



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

EFFECTO DEL RESVERATROL EN LA EXPRESIÓN DE LAS BOMBAS DE CALCIO SERCA2b y SERCA3 EN LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER DE MAMA

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

PRESENTA:

IBQ. EDUARDO DE JESÚS IZQUIERDO TORRES

TUTOR PRINCIPAL: DR. ÁNGEL ZARAIN HERZBERG
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR Y ENTIDAD O INSTITUCIÓN DE
ADSCRIPCIÓN

DRA. MARTHA ROBLES FLORES

FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

DRA. MARCELA LIZANO SOBERÓN

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGÍA

MÉXICO, D. F. Febrero de 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

EFFECTO DEL RESVERATROL EN LA EXPRESIÓN DE LAS BOMBAS DE CALCIO SERCA2b y SERCA3 EN LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER DE MAMA

RECONOCIMIENTOS

Esta tesis de maestría se realizó bajo la dirección del Dr. Ángel Zarain Herzberg en el laboratorio de Biología Molecular del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México.

El comité tutorial que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo formado por:

Dr. Ángel Zarain Herzberg	Facultad de Medicina, UNAM
Dra. Martha Robles Flores	Facultad de Medicina, UNAM
Dra. Marcela Lizano Soberón	Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

Se reconoce la asesoría técnica de la Biol. Gabriela Rodríguez Rodríguez por su apoyo en la realización de los experimentos que fundamentan ésta tesis.

El proyecto fue apoyado por el proyecto DGAPA/PAPIIT IN213613. Durante los estudios de maestría gocé de la beca otorgada por CONACyT No. 378652 para la realización de la presente Tesis. Se agradece al Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP) por la beca otorgada para asistir al XXX Congreso Nacional de Bioquímica que se llevó a cabo en Guadalajara, Jalisco del 2 al 8 de noviembre de 2014.

El jurado del examen de maestría estuvo constituido por:

Presidente	Dr. Fernando López Casillas	IFC, UNAM
Vocal	Dra. Rocío Ángeles García Becerra	INCMNSZ
Vocal	Dr. Armando Roberto Tovar Palacio	INCMNSZ
Vocal	Dr. Ernesto Soto Reyes Solís	INCAN
Secretario	Dr. Luis Vaca Domínguez	IFC, UNAM

AGRADECIMIENTOS

A mi familia por su incondicional e infaltable apoyo.

A mi madre por respetar siempre mis decisiones y apoyarme a seguir adelante con mis sueños aunque ello implicara irme lejos de mi hogar.

A mi padre por siempre darme fuerza, ánimos y buenas palabras para seguir adelante.

A mi hermana por siempre estar pendiente y confiar en mí.

A todos aquellos viejos amigos de la infancia y de diversas etapas de mi vida que siempre estuvieron al pendiente de mí y de que nuestra relación no decayera a pesar de la distancia, así como los amigos que encontré en esta nueva etapa de mi vida. Ellos saben quiénes son.

A mis amigos y compañeros de Laboratorio: Lucía Flores, Abigail Guzmán, Lola Hernández, Abril Saint Martin, Rafael Estrada, Jorge Fragoso, Eric Flores.

Personas con quienes aprendí muchísimo y con quienes puedes platicar desde los temas más interesantes hasta lo más banal que puede existir. Mención honorífica para Gabriela Rodríguez por aguantarme y no terminar estrangulándome.

Al Dr. Ángel Zarain por su disposición y apoyo absoluto en todo lo desarrollado con este trabajo.

ÍNDICE	Página
Índice de figuras	II
Índice de tablas	III
Abreviaturas	IV
Resumen	VI
Abstract	VIII
1.- Introducción	1
2.- Antecedentes	2
2.1.- El calcio	2
2.2.- Las bombas SERCA: expresión y genética	6
2.2.1.- El gen <i>ATP2A1</i>	7
2.2.2.- El gen <i>ATP2A2</i>	8
2.2.3.- El gen <i>ATP2A3</i>	9
2.3.- Estructura de las enzimas SERCA	10
2.4.- Mecanismo catalítico de las bombas SERCA	12
2.5.- Las bombas SERCA y el cáncer	14
2.6.- Cáncer de mama	19
2.7.- Fitoestrógenos y cáncer de mama	22
2.7.1.- Resveratrol	26
3.- Planteamiento del problema	30
4.- Hipótesis	30
5.- Objetivo general	31
6.- Objetivos particulares	31
7.- Estrategia experimental	32
8.- Resultados	38
8.1.- Cambios morfológicos en las líneas celulares MCF-7, MCF-10A y MDA-MB-231 después de tratamientos con distintas concentraciones de RSV	38
8.2.- Análisis de viabilidad celular de los tratamientos con RSV en las líneas celulares	43
8.3.- Expresión de mRNA relativa de los marcadores de apoptosis Bcl-2 y BIM; y de proliferación Ki67 en las líneas celulares cancerosas tratadas con 200 μ M de RSV	45
8.4.- Cambios en la proliferación celular producidos por los tratamientos con RSV en las líneas celulares	47
8.5.- Detección de apoptosis producida por los tratamientos con RSV en las líneas celulares	51
8.6.- Expresión de mRNA relativa de SERCA2 y SERCA3 en las líneas celulares tratadas con distintas concentraciones de RSV	53
8.7.- Cambios en el flujo intracelular de Ca^{2+} debido a los tratamientos con RSV en las líneas celulares	55
9.- Discusión	56
10.- Conclusiones	69
11.- Perspectivas	70
12.- Bibliografía	71

ÍNDICE DE FIGURAS	Página
Figura 1. Dinámica y homeostasis de la señalización por Ca^{2+}	3
Figura 2. Mecanismos que regulan la concentración intracelular de Ca^{2+}	5
Figura 3. Generación de múltiples isoformas de SERCA por procesamiento alternativo	7
Figura 4. Estructura de las enzimas SERCA	11
Figura 5. Estructura tridimensional de la bomba SERCA mostrando las conformaciones E1 y E2	11
Figura 6. Esquema de reacción simplificado del ciclo de reacción de las ATPasas de Ca^{2+}	12
Figura 7. Modelo de movilización de Ca^{2+} por la bomba SERCA	14
Figura 8. Mortalidad de cáncer de mama y cervical en México, 1955-2008	20
Figura 9. Múltiples blancos para la acción de los fitoestrógenos	23
Figura 10. Diferentes formas por las cuales los fitoestrógenos pueden alterar la transcripción	25
Figura 11. Estructura de los isómeros cis y trans del RSV	27
Figura 12. Modelo propuesto de cómo el RSV imita la restricción calórica	28
Figura 13. Efectos antiproliferativos del RSV	29
Figura 14. Efecto sobre el número de células en la línea MDA-MB-231 con distintas concentraciones de RSV	39
Figura 15. Efecto sobre el número de células en la línea MCF-7 con distintas concentraciones de RSV	40
Figura 16. Efecto sobre la morfología de las células MCF-10A con distintas concentraciones de RSV	42
Figura 17. Ensayo de viabilidad celular en la línea celular MDA-MB-231 con diferentes concentraciones de RSV	43
Figura 18. Ensayo de viabilidad celular en la línea celular MCF-7 con diferentes concentraciones de RSV	44
Figura 19. Ensayo de viabilidad celular en la línea celular MCF-10A con diferentes concentraciones de RSV	44

Figura 20. Expresión de los genes que codifican para Bcl-2, BIM y Ki67 después de un tratamiento con 200 μ M de RSV en la línea celular MDA-MB-231	46
Figura 21. Expresión de los genes que codifican para Bcl-2, BIM y Ki67 después de un tratamiento con 200 μ M de RSV en la línea celular MCF-7	46
Figura 22. Alteración en la proliferación de las líneas celulares MDA-MB-231, MCF-7 y MCF-10A con distintas concentraciones de RSV por 72 h	47
Figura 23. Actividad de caspasa-3 normalizada en las líneas celulares MCF-10A, MCF-7 y MDA-MB-231 después de un tratamiento por 72 h con RSV	48
Figura 24. Expresión del mRNA de SERCA2b en la línea celular MDA-MB-231 a distintas concentraciones de RSV y distintos tiempos de tratamiento	50
Figura 25. Expresión del mRNA de SERCA3 en la línea celular MDA-MB-231 a distintas concentraciones de RSV y distintos tiempos de tratamiento	50
Figura 26. Expresión del mRNA de SERCA2b en la línea celular MCF-7 a distintas concentraciones de RSV y distintos tiempos de tratamiento	51
Figura 27. Expresión del mRNA de SERCA3 en la línea celular MCF-7 a distintas concentraciones de RSV y distintos tiempos de tratamiento.	51
Figura 28. Expresión del mRNA de SERCA2b en la línea celular MCF-10 con distintas concentraciones de RSV a 72 h	52
Figura 29. Expresión del mRNA de SERCA3 en la línea celular MCF-10 con distintas concentraciones de RSV a 72 h	52
Figura 30. $[Ca^{2+}]$ citosólico basal en las líneas celulares MCF-10A, MCF-7 y MDA-MB-231 tratadas y no tratadas con 50 μ M de RSV por 72 h.	54
Figura 31. Liberación de $[Ca^{2+}]$ inducida por tapsigargina en las líneas celulares MCF-10A, MCF-7 y MDA-MB-231 tratadas y no tratadas con 50 μ M de RSV por 72 h.	54

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Subtipos moleculares de cáncer de mama	21
Tabla 2. Secuencias de los primers utilizados para RT-PCR	34
Tabla 3. Cuantificaciones de Ca^{2+} citosólico y Ca^{2+} liberado del RE en las líneas celulares MCF-10A, MCF-7 y MDA-MB-231	55

ABREVIATURAS

[Ca²⁺]_i: Concentración intracelular de Ca²⁺.

Akt (PKB): Proteína cinasa B.

Asn: Asparagina.

Asp: Ácido aspártico.

ATCC: American Type Culture Collection.

ATP: Trifosfato de adenosina.

ATP21-3: Genes de codifican para las enzimas SERCA1-3 respectivamente.

Bcl-2: β-cell lymphona 2.

CaMKII: Proteína cinasa dependiente de Ca²⁺ calmodulina.

cAMP: Adenosín monofosfato cíclico.

CAT: Catalasa.

cDNA: DNA complementario.

CK: Citoqueratina.

DNA: Ácido desoxiribonucleico.

E1: Estado de conformación 1 del ciclo catalítico de SERCA.

E1P: Estado de conformación 1 fosforilado del ciclo catalítico de SERCA.

E2: Estado de conformación 2 del ciclo catalítico de SERCA.

E2P: Estado de conformación 2 fosforilado del ciclo catalítico de SERCA.

ER-: Receptor de estrógenos negativo.

ER+: Receptor de estrógenos positivo.

Glu: Ácido glutámico.

GPX1: Glutación Peroxidasa 1.

HER2: Receptor 2 de factor de crecimiento epidérmico humano.

IGF: Factor de crecimiento insulínico.

IHC: Inmunoquímica.

IP3: Inositol trifosfato.

IRS-1: Sustrato de receptor de insulina 1.

IRS-2: Sustrato de receptor de insulina 2.
Lys: Lisina.
mRNA: RNA mensajero.
NFAT: Nuclear Factor of Activated T-cells.
PARP: Poly ADP ribose polymerase.
PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.
PI3K: Fosfoinositol 3-cinasa.
PKA: Proteína cinasa A.
PKA: Proteína cinasa activada por aAMP.
PLB: Fosfolamban.
PMCA: ATPasa de Ca^{2+} de la membrana plasmática.
pNA= p-nitroanilida.
PR: Receptor de progesterona.
Rb: Proteína del retinoblastoma.
RE: Retículo endoplásmico.
RS: Retículo sarcoplásmico.
RSV: Resveratrol.
SERCA: ATPasa de Ca^{2+} del retículo Sarco(Endo)Plásmico.
SFB: Suero fetal bovino.
SIRT1: Sirtuina 1.
SNC: Sistema nervioso central.
SNL: Sarcolipina.
SOC: Canales sensibles a Ca^{2+} .
SOD1: Súperoxido dismutasa 1.

RESUMEN

En células eucariontes, el ión calcio (Ca^{2+}) es un segundo mensajero que controla procesos fundamentales para su correcto funcionamiento y desarrollo como el crecimiento, diferenciación y muerte celular, los cuales se encuentran relacionados con diversas enfermedades, entre ellas el cáncer. Por lo mencionado, la homeostasis de Ca^{2+} es fundamental en el desarrollo de procesos neoplásicos. En el mantenimiento de la homeostasis de Ca^{2+} se encuentran involucrados varios compartimentos celulares, entre ellos el retículo endoplásmico (RE) y la mitocondria; así como diversas proteínas que unen Ca^{2+} con gran afinidad y lo transportan hacia distintos destinos según se requiera. Entre las proteínas involucradas en la movilización intracelular de Ca^{2+} , una de las más importantes es la ATPasa de Ca^{2+} del Retículo Sarco(Endo)Plásmico (SERCA), que transporta activamente Ca^{2+} desde el citosol hacia el lumen del RE. SERCA es codificada por 3 genes diferentes (*ATP2A1-3*) que presentan expresión específica de tejido y del estado de desarrollo.

Varios estudios recientes han demostrado que la expresión de SERCA2 y SERCA3 se ve disminuida o ausente en varios tipos de cáncer, incluido el cáncer de mama. Por otro lado, algunos reportes han mostrado que los fitoestrógenos (entre ellos el resveratrol, RSV) inducen apoptosis o arresto del ciclo celular en células de diversos tumores malignos de manera específica, sin dañar a las células normales.

En este trabajo de tesis se comparó, mediante PCR en tiempo real, la expresión de los genes *ATP2A2* y *ATP2A3* en líneas celulares de cáncer de mama (MCF-7 y MDA-MB-231) y en una línea celular de tejido mamario no canceroso (MCF-10A)

con o sin tratamiento con RSV; así como también se evaluó cómo eran alterados los procesos de proliferación celular (actividad metabólica y DNA total), apoptosis (actividad de caspasa-3) y movilización intracelular de Ca^{2+} (FURA2-AM).

Los resultados demuestran que el tratamiento con RSV incrementa la expresión del gen *ATP2A3* pero no de *ATP2A2* de manera específica en las líneas celulares cancerosas; además, provoca disminución de la proliferación en una manera dependiente del tiempo y concentración del tratamiento: se observa también una inducción de apoptosis y cambios en los niveles basales de Ca^{2+} intracelular, así como en la capacidad de liberación de Ca^{2+} por parte del RE.

Por lo anterior, podemos definir una nueva vía de protección mediada por RSV, a través de cambios en el manejo de Ca^{2+} intracelular, aunque es necesaria investigación más profunda con el fin de dilucidar los mecanismos moleculares que gobiernan este efecto.

ABSTRACT

In eukaryotic cells, the calcium ion (Ca^{2+}) is a second messenger that controls fundamental processes for its function and development such as growth, differentiation and cell death, which are related to different diseases. Because of this, Ca^{2+} homeostasis is important for the development of cancer tumors. In Ca^{2+} homeostasis maintenance, some cell compartments such as endoplasmic reticulum and mitochondrion, as well as several proteins that bind Ca^{2+} with high affinity and transport it toward different fates as required, are involved. Among proteins involved in intracellular Ca^{2+} mobilization, one of the most important is the Sarco/Endoplasmic Reticulum Ca^{2+} ATPase (SERCA) that actively pumps calcium from the cytosol toward the lumen of the ER. SERCA is encoded by three different genes (*ATP2A1-3*), whose expression occurs in a tissue and development stage specific manner.

Recently, several publications have shown a decrease or absence of SERCA2 and SERCA3 expression in various types of cancer, such as breast cancer. On the other hand, some reports have shown that phytoestrogens (among them, resveratrol, RSV) induce apoptosis or cell cycle arrest specifically in cancer cells, without damage to normal cells.

In this thesis work, we compared *ATP2A2* and *ATP2A3* mRNA expression in breast cancer cell lines (MCF-7 and MDA-MB-231) and a cell line of normal mammary tissue (MCF-10A) with or without a treatment with RSV using Real Time PCR, as well as we evaluated how cell proliferation (metabolic activity and total DNA), apoptosis (active caspase-3) and Ca^{2+} mobilization (FURA2-AM) processes were altered.

Results demonstrate that the treatment with RSV increases the *ATP2A3* mRNA expression but not *ATP2A2* mRNA expression in a very cancerous cell line specific manner, as well as there is a decrease in cell proliferation in a time and concentration dependent manner. There is an induction of apoptosis and changes in cytosolic Ca^{2+} levels, as well as changes in the capacity for Ca^{2+} release by the ER were detected.

For this reason, we can define a new resveratrol-mediated protection pathway through changes in intracellular Ca^{2+} management. Nevertheless, deeper research is needed to understand the molecular mechanisms underlying this effect.

1. INTRODUCCIÓN

La importancia del ión calcio (Ca^{2+}) como segundo mensajero en el correcto funcionamiento celular queda a la vista cuando se analiza la repercusión que su regulación tiene en la activación, directa o indirecta, de diversas vías de señalización relacionadas con funciones como la proliferación, apoptosis, expresión de genes, entre otras. Por lo tanto, es importante que existan mecanismos específicos que controlen la concentración intracelular de calcio $[\text{Ca}^{2+}]_i$ tanto en el citosol, como en el retículo endoplásmico (RE), que es el principal reservorio de este catión en la célula.

Los gradientes de concentración de Ca^{2+} se mantienen por la actividad de las ATPasas de Ca^{2+} del Retículo Sarco(Endo)Plásmico (SERCA), que transportan el Ca^{2+} del citoplasma al interior de este organelo; y las ATPasas de Ca^{2+} de la membrana plasmática (PMCA, por Plasma Membrane Calcium ATPases), que transportan el Ca^{2+} al exterior de la célula. Estas enzimas utilizan la energía de la hidrólisis del ATP para transportar el Ca^{2+} en contra de su gradiente de concentración. La actividad de las enzimas SERCA contribuye a remover aproximadamente el 90% del Ca^{2+} citosólico libre, mientras que las PMCA transportan cerca del 10% del Ca^{2+} citoplásmico (Contreras-Leal et al. 2010).

A la fecha, existen varios reportes de mutaciones y alteraciones en la expresión de las diferentes isoformas de las bombas SERCA en diferentes tipos de tumores cancerosos humanos y animales. Se han identificado mutaciones en los genes *ATP2A2* y *ATP2A3*, así como disminución en la expresión de las proteínas SERCA2

y SERCA3 en distintos tipos de neoplasias como cáncer de colon, oral, del SNC, de tiroides, de próstata, entre otros (Flores-Peredo and Zarain-Herzberg, 2012).

La evidencia directa entre la deficiencia de la expresión y/o función de las bombas SERCA y la formación de tumores, ha sido provista por un estudio en ratones heterocigotos para el gen *ATP2A2*. Los ratones *Atp2a2*^{+/-} presentaron alta incidencia de carcinomas de células escamosas, como resultado directo de la haploinsuficiencia del gen que codifica para las isoformas SERCA2 (Liu, Boivin et al. 2001).

De manera análoga, se ha reportado que en células tumorales de cáncer de colón y gástrico, la expresión del gen *ATP2A3*, que codifica para las distintas isoformas de SERCA3, disminuye de manera importante o incluso se pierde por completo. Los resultados muestran que la pérdida de su expresión es un evento temprano del proceso de carcinogénesis de colón (Brouland et al. 2005) y de mama (Papp and Brouland, 2011).

2. ANTECEDENTES

2.1 EL CALCIO

En el curso de la evolución, han surgido numerosos agentes portadores de señales que son esenciales para el correcto funcionamiento de las células, siendo el Ca²⁺ el más versátil de ellos. El Ca²⁺ transmite señales a funciones tan fundamentales como la transcripción de genes, contracción muscular (y motilidad en general), secreción (incluyendo la de neurotransmisores), generación de combustible en varias vías metabólicas, entre otros. Debido a esta participación tan importante, es fundamental

que existan mecanismos que lo regulen de manera eficiente y precisa. Este trabajo es realizado por proteínas especializadas que enlazan Ca^{2+} con gran especificidad y afinidad en el ambiente intracelular, que en la mayoría de los casos contiene concentraciones que se encuentran en el orden de 100 nM (Brini and Carafoli, 2008). Para lograr esta gran versatilidad en su participación en diversos procesos, el sistema de señalización de Ca^{2+} opera de diversas formas (Figura 1).

