



Grafica 2. Viabilidad de las células MCF-7 en función del tiempo posterior al tratamiento con H₂O₂ concentración 200 μM a 2h. n=3. ANOVA ± EE. *(p< 0.05).

8.4 Localización de Bik posterior al reto oxidante

En la línea MDA-MB-231 se observó la presencia de Bik en el núcleo cuando no fue tratada con H₂O₂, sin embargo a partir de los 30 min hasta las 2 h se puede observar la migración de Bik hacia el citoplasma.

Para determinar la movilidad de Bik al citoplasma por una proteína se hizo una co-inmunocolocalización con p53 en la que se observó que a las 2 h posteriores al tratamiento co-inmunocolocalizan, sin embargo se observa una homogénea distribución de p53 en toda la célula. En contraste en la línea MCF-7 se observó una ausencia de Bik en el núcleo en las células no tratadas con H₂O₂, pero a partir de los 30 min hasta las 2 h se puede observar la migración de Bik al núcleo.

MDA-MB-231

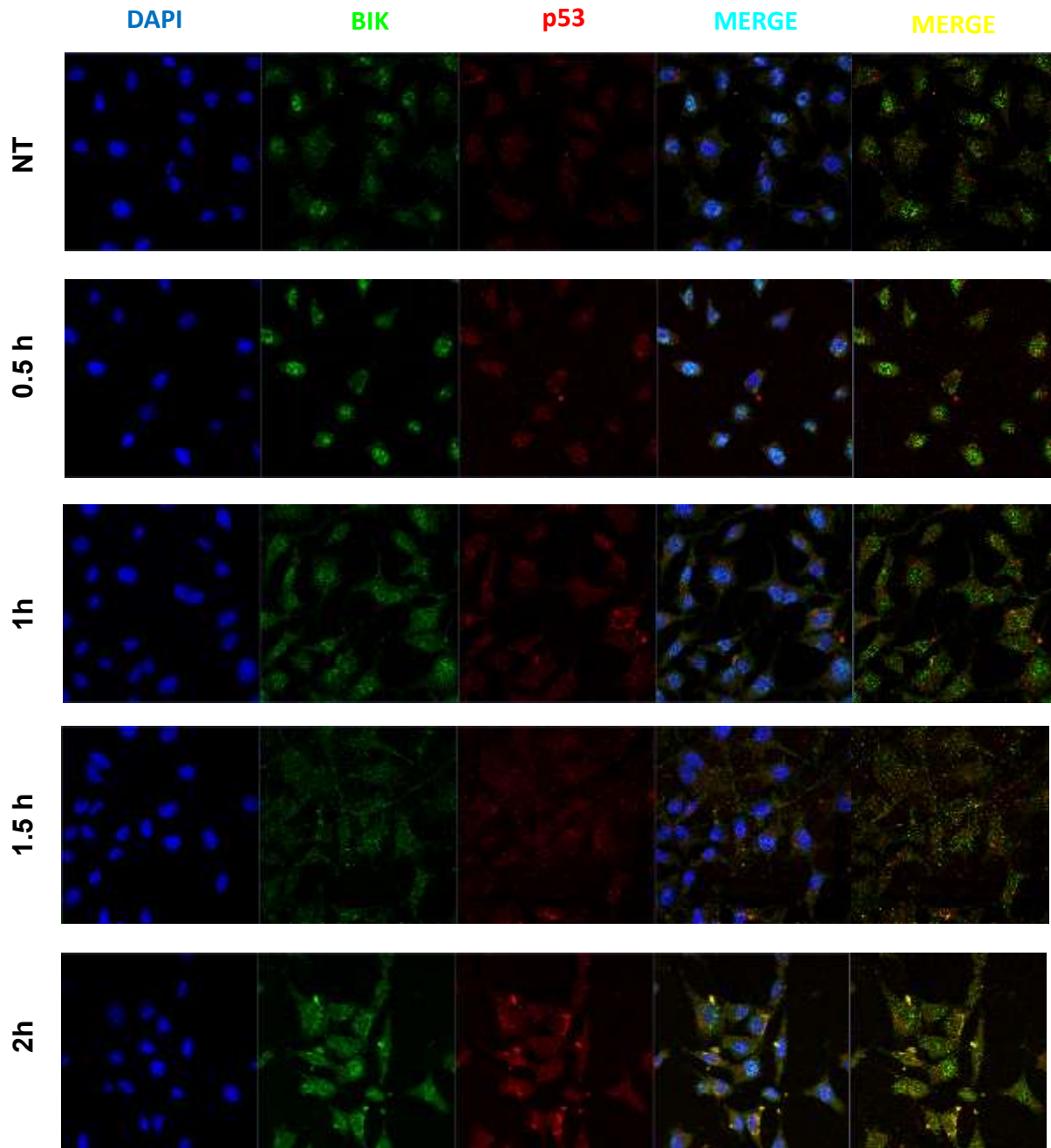


Figura 3. Movilización de Bik del núcleo al citoplasma ante un reto oxidante. Inmunocolocalización de Bik y p53 en la línea celular MDA-MB-231.

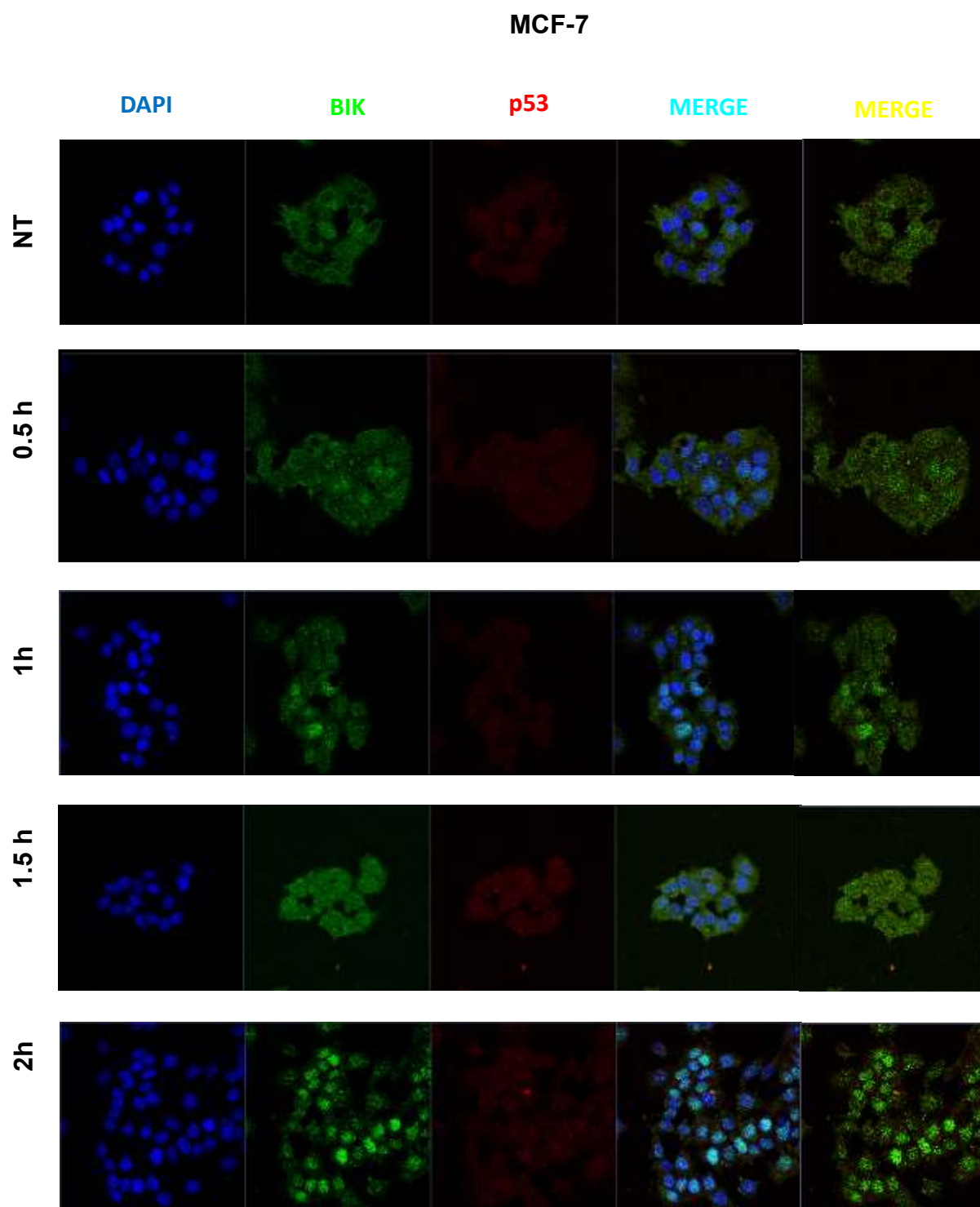


Figura 4. Movilización de Bik del citoplasma al núcleo ante un reto oxidante. Inmunocolocalización de Bik y p53 en la línea MCF-7.

Para obtener datos adicionales de la localización subcelular de Bik en el citoplasma se realizó una inmunocolocalización con COX4 una proteína localizada en la mitocondria que forma parte del complejo 4 de la Citocromo c oxidasa de la cadena respiratoria, para observar si Bik se hallaba en este compartimento subcelular. Hasta el momento se ha reportado la localización de Bik en el RE en humanos y en murinos la proteína homóloga de Bik (Bik) también se localizó en la membrana mitocondrial.

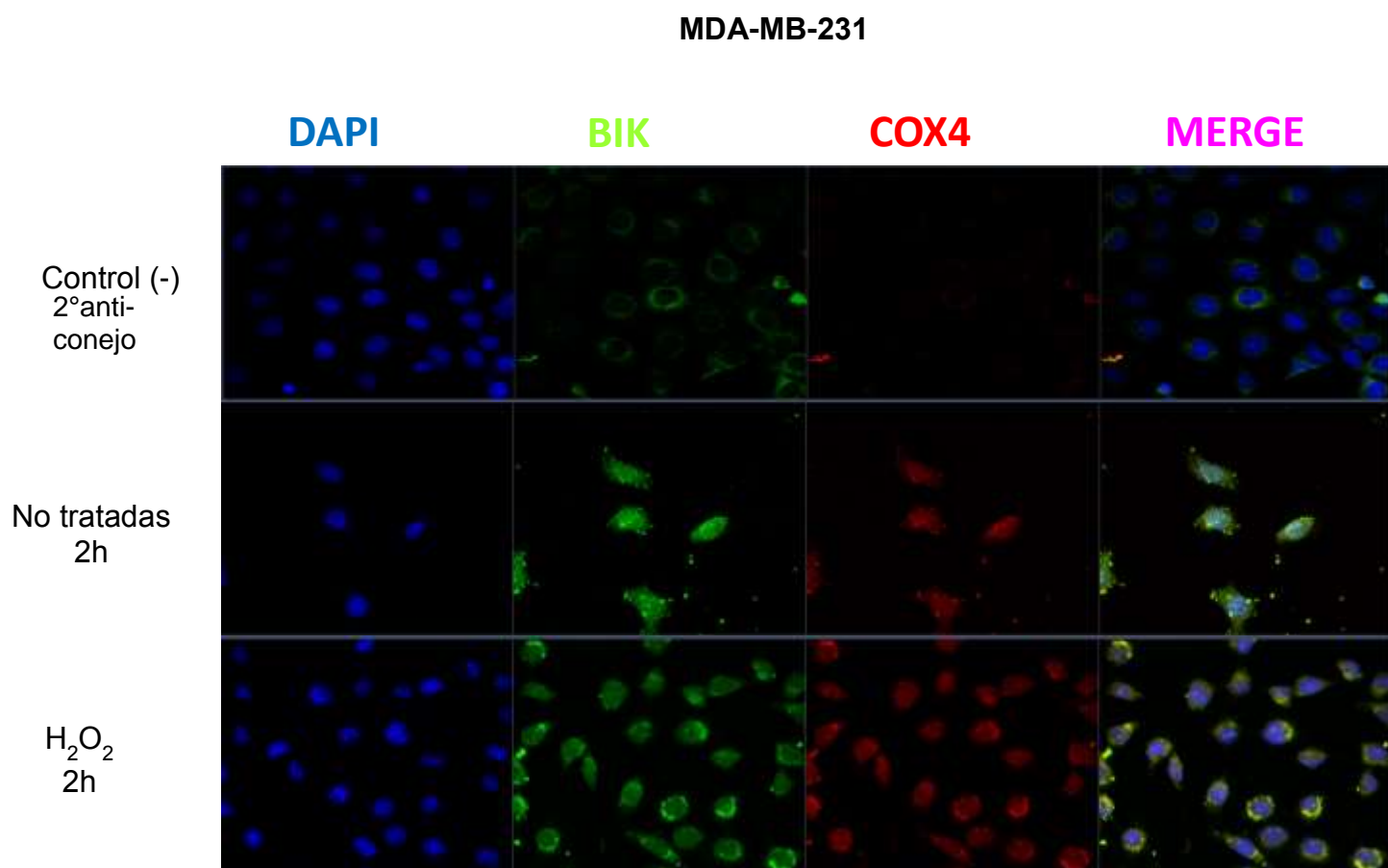


Figura 5. Inmunocolocalización de Bik y Cox 4. Se observa el cambio de localización de Bik del núcleo al citoplasma y particularmente la mitocondria en respuesta al cambio en el estado redox en las células MDA-MB-231.