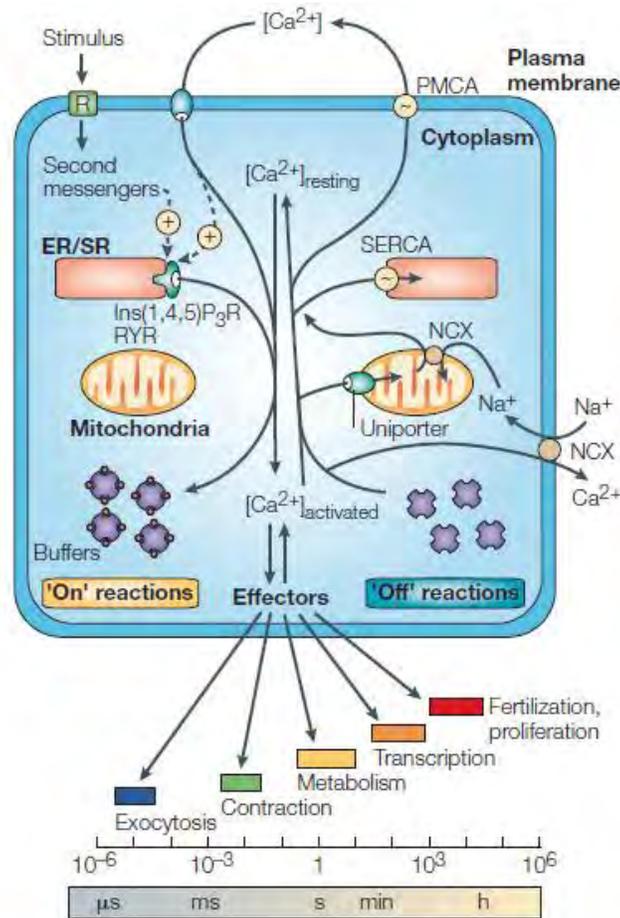


Figura 1. Dinámica y homeostasis de la señalización por Ca^{2+} . Durante las reacciones de activación se moviliza Ca^{2+} hacia el citosol. La mayoría de ese Ca^{2+} se une a búferes, mientras que una pequeña proporción se une a proteínas efectoras que activan varios procesos celulares que operan en un amplio espectro temporal. Durante las reacciones de desactivación, el Ca^{2+} citosólico es removido para restaurar el estado de reposo (Berridge et al. 2003).

Por ejemplo, el Ca^{2+} puede provocar exocitosis en microsegundos, mientras que en cuestión de minutos a horas es capaz de poner en marcha procesos como la transcripción de genes y la proliferación. Uno de los retos más importantes es entender cómo estos sistemas de señalización pueden regularse para controlar procesos celulares tan divergentes (Berridge et al. 2003)

La red de señalización de Ca^{2+} puede dividirse en cuatro estados funcionales:

- La señalización inicia con un estímulo que genera varias señales para la movilización de Ca^{2+} .
- Esto activa a los mecanismos “on” (de activación) que llevan el Ca^{2+} hacia el citosol.
- El Ca^{2+} funciona como un segundo mensajero que estimula numerosos procesos celulares.
- Finalmente, los mecanismos “off” (de desactivación) compuestos de bombas e intercambiadores, eliminan el Ca^{2+} del citosol para restaurar el estado de reposo (Berridge et al. 2000).

En células en reposo, la $[\text{Ca}^{2+}]$ libre en el espacio extracelular es de 1-2 mM, mientras que en el citosol se mantiene entre 10-100 nM, aunque a través de la movilización del Ca^{2+} de los reservorios celulares como el RE, el aparato de Golgi, los lisosomas, o por la entrada de Ca^{2+} a través de la membrana plasmática desde el medio extracelular, la $[\text{Ca}^{2+}]$ citosólico puede llegar hasta 1 μM . Por otro lado, se estima que la $[\text{Ca}^{2+}]$ puede estar entre 100 y 500 μM dentro del RE, que es el principal reservorio de este catión al interior de la célula (Monteith et al. 2007; Roderick and Cook, 2008). Estos gradientes de concentración de Ca^{2+} se mantienen

por la actividad de las bombas SERCA, que transportan el Ca^{2+} del citoplasma al interior de este organelo y las bombas PMCA que transportan el Ca^{2+} al exterior de la célula (Figura 2). Estas enzimas utilizan la energía de la hidrólisis del ATP para transportar el Ca^{2+} en contra de su gradiente de concentración. El aumento en la concentración citoplásmica de Ca^{2+} activa varias proteínas involucradas en procesos celulares importantes como proliferación, contracción muscular, expresión génica, entre otros (Contreras-Leal et al. 2010).

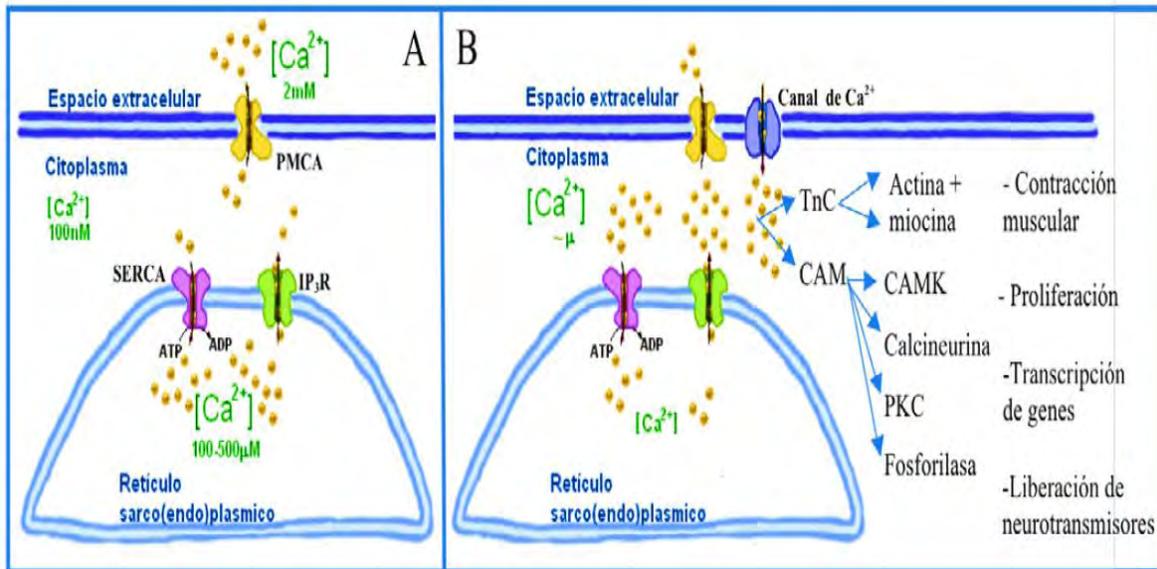


Figura 2. Mecanismos que regulan la concentración intracelular de Ca^{2+} . A) Se muestran las $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y tres de las proteínas que participan en la homeostasis de este catión: las bombas PMCA, SERCA y el canal de liberación de Ca^{2+} activado por IP₃ (IP₃R). B) En respuesta a señales celulares y extracelulares hay liberación de Ca^{2+} del lumen del RE y entrada masiva de Ca^{2+} del espacio extracelular (Contreras-Leal et al. 2010).

2.2 LAS BOMBAS SERCA: EXPRESIÓN Y GENÉTICA

Las bombas SERCA son proteínas integrales de membrana que transportan Ca^{2+} activamente hacia el lumen del retículo sarcoplásmico (RS) de células musculares y del RE de todos los tipos celulares, mediante la hidrólisis de ATP. Estas bombas muestran un alto grado de conservación entre especies, en humanos las bombas SERCA son codificadas por tres genes: *ATP2A1*, 2 y 3, cada uno de los cuales codifica diferentes isoformas de la proteína SERCA1, 2 y 3 respectivamente. El gen *ATP2A1* codifica dos isoformas de SERCA1 que se expresan exclusivamente en músculo esquelético de contracción rápida y su expresión está regulada durante el desarrollo, la isoforma SERCA1a se expresa en adultos y SERCA1b en neonatos. El gen *ATP2A2* codifica para tres isoformas: SERCA2a que se expresa abundantemente en corazón y músculo esquelético de contracción lenta; SERCA2b que se expresa en músculo liso y de forma ubicua en tejidos no musculares; y SERCA2c que se expresa en células endoteliales y de linaje hematopoyético. El gen *ATP2A3* codifica para la proteína SERCA3, que por procesamiento alternativo produce seis isoformas (a-f), las cuales se expresan en células epiteliales y hematopoyéticas (Flores and Zarain-Herzberg, 2010). Entre los genes *ATP2A1-3* se dan lugar a once isoformas de SERCA, todas funcionales y con un peso molecular aproximado de 100 kDa. El procesamiento alternativo ocurre en la región 3' de cada transcrito, por lo que todas las isoformas difieren entre sí en su extremo carboxilo (Figura 3).

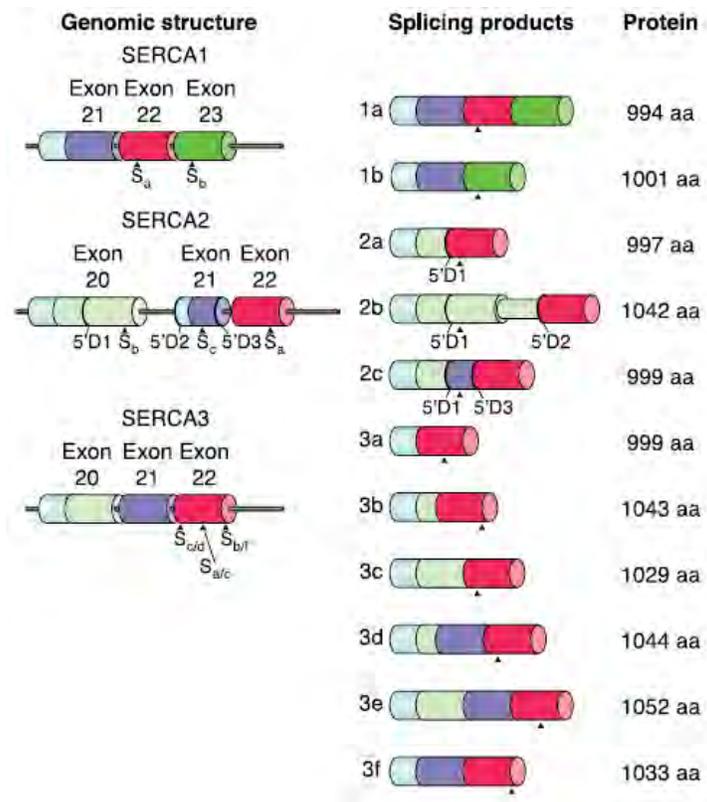


Figura 3. Generación de múltiples isoformas de SERCA por procesamiento alternativo de los genes humanos *ATP2A1-3*. Los exones están representados por cilindros de colores, los intrones por la línea negra. El cilindro delgado representa un pseudoexón no traducido. 5'D1, 5'D2, and 5'D3 indican los sitios donadores para el splicing que da lugar a los transcritos de SERCA2a, 2b y 2c respectivamente. Sa-f indica la posición de los diferentes codones stop para las isoformas correspondientes (Brini and Carafoli, 2009).

2.2.1 GEN *ATP2A1*

El gen *ATP2A1* humano se localiza en el brazo corto del cromosoma 16 en la banda 12.1, abarca 12.29 kb, contiene 23 exones y codifica para un transcrito de 3.3 kb. El exón 22 puede sufrir procesamiento alternativo para dar dos isoformas que se expresan en tejido muscular de contracción rápida. SERCA1a en el humano tiene 994 aminoácidos (aa) (se muestra la secuencia del extremo carboxilo que difiere

entre las isoformas: ...**NYLEG**) mientras que SERCA1b tiene 1001aa (...**NYLEDPEDERRK**) (Brandl et al. 1986; Brandl et al. 1987; Korczak et al. 1988).

2.2.2 GEN *ATP2A2*

El gen *ATP2A2* humano se encuentra en el cromosoma 12, banda 24.1, abarca 65.69 kb y se encuentra organizado en 21 exones (Zarain-Herzberg and Alvarez-Fernández, 2002). El transcrito de 4.4 kb genera por procesamiento alternativo 3 isoformas: SERCA2a, b y c. Las tres isoformas son idénticas hasta el aminoácido 993, pero por procesamiento alternativo del exón 20 se generan las isoformas SERCA2a con 997 aa (...**NYLEPAILE**) y SERCA2b con 1042 aa (...**NYLEP/SDMFWS**) (Lytton et al. 1989). SERCA2a tiene 10 pasos transmembranales ubicando su extremo carboxilo terminal en citoplasma (Verboomen et al. 1994). SERCA2b posee un dominio transmembrana extra de tal forma que el extremo carboxilo se encuentra en el lumen del retículo, lo cual junto con su expresión ubicua, son características únicas de esta isoforma, la cual se expresa principalmente en cardiomiocitos y en músculo esquelético de contracción lenta, así como en músculo liso y en todos los tejidos no musculares (Zarain-Herzberg et al. 1990). La isoforma SERCA2c se ha descrito por la inclusión de una pequeña secuencia codificante dentro del intrón 20, ahora exón 21, generando una proteína de 999 aa (...**NYLEPVLSSEL**). La expresión de SERCA2c se ha identificado en tejido epitelial, mesenquimal, así como en células hematopoyéticas (Dally et al. 2006).

2.2.3 GEN *ATP2A3*

El gen *ATP2A3* es el miembro de la familia que fue descrito más recientemente y sin embargo, el que genera mayor número de isoformas, en total 6 (Dode et al. 1998; Martin et al. 2002; Bobe et al. 2004). El gen humano abarca 40.59 kb del cromosoma 17q13.3 y contiene 22 exones que codifican un transcrito de 4.7 kb, el cual produce 6 isoformas (a-f) por procesamiento alternativo de los últimos 3 exones (20, 21 y 22). SERCA3a posee 999 aa (...**NHMHEEMSQK**), SERCA3b 1043 aa (...**NHMH/PVCTSD**) y SERCA3c 1024 aa (...**NHMH/LASLKK**). Tienen diferentes extremos carboxilos y se producen como resultado de la exclusión de los exones 20 y 21 en SERCA3a, por exclusión parcial del exón 20 y total del 21 para SERCA3b y por exclusión total del 21 en SERCA3c. SERCA3d con 1044 aa (...**NHMH/EEAGKK**) y SERCA3e con 1052 aa (...**NHMH/EEMSQK**) conservan parte o completamente el exón 20, respectivamente, seguido de los exones 21 y 22. Por último, la isoforma SERCA3f que posee 1033 aa (...**NHMH/EMSQK**) se genera por exclusión total del exón 20 pero conserva el 21 y 22. A nivel de expresión de proteína, las isoformas a, b y c, se expresan muy abundantemente en células hematopoyéticas, nódulos linfáticos, timo, bazo, glándulas salivales, tráquea, colón y páncreas (Kovács et al. 2001; Martin et al. 2002; Bobe et al. 2005). SERCA3 aparece siempre co-expresada con la isoforma de expresión ubicua, SERCA2b; sin embargo, SERCA2b puede encontrarse en ausencia de SERCA3 (Flores and Zarain-Herzberg, 2010).

2.3 ESTRUCTURA DE LAS ENZIMAS SERCA

Las enzimas SERCA son una clase típica de ATPasas de tipo P, las cuales forman fosfoproteínas como intermediarios y se someten a cambios conformacionales durante el curso de la hidrólisis del ATP (MacLennan et al. 1997). Estudios de biología molecular y cristalografía de rayos X han permitido determinar que las enzimas SERCA están formadas por una sola cadena polipeptídica de alrededor de 1000 aminoácidos, con una masa molecular aproximada de 110 kDa (Toyoshima ad Mizutani, 2004). Estas enzimas constan de 4 dominios principales: un dominio M formado por 10 hélices- α transmembranales y 3 dominios citosólicos que conforman la cabeza globular de la enzima: el dominio de unión al nucleótido (N), el dominio de fosforilación (P), que en conjunto forman el dominio catalítico y el dominio accionador (A) (Figura 4). Los dominios A y P están conectados al dominio M, que rodean el sitio de unión al ion Ca^{2+} . Estudios de mutagénesis dirigida y expresión *in vitro*, demostraron que los sitios de unión al Ca^{2+} se localizan principalmente en grupos carboxilo de los residuos de ácido aspártico (Asp) y ácido glutámico (Glu) en las hélices M4, M5 y M6. Estos sitios de unión al Ca^{2+} pueden existir en un estado de alta afinidad, permitiendo el acceso de los iones Ca^{2+} del citosol, o en un estado de baja afinidad, orientado hacia el lumen del RE (Inesi et al. 2006).

Las enzimas SERCA tienen grandes cambios conformacionales durante el proceso de transporte de los iones Ca^{2+} (Figura 5).

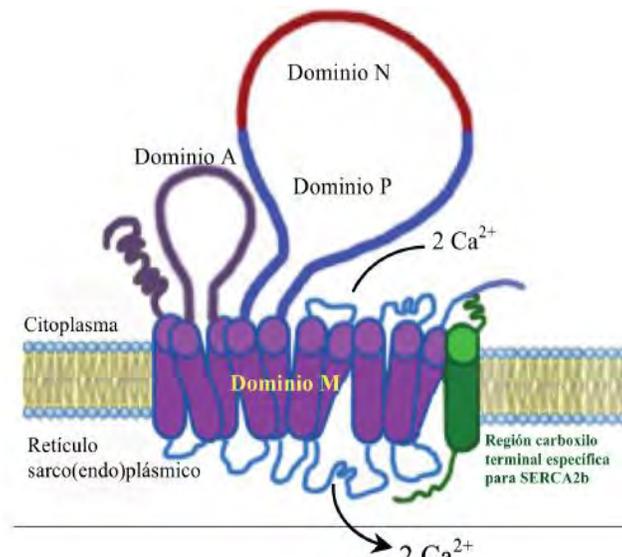


Figura 4. Estructura de las enzimas SERCA (Contreras-Leal et al. 2010).

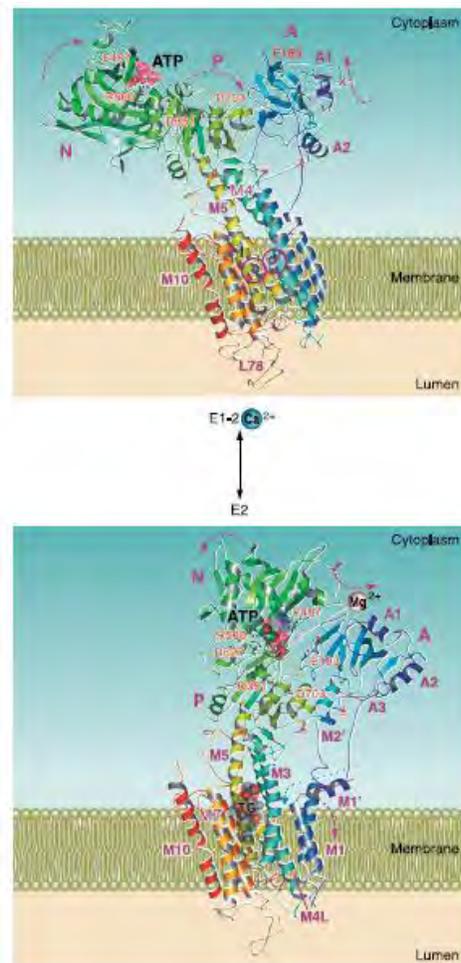


Figura 5. Estructura tridimensional de la bomba SERCA mostrando las conformaciones E1 y E2 (Brini and Carafoli, 2009).

2.4 MECANISMO CATALITICO DE LAS BOMBAS SERCA

Las bombas SERCA transportan dos iones Ca^{2+} en contra de un gradiente de concentración por medio del intercambio de dos o tres protones por molécula de ATP hidrolizada. La energía necesaria para realizar su función es de aproximadamente 12 kcal (de Meis, Arruda et al. 2003).

Para el transporte de Ca^{2+} desde el citosol al lumen del RE o RS, las bombas SERCA pasan por un complejo ciclo que involucra cambios conformacionales de la proteína. Hasta la unión de dos iones Ca^{2+} , la transfosforilación de ATP conduce al cambio conformacional de la proteína desde una proteína con alta afinidad por Ca^{2+} a un intermediario de baja afinidad. El mecanismo de reacción comúnmente se interpreta de acuerdo a un esquema E1/E2 (Figura 6).