MCF-7

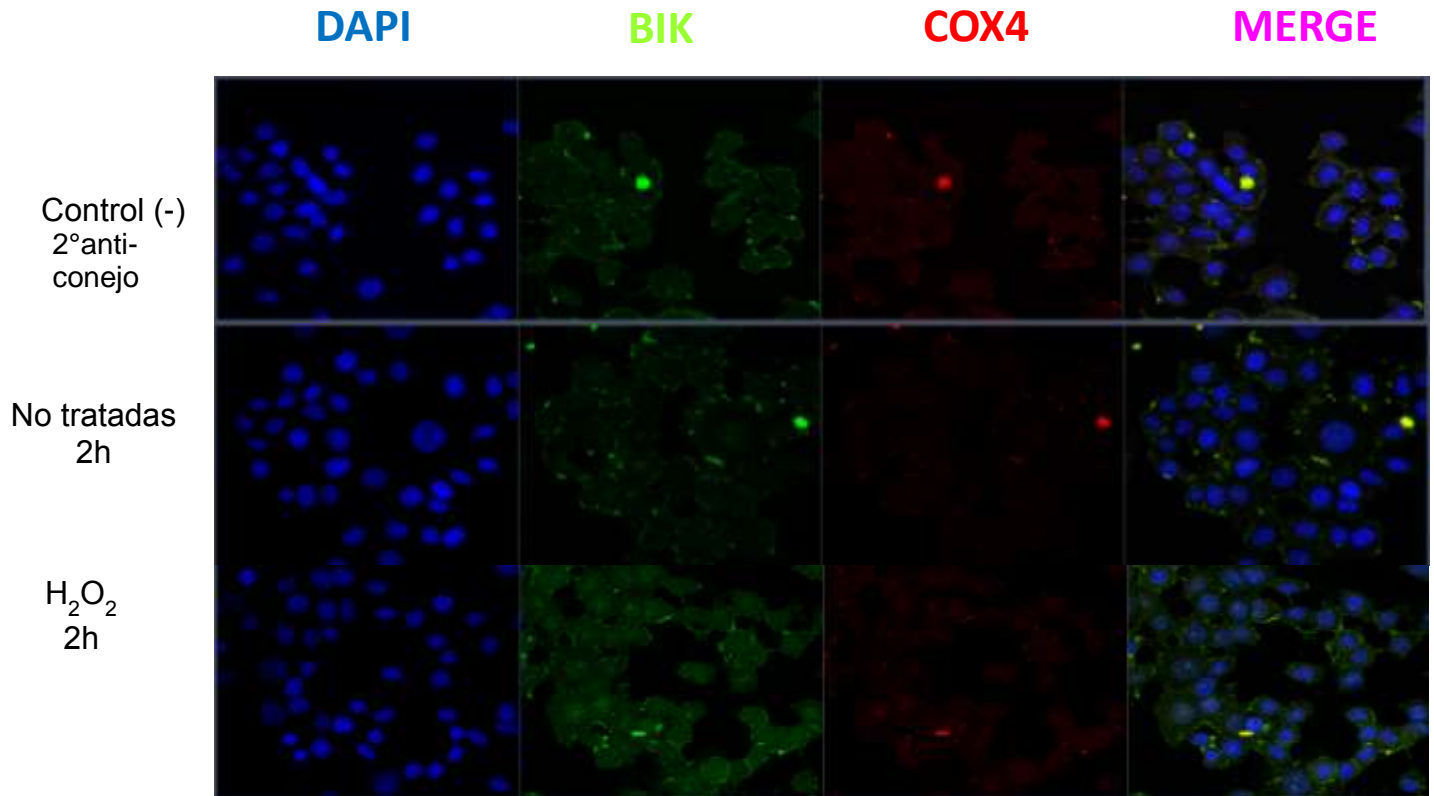


Figura 6. Inmuno-colocalización de Bik y Cox 4. Se observa el cambio de localización de Bik del citoplasma al núcleo y a las mitocondrias en respuesta al cambio en el estado redox en las células MCF-7.

9. DISCUSIÓN

Las ERO que se generan continuamente durante la fisiología normal de las células producen daño al ADN, a las proteínas y a los lípidos. En individuos sanos se pueden detectar bases nitrogenadas alteradas en el ADN, aminoácidos oxidados en las proteínas y peroxidación de lípidos (Marnett y Plastaras, 2001). Sin embargo, ante un estímulo oxidante de baja intensidad las células y los organismos se suelen adaptar y pueden resistir luego frente a condiciones más oxidantes (Luna *et al.*, 2013).

Las respuestas adaptativas ante los estímulos oxidantes pueden modular los mecanismos de biotransformación o bien inducir los mecanismos antioxidantes; también pueden regular las vías transduccionales que inducen la muerte celular (Zentella, 2003). Como se mencionó en la introducción, Mathai y colaboradores reportaron (2002) que el estrés genotóxico puede inducir la transcripción de Bik por medio del factor de transcripción p53, así mismo también se ha reportado la inducción de Bik por el factor embrionario tirotrópico (TEF) como respuesta al estrés oxidante (Ritchie *et al.*, 2009). Con la finalidad de inducir la expresión de Bik mediante un reto oxidante y estudiar su localización subcelular, en este proyecto empleamos concentraciones subletales de H₂O₂ para modificar el estado redox.

Se usaron dos líneas celulares de cáncer de mama MDA-MB-231 y MCF-7, líneas que representan dos tipos de adenocarcinomas mamarios con diferentes grados de agresividad y respuesta a tratamientos. El agente inductor del

cambio en el estado redox fue elegido por su fácil manipulación además de su uso reportado en diversos artículos (Tan *et al.*, 2014; Katsube *et al.*, 2014; Keyse y Terrel, 1987). Existen señales dentro de la célula que dependen de la concentración del H₂O₂, a concentraciones nanomolares (10⁻⁹) 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 *et al.*, 2010)

La concentración de H₂O₂ ocupada para inducir el cambio dependió de la expresión proteica de Bik y viabilidad celular de cada línea ante cada concentración. Por lo que la decisión de tratar a las células con H₂O₂-200μM se tomó con base en dos observaciones, la primera, que la concentración utilizada generará una señal de estrés para inducir una respuesta adaptativa y la expresión de proteínas pro-apoptóticas como Bik y la segunda, que las células sobrevivieran para llevar a cabo los ensayos experimentales. Nuestros resultados mostraron una mayor expresión de la proteína Bik en las células tratadas con H₂O₂-200μM en comparación con las células no tratadas, lo que coincide con lo reportado en la literatura previamente (Burdon, 1995; Wiese *et al.*, 1995; Pickering *et al.*, 2012).

El tiempo de incubación fue elegido con base en estudios previos en el laboratorio que demuestran que 2 h es tiempo suficiente para generar un cambio en el estado redox y un aumento de la expresión de proteínas pro-apoptóticas (Luna *et al.*, 2010) ya que las respuestas que se pueden presentar están condicionadas a la intensidad y al tiempo de duración del estímulo.

Las curvas de viabilidad de las líneas celulares MDA-MB-231 y MCF-7 después del tratamiento con H₂O₂ muestran una disminución de la viabilidad estadísticamente significativa ($p < 0.05$), con respecto al dato del tiempo anterior de cada gráfica y con respecto a las células no tratadas. Estos datos coinciden con el aumento en la expresión de Bik, lo que podría explicar la disminución de la viabilidad ya que Bik a su vez induce la muerte celular a través de la vía intrínseca o al unirse con proteínas antiapoptóticas como Bcl-2 y Bcl-xL, evitando así que estas recluten a proteínas pro-apoptóticas como Bax y Bak u otras complejos proteicos como Apaf-1 y permitan la sobrevivencia de las líneas celulares **Figura 1** (Tong *et al.*, 2001; Chinnayan *et al.*, 1997).

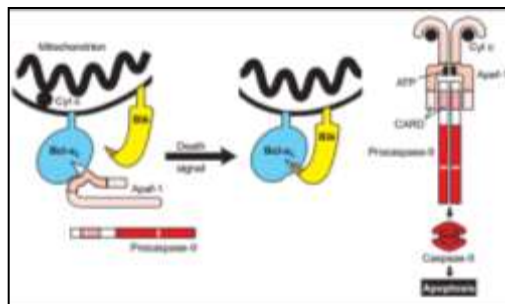


Figura 1. Regulación de Apaf-1 por Bcl-xL, Bik puede unirse Apaf-1 y prevenir la activación de la procaspasa 9. Imagen tomada de Adams y Cory, 1998.

Sin embargo, a pesar de que la viabilidad celular de las líneas va disminuyendo en función del tiempo y esto se correlaciona con el aumento de expresión de Bik, existe un número considerable de células que sobreviven a los cambios en el estado redox, existen razones reportadas que pueden explicar esta situación, la primera de ellas es que Bcl-2 aumenta su expresión cuando hay cambios subletales en el estado oxidado (Luna *et al.*, 2010) y entre las funciones conocidas de Bcl-2, se encuentra la protección contra el estrés oxidante. Se ha demostrado que esta proteína tiene la capacidad de activar mecanismos antioxidantes que contrarrestan los niveles de especies reactivas de oxígeno y disminuyen la lipoperoxidación (Hockenbery *et al.*, 1993). De manera interesante, también se ha reportado que la sobreexpresión de la proteína Bcl-2 puede promover la presencia de las enzimas de reparación del ADN, tales como la endonucleasa apurínica/apirimidínica. Esto implica que las células que sobreexpresan Bcl-2 podrían sobrevivir más tiempo con un incremento en la capacidad de reparación del daño al ADN (Deng *et al.*, 1999). Pero también se ha visto que se activa el factor de transcripción Nrf2 aumentando enzimas antioxidantes como GST y γ -GCS (López *et al.*, 2010). Asimismo, miembros de la familia Bcl-2 pueden regular mutuamente su expresión. Pares como Mcl/Bim y Bcl-2/Bim, apoyan esta propuesta (Jorgensen *et al.*, 2007; Toumi *et al.*, 2007). La sobreexpresión de Bcl-2, induce una acumulación de Bik y por otra parte el silenciamiento de Bcl-2 hace que disminuye la expresión de Bik, lo que sugiere un efecto directo de Bcl-2 en la expresión de Bik en células de mieloma múltiple y células epiteliales orales (Mathai *et al.*, 2002; Bodet *et al.*, 2010, se puede

teorizar que de esta manera las líneas celulares que resisten al cambio en el estado redox aún con el aumento de expresión de Bik pueden sobrevivir por medio de la posible participación de Bcl-2.

Otro mecanismo para la sobrevivencia de las líneas celulares puede ser vía RE. El RE es un organelo con múltiples funciones como el almacenamiento de calcio (Ca^{+2}) y el procesamiento y plegamiento de proteínas de membrana y de secreción. Cambios en el estado redox generan problemas en el plegamiento de las proteínas del RE haciendo que se acumulen proteínas mal plegadas. Este fenómeno es denominado “estrés del retículo” y puede conducir a la muerte por apoptosis. Para contrarrestar este fenómeno la célula activa una compleja señalización conocida como respuesta a proteínas mal plegadas (UPR) (Hetz y Glimcher, 2007). La proteína reguladora de la glucosa GRP78 también conocida como Bip es la mayor chaperona molecular en el RE. GRP78 es una proteína multifuncional con propiedades anti-apoptóticas, es clave en la sobrevivencia ante la UPR, es un componente que se puede cuantificar para medir el estrés en el RE. En el cáncer de mama los niveles de GRP78 son muy altos y se correlacionan con la malignidad y la metástasis así como la resistencia a la terapia farmacológica (Lee, 2001; Hendershot, 2004; Little *et al.*, 1994; Kaufman, 2002; Rutkowski *et al.*, 2006; Gazit *et al.*, 1999; Li y Lee, 2006; Fu y Le, 2006; Fernandez *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2006). GRP78 es sobreexpresado en cáncer de mama maligno y se encuentra asociado con la resistencia a la quimioterapia. GRP78, pero no otras chaperonas, forman un complejo con Bik. La sobreexpresión de GRP78 inhibe a Bik formar una unión

en líneas celulares de cáncer de mama como MCF-7/BUS una variante de MCF-7 que es muy dependiente del estrógeno para su proliferación y sobrevivencia (Fu *et al.*, 2007).