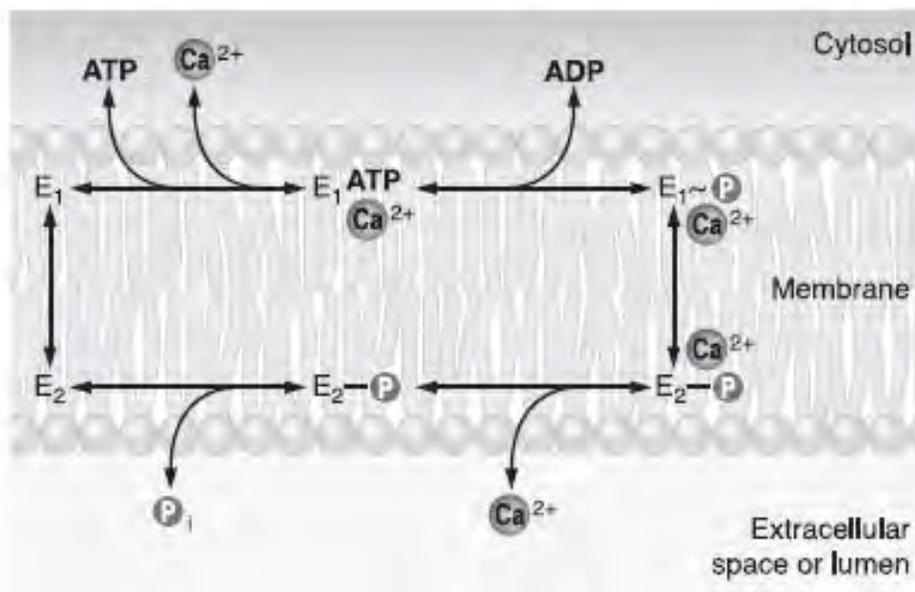


Figura 6. Esquema de reacción simplificado del ciclo de reacción de las ATPasas de Ca^{2+} . Las bombas existen en dos estados conformacionales principales: E1 une Ca^{2+} con gran afinidad en el lado citosólico; E2 tiene baja afinidad y libera el Ca^{2+} en el lumen del RE (Brini and Carafoli, 2009).

El modelo clásico postula que en el estado E1 los sitios de unión a Ca^{2+} tienen muy alta afinidad por el catión y se encuentran accesibles en el citoplasma. Sin embargo, en el estado E2 los sitios tienen muy baja afinidad y expuestos hacia el lumen del RE, resultando en la liberación de los dos iones de Ca^{2+} (de Meis and Vianna, 1979). En el ciclo de reacción, después de la fosforilación, los dominios P, A y gran parte del N se alinean. La enzima utiliza al ATP para formar un puente entre el dominio P y N. El ciclo de reacción está regulado esencialmente por Ca^{2+} , ya que el ATP puede unirse a la enzima incluso en ausencia del ión, sin embargo, en ausencia de Ca^{2+} el ciclo no puede continuar (MacLennan et al. 1997).

En la primera etapa del ciclo catalítico, dos iones Ca^{2+} se unen al dominio M en su conformación de alta afinidad por Ca^{2+} (E1); casi de inmediato el ATP se une a un residuo de lisina (Lys515), localizado en el dominio N. La enzima tiene un cambio conformacional que favorece el acercamiento del ATP, del dominio N al P, para fosforilar un residuo de ácido aspártico, lo que genera un intermediario fosforilado (E1P). La energía liberada de la hidrólisis del ATP permite a la enzima cambiar su conformación, de E1P a E2P, que muestra baja afinidad por Ca^{2+} . Con este cambio conformacional, el Ca^{2+} queda expuesto hacia el interior del lumen del RE o RS; se produce la liberación del Ca^{2+} y la hidrólisis del intermediario fosforilado (Figura 7). Tras la disociación del intermediario fosforilado y liberación de P_i , la enzima SERCA vuelve a su conformación E1 para iniciar otro ciclo catalítico (Inesi et al. 2006).

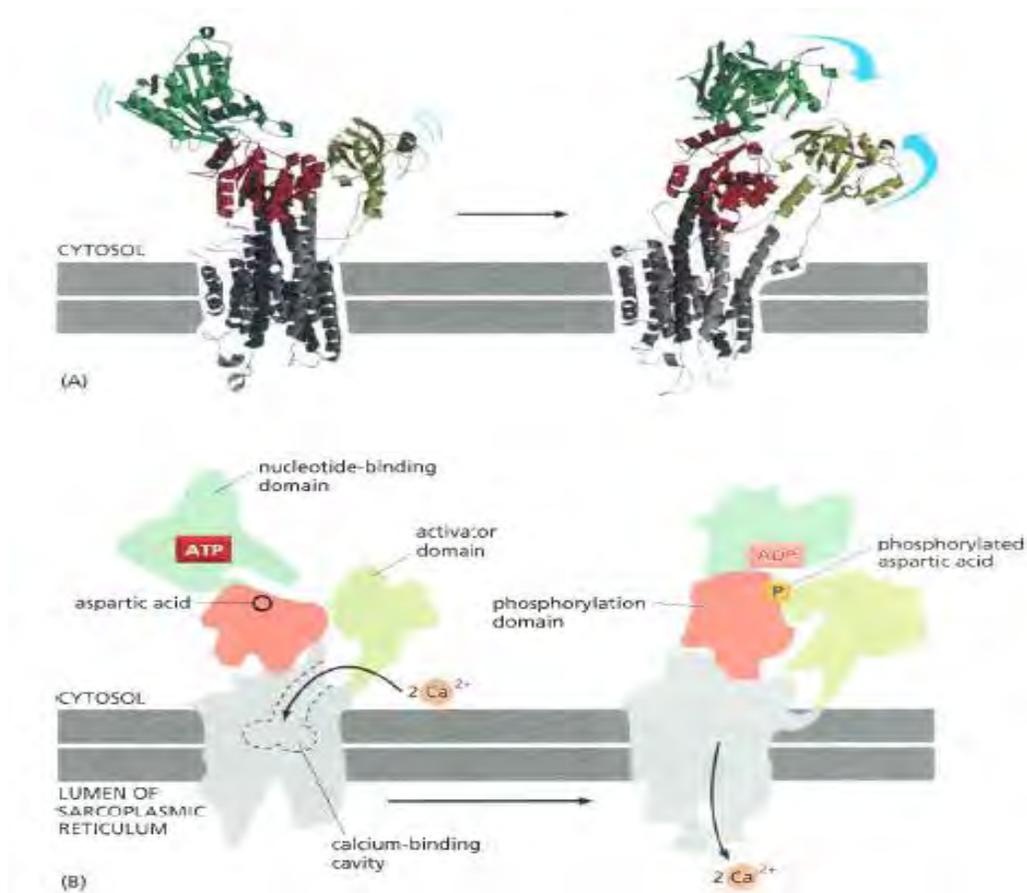


Figura 7. Modelo de movilización de Ca²⁺ por la bomba SERCA (Alberts, 5th edition, Molecular Biology of the Cell).

2.5 LAS BOMBAS SERCA Y EL CÁNCER

La expresión y actividad de canales y bombas de Ca²⁺ pueden ofrecer una ventaja para la proliferación o resultar en mecanismos adaptativos para la supervivencia y resistencia a la apoptosis. El perfil de cambios en las proteínas que se encargan de la homeostasis de Ca²⁺ no sigue un patrón uniforme en las diferentes neoplasias y los mecanismos que modifican su función son muy amplios. Su expresión puede

alterarse directamente por eventos de mutación, mediante mecanismos epigenéticos, por expresión alterada de factores de transcripción que modulen su expresión o mediante complejas vías de señalización (Flores and Zarain-Herzberg, 2010).

Diversas mutaciones de las bombas SERCA han sido reportadas en varios tipos de tumores cancerosos. En particular, se han identificado mutaciones en los genes *ATP2A2* y *ATP2A3*, así como disminución en la expresión de las proteínas SERCA2 y SERCA3 que codifican estos genes, por lo que se ha propuesto una participación importante de las bombas SERCA en la promoción y mantenimiento de distintas neoplasias como cáncer de colon, estómago, cavidad oral, SNC, tiroides, próstata, mama, y posiblemente de otras células malignas.

La evidencia más directa entre la deficiencia de SERCA y la formación de tumores fue observada en ratones heterocigotos del gen *Atp2a2*^{+/-}, donde se encontró que los animales presentaban una alta incidencia de carcinomas en células escamosas (o epitelio plano) como resultado directo de la haploinsuficiencia de SERCA2 (Liu et al. 2001). En ratón también se ha visto que la taspigargina (un inhibidor de origen natural irreversible, muy potente y altamente específico de la actividad de SERCA), sirve como un agente promotor de tumores de diferentes grados de malignidad sobre la piel del animal, comprobando que promueve el crecimiento de queratinocitos en cultivo (Gniadecky and Gajkowska, 2003).

En humanos, hay reportes que indican que la expresión de SERCA2b está significativamente disminuida en cáncer oral así como en cáncer de tiroides (Pacífico et al. 2003). Alternativamente, las mutaciones somáticas y en la línea

germinal en el gen *ATP2A2* han sido detectadas en pacientes con cáncer de colon y pulmón con la consecuente pérdida o reducción de la expresión de SERCA2, las cuales se han asociado con una predisposición a desarrollar este tipo de neoplasias (Korosec et al. 2006).

En 2004, el análisis de mutaciones en el gen *ATP2A2* en muestras de 52 pacientes con cáncer oral, en 32 pacientes con lesiones pre-malignas del mismo tipo celular y de 8 líneas celulares derivadas de éste tipo de cáncer, solo se identificó una deleción de 12 pares de bases en una de las líneas celulares, la cual condujo a un desfase en el marco de lectura a partir del exón 14 de la secuencia codificante, afectando al dominio de unión del ATP de la enzima. El análisis de los niveles de expresión del gen *ATP2A2* y de la proteína de SERCA2, identificó una disminución significativa entre los pacientes con cáncer. Los autores identificaron hipermetilación de la región promotora del gen *ATP2A2* en aquellas muestras con baja expresión del gen, restableciendo su expresión mediante tratamiento con 5-azacitidina, un agente desmetilante del DNA. En suma, los autores postularon la posible función de *ATP2A2* como gen supresor de tumores, donde la disminución en su expresión contribuye de forma temprana al desarrollo de cáncer oral (Endo et al. 2004).

La expresión de SERCA3 es muy abundante en mucosas y epitelios, sin embargo, se ha visto que disminuye drásticamente hasta incluso hacerse indetectable en carcinomas de mama, colon y mucosa gástrica, estos hallazgos se reportaron tanto en muestras de pacientes como en diferentes líneas celulares (Gelebart P. et al. 2002, Papp B et al. 2011).

En otro trabajo, cuando se amplió la búsqueda de mutaciones al gen *ATP2A3*, se estableció que las mutaciones en ambos genes *ATP2A2* y *ATP2A3* aumentan la susceptibilidad a desarrollar carcinomas de células escamosas en cabeza y nuca. El análisis incluyó 79 pacientes con carcinomas y 124 donadores sanos. En el gen *ATP2A2* se encontraron 4 mutaciones puntuales: 2 en el promotor, 1 en el exón 13 y 1 en el intrón XIX. Tres de estas alteraciones se encontraron en línea germinal y 1 en células somáticas. Las mutaciones en el promotor *ATP2A2* corresponden con las reportadas previamente por el mismo grupo en pacientes con cáncer de colon, así como la del intrón XIX. Además, la mutación en el intrón XIX es común en familias con enfermedad de Darier, un trastorno genético de herencia autosómica dominante, que se caracteriza por una diferenciación anormal de la piel a causa de mutaciones en el gen *ATP2A2*. Ninguna de estas mutaciones modificó la secuencia de aminoácidos, pero las que afectaron la región promotora presentaron expresión reducida de mRNA del gen *ATP2A2*. En el gen *ATP2A3* se encontraron 4 mutaciones diferentes en 7 pacientes con cáncer de cabeza y nuca: 2 mutaciones diferentes de sentido equivocado en el exón 14 y 2 en los intrones III y XX. La cuantificación de los niveles de expresión de mRNA para SERCA2b y SERCA3a-f, no mostró diferencia entre el tejido afectado y el normal del mismo paciente, pero la comparación entre los diferentes pacientes con o sin mutaciones en los genes *ATP2A2* y *ATP2A3*, identificó una disminución significativa solo en aquellos con mutaciones en el promotor del gen *ATP2A2*. El resultado anterior llevó a investigar si la disminución en la expresión correspondía a la hipermetilación de los promotores de los genes *ATP2A2* y *ATP2A3*, sin embargo, no se encontraron cambios (Korosec et al. 2008).

En 2009, el mismo grupo analizó la frecuencia de mutaciones en el gen *ATP2A3* en 275 muestras de pacientes con cáncer en colon, pulmón o en el SNC. Los autores concluyen que la ausencia de mutaciones somáticas sobre el gen *ATP2A3* indica que éste gen no funciona como supresor tumoral pero que la expresión incompleta del mismo, es suficiente para modificar el ambiente celular y tisular que predispone al desarrollo del cáncer. Además, estos estudios sugieren que las mutaciones en los genes que codifican las bombas SERCA constituyen eventos tempranos en el proceso carcinogénico (Korosec et al. 2009).

La disminución en la expresión de SERCA2 en líneas tumorales de tiroides y de SERCA3 en líneas de cáncer gástrico y de colon se han asociado principalmente con pérdida de la diferenciación de las células cancerosas más que con la transformación neoplásica per se (Gelebart et al. 2002, Pacifico et al. 2003). También hay evidencia de que la pérdida de la actividad de SERCA y el consecuente vaciado de los depósitos intracelulares induce proliferación en diferentes tipos celulares tanto normales como neoplásicos. La entrada de Ca^{2+} mediante la apertura de canales sensibles a Ca^{2+} conduce a la activación del factor de transcripción NFAT (por sus siglas en inglés Nuclear Factor of Activated T-cells), cuyos genes blanco conducen a proliferación y angiogénesis (formación de nuevos vasos sanguíneos, relacionados con la diseminación de tumores por el cuerpo) (Lipskaia et al. 2007).

Se propone que la activación de la vía Ca^{2+} /calcineurina/NFAT lleva a un aumento en la proliferación celular a través de un mecanismo que involucra la pérdida o disminución de la actividad de las bombas SERCA y el consecuente vaciado del RE, lo cual activa la entrada de Ca^{2+} desde el espacio extracelular. La apertura de

canales sensibles a Ca^{2+} (SOC, por sus siglas en inglés *Store-Operated Calcium Channels*) incrementa la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, la cual es detectada por la calmodulina quien a su vez activa a la calcineurina, la cual es una proteína fosfatasa que desfosforila al factor de transcripción NFAT. La translocación de NFAT desfosforilado al núcleo, promueve la expresión de genes específicos relacionados con la proliferación de diversos tipos celulares normales y neoplásicos como por ejemplo ciclinas, c-Fos y c-Jun.

Las bombas SERCA también desempeñan un papel esencial en la síntesis, plegamiento, transporte y secreción de proteínas. La acumulación de proteínas mal plegadas en el RE conduce a la respuesta conocida como estrés del RE, el cual lleva al vaciamiento de Ca^{2+} del RE y constituye una señal para la apoptosis. También se ha reportado que la proteína anti-apoptótica BCL-2 ejerce su función reduciendo la $[\text{Ca}^{2+}]$ dentro del RE por inhibición de SERCA2 (Brini and Carafoli 2009, Lipskaia et al. 2007).

2.6 CÁNCER DE MAMA

El cáncer de mama es conocido por ser el más común entre las mujeres. La incidencia mundial de esta condición patológica es de aproximadamente 1.67 millones de casos al año (Ghoncheh et al. 2015). A pesar de los avances multidisciplinarios en los tratamientos, mueren alrededor de un 10% de las pacientes tratadas (Matsumoto et al. 2015). Desde el 2006, el cáncer de mama es la primera causa de muerte en mujeres mexicanas (Figura 8), ocupando el 14% de las muertes relacionadas con el cáncer. Su incidencia ha ido en aumento en las últimas décadas,

desde un riesgo anual del 2% en 1980, hasta el 5% en 2010 (Chávarri-Guerra et al. 2012).

Tradicionalmente se percibía al cáncer de mama como una sola enfermedad. Sin embargo, avances recientes en expresión génica y genómica han revelado que el cáncer de mama es en realidad un conjunto de enfermedades que exhiben características anatómicas diferentes, respuestas a tratamientos e índices de supervivencia distintos (Taherian-Fard et al. 2014).

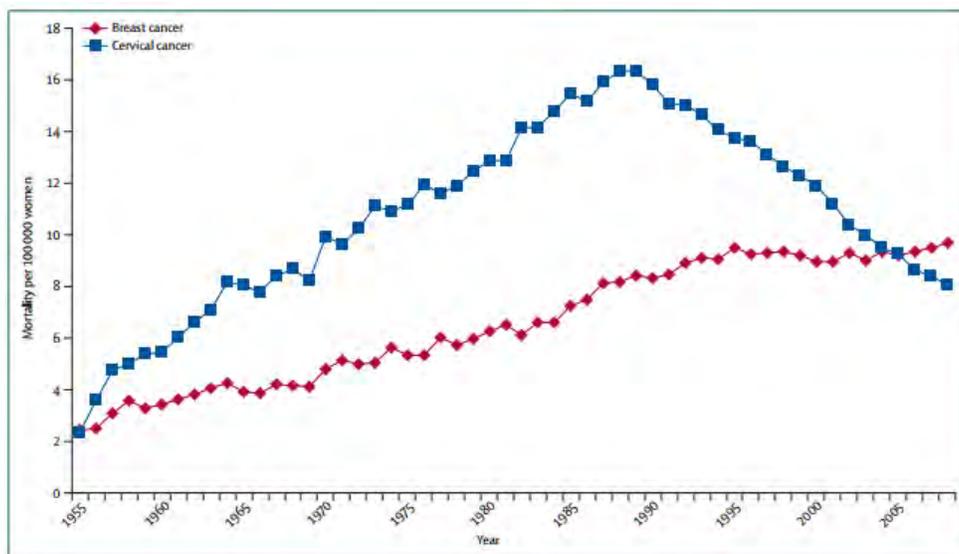


Figura 8. Mortalidad de cáncer de mama y cervical en México, 1955-2008 (Chávarri-Guerra et al. 2012).

Los perfiles de expresión se refieren al proceso de medir la expresión de miles de genes simultáneamente en una muestra de tejido dada. Los patrones resultantes reflejan las bases moleculares del fenotipo tumoral y pueden ser usados para comparaciones y clasificación. Esta tecnología nos proporciona una herramienta poderosa que nos asiste en la determinación del diagnóstico, pronóstico y tratamiento del cáncer. Entender el desarrollo del cáncer de mama es crítico para

su tratamiento y prevención, sin embargo poco se sabe de los eventos moleculares involucrados en su progresión (Moldovan et al. 2013).

En el año 2000, se propuso la primera clasificación molecular del cáncer de mama utilizando análisis de expresión génica sobre microarreglos de DNA, categorizándolo en 5 principales clases: Tipo basal (basal-like, triple negative), sobre-expresión del receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2), luminal A, luminal B y subtipo normal (normal breast-like subtype). Estos tumores pueden además ser separados en dos brechas, ER⁺ y ER⁻ (Tabla 1). Los del subtipo luminal A tienen los mejores pronósticos mientras que los de tipo basal y HER2 tienen los peores; el tipo luminal B tiene un pronóstico intermedio (Cornejo et al. 2014).

Tabla 1. Subtipos moleculares de cáncer de mama (Cornejo et al. 2014).