Por ello, aunque nuestros resultados muestran una disminución de la viabilidad, estas son las posibles razones de como las células sobrevivieron después del tratamiento con H₂O₂ y el aumento de Bik.

Kauffman y sus colaboradores reportaron el aumento de Bcl-2 a nivel nuclear debido al aumento del estrés oxidante en ratas viejas. Además se encontró que esta localización subcelular falla en proteger a las células de la apoptosis inducida por estrés oxidante (Kauffman *et al.*, 2001, 2002, 2003). Con el objetivo de describir si otras proteínas de la familia Bcl-2 cambian de localización subcelular dependiendo del cambio en el estado redox y debido a la resistencia de todas las células a morir por apoptosis a pesar de la expresión de Bik, se decidió evaluar su localización subcelular.

Por inmunofluorescencia se evaluó la localización de Bik 2 h después del tratamiento con H₂O₂-200 µM. En la línea MDA-MB-231 se observó la presencia de Bik en el núcleo cuando no fue tratada con H₂O₂, sin embargo a partir de los 30 min hasta las 2 h se puede observar la migración de Bik hacia el citoplasma.

Lo primero que se trató de contestar es si la expresión de p53 se correlacionaba con la expresión y la localización de Bik, sin embargo, no se encontró una correlación entre los niveles de expresión de p53 y Bik, ya que aparentemente p53 aparece constante y homogéneamente en la célula a lo largo del tratamiento con peróxido de hidrógeno. Hur y colaboradores en el

2006 reportaron que la expresión de Bik en células de cáncer de mama no es regulada a nivel transcripcional por p53 y que la degradación se da por el proteosoma. De igual manera no hay reportes en MDA-MB-231 que correlacionen la expresión de p53 y Bik, ya que esta proteína al estar mutada en esta línea celular pierde la afinidad por los promotores de algunos de sus genes blanco como el de Bik (Oshiro, 2003).

Sin embargo es muy importante mencionar que en la línea MDA-MB-231 se encontró expresión de Bik en el núcleo y posterior al tratamiento con H₂O₂ la proteína se movilizó al citoplasma. En contraste en la línea MCF-7 se observó la ausencia de Bik en el núcleo cuando no fue tratada con H₂O₂ pero si se encontró en el citoplasma, sin embargo a partir de los 30 min hasta las 2 h se puede observar la migración de Bik al núcleo. El motivo de porque Bik puede estar localizado en el núcleo no es claro, sin embargo, en la literatura se ha descrito la presencia de miembros de la familia Bcl-2 en el núcleo.

La familia proteínas Bcl-2 está compuesta por miembros que se cree generalmente predominan en el citoplasma y están asociado a la membrana. Al igual que Bcl-2, muchos miembros de la familia Bcl-2 contienen un dominio de trans-membranal C-terminal. Existen algunas investigaciones que tienen como objetivo evaluar el papel funcional de su localización en las membranas externas de las mitocondrias, el retículo endoplasmático, y la membrana perinuclear. Sin embargo, por microscopía confocal de fluorescencia en células de cáncer de mama (MCF-7) y células de cáncer de colon de rata inmunoteñidas con anticuerpos comerciales para Bax y Bcl- 2 se reveló que

estas proteínas no están sólo presentes en el citoplasma celular, sino también dentro de los núcleos en interfase. Lo cual fue confirmado por western blot de núcleos aislados por los mismos autores (Lu *et al.*, 1994). En las células humanas, se encontró solo a la proteína Bcl-2 y no a Bax, asociada a la cromatina en fase mitótica. Estos datos parecen ser una creciente evidencia de lo importante que es la comprensión del papel de la familia Bcl-2 en el interior del núcleo (Lu *et al.*, 1994; Hoetelmans *et al.*, 2000).

Además se ha reportado que la sobreexpresión transitoria de Bcl-2 localizada en el núcleo puede inducir la apoptosis, lo cual contrasta con su función anti-apoptótica, pero se cree que la razón de esta función se relaciona con su localización subcelular (Portier y Tagliatela, 2006). Por ello parece ser tan importante el hallazgo del cambio en la localización subcelular de Bik en las líneas celulares, lo más importante de responder en un futuro es si estas diferencias en la localización de Bik entre las líneas se encuentran relacionadas con su grado de agresividad.

Por otro lado el principal argumento que explicaría la posible razón del cambio de localización de Bik del núcleo al citoplasma en la línea MCF-7 para cumplir su función pro-apoptótica en respuesta al reto oxidante.

En la línea MCF-7 la transfección con la forma murina de Bik se inmunocolocalizó 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), además varios de los miembros de la familia Bcl-2

como Bcl-2 y Bcl-xL cuentan con un dominio transmembranal que les permite la unión a diferentes membranas y ya que la secuencia de este dominio es altamente homologa entre los miembros de esta familia es posible que por medio de este sea que Bik se una a la membrana mitocondrial.

Por lo que, con base en los resultados obtenidos en este proyecto, se postulan dos cosas, la primera es que la inducción de un reto oxidante de las líneas celulares MDA-MB-231 y MCF-7 genera un aumento en los niveles de Bik, y segunda, el cambio en el estado oxidado celular de las líneas genera un cambio en la localización de Bik dependiendo de la línea celular a la que se le trate y esto podría ser relacionado con su nivel de agresividad y su función.

10. CONCLUSIÓN

- Los niveles de la proteína Bik aumentan ante un reto oxidante.
- En la línea MDA-MB-231 la proteína Bik se localiza en la mitocondria en respuesta a un reto oxidante.
- En la línea MCF-7 Bik se localiza en el núcleo en respuesta a un reto oxidante.

11. REFERENCIAS

- Adrain C. y Martin S. 2001. The mitochondrial apoptosome: a killer unleashed by the cytochrome seas. *Trends Biochem. Sci.* 26, 390–397.
- Afonso N. y Bouwman D. 2008. Lobular carcinoma in situ. *Eur Cancer Prev.* 17(4): 312–316.
- Ariazi E., Ariazi J., Cordera F. y Jordan V. 2006. Estrogen receptors as therapeutic targets in breast cáncer. *Curr Top Med Chem.* 6(3):181-202.
- Betteredge D. 2000. What is oxidative stress? *Metabolism.* 49(2 Suppl 1):3-8.
- Blackwood M. y Weber B. 1998. BRCA1 and BRCA2: from molecular genetics to clinical medicine. *J Clin Oncol.*16(5):1969-77.
- Blatt N., Boitano A., Lyssiotis C., Opiari Jr A. y 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. y 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.* 103(12):1808-14.
- Boveris A., Repetto M., Boveris A. y Valdez L. 2008. Determinación del estrés oxidativo en seres humanos en situaciones clínicas. En:

Königsberg M, ed. Radicales libres y estrés oxidativo. Aplicaciones médicas. El manual moderno. 1ª ed. México: 2008. p. 319-28.

- Burdon R. 1995. Superoxide and hydrogen peroxide in relation to mammalian cell proliferation. *Free Radic Biol Med.* 18:775-94.
- Boyd J., Malstrom S., Venkatesh L., Schaeper U., Elangovan B., D`Sa-Eipper C. y Chinnadurai G. 1994. Adenovirus E1B 19 kDa and Bcl-2 proteins interact with a common set of cellular proteins. *Cell.* 79(2):341–351.
- Cañas P. 1999. The role of xanthine oxidase and effects of antioxidants in ischemia reperfusion cell injury. *Acta Physiol Pharmacol Ther Latinoam.* 49(1):13-20.
- Chinnadurai G., Vijayalingam S. y 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.
- Chinnaiyan A. 1991. The apoptosome: heart and soul of the cell death machine. *Neoplasia.* 5–15.
- Chittenden T., Flemington C., Houghton AB., Ebb RG., Gallo GJ., Elangovan B., Chinnadurai G. y 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.
- Cleator S., Ahamed E., Coombes R. y Palmieri C. 2009. A update on the treatment of patients with hormone receptor-positive breast cancer. *Clin Breast Cancer.* Suppl 1:S6-S17.
- Cory S. y Adams J. 2001. Life-or-death decisions by the Bcl-2 protein family. *Trends Biochem Sci.* 26(1):61-6.
- Cory S. y Adams J. 2002. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer.* 2:647–56.
- Cotter T. 2009. Apoptosis and cancer: the genesis of a research field. *Nat Rev Cancer.* 9(7):501–507.

- Creagh E., Conroy H. y Martin S. 2003 Caspase-activation pathways in apoptosis and immunity. *Immunol. Rev.* 193, 10–21.
- Cummings M., Winterford C. y Walker N. 1997. Apoptosis. *The Am J Surg Pathol.* 21(1):88–101.
- Daniel P., Pun K., Ritschel S., Sturm I., Holler J., Doörken B., Brown R. 1999. Expression of the death gene Bik/Nbk promotes sensitivity to druginduced apoptosis in corticosteroid-resistant T-cell lymphoma and prevents tumor growth in severe combined immunodeficient mice. *Blood* 94: 1100–1107.
- Deal F. 1995. Agios, energy and stress in reu redegenerativo diseases. *Ana Neurol.* 38: 357-66.
- De Duve C. y Baudhuin P. 1969. Peroxisomes microbodies and related particles. *Physiol Rev.* 46:323–357.
- DeLeve L. y Kaplowitz N. 1991. Gluthatione metabolism and its role in hepatotoxicity. *Pharmacol Ther.* 52:287-305.
- Deng Y., Lin C., Zheng J., Liang X., Chen J., Fu M., Xiao P. y Wu M. 1999. Mechanisms of arsenic trioxide induced apoptosis of human cervical cancer HeLa cells and protection by Bcl-2. *Sci China C Life Sci.* 42(6):635-43.
- Dunnwald L., Rossing M. y Li Cl. 2007. Hormone receptor status, tumor characteristics, and prognosis: a prospective cohort of breast cancer patients. *Breast Cancer Research.* 9(1):R6.
- Elangovan B. y Chinnadurai G. 1997. Functional dissection of the proapoptotic protein Bik. Heterodimerization with anti-apoptosis proteins is insufficient for induction of cell death. *J Biol Chem.* 272(39):24494–24498.
- Ferlay J., Shin HR., Bray F., Forman D., Mathers C. y Parkin DM. GLOBOCAN 2008 v2.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No.10 Lyon, France: International Agency for Research on

Cancer. 2010. Disponible en: <http://globocan.iarc.fr>, acceso el día 4/Febrero/2013.

- Freeman B. y Crapo J. 1982. Biology of diseases: free radicals and tissue injury. *Lab Invest.* 47(5):412-26
- Forman H. y Kennedy J. 1974. Role of superoxide radical in mitochondrial dehydrogenase reactions. *Biochem Biophys Res Commun.* 60:1044–1050.
- Foulkes W. 2006. BRCA1 and BRCA2: chemosensitivity, treatment outcomes and prognosis. *Fam Cancer.* 5(2):135-42.
- Fridovich J. 1975. Superoxidedismutases. *Ann Rev Biochem.* 44: 147-59.
- Fu Y., Li J. y Lee A. 2007. GRP78/BiP inhibits endoplasmic reticulum BIK and protects human breast cancer cells against estrogen starvation-induced apoptosis. *Cancer Res.* 67(8):3734-40.
- Germain M., Mathai J., McBride H. y Shore G. 2005. Endoplasmic reticulum BIK initiates DRP1-regulated remodelling of mitochondrial cristae during apoptosis. *EMBO J.* 24(8):1546–1556.
- González M. y Morera P. 2001. Oxidación celular y fármacos mucoactivos antioxidantes. *ArchBronconeumol.* 37: 407 –410.
- Halliwell B. y Gutteridge J. 1999. Free radicals in biology and medicine (3rd ed.) Oxford University Press.
- Han J., Sabbatini P. y White E. 1996. Induction of apoptosis by human Nbk/Bik, a BH3-containing protein that interacts with E1B 19K. *Mol Cell Biol.* 16(10):5857-64.
- Hanada M., Aimé C., Sato T. y Reed J. 1995. Structure-function analysis of Bcl-2 protein. Identification of conserved domains important for homodimerization with Bcl-2 and heterodimerization with Bax. *J Biol Chem.* 19;270(20):11962-9.