Subtipo molecular	ER/PR/HER2	Otro IHC	Vías moleculares	Grado histológico
Luminal A	ER ³⁺ , PR ³⁺ , HER2 ⁻	CK ⁸⁺ CK ¹⁸⁺ , GATA ³⁺	Genes responsivos a ER	Bajo
Luminal B	ER ⁻ , PR ^{+/-} , HER2 ⁺	CK ⁸⁺ , CK ¹⁸⁺ , GATA ³⁺	Genes responsivos a ER, mutaciones en TP53	Intermedio
HER2	ER ⁻ , PR ⁻ , HER2 ⁺		Genes HER1, mutaciones en TP53	Alto
Tipo basal (triple negativo)	ER ⁻ , PR ⁻ , HER2 ⁻	CK ⁵⁺ , CK ¹⁴⁺ , CK ¹⁷⁺ , EGFR ⁺ , c-KIT ⁺ , CD ⁴⁴⁺ , nestina ²⁺ , P-cadherina ⁺	Mutaciones en TP53, vía de BRCA1	Alto
Breast like	ER ^{+/-} , PR ^{+/-} , HER2 ⁻			Bajo

Abreviaturas. CK, citoqueratina; ER, receptor de estrógeno; GATA3, proteína 3 de unión a GATA; HER2: receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano; IHC, inmunohistoquímica; PR, receptor de progesterona.

Muchas enfermedades humanas se caracterizan por alteraciones en la expresión de diversos factores de transcripción. Muchos proto-oncogenes y genes supresores de tumores (anti-oncogenes) son bien conocidos por codificar proteínas las cuales, solas o en complejo actúan como reguladores transcripcionales. Defectos en ER, Myc, Rb y p53 contribuyen a procesos que llevan a la proliferación descontrolada en tumores mamarios y otras neoplasias. Por ejemplo, la sobre-expresión de Myc es encontrada en alrededor del 30% de los casos de cáncer de mama primario, mientras que una regulación positiva constitutiva de ER ocurre en más del 50% de los nuevos casos. Asimismo, la pérdida de función de p53 por mutaciones que paralizan su actividad transcripcional se puede encontrar en un 20-40% de los casos, mientras que las mutaciones inactivantes que resultan en la pérdida de la expresión de Rb están presentes en un 15-20% de los tumores mamarios (Benz, 1998).

Aunado a lo anterior, las alteraciones epigenéticas como la hipermetilación de las islas CpG en los promotores de muchos genes, así como las modificaciones post-traduccionales de las histonas se han asociado claramente con la iniciación y progresión del cáncer de mama, añadiendo un nivel más de dificultad para su comprensión (Dworkin et al. 2009). Es muy importante la identificación de nuevos biomarcadores para la reclasificación de cáncer de mama ya que nos llevan al desarrollo de nuevas terapias y estrategias de tratamientos para contribuir al manejo personalizado de las pacientes (De Abreu et al. 2014).

2.7 FITOESTRÓGENOS Y CÁNCER DE MAMA

La mayoría de los cánceres de mama son dependientes de estrógeno, y en mujeres posmenopáusicas el suministro de estrógenos en el tejido mamario se deriva de la conversión periférica de los andrógenos circulantes. Sin embargo, hay una paradoja relativa a la epidemiología de cáncer de mama y la ingesta alimentaria de los fitoestrógenos, que se unen débilmente a los receptores de estrógeno e inician la transcripción dependiente de estrógeno (Rice & Whitehead, 2006). Numerosos estudios epidemiológicos y clínicos han evaluado la relación entre el consumo de fitoestrógenos y las enfermedades humanas, pero los resultados aún no han producido un panorama claro de si estos compuestos tienen un potencial terapéutico o no. La dosis, composición dietética, el tipo de fitoestrógeno administrado y la duración del uso varían considerablemente entre los distintos estudios, haciendo que sea difícil una comparación (Patisaul and Jefferson, 2010) además de que poseen múltiples blancos de acción (Figura 9).

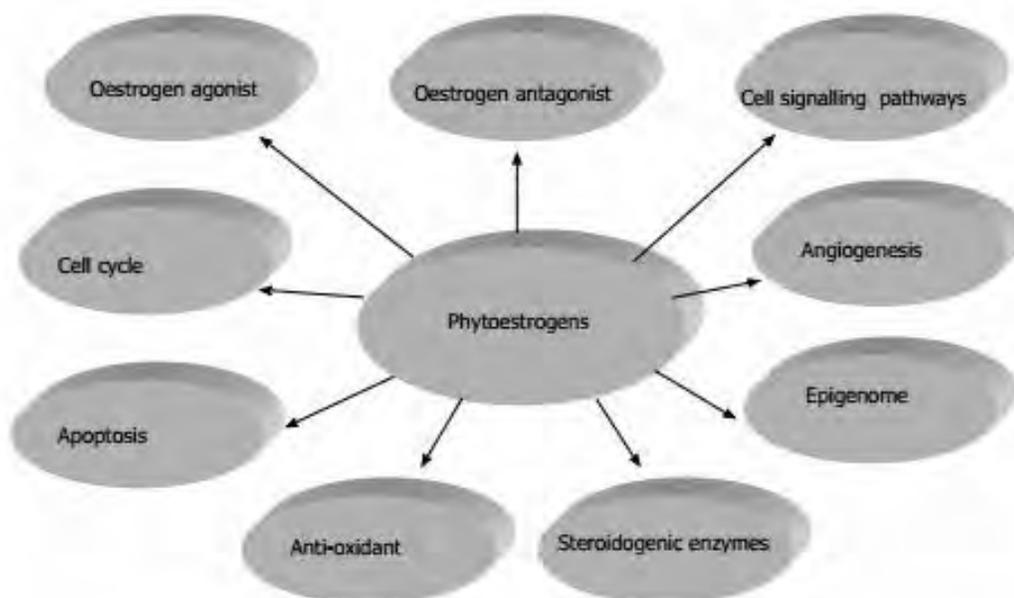


Figura 9. Múltiples blancos para la acción de los fitoestrógenos (Bilal et al. 2014).

Los fitoestrógenos son un grupo de sustancias derivadas de las plantas que son estructural o funcionalmente similares al estradiol. El interés en estas moléculas ha sido alimentado por una serie de datos epidemiológicos que sugieren un menor riesgo de cáncer de mama en mujeres que habitan en países con alto consumo de fitoestrógenos, por ejemplo en Japón. (Duffy et al. 2007).

El alto consumo de soya (una fuente abundante de fitoestrógenos) se ha asociado con menor riesgo de cáncer de mama. Además, la tasa de cáncer de mama entre inmigrantes de países con alto consumo de fitoestrógenos hacia países de bajo consumo ha ido en aumento, sugiriendo que cambios en el estilo de vida, incluyendo los cambios dietéticos en la captación de fitoestrógenos juegan un papel importante, aunque podrían no ser los únicos (Duffy et al. 2007).

Los estrógenos se reconocen cada vez más como una causa de cáncer de mama. Tanto las concentraciones elevadas de estrógeno endógeno como la terapia hormonal con estrógenos durante la menopausia se asocian con un mayor riesgo de cáncer de mama. Sin embargo, el papel de los fitoestrógenos es ambiguo. En modelos animales y estudios *in vitro*, los fitoestrógenos se unen débilmente a los receptores de estrógenos y pueden ya sea producir o inhibir los efectos del estrógeno. La actividad de un fitoestrógeno depende de su estructura y su metabolismo, su concentración relativa a la de los estrógenos endógenos y a la función biológica evaluada (Ziegler, 2004). Una de las funciones más estudiadas de los fitoestrógenos es la modulación de la transcripción (Figura 10).

En un estudio con aproximadamente 15, 000 mujeres holandesas de entre 49 y 70 años reclutadas para un programa de seguimiento por 4-8 años con una dieta alta

en lignanos e isoflavonas (dos tipos de fitoestrógenos) se identificaron 280 casos de cáncer de mama. Los puntos fuertes del estudio incluyen el uso de un detallado y validado cuestionario semi-cuantitativo de ingesta de alimentos, cuidadosamente desarrollado para detectar los niveles de fitoestrógenos consumidos. No se encontró asociación entre el consumo de isoflavonas y la incidencia de cáncer de mama. Sin embargo, se observó una disminución en el riesgo de cáncer de mama de un 30% para las mujeres que ingerían altas cantidades de lignanos (un promedio de 0.8 mg/día) (Ziegler, 2004).

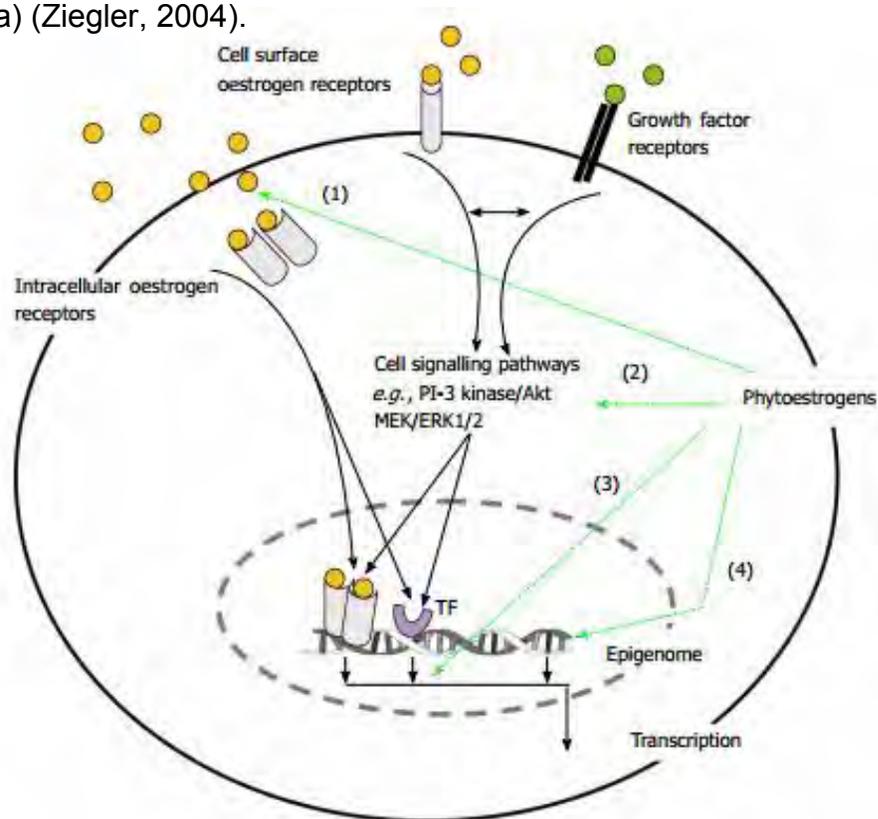


Figura 10. Diferentes formas por las cuales los fitoestrógenos pueden alterar la transcripción.

- 1) Actuar como agonista/antagonista de la actividad transcripcional de los receptores de estrógeno;
- 2) Modulando vías de señalización celular que pueden ser activadas por receptores de estrógenos en la superficie celular;
- 3) Inhibiendo o estimulando la transcripción de genes reguladores de la apoptosis y el ciclo celular;
- y 4) Alteraciones epigenéticas en el DNA, proteínas histonas y RNA para alterar la transcripción/traducción de proteínas (Bilal et al. 2014).

En otro estudio *in vitro* se encontró que fitoestrógenos como el RSV, la genisteína y la quercetina tienen efectos antiproliferativos sobre la línea celular de cáncer de mama MCF-7 incluso a concentraciones bajas por un mecanismo que es dependiente del receptor de estrógenos, además de ser capaces de mantener la supervivencia de las células normales de la línea MCF-10A (Chen & Chien, 2014).

2.7.1 RESVERATROL

El resveratrol (3,5,4'-trihidroxiestilbeno, RSV) pertenece al grupo de los fitoquímicos, y dentro de ellos a los polifenoles (flavonoides o catequinas). De manera general, a estas sustancias de metabolismo desconocido se les atribuyen funciones antioxidantes y de inhibición enzimática (ciclooxigenasa, lipooxigenasa y xantina), al estabilizar las especies reactivas de oxígeno, y quelar el hierro y el cobre, que facilitan acciones pro-oxidantes. Es un potente antioxidante, un polifenol natural, elaborado por más de 70 especies de plantas en respuesta a situaciones estresantes (radiación ultravioleta, infecciones fúngicas, etc.). El RSV se encuentra en la naturaleza en forma de isómero *cis* y *trans* (Figura 11, siendo la forma más habitual y estudiada, el *trans*-resveratrol (Millán et al. 2008). El RSV ha sido ampliamente estudiado por sus efectos benéficos en diversos tipos de cáncer como cáncer de piel no-melanoma, melanoma, de mama, gástrico y colorectal, de pulmón, carcinogénesis esofágica, cáncer de próstata, neuroblastoma, hepatoma, fibrosarcoma, cáncer de páncreas y leucemia (Athar et al. 2007).

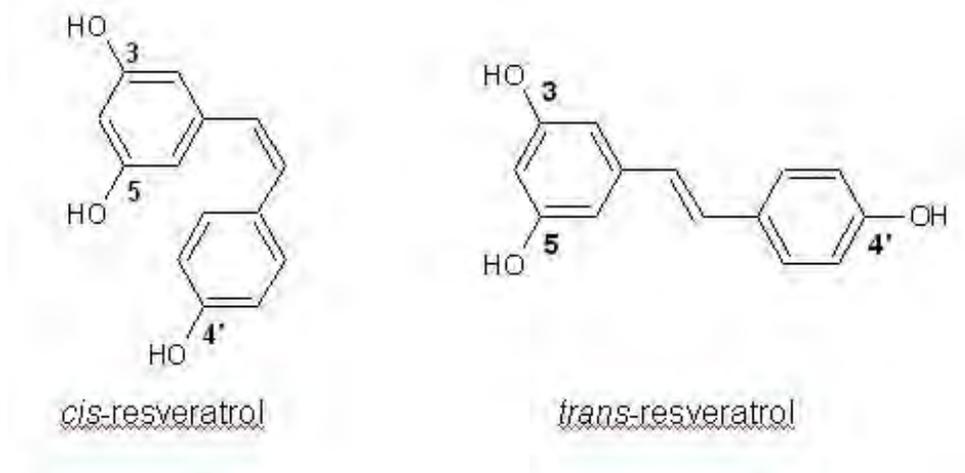


Figura 11. Estructura de los isómeros cis y trans del RSV.

A nivel molecular, el RSV ha mostrado una actividad importante en procesos anti-inflamatorios, anti-proliferación, control del ciclo celular, apoptosis, entre otros (Le corre et al. 2005). Sin embargo, a pesar de sus beneficios a la salud bien documentados, su mecanismo de acción permanece controversial (Tennen et al. 2012). Hasta hace un tiempo, la activación de la proteína cinasa activada por AMP (AMPK) era el evento de señalización más ríto arriba que se conocía desencadenado por el RSV. Más recientemente, Park y su equipo demostraron que el RSV directamente inhibe varias fosfodiesterasas, lo cual lleva a la activación de AMPK. Estos pasos incluyen un aumento en los niveles de cAMP, la activación del factor intercambiador de nucleótidos de guanina dependiente de cAMP (Epac1), incremento en los niveles de Ca^{2+} citosólico y activación de la vía CamKKb-AMPK a través de la fosfolipasa C (PLC) y el receptor de rianodina (RyR). Como consecuencia, el RSV incrementa la concentración de NAD^+ y la actividad de SIRT1, imitando los efectos de la restricción calórica (Figura 12) (Park et al. 2012).

Otro estudio reciente demostró que el RSV imita estructuralmente a la tirosina y es capaz de unirse a una enzima TyrRS, provocando su translocación al núcleo y la transcripción de genes protectores para el organismo, entre ellos p53 (Sajish and Schimmel, 2014). Las blancos moleculares del RSV que modulan sus efectos antiproliferativos se resumen en la figura 13.

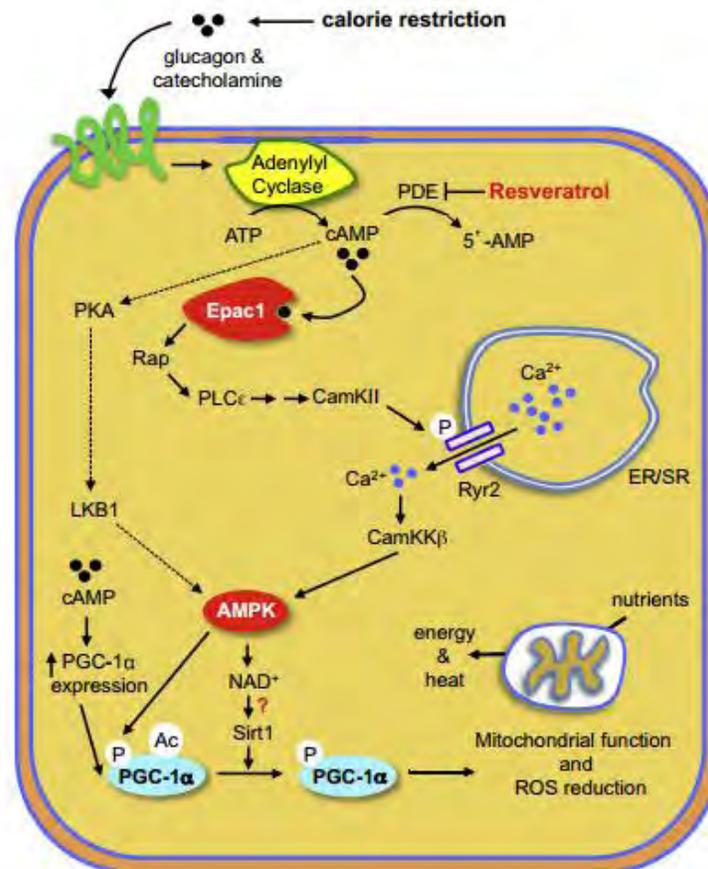


Figura 12. Modelo propuesto de cómo el RSV imita la restricción calórica (Park et al. 2012).

El mecanismo de acción del RSV en cáncer de mama ha sido analizado en diversas investigaciones con algunos resultados interesantes. Por ejemplo: Disminuye la proliferación y número de células en las líneas celulares de cáncer de mama MCF-7 y MDA-MB-231, induce apoptosis en MCF-7 y en menor medida en MDA-MB-231, induce cambios en la expresión de reguladores del ciclo celular de manera

diferencial dependiendo la línea celular e inhibe la actividad de la ribonucleótido reductasa (Pozo-Guisado et al. 2002). También se demostró que la mitocondria, el Ca^{2+} y la calpaína son mediadores importantes de la apoptosis inducida por RSV en cáncer de mama (Sareen et al. 2007); El RSV puede también inducir arresto del crecimiento mediante la vía Akt-caspasa-9 en la línea celular MCF-7 (Li et al. 2006); disminuye la expresión de genes involucrados en la reparación del DNA (León-Galicia et al. 2013); en la línea celular MDA-MB-435 se demostró que el RSV inhibe la migración e invasión impidiendo la actividad de IGF-1, en parte, a través de la supresión de la activación de la vía PI-3K/Akt (Tang et al. 2008); previene el silenciamiento epigenético de BRCA-1(Papoutsis et al. 2010); En la línea celular MDA-MB-231, RSV induce apoptosis por activación de la caspasa-3 que provoca la degradación de PARP [Poly(ADP-ribose) polymerase protein] (Alkhalaf et al. 2007), entre otros efectos.

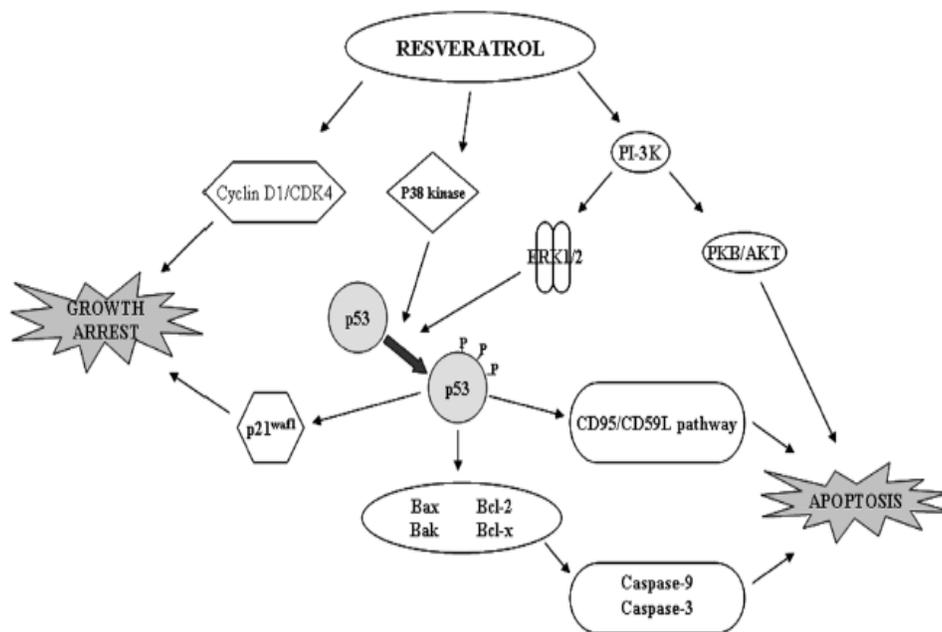


Figura 13. Efectos antiproliferativos del RSV. El RSV induce diferentes vías que llevan a un arresto del crecimiento y apoptosis (Le Corre et al. 2005).

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El ión Ca^{2+} puede modular una amplia variedad de procesos vitales para la supervivencia y buen funcionamiento de las células. Por dicha razón, es importante que conozcamos a fondo los diversos componentes que se encargan de su homeostasis, tanto su funcionamiento como su expresión. En los últimos años, se ha asociado a uno de estos componentes (la bomba SERCA) como un participante activo de distintas enfermedades. En cáncer de mama se ha visto que la expresión de SERCA3 se pierde casi por completo con respecto al tejido normal. Sin embargo, se desconoce si esto ocurre también a nivel de mRNA y cuáles son los mecanismos que modulan su expresión; así como si algunos agentes naturales como el RSV, que ha mostrado propiedades anti-cáncer en diversos modelos *in vitro* e *in vivo*, pueden reestablecer la expresión y/o función de la bomba SERCA.

4. HIPÓTESIS

El RSV puede modular la expresión de los genes *ATP2A2* y *ATP2A3* en líneas celulares de cáncer de mama, contribuyendo a cambios en la proliferación y muerte celular por un mecanismo que es dependiente de Ca^{2+} .

5. OBJETIVO GENERAL

Analizar la expresión de los genes *ATP2A2* y *ATP2A3* en líneas celulares de cáncer de mama después de aplicar tratamientos con distintas concentraciones de RSV. Además, evaluar el efecto que este tratamiento tiene en la proliferación celular, apoptosis y movilización intracelular de Ca^{2+} .

6. OBJETIVOS PARTICULARES

- Realizar cultivos de células tumorales de tejido mamario (MCF-7 y MDA-MB-231), así como células de tejido mamario normal (MCF-10A).
- Aplicar tratamientos a las líneas celulares con distintas concentraciones de RSV durante distintos tiempos.
- Medir viabilidad celular, proliferación y apoptosis como consecuencia de los tratamientos aplicados.
- Evaluar los niveles relativos de mRNA de los genes *ATP2A2* y *ATP2A3* después de los tratamientos con RSV.
- Determinar la concentración intracelular de Ca^{2+} en células tratadas y no tratadas con RSV.

7. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Cultivos celulares.

Las líneas celulares correspondientes a adenocarcinoma mamario MCF-7 (luminal A) y MDA-MB-231 (triple negativo); y una correspondiente a tejido normal (MCF-10A) que se utilizaron en este trabajo fueron todas adquiridas de ATCC.

Las líneas MCF-7 y MDA-MB-231 fueron crecidas en medio DMEM suplementado con 10% de SFB, kanamicina y antibiótico antimicótico para evitar contaminación, 5% de CO₂ y 37°C conforme a las indicaciones del proveedor.

La línea MCF-10^a se creció en medio DMEM/F12 suplementado con 10% de SFB, rhEGF (20 ng/mL), insulina (10 µg/mL), hidrocortisona (1 µg/mL), kanamicina y antibiótico antimicótico para evitar contaminación, 5% de CO₂ y 37°C conforme a las indicaciones del proveedor.

Tratamientos farmacológicos.

Los cultivos se sometieron a tratamientos con un suplemento certificado que contiene 99% trans-resveratrol de la marca MegaResveratrol®. Las concentraciones utilizadas fueron 10, 50, 100 y 200 µM, el vehículo utilizado para disolverlo fue etanol absoluto, partiendo de una solución stock que contenía 10 mg RSV/mL etanol (43.8 mM). Los tiempos de incubación fueron de 12, 24, 48 y 72 h, realizándose cambios de medio diariamente. Los controles consistieron en cultivos con medio de cultivo y otro con medio de cultivo más el vehículo para corroborar que los efectos observados se debieran exclusivamente al tratamiento con RSV.

Ensayos de viabilidad celular.

Un total de 10^4 células de cada línea celular fueron sembradas en placas de 96 pozos, cuando alcanzaron 80% de confluencia fueron aplicados los tratamientos con las distintas concentraciones y tiempos de RSV. Al terminar el tiempo de incubación, se agregó el reactivo Prestoblu Cell Viability Reagent (Molecular probes A-13261) en una relación 1:10. Se incubó a 37°C por un mínimo de 30 min y un máximo de 24 h para determinar el punto de mayor sensibilidad de detección. Las medición de fluorescencia se realizó en un Multilabel counter Victor 2 I420 (Perkin Elmer). Los valores más altos de fluorescencia se correlacionan con mayor actividad metabólica. La longitud de onda de excitación para el Prestoblu Cell Viability Reagent es de 560 nm y la de emisión de 590 nm.

Purificación de RNA total y RT-PCR.

Se realizó la extracción de RNA total por el método orgánico (Chomczynski and Sacchi, 1987) con Trisure (Bioline 38033) como lo indica el fabricante. Se evaluó la calidad del mismo mediante electroforesis en gel desnaturizante de agarosa con formaldehído y se cuantificó por espectrofotometría en un Nanodrop 2000 (LifeTechnologies) con la relación de absorbancia 280/260 nm mayor o igual a 1.8 como RNA de buena calidad. Se tomó 1 µg de RNA total para la síntesis de cDNA mediante la reacción de transcripción reversa con la enzima con la enzima M-MLV (Invitrogen 28025-013) en un volumen final de 20 µL. Posteriormente, para evaluar el efecto de los tratamientos sobre los cultivos celulares se realizó la amplificación de los genes de interés (*ATP2A2*, *ATP2A3*, *BCL2*, *BCL2L11* y *MKI67*) mediante RT-

PCR, a través de cuantificación relativa con Rotor-Gene SYBR® Green PCR Kit (Qiagen 204076) normalizando cada muestra contra un gen de expresión ubicua (β -actina y GAPDH). Las secuencias de cada par de primers se muestran en la Tabla 2. Del gen *ATP2A2* se amplificó solamente la isoforma SERCA2b por ser de expresión ubicua en todos los tipos celulares. Para amplificar SERCA3 se flanqueó una porción del mRNA que es común en todas las isoformas (a-f).

Tabla 2. Secuencias de los primers utilizados para RT-PCR (F= Forward; R= Reverse).

Nombre del primer	Secuencia 5'→3'	Tamaño del producto
<i>hSERCA2b F</i>	CGA ACC CTT GCC ACT CAT CTT C	189 nt
<i>hSERCA2b R</i>	TGC CGA GAA CGA GCA GGA TTT G	
<i>hSERCA3 F</i>	CAG GGG ACA TTG TAG AAG TGG C	126 nt
<i>hSERCA3 R</i>	TGG TCA CGG ACA CAG ATT CAC C	
<i>hBCL2 F</i>	TTG ACA GAG GAT CAT GCT GTA CTT	103 nt
<i>hBCL2 R</i>	ATC TTT ATT TCA TGA GGC ACG TT	
<i>hBIM F</i>	GCT GTG GAG GCT GAA TCC	74 nt
<i>hBIM R</i>	TCG GCT GCT TGG TAA TTA TTC	
<i>hKI67 F</i>	GGT GTG CAG AAA ATC CAA AGA	77 nt
<i>hKI67 R</i>	ACT GTC CCT ATG ACT TCT GGT TG	
<i>hActina F</i>	TGAAGGTGACAGCAGTCGGTTG	146 nt
<i>hActina R</i>	GGCTTTTAGGATGGCAAGGGAC	
<i>hGAPDH F</i>	TGCCCTCAACGACCACTTTG	152 nt
<i>hGAPDH R</i>	TCTCTCTTCCTCTTGTGCTCTTGC	

Análisis de los resultados de RT-PCR en tiempo real.

Los datos de amplificación fueron obtenidos por triplicado de cada una de las muestras, se convirtieron en logaritmo y se analizaron los valores de Ct (ciclo umbral o threshold) mediante el método de $\Delta\Delta Ct$ (Pfaffl M.W., 2001), con datos de Ct con $SD \leq 0.5$ entre los triplicados de cada muestra procedente de tres experimentos independientes, utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Expresión} \frac{\text{Target gene}}{\text{gen normalizador}} = \frac{(\text{Eficiencia target gene})^{\Delta Ct \text{ target gene}(\text{Control-tratado})}}{(\text{Eficiencia gen normalizador})^{\Delta Ct \text{ gen normalizador}(\text{Control-tratado})}}$$

Las expresiones de β -actina y GAPDH fueron utilizadas como genes normalizadores. Las gráficas mostradas en la sección de resultados corresponden a las normalizaciones con β -actina.

Ensayos de proliferación.

El reactivo CyQUANT Cell Proliferation Assay Kit de Invitrogen (MP 07026) fue utilizado para la medición de la proliferación, es un método sensible basado en un colorante que aumenta su fluorescencia cuando se une al DNA (Jones et al. 2001). Un número constante de células de las tres líneas celulares fueron sembradas en placas de 96 pozos y se realizó el tratamiento con las distintas concentraciones de RSV durante 72 h. Al término del tratamiento, se retiró el medio y las células fueron lavadas con PBS y congeladas a -70°C durante 30 min. Las células fueron posteriormente descongeladas y se agregaron 200 μL de reactivo CyQUANT diluido 1:400 en búfer de lisis 1X. La placa fue incubada a temperatura ambiente durante 5

min protegida de la luz y se procedió a la medición de la fluorescencia (~480 nm de excitación y ~520 nm de emisión máxima).

Ensayos de actividad de caspasa-3.

Las células control y tratadas por 72 h con RSV fueron lavadas dos veces con PBS, posteriormente se cosecharon mecánicamente y sometidas a centrifugación durante 5 min a 10,000 rpm. Las células fueron después resuspendidas en un volumen de búfer de lisis que depende el número de células (Caspase 3 Assay Kit Colorimetric, Sigma Casp-3-c) (Nicholson et al. 1995). Las células se incubaron por 20 min en hielo y los lisados fueron centrifugados a 12,000 rpm por 15 minutos. Los sobrenadantes fueron transferidos a tubos nuevos. La proteína total se cuantificó por espectrofotometría en un Nanodrop 2000 (LifeTechnologies). La reacción consistió en incubar durante 24 h 60 µg de proteína total con búfer de ensayo y 10 µL del sustrato hidrolizable por la caspasa 3. Este sustrato contiene el péptido acetil-Asp-Glu-Val-Asp p-nitronilida (pNA), el cual tiene una alta absorbancia a 405 nm.

Determinación de $[Ca^{2+}]_i$ con FURA-2, AM.

Las líneas celulares control y tratadas con 50 µM de RSV por 72 h. fueron cargadas en placas p-100 con el fluoróforo FURA-2, AM a una concentración final de 5 µM y 0.001% de ácido plurónico en medio Krebs-Ringer-Hepes-Glucosa (NaCl 120 mM, KH_2PO_4 1.2 mM, $MgSO_4$ 1.2 mM, KCl 4.75 mM, glucosa 10 mM, Hepes 20 mM, $CaCl_2$ 1.27 mM, albúmina sérica bovina 0.05%, pH 7.4), durante 45 minutos a 37°C en una atmósfera de 5% de CO_2 . Después de la incubación, las células fueron lavadas con PBS para eliminar la albúmina y el FURA-2, AM externo, a continuación

las células fueron despegadas con tripsina/EDTA al 0.025% por 1 minuto, fueron resuspendidas nuevamente en Krebs y centrifugadas a 3,000 rpm por 3 minutos, el sobrenadante se descartó y se lavó dos veces más. El pellet de células fue homogenizado en 2 mL de Krebs para proceder a la lectura en agitación constante mediante un espectrofluorómetro AMINCO-Bowman serie 2, el cual registra los cambios de fluorescencia con excitación a 340 nm y emisión de 510 del fluoróforo. La cuantificación se hizo de acuerdo a la ecuación publicada originalmente por el grupo de Roger Tsien:

$$[Ca^{2+}]_i = K_d \left[\frac{R - R_{min}}{R_{max} - R} \right] \left(\frac{Sf_2}{Sb_2} \right)$$

Donde K_d es la constante de disociación del fluoróforo, Sf_2 es la intensidad máxima de la fluorescencia para cero Ca^{2+} obtenida a la longitud de onda utilizada para monitorear el Ca^{2+} libre, Sb_2 es la intensidad mínima de fluorescencia a condiciones saturantes de Ca^{2+} (obtenida a la misma longitud de onda que Sf_2), R_{min} y R_{max} son los valores de fluorescencia obtenidos en condiciones de Ca^{2+} cero y saturantes, respectivamente (Paredes, et al. 2008).

Análisis estadístico

Los resultados de todos los experimentos son expresados como la media de 3 experimentos independientes ($n=3$) \pm error estándar (EE). Los valores fueron comparados con análisis de varianza (ANOVA) con el software GraphPad Prism 6, aplicando la prueba de Dunnett que compara varios grupos contra el control. En las gráficas, el asterisco (*) denota valores estadísticamente significativos con $p \leq 0.05$ comparados con el control correspondiente de cada experimento.

8. RESULTADOS

8.1.- Cambios morfológicos en las líneas celulares MCF-7, MCF-10A y MDA-MB-231 después de tratamientos con distintas concentraciones de RSV.

Con la finalidad de analizar el efecto del RSV sobre las distintas líneas celulares, al medio completo adicionado con 10% de SFB, se les agregó distintas concentraciones de RSV (10, 50, 100 y 200 μM) y se realizaron cultivos con 12, 24, 48 y 72 h de tratamiento. Se muestran imágenes de los tiempos y concentraciones que más mostraron diferencias comparadas con el control. Las tres líneas celulares son adherentes. En el caso de las líneas celulares cancerosas MDA-MB-231 y MCF-7 (Figuras 14 y 15, respectivamente) se observó claramente una disminución en el número de células en una manera dependiente de la dosis y del tiempo de exposición, efecto que es más notorio en la línea MCF-7. En el caso de la línea MCF-10A (Figura 16), donde la morfología es ligeramente alargada, ésta se acentúa aún más con concentraciones altas de RSV (200 μM) aún a tiempos cortos (24 h), mostrando signos de senescencia o estrés como citoplasma más aplanado y cambios en la expresión de genes (Ben-Porath and Weinberg, 2004) como se mostrará más adelante. Concentraciones bajas de RSV (10 y 50 μM) parecen no impedir de manera significativa la proliferación, puesto que las células tratadas se comportan de manera muy parecida al control.

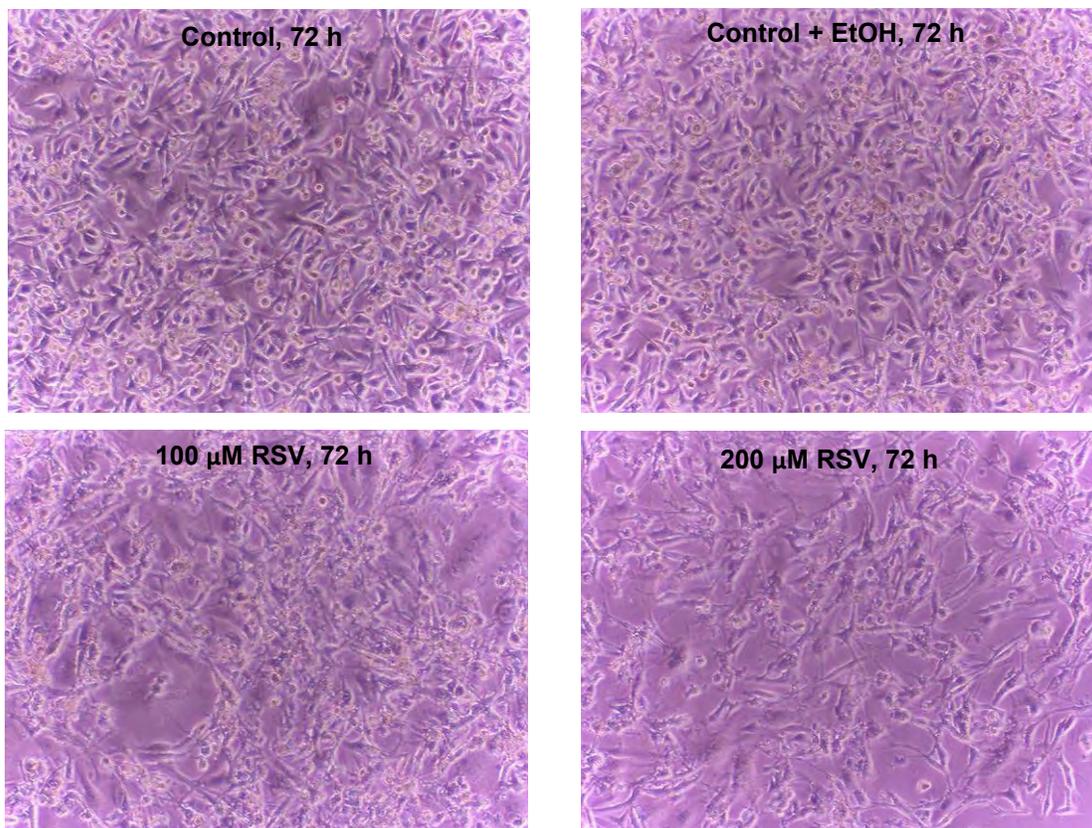


Figura 14. Efecto sobre el número de células en la línea MDA-MB-231 con distintas concentraciones de RSV. Las concentraciones de RSV y tiempos utilizados se muestran en las fotos, se realizó cambio de medio de cultivo fresco con tratamiento cada 24 h.

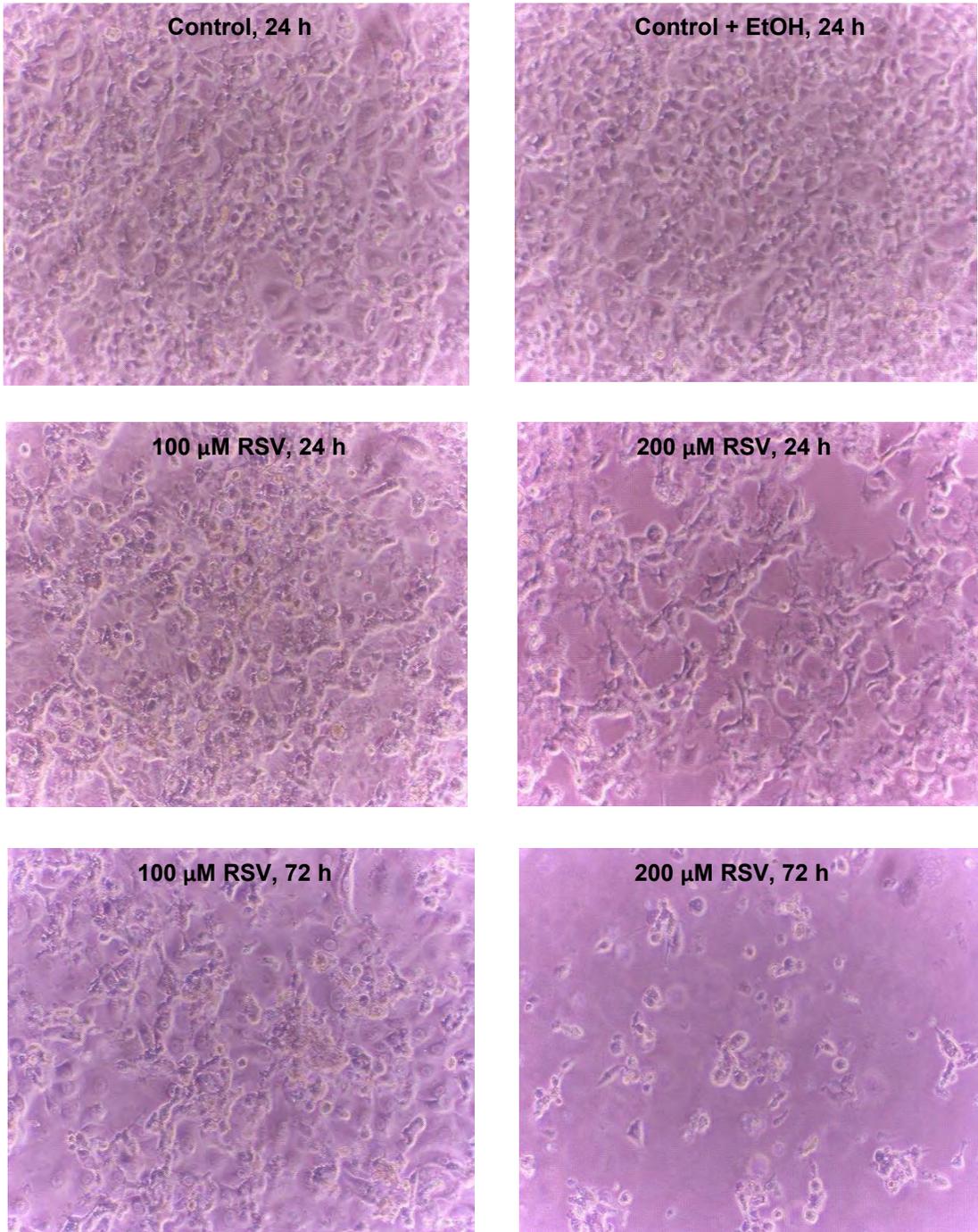
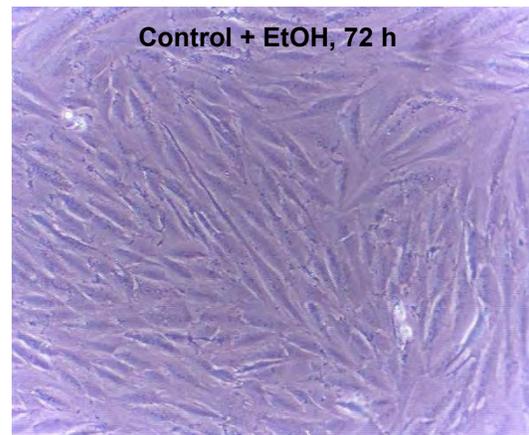
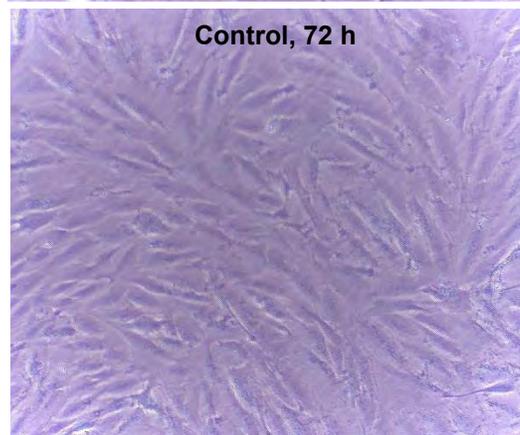
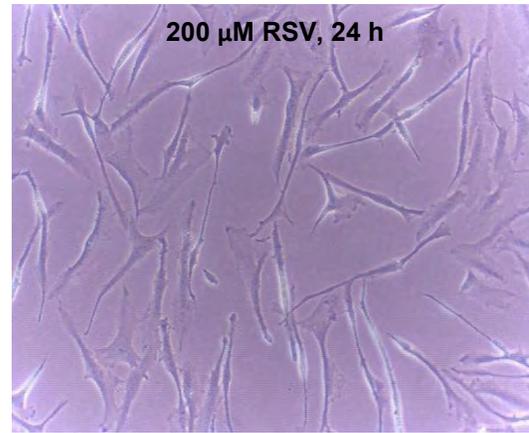
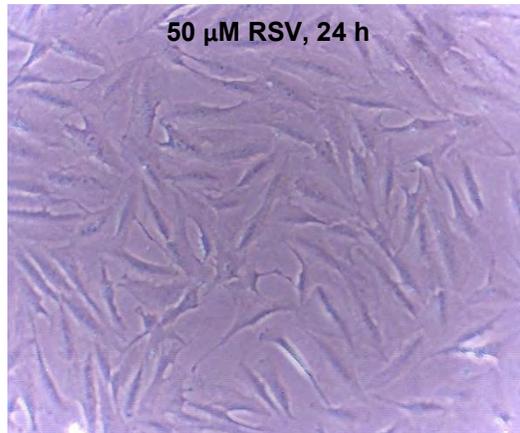
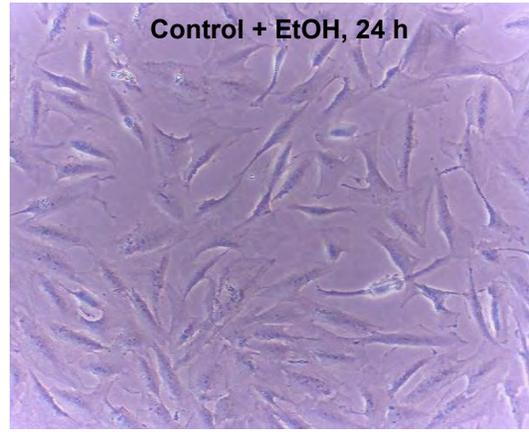
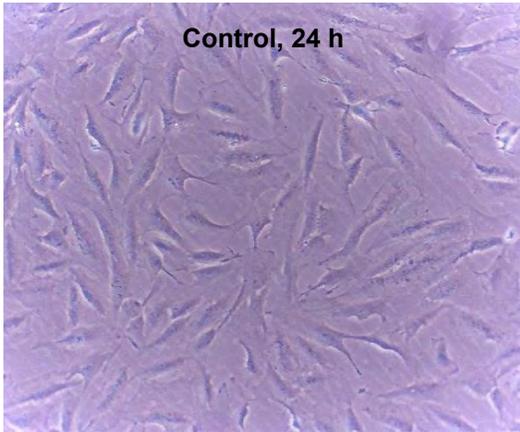


Figura 15. Efecto sobre el número de células en la línea MCF-7 con distintas concentraciones de RSV. Las concentraciones de RSV y tiempos utilizados se muestran en las fotos, se realizó cambio de medio de cultivo fresco con tratamiento cada 24 h.



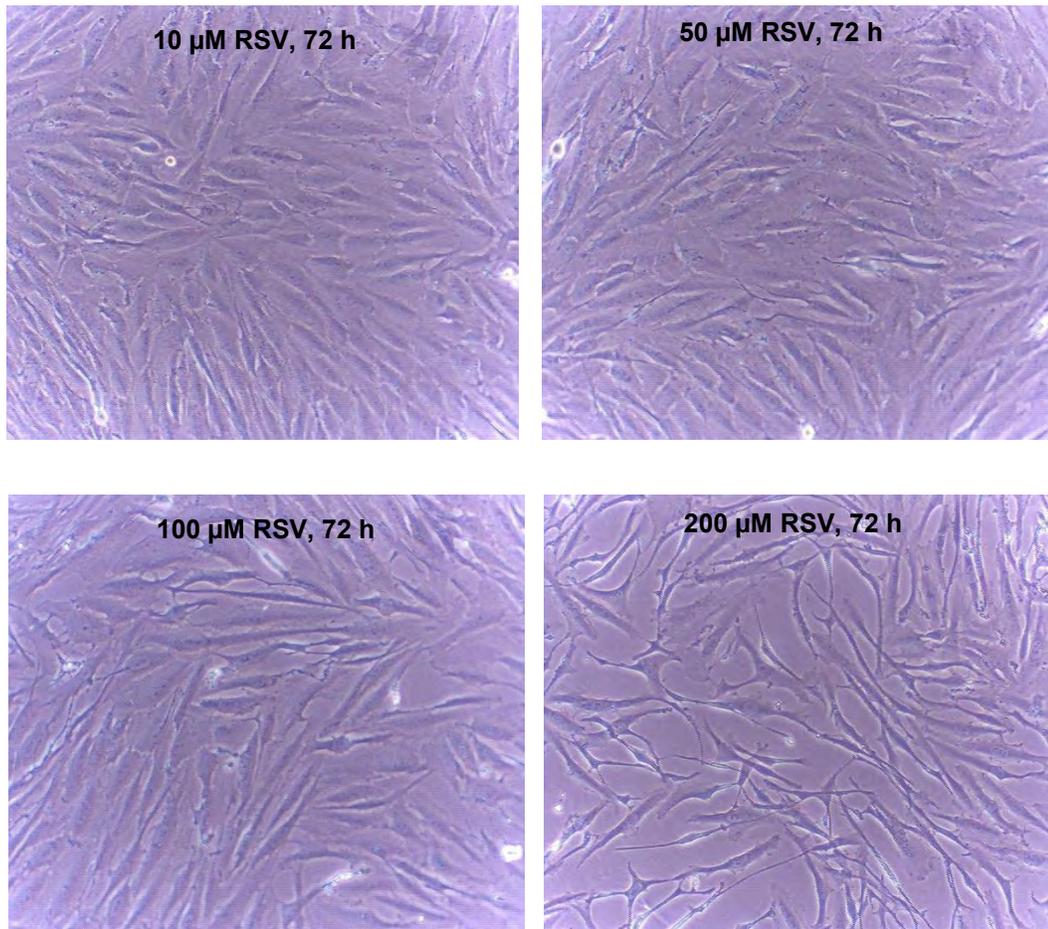


Figura 16. Efecto sobre la morfología de las células MCF-10A con distintas concentraciones de RSV. Las concentraciones de RSV y tiempos utilizados se muestran en las fotos, se realizó cambio de medio de cultivo fresco con tratamiento cada 24 h.

8.2.- Análisis de viabilidad celular de los tratamientos con RSV en las líneas celulares.

Con el objetivo de investigar el efecto de las distintas concentraciones de RSV y los tiempos de tratamiento en la viabilidad de las tres líneas celulares, se determinó ésta con el reactivo PrestoBlue Cell Viability Reagent de Invitrogen (A13261) (Ahmed et al. 1994). Los resultados muestran que en las líneas celulares cancerosas la viabilidad disminuye en una manera dependiente de la dosis y del tiempo de tratamiento, llegando a disminuir hasta en un 50% en la línea MDA-MB-231 (Figura 17) y hasta un 60% en la línea MCF-7 (Figura 18) con concentraciones altas de RSV (200 μM) durante 72 h. La exposición a concentraciones bajas no disminuye considerablemente la viabilidad. En el caso de la línea celular MCF-10A (Figura 19), no se observa cambio significativo en la viabilidad en ninguna de las condiciones probadas. Los resultados fueron normalizados contra el control, el cual fue considerado con valor de 1.0.

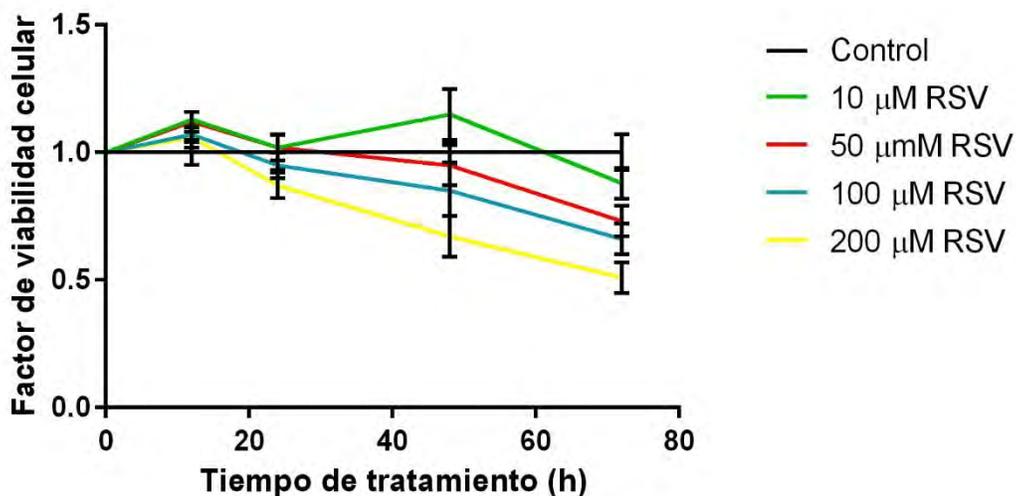


Figura 17. Ensayo de viabilidad celular en la línea celular MDA-MB-231 con diferentes concentraciones de RSV. ANOVA, $n = 3$, $p \leq 0.05$

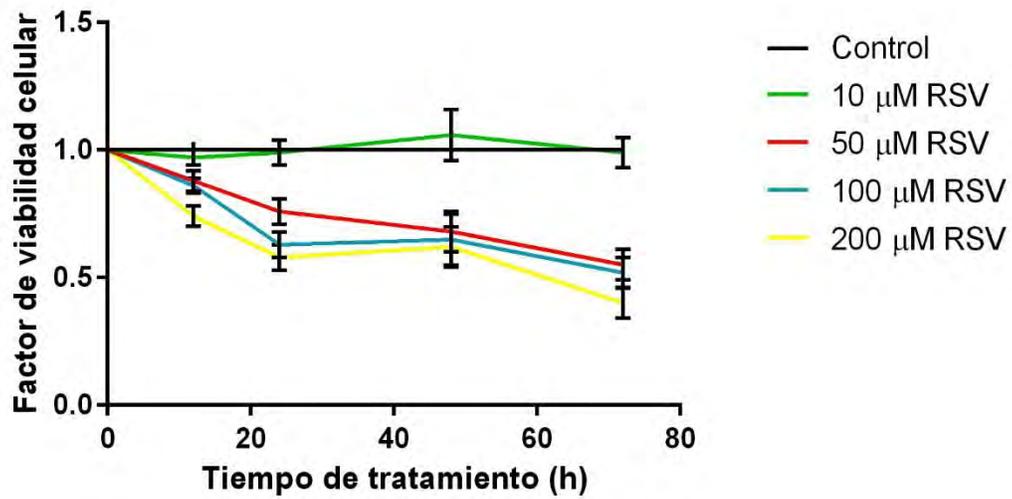


Figura 18. Ensayo de viabilidad celular en la línea celular MCF-7 con diferentes concentraciones de RSV. ANOVA, $n = 3$, $p \leq 0.05$

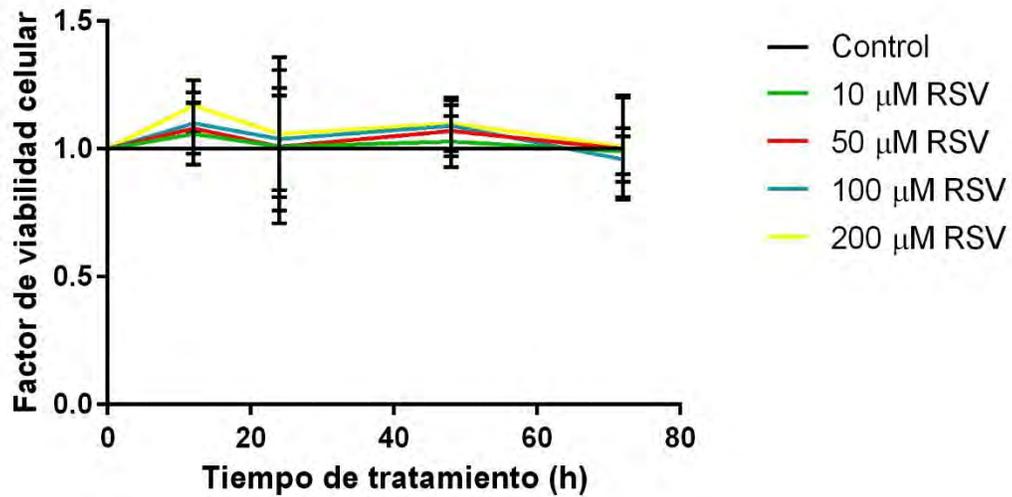


Figura 19. Ensayo de viabilidad celular en la línea celular MCF-10A con diferentes concentraciones de RSV. ANOVA, $n = 3$, $p \leq 0.05$

8.3.- Expresión del mRNA relativa de los marcadores de apoptosis Bcl-2 y BIM; y de proliferación Ki67 en las líneas celulares cancerosas tratadas con 200 µM de RSV.

Con el fin de identificar el posible mecanismo de acción del RSV sobre la apoptosis y/o proliferación, evaluamos mediante RT-PCR la expresión del mRNA de algunos marcadores como Bcl-2 (anti-apoptótico), BIM (pro-apoptótico) y Ki67 (proliferación).

Los resultados fueron los esperados en la línea celular MDA-MB-231 (Figura 20), la determinación de la expresión de los marcadores a las 12 y 24 h muestra que tanto el gen Bcl-2 que evita la apoptosis como el gen Ki-67 que promueve la proliferación disminuyeron su expresión aproximadamente un 50% con respecto al control; de igual manera, el gen que codifica para la proteína BIM, la cual es promotora de la apoptosis aumentó de 2 a 2.5 veces.

Por otro lado, en la línea celular MCF-7 (Figura 21) se observa que el gen Ki67 disminuye su expresión al igual que en la línea celular MDA-MB-231. Sin embargo el gen Bcl-2 mostró una disminución de su expresión a 12 h, mientras que a 24 h su expresión aumenta hasta casi 2.5 veces. El mRNA de BIM a 12 h se encuentra disminuido con respecto al control, y es hasta las 24 h que empieza a mostrar un aumento de 2 veces.

Los estudios de expresión génica en la línea MCF-10A no se realizaron debido a que el análisis de viabilidad celular no mostró cambios en ninguna condición experimental.

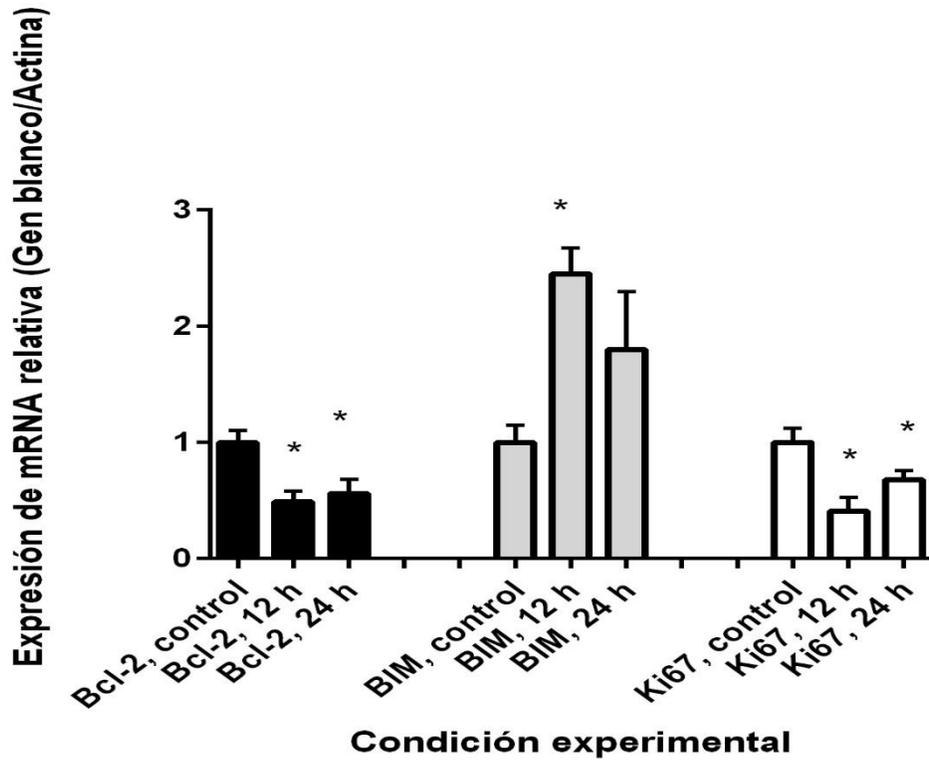


Figura 20. Expresión de los genes que codifican para Bcl-2, BIM y Ki67 después del tratamiento con 200 μ M de RSV en la línea celular MDA-MB-231. ANOVA, n = 3, p<0.05.