- Hansberg W.: Biología de las Especies de Oxígeno Reactivas, en: el Mensaje Bioquímico, Editado por el Depto. De Bioquímica. Fac. Medicina, UNAM. México. Vol XXVI: 19-54.
- Hegde R., Srinivasula S., Ahmad M., Fernandes-Alnemri T. y Alnemri E. 1998. Bcl-2, 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 B., Ross R. y Pike M. 1993. Hormonal chemoprevention of cancer in women. *Science.* 259(5095):633–638.
- Hermes M.: Oxidative stress and Medical Sciences, en Functional Metabolism: Regulation and Adaptation, editado por Kenneth B. Storey. 1st ed. E.U.A. John Wiley & Sons, Inc. 2004. Capítulo 13: 369-382.
- Hetz C. y Glimcher L. 2008. The daily job of night killers: alternative roles of the BCL-2 family in organelle physiology. *Trends Cell Biol.* 18(1):38-44.
- Hidalgo A. y Jiménez G. 2009. Bases genómicas del cáncer de mama: avances hacia la medicina personalizada. *Salud Publica Mex;* 51 supl 2:S197-S207.
- Hill M., Adrain C., Duriez P., Creagh E. y Martin S. 2004. Analysis of the composition, assembly kinetics and activity of native Apaf-1 apoptosomes. *Embo J.* 23:2134–45.
- Hoetelmans R., van Slooten H., Keijzer R., Erkeland S., van de Velde C. y Dierendonck J. 2000. Bcl-2 and Bax proteins are present in interphase nuclei of mammalian cells. *Cell Death Differ.* 7(4):384-92.
- Hockenbery D., Oltvai Z., Yin X., Milliman C., Korsmeyer S. 1993. Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. *Cell.* 75(2):241-51
- IDC. Invasive Ductal Carcinoma. 2012. Disponible en: <http://www.breastcancer.org/symptoms/types/idc>, acceso el día 21/Marzo/2013.
- Igney F. y Krammer P. 2002 Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nat Rev Cancer.* 2:277–88.

- Jimenez I., Speisky C. y Noran C. 2000. Radicales libres y antioxidantes en la prevención de enfermedades: II mecanismo de defensa antioxidantes. *ReuChilNut.* 27 (2): 210-9.
- Johnson C., Ge X., Green K. y Liu X. 2000. Selenium distribution in the local environment of selected villages of the Keshan Disease belt, Zhangjiakou District, Hebei Province, People Republic of China. *Appl. Geochem.* 15: 385-401.
- Jorgensen TN., McKee A., Wang M., Kushnir E., White J., Refaeli Y, Kappler JW. y Marrack P. 2007. Bim and Bcl-2 mutually affect the expression of the other in T cells. *J Immunol.* 179(6):3417-24.
- Katsube T., Mori M., Tsuji H., Shiomi T., Wang B., Liu Q., Neno M. y 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.* 2014 April 27.
- Kelekar A. y Thompson C .1998. Bcl-2-family proteins: the role of the BH3 domain in apoptosis. *Trends Cell Biol.* 1998 Aug;8(8):324-30.
- Keyse SM. y Tyrrell RM. 1987. Both near ultraviolet radiation and the oxidizing agent hydrogen peroxide induce a 32-kDa stress protein in normal human skin fibroblasts. *J Biol Chem.* 262(30):14821-5.
- Konigsberg M.: Radicales libres y estrés oxidativo. Aplicaciones médicas, México: El Manual Moderno México, 2007.
- Lademann J., Patzelt A., Schanzer S., Richter H., Meinke MC., Sterry W.,. 2011. Uptake of antioxidants by natural nutrition and supplementation: pros and cons from the dermatological point of view. *Skin Pharmacol Physiol.* 24 (5): 269-73.
- Lambeth JD. 2002 Nox/Duox family of nicotinamide adenine dinucleotide (phosphate) oxidases. *Curr Opin Hematol.* 9:11–17..
- 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

- Locksley R., Killeen N., y Lenardo M. 2001. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell*. 104:487–501.
- Loschen G., Azzi A., Richter C. y Flohe L. 1974. Superoxide radicals as precursors of mitochondrial hydrogen peroxide. *FEBS Lett*. 42:68
- Lu QL., Hanby AM., Nasser Hajibagheri MA., Gschmeissner SE., Lu PJ., Taylor-Papadimitriou J., Krajewski S., Reed JC. y Wright NA. 1994. Bcl-2 protein localizes to the chromosomes of mitotic nuclei and is correlated with the cell cycle in cultured epithelial cell lines. *J Cell Sci*. 107 (Pt 2):363-71.
- Luna-López A., Triana-Martínez F., López-Diazguerrero NE. 2010. Bcl-2 sustains hormetic response by inducing Nrf-2 nuclear translocation in L929 mouse fibroblasts. *Free Radic Biol Med*. 49:1192-204.
- Marnett LJ, Plastaras JP. 2001. Endogenous DNA damage and mutation. *Trends Genet*. 17(4):214-21.
- Martinvalet D., Zhu P. y Lieberman J. 2005. Granzyme A induces caspase- independent mitochondrial damage, a required first step for apoptosis. *Immunity*. 22:355–70.
- Mathai, J., Germain, M., Marcellus, R. y Shore, G. 2002. Induction and endoplasmic reticulum location of BIK/NBK in response to apoptotic signaling by E1A and p53. *Oncogene*. 21, 2534-2544.
- Massey V., Strickland S., Mayhew S., Howell L., Engel P., Matthews R., Schulman M. y 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.
- Montero E. 1996. Los radicales libres y las defensas antioxidantes. *An FacMed*. 57 (4):278- 81.
- McCord J. y 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.

- Montero E. 1996. Los radicales libres y las defensas antioxidantes. *An FacMed.* 57 (4):278- 81.
- Nicholson, D. 1999. Caspase structure, proteolytic substrates and function during apoptotic death. *Cell Death Differ.* 6, 1028–1042.
- Oltavai Z., Milliman C. y Korsmeyer S. 1993. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell.* 27;74(4):609-19
- Organización Mundial de la Salud. 2014. Cancer. Nota descriptiva N°287.
- Oshiro MM., Watts GS., Wozniak RJ., Junk DJ., Munoz-Rodriguez JL., Domann FE., Futscher BW. Mutant p53 and aberrant cytosine methylation cooperate to silence gene expression. *Oncogene.* (23):3624-34 2003.
- Palmieri C., Cheng G., Saji S., Zelada M., Wärrri A. , Weihua Z., Van Noorden S., Wahlstrom T., Coombes R., Warner M. y Gustafsson J. 2002. Estrogen receptor beta in breast cancer. *EndocrRelat Cancer.*9(1):1-13.
- Pan, K. O’Rourke, V. M. Dixit, J. Biol. Chem. 273, 5841 1998); Y. Hu, M. A. Benedict, D. Wu, N. Inohara, G. Nuñez, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 95, 4386.
- Parker L. 1994. Vitamina E is nature’s master antioxidant. *Scienceand Medicine.* 1: 54-63.
- Peto J., Collins N., Barfoot R., Seal S., Warren W., Rahman N., Easton DF., Evans C., Deacon J. y 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. Nrf2-dependent induction of proteasome and Pa28 alpha-beta regulator are

required for adaptation to oxidative stress. *J Biol Chem.* 2012;287:10021-31.