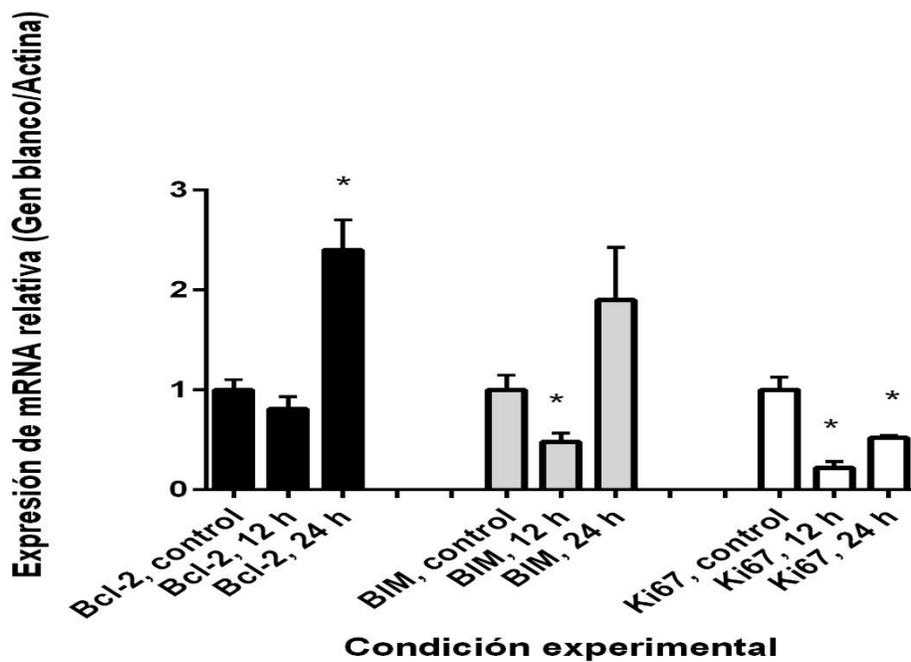


Figura 21. Expresión de los genes que codifican para Bcl-2, BIM y Ki67 después del tratamiento con 200 μ M de RSV en la línea celular MCF-7. ANOVA, n = 3, p<0.05.

8.4.- Cambios en la proliferación celular producidos por los tratamientos con RSV en las líneas celulares.

A diferencia de otros métodos que se basan en la detección de actividad metabólica, el ensayo utilizado (CyQUANT) se basa en la cantidad de DNA presente, por lo cual es ideal para determinación de la proliferación celular. Los resultados muestran que el tratamiento con RSV disminuye la proliferación en una manera dependiente de la dosis en las líneas celulares cancerosas MDA-MB-231 y MCF-7, mientras que en la línea celular MCF-10A no se observan cambios (Figura 22), resultados muy parecidos a los presentados en la sección de viabilidad celular. Los resultados fueron normalizados contra el control, el cual fue considerado con valor de 100%.

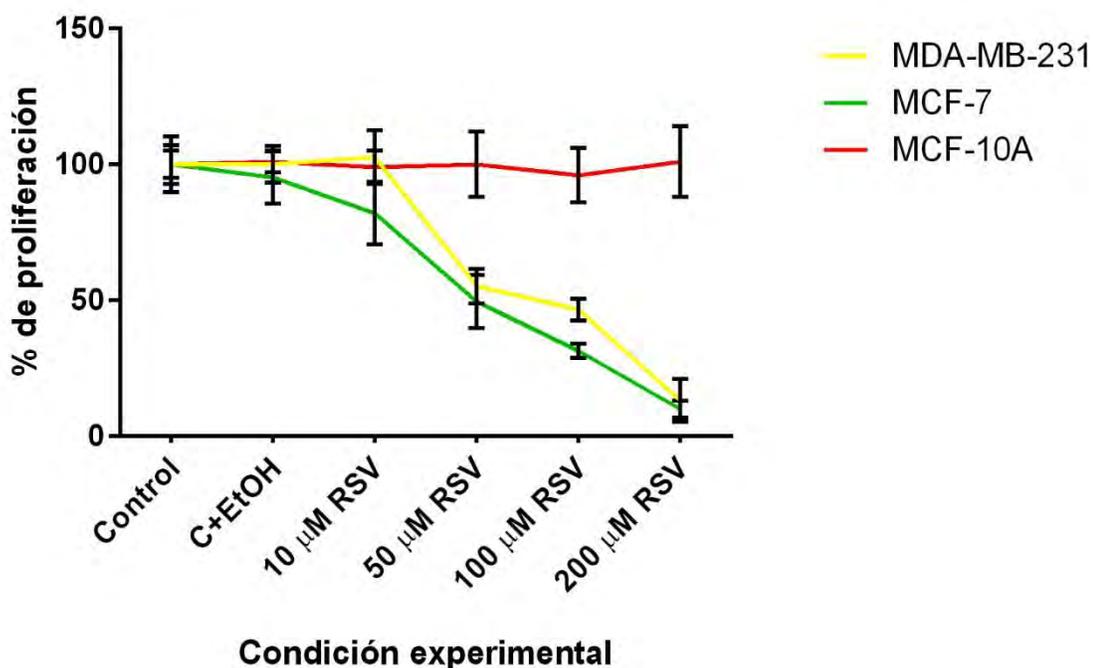


Figura 22. Alteración en la proliferación de las líneas celulares MDA-MB-231, MCF-7 y MCF-10A con distintas concentraciones de RSV por 72 h.

8.5.- Detección de apoptosis producida por los tratamientos con RSV en las líneas celulares.

Para identificar si la disminución en la viabilidad celular se debe a la inducción de apoptosis por RSV, se realizó un ensayo de actividad de caspasa-3, la cual es una proteína efectora importante en la cual convergen tanto la vía intrínseca como la vía extrínseca de la apoptosis. Por los resultados, se pudo detectar la presencia de caspasa-3 activa en ambas líneas celulares cancerosas, mientras que en la línea control se encontró disminución de la actividad de caspasa-3 a partir de 50 μ M de RSV (Figura 23). Esto concuerda con varios estudios (Yang, 2001; Sareen, 2007; Shi, 2011; Joe, 2002; Alkhalaf, 2008; Pozo-Guisado, 2002 y 2005) que han reportado que el tratamiento con RSV induce apoptosis en las líneas celulares cancerosas utilizadas en este proyecto.

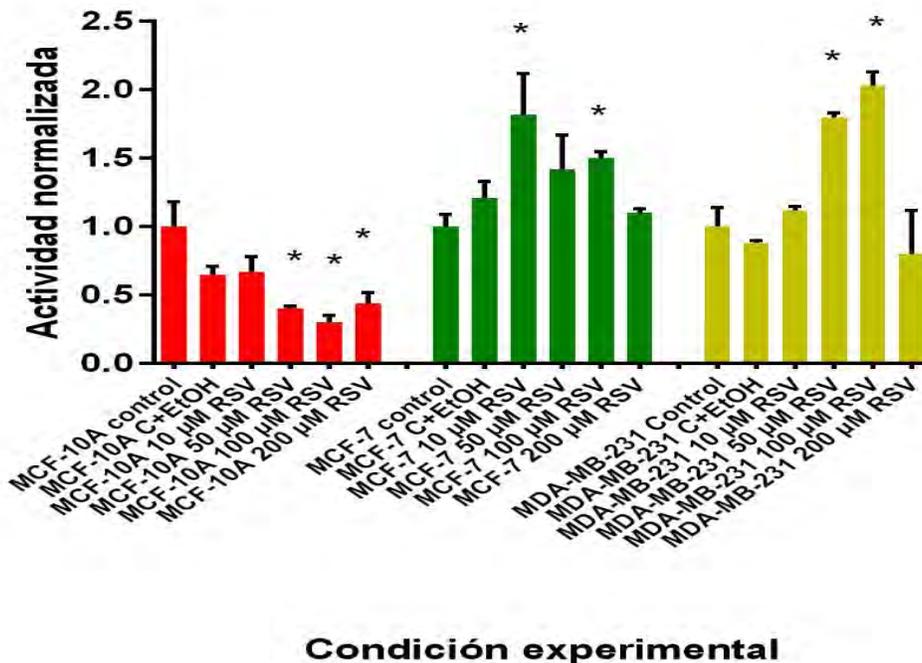


Figura 23. Actividad de caspasa-3 normalizada en las líneas celulares MCF-10A, MCF-7 y MDA-MB-231 después de un tratamiento por 72 h con RSV. ANOVA, n = 3, p \leq 0.05.

8.6.- Expresión del mRNA relativa de SERCA2 y SERCA3 en las líneas celulares tratadas con distintas concentraciones de RSV.

Se procedió a realizar curvas de expresión para identificar la dosis y tiempo a los cuales se lograba mayor expresión del mRNA de nuestros genes de interés, los tiempos probados fueron 12, 24, 48 y 72 h; y las concentraciones fueron de 10, 50 100 y 200 μM . Los resultados muestran que el aumento en la expresión de SERCA3 es dependiente del tiempo de tratamiento y se presenta un comportamiento transitorio, obteniéndose un máximo de expresión a concentraciones intermedias de 50 y 100 μM en el caso de la línea celular MDA-MB-231, casi 6 veces su expresión con respecto al control (Figura 25); en la línea celular MCF-7 se empieza a observar un ligero aumento cuando se aplica una concentración de 200 μM , mientras que durante las concentraciones menores a 200 μM , los niveles se mantienen equiparables al control (Figura 27).

Para el caso de ambas líneas celulares cancerosas (Figuras 24 y 26), se observó que los niveles del mRNA de SERCA2b se mantienen esencialmente constantes en las condiciones probadas, indicando que probablemente el mecanismo por el cual el RSV induce un aumento en la expresión de SERCA3 es específico del gen o de tejido, puesto que sólo mostró incrementar la expresión de la isoforma tejido-específica de la bomba. Los resultados obtenidos en la línea celular no cancerosa MCF-10A muestran que el tratamiento con RSV no afecta la expresión ni de SERCA2b (Figura 28) ni de SERCA3 (Figura 29), al menos en concentraciones bajas (10 y 50 μM) e intermedias (100 μM). Sin embargo, con una concentración

alta (200 μM) durante 72 h se observa que la expresión de SERCA3 se eleva casi 5 veces con respecto al control y la de SERCA2b hasta 2.5 veces.

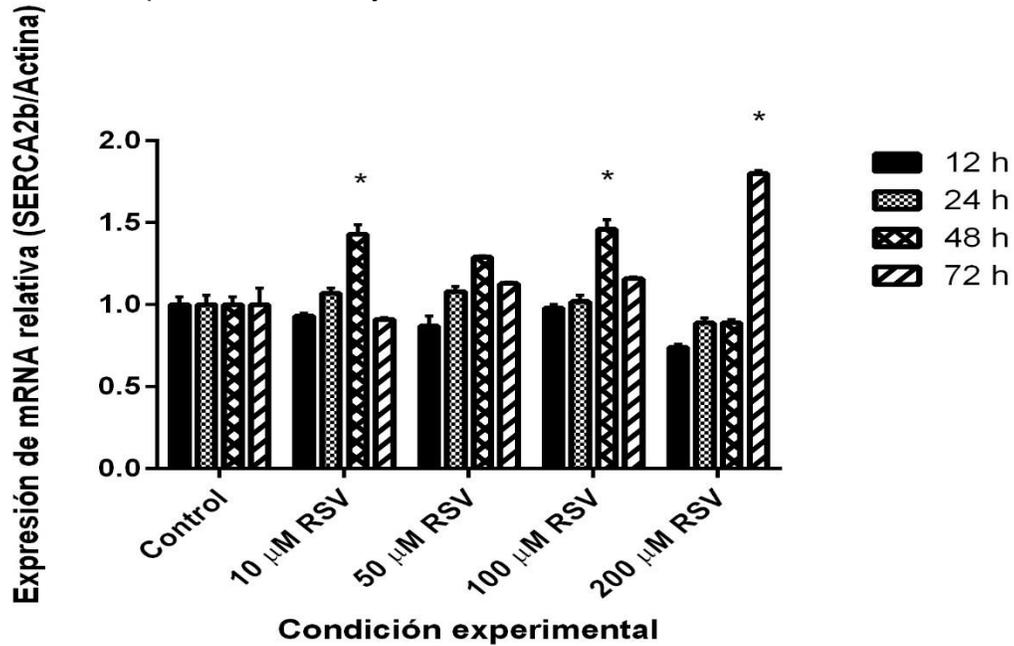


Figura 24. Expresión del mRNA de SERCA2b en la línea celular MDA-MB-231 a distintas concentraciones de RSV y distintos tiempos de tratamiento. ANOVA, $n = 3$, $p < 0.05$.

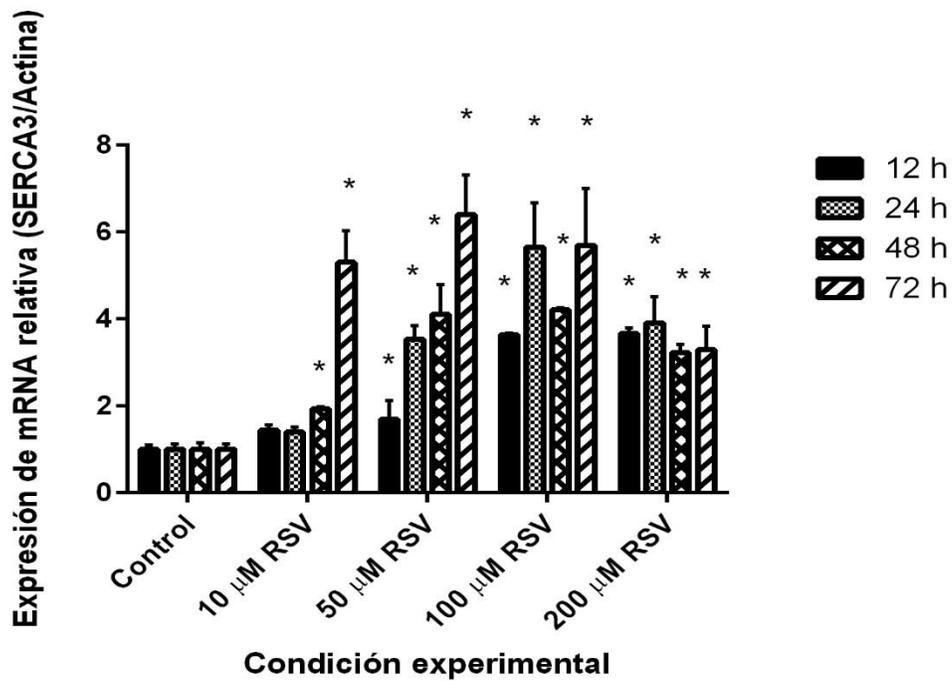


Figura 25. Expresión del mRNA de SERCA3 en la línea celular MDA-MB-231 a distintas concentraciones de RSV y distintos tiempos de tratamiento. ANOVA, $n = 3$, $p < 0.05$.

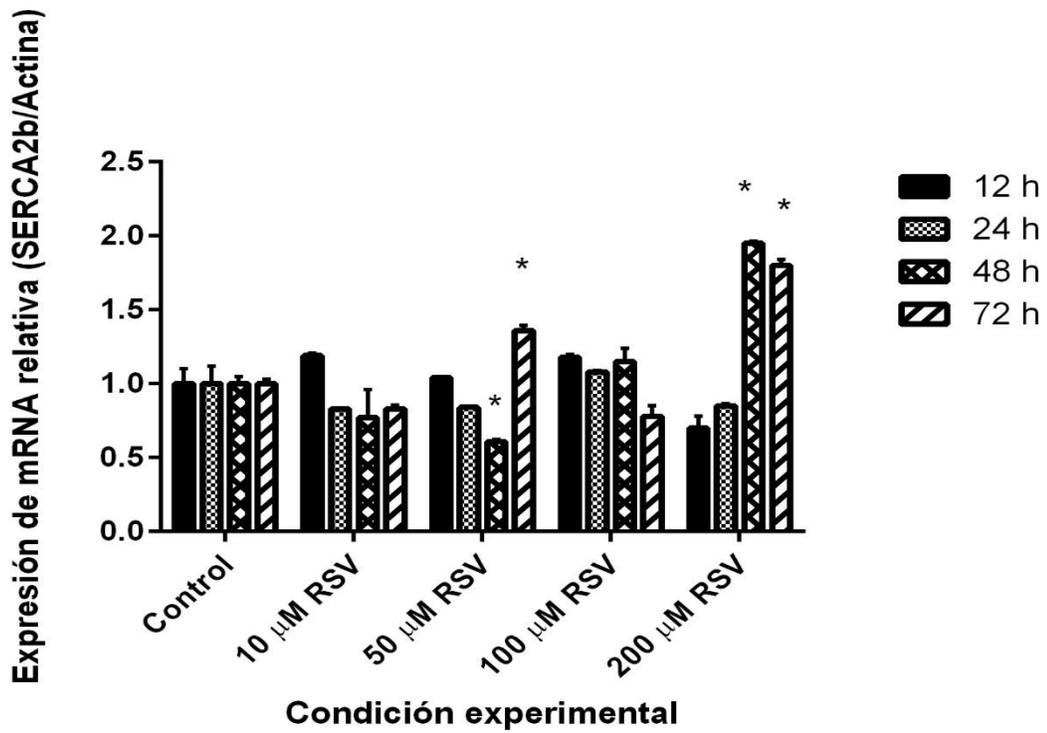


Figura 26. Expresión del mRNA de SERCA2b en la línea celular MCF-7 a distintas concentraciones de RSV y distintos tiempos de tratamiento. ANOVA, n = 3, p<0.05.

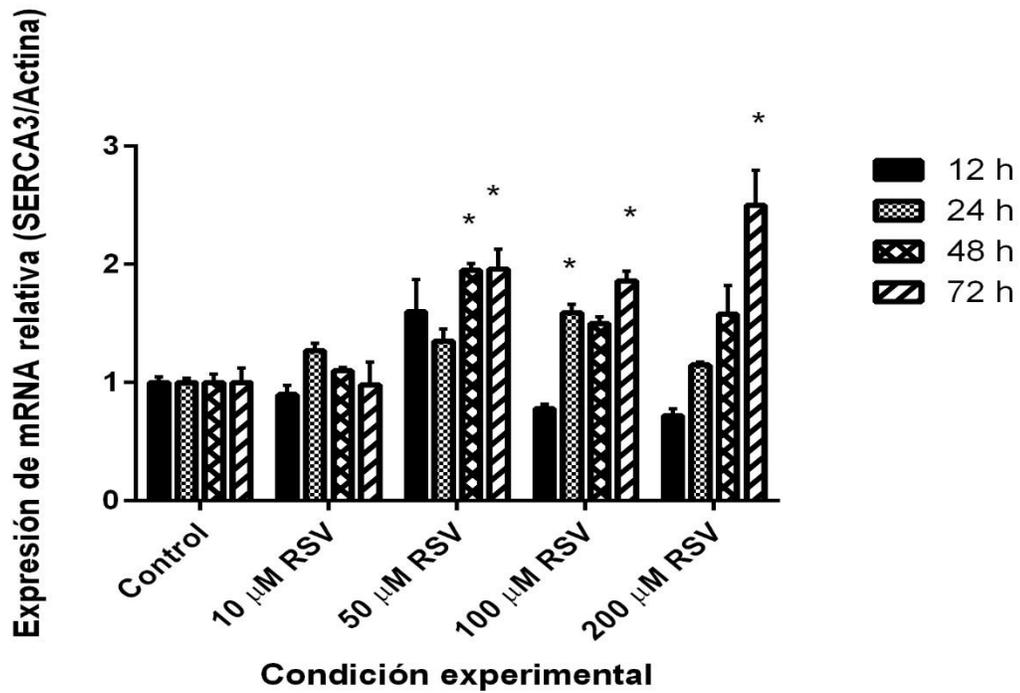


Figura 27. Expresión del mRNA de SERCA3 en la línea celular MCF-7 a distintas concentraciones de RSV y distintos tiempos de tratamiento. ANOVA, n = 3, p<0.05.

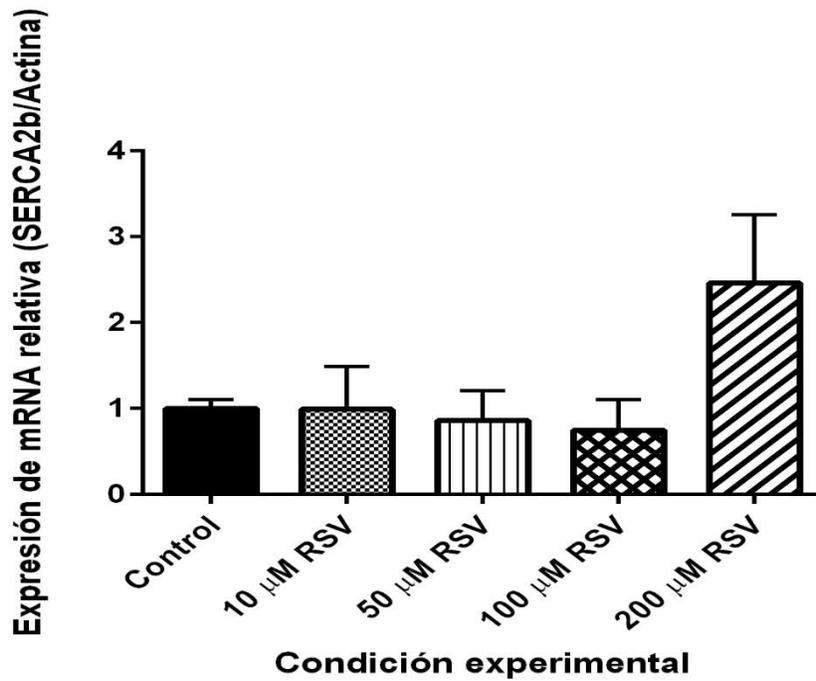


Figura 28. Expresión del mRNA de SERCA2b en la línea celular MCF-10 con distintas concentraciones de RSV a 72 h. ANOVA, n = 3, $p \leq 0.05$.

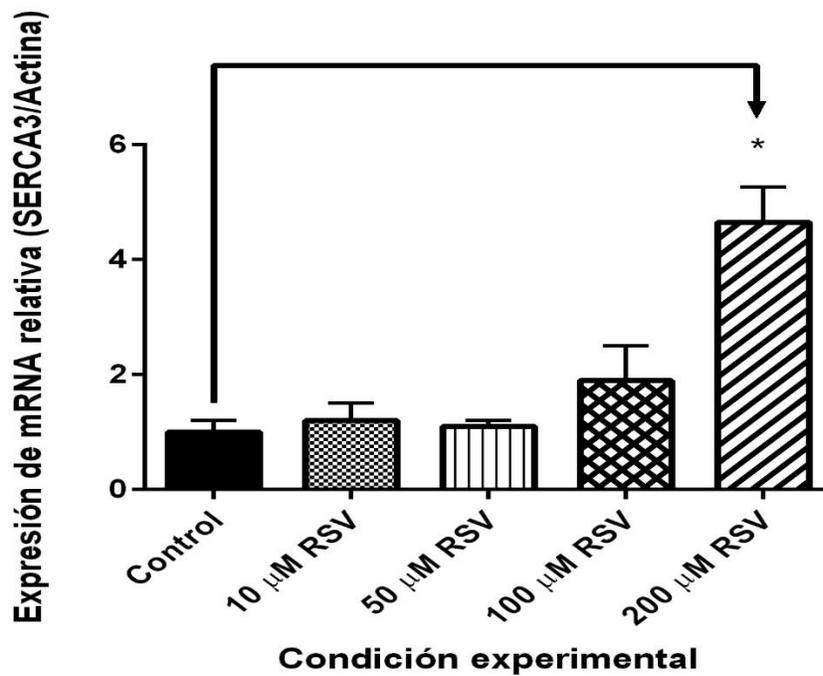


Figura 29. Expresión del mRNA de SERCA3 en la línea celular MCF-10 con distintas concentraciones de RSV a 72 h. ANOVA, n = 3, $p \leq 0.05$.

8.7.- Cambios en el flujo intracelular de Ca²⁺ debido a los tratamientos con RSV en las líneas celulares.

Como se mencionó previamente, los niveles de Ca²⁺ intracelulares juegan un papel importante en la homeostasis celular, controlando diversos procesos como la proliferación y apoptosis. Ya que la bomba SERCA pertenece al sistema de control del Ca²⁺ citosólico, y dado que los resultados previos muestran que el tratamiento con RSV puede incrementar su expresión hasta 6 veces para el caso de SERCA3 a nivel de mRNA en la línea MDA-MB-231, decidimos evaluar si el tratamiento con RSV a la concentración que induce una máxima expresión (50 µM) provocaba cambios en el flujo intracelular de Ca²⁺. Esto lo hicimos mediante el uso del colorante fluorescente de unión a Ca²⁺ FURA-2, AM que es permeable a la membrana celular, por lo que puede introducirse al citosol y unirse específicamente al Ca²⁺, provocando un aumento en la fluorescencia que puede ser monitoreado en tiempo real. Se puede observar que el contenido de Ca²⁺ basal es similar en las líneas MCF-10A y MDA-MB-231, mientras que en la línea MCF-7 es mayor (más del doble). El tratamiento con 50 µM de RSV disminuyó el Ca²⁺ citosólico en las líneas MCF-10A y MCF-7, mientras que lo aumentó en la línea MDA-MB-231 (Figura 30).

Por otro lado, se encontró que las líneas celulares respondían de manera diferente a un estímulo de Tapsigargina, un inhibidor específico de las bombas SERCA que permite determinar la concentración de Ca²⁺ almacenada en el RE. Mientras que en la línea MCF-10A, el Ca²⁺ liberado fue igual tanto en el control como en las células tratadas, el tratamiento provocó una menor liberación de Ca²⁺ en la línea MCF-7 y mayor liberación en la línea MDA-MB-231 (Figura 31).

La tabla 3 resume los resultados obtenidos en las figuras 30 y 31, mostrando los valores numéricos de la $[Ca^{2+}]_i$ así como del Ca^{2+} liberado por el retículo.

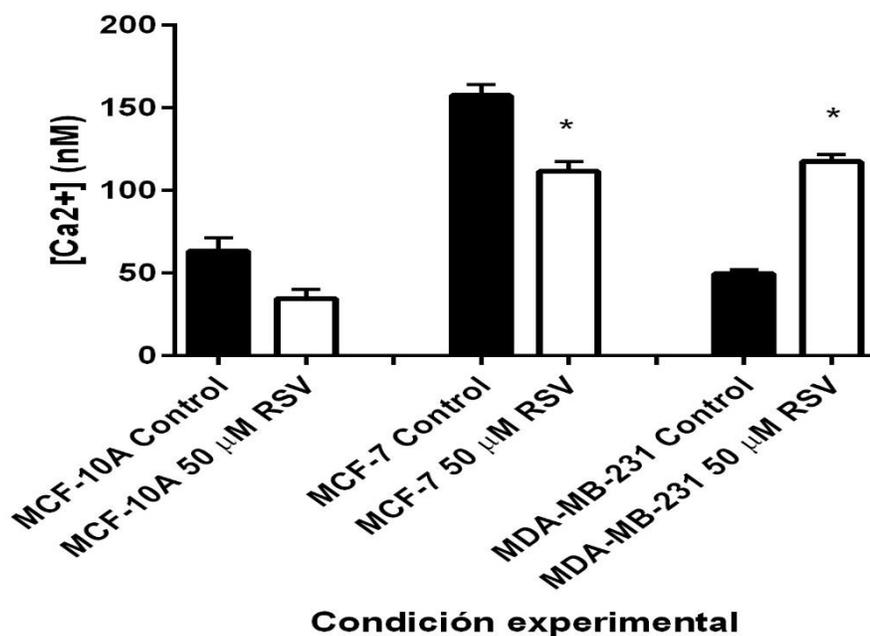


Figura 30. $[Ca^{2+}]$ citosólico basal en las líneas celulares MCF-10A, MCF-7 y MDA-MB-231 tratadas y no tratadas con 50 μ M de RSV por 72 h.. ANOVA, n = 3, $p \leq 0.05$.

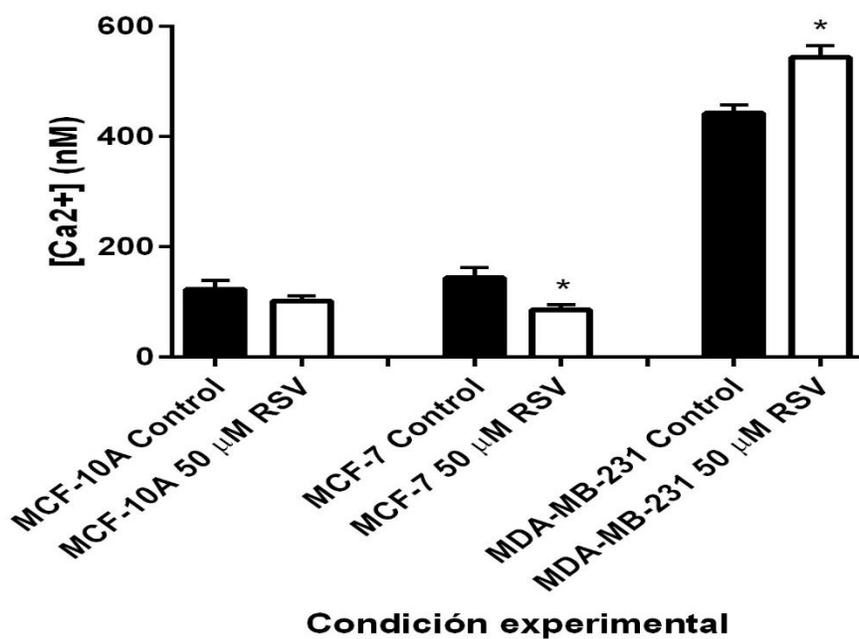


Figura 31. Liberación de $[Ca^{2+}]$ inducida por tapsigargina en las líneas celulares MCF-10A, MCF-7 y MDA-MB-231 tratadas y no tratadas con 50 μ M de RSV por 72 h.. ANOVA, n = 3, $p \leq 0.05$.

Tabla 3. Cuantificaciones de Ca²⁺ citosólico y Ca²⁺ liberado del RE en las líneas celulares MCF-10A, MCF-7 y MDA-MB-231.

Línea celular	Ca ²⁺ citosólico en células Control (nM)	Error estándar	Ca ²⁺ citosólico en células tratadas (nM)	Error estándar	$\Delta[Ca^{2+}]_i$	Ca ²⁺ liberado del RE en células control (nM)	Error estándar	Ca ²⁺ liberado del RE en células tratadas (nM)	Error estándar	$\Delta[Ca^{2+}]$ liberado
MCF-10A	63.34	±8.3	34.67	±5.42	-28.67	123	±16.8	102.2	±9.15	-20.8
MCF-7	157.51	±6.51	111.81	±5.73	-45.7	144.41	±18.24	86.23	±9.55	-58.18
MDA-MB-231	49.83	±2.2	117.6	±4.15	+67.77	442.87	±14.5	544.1	±21.66	+101.23

9. DISCUSIÓN

La expresión disminuida o incluso inexistente de las bombas SERCA ha sido una constante en diversas patologías, entre las cuales se encuentra el cáncer, por lo que se concluye que su expresión alterada incide en el desarrollo normal de la célula. A pesar de esto, no se ha podido encontrar una relación directa entre su expresión alterada y la presentación del proceso carcinogénico. Sin embargo, se piensa que estos cambios en su expresión confieren mayor susceptibilidad a desarrollar esta neoplasia. La alteración en la homeostasis de Ca^{2+} puede contribuir a la modificación de procesos fundamentales como la proliferación, diferenciación y la muerte celular, los cuales son importantes en el proceso carcinogénico. En el mantenimiento de la homeostasis de Ca^{2+} , las bombas SERCA juegan un papel importante para que la célula vuelva a su estado de reposo, evitando que se pierda la regulación de diversas vías de transducción de señales a través de un mecanismo de retroalimentación negativa.

En 2011, Papp y Brouland demostraron que en lesiones pre-cancerosas y cancerosas en la glándula mamaria había una pérdida casi total de la expresión de SERCA3 comparada con tejido epitelial mamario normal (Papp & Brouland, 2011). Estos datos indican que SERCA3 es un nuevo marcador fenotípico que muestra patrones específicos de expresión en glándulas mamarias normales. Los datos presentados por este grupo sugieren que la función de bombeo de Ca^{2+} del RE está relacionada con la carcinogénesis de mama desde etapas muy tempranas razón por la cual propusieron que la detección de los niveles de expresión de SERCA3 puede ser útil para la caracterización inmunofenotípica de lesiones benignas y malignas;

además de que la comprensión de los mecanismos moleculares de la homeostasis de Ca^{2+} en el RE puede abrir nuevas vías hacia un mejor entendimiento de esta neoplasia. Aunado a lo anterior, se sabía por diversos estudios que la administración de dosis micromolares de RSV a cultivos de células de diversos tipos de cáncer de mama provocaba disminución de la proliferación, arresto del ciclo celular, inhibición de metástasis e induce autofagia. No obstante, poco se sabe de los mecanismos moleculares que gobiernan este efecto quimioprotector.

En este trabajo, con la finalidad de investigar el efecto del RSV sobre la expresión de los genes *ATP2A2* y *ATP2A3*, y por lo tanto en la homeostasis de Ca^{2+} intracelular, se utilizaron las líneas celulares cancerosas MCF-7 y MDA-MB-231, las cuales difieren principalmente en que la primera expresa receptores de estrógenos α , mientras que la segunda no expresa ningún tipo de receptor de hormonas, por lo cual se clasifican en subtipos moleculares distintos de cáncer de mama como luminal A y triple negativo, respectivamente. Por otro lado, también se incluyó una línea celular correspondiente a tejido epitelial mamario no canceroso como control, MCF-10A.

Los resultados muestran que, mientras la expresión del mRNA de SERCA2b permanece esencialmente constante en las dos líneas celulares cancerosas después de los tratamientos con RSV, la expresión del mRNA de SERCA3 se vio incrementada, aunque de manera más significativa en la línea celular MDA-MB-231. La expresión de SERCA2b y de SERCA3 en la línea celular control no mostró cambios sino hasta con concentraciones altas de RSV (200 μM), lo cual coincide con un cambio en la morfología de las células que fue observado mediante microscopia

óptica. En las líneas celulares cancerosas se observó una disminución importante del número de células.

Previamente se ha mencionado que el RSV puede modular la expresión de diversas proteínas que funcionan como modulares de la transcripción, ya sea de manera positiva o negativa. Debido a que los promotores de los genes *ATP2A2* y *ATP2A3* son distintos, una posible explicación para los resultados observados que es que se haya alterado la expresión de algún factor de transcripción (o de algún co-activador transcripcional) que pudiera interactuar con algún elemento de respuesta presente en el promotor del gen *ATP2A3*. Sin embargo, las posibilidades que existen para explicar el mecanismo son diversas y se necesita investigación más detallada para resolverlo.

Por otro lado, diversos estudios han mostrado que la dosis es importante al momento de observar los efectos protectores del RSV hacia diversas patologías, lo cual quedó en evidencia en el análisis de expresión de los genes *ATP2A2* y *ATP2A3* en las líneas cancerosas, en el cual se muestra que el mayor incremento de la expresión de *ATP2A3* se dio a una concentración intermedia (50 μ M), mientras que a concentraciones mayores la expresión empezó a disminuir nuevamente hasta niveles equiparables con el control o incluso menores. Para el caso del gen *ATP2A2*, la administración de altas dosis hizo que su expresión aumentara o disminuyera, lo cual podría indicar una desregulación o efecto secundario provocado por el tratamiento. En el caso de la línea celular control se puede observar que la expresión de ambos genes se mantiene constante, pero al observar la expresión cuando se administró una dosis alta se pudo observar un aumento en la expresión

de ambos genes, lo cual se pudiera correlacionar con el cambio en la morfología en las células.

Las proteínas Bcl-2 son una gran familia de reguladores intracelulares de la apoptosis que se encuentran conservadas en la evolución desde los gusanos hasta los humanos (Alberts, Molecular Biology of the Cell, 5th edition). La proteína Bcl-2 bloquea la apoptosis y coopera con c-myc en la transformación celular (Tsujiimoto, 1998); paradójicamente, la familia Bcl-2 contiene otras proteínas que son pro-apoptóticas, a diferencia de la proteína Bcl-2. Una de estas proteínas es BIM (Bcl-2 like protein 11, Bcl2L11) que es capaz de interactuar con algunos otros miembros de la familia de Bcl-2 como Bcl-2, Bcl2L1 y MCL1, entre otros. Estudios previos con ratones transgénicos sugieren que esta proteína funciona como un iniciador esencial de la apoptosis debido a que induce la oligomerización de Bax/Bak en la mitocondria (Gogada et al. 2012). La proteína Ki67 se encuentra principalmente en el núcleo y es considerada un marcador de proliferación debido a que se expresa exclusivamente en células proliferando y la salida del ciclo celular lleva a una disminución dramática de su expresión. Ki67 ha sido asociada con la transcripción del RNA ribosomal ya que su inactivación lleva a la inhibición de la síntesis de éste (Scholzen and Gerdes, 2000).

La resistencia a fármacos es un fenómeno bien conocido que resulta cuando las enfermedades se vuelven tolerantes a tratamientos farmacológicos. Este concepto fue considerado primeramente en bacterias que desarrollan resistencia a ciertos antibióticos, pero desde entonces se han encontrado mecanismos similares en diversas enfermedades, entre ellas el cáncer (Housman et al. 2014).

La quimioterapia y la terapia hormonal son dos de las principales vías del tratamiento contra el cáncer, sin embargo su efectividad se puede ver limitada por la resistencia a fármacos. Los mecanismos de resistencia se pueden dividir en dos: intrínsecos y adquiridos. La resistencia intrínseca indica que antes de recibir la terapia, hay factores pre-existentes que median la resistencia en las células tumorales y hacen que la terapia no sea efectiva. La resistencia a fármacos adquirida se puede desarrollar durante los tratamientos a tumores que fueron inicialmente sensibles, puede ser causada por mutaciones que surgen durante el tratamiento así como a través de otras respuestas adaptativas como la expresión incrementada del agente terapéutico diana y la activación de vías de señalización alternativas compensatorias (Holohan et al. 2013). Estos mecanismos de resistencia afectan a pacientes con diversos tipos de cáncer en la sangre y tumores sólidos, incluyendo cáncer de mama, ovario, pulmón y tracto intestinal (Persidis, 1999).

Cada célula cancerosa de un paciente dado tiene un fondo genético particular que depende no solamente del tejido de origen, sino también de los patrones de activación de oncogenes y la inactivación de supresores de tumores, así como de variaciones aleatorias en la expresión génica como resultado del fenotipo mutante de la mayoría de los cánceres. En consecuencia, cada cáncer expresa un arreglo diferente de genes de resistencia a fármacos, y las células cancerosas aunque sean derivadas clonalmente, exhiben una gran heterogeneidad con respecto a la resistencia a fármacos (Gottesman, 2002).

Los resultados de los análisis de expresión de los marcadores de apoptosis y proliferación en las líneas celulares cancerosas mostraron que en la línea celular MDA-MB-231 hubo una disminución de la expresión del oncogén Bcl-2 en un 50% comparado con el control a las 12 y 24 h de tratamiento con RSV. Resultados muy similares se encontraron con el marcador de proliferación Ki67. Por otro lado, el gen que codifica para la proteína promotora de apoptosis BIM mostró un aumento de su expresión de 2 - 2.5 veces. Sin embargo, en la línea celular MCF-7 se observó que solamente el gen Ki67 se comportaba de la misma manera que en la línea celular MDA-MB-231, mientras que paradójicamente el gen Bcl-2 empezó a mostrar un aumento de su expresión de hasta 2.5 veces a las 24 h, después de que a las 12 h de tratamiento había disminuido en un 10%. Esto indica que probablemente se desarrolló algún mecanismo de resistencia en la línea celular MCF-7, que a diferencia de la línea MDA-MB-231, sí expresa receptores de estrógeno. Se ha observado que las líneas celulares y los tipos de cáncer de mama que expresan receptores de estrógeno muestran una resistencia adquirida frecuentemente después de que al principio respondían a terapia endocrina, lo cual hace que su utilidad sea limitada en muchas ocasiones (Ziauddin, 2014; Osborne and Schiff, 2011). Esto es importante de analizar ya que los estrógenos juegan un papel importante en la patogénesis del cáncer de mama a través del ER α , aproximadamente el 70% de los tumores mamarios son positivos a receptor de estrógeno (García-Becerra et al. 2013).

Múltiples estudios han mostrado que el RSV disminuye la viabilidad celular y proliferación de células de varios tipos de cáncer, incluyendo el cáncer de mama.

Los resultados obtenidos en este trabajo coinciden con lo previamente reportado: el tratamiento con RSV disminuye la viabilidad celular y la proliferación en una manera dependiente del tiempo y de la concentración en una forma directamente proporcional. Sin embargo, se sabe muy poco del mecanismo molecular que gobierna éste proceso, además de que se ha visto que la ruta seguida para la disminución de la proliferación es específica de cada