- Poderoso J., Boveris A. y Cadenas E. 2000. Mitochondrial oxidative stress: a self-propagating process with implications for signaling cascades. *Biofactors.* 11:43-5.
- Portier BP, Taglialatela G. 2006. Bcl-2 localized at the nuclear compartment induces apoptosis after transient overexpression. *J Biol Chem.* ;281(52):40493-502.
- Reed J. 1998. Bcl-2 family proteins. *Oncogene.* 24;17(25):3225-36.
- Ritchie A., Gutierrez O. y Fernandez-Luna JL. 2009. PAR bZIP-bik is a novel transcriptional pathway that mediates oxidative stress-induced apoptosis in fibroblasts. *Cell Death Differ.* 16: 838–846
- Robbins D. y Zhao Y. 2011. The role of manganese superoxide dismutase in skin cancer. *Enzyme Res.* 1-7.
- Rodríguez C., Rodríguez J., Obregón O., Rodríguez M., Ordaz C. y Acosta J. 1994. Radicales libres: parte I, consideraciones químicas, bioquímicas y fisiopatológicas. *RevCardiol.* 14 (5): 73-84.
- Rodríguez C., Rodríguez J., Obregón O., Rodríguez M., Acosta J., Ordaz C., 1995. Radicales libres: parte II cáncer, diabetes y envejecimiento. *RevCardiol.* 15 (1) 13-9.
- Rutkowski R., Pancewiz S., Rutkowski K. y Rutkowska J. 2007. Reactive oxigena and nitrogen species in inflammatory process. *Pol Merkur Lekarski.* 23 (134):131-6.
- Saelens X., Festjens N., Vande Walle L., Van Gurp M., van Loo G. y Vandenameele P. 2004. Toxic proteins released from mitochondria in cell death. *Oncogene.* 23:2861–74.
- Sakahira H., Enari M. y Nagata S. 1998. Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature.* 391:96–9.

- Szatrowski T. y Nathan C. 1991 Production of large amounts of hydrogen peroxide by human tumor cells. *Cancer Res.* 51:794-798.
- Schroder M. y Kaufman R. 2005. The mammalian unfolded protein response. *Annu Rev Biochem* 74: 739–789
- Sies H. 1991. Oxidative stress from basic research to clinical application. *Am J Med.* 91(Suppl):31-8.
- Stennicke H. y Salvesen G. 1998. Properties of the caspases. *Biochim. Biophys Acta.* 1387, 17–31.
- Stennicke H. Jürgensmeier J., Shin H., Deveraux Q., Wolf B., Yang X., Zhou Q., Ellerby H., Ellerby L., Bredesen D., Green D., Reed J., Froelich C. y Salvesen G. 1998. Pro-caspase-3 is a major physiologic target of caspase-8. *J. Biol. Chem.* 273, 27084–27090.
- Slee E., Adrain C. y Martin S. 2001. Executioner caspase-3, -6, and -7 perform distinct, non-redundant roles during the demolition phase of apoptosis. *J Biol Chem.* 276:7320–6.
- Szegezdi E., Fitzgerald U., Samali A. 2003. Caspase-12 and ER-stress-mediated apoptosis: the story so far. *Ann NY Acad Sci* 1010: 186–194.
- Tan JJ., Azmi SM., Yong YK., Cheah HL., Lim V., Sandai D., Shaharuddin B. 2014. Tualang honey improves human corneal epithelial progenitor cell migration and cellular resistance to oxidative stress in vitro. *PLoS One.* 9(5):e96800.
- Taylor C., Cullen S., y Martin S. 2008. Apoptosis: Controlled demolition at the cellular level. *Nature Reviews Molecular Cell Biology.* 9, 231-241.
- Toyokuni S., Okamoto K., Yodoi J. y Hiai H. 1995. Persistent oxidative stress in cancer. *FEBS Lett.* 358:1-3.
- Toumi S., Trichet V., Gomez-Bougie P., Gratas C., Bataille R. y Amiot M. 2007. Reciprocal protection of Mcl-1 and Bim from ubiquitin-proteasome degradation. *Biochem Biophys Res Commun.* 361(4):865-9.

- Portakal O., Ozkaya O., Erden Inal M., Bozan B., Kosan M., Sayek I. 2000 Coenzyme Q10 concentrations and antioxidant status in tissues of breast cancer patients. *Clin Biochem.* 33:279- 284.
- 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.
- Tong Y., Yang Q., Vater C., Venkatesh L., Custeau D., Chittenden T., Chinnadurai G. y Gourdeau H. 2001. The pro-apoptotic protein, Bik, exhibits potent antitumor activity that is dependent on its BH3 domain. *Mol Cancer Ther.* 1(2):95-102.3(2):160-2.
- Turnes J. Fuentes, Intracelulares de especies oxidantes en condiciones normales y patológicas. *Antioxidantes y calidad de vida.* 1994; 1: 16-19.
- Verma S., Zhao L.J. y Chinnadurai G. Phosphorylation of the Pro-apoptotic Protein BIK. mapping of phosphorylation sites and effect on apoptosis. *J Biol Chem.* 276(7):4671–4676.
- Walsh T., Casadei S., Coats K., Swisher E., Stray S., Higgins J., Roach K., Mandell J., Lee M., Ciernikova S., Foretova L., Soucek P. y King M. 2006. Spectrum of mutations in BRCA1, BRCA2 CHECK2, and TP53 in families at high risk of breast cáncer. *JAMA.* 295(12):1379-88.
- Weinberg, R.A. 1996. How cancer arises. *Scientific American,* 275(3): 62.
- Wiese A., Pacifici R. y Davies K. Transient adaptation of oxidative stress in mammalian cells. *Arch Biochem Biophys.* 318:231-40.
- Yang T., Kozopas K. y Craig R. 1995. The intracellular distribution and pattern of expression of Mcl-1 overlap with, but are not identical to, those of Bcl-2. *J Cell Biol.* 128(6):1173-84.
- Yin X., Oltvai Z., Veis-Novack D., Linette G. y Korsmeyer S. 1994. Bcl-2 gene family and the regulation of programmed cell death. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* ;59:387-93.
- Zentella D., Erika O., Ventura J., López R. e Ibarra M. 2008. Estrés oxidativo y apoptosis En: Konigsber M. ed. Radicales libres y estrés

oxidativo. Aplicaciones médicas. El manual moderno. 1^a ed. México: 2008 p. 477-485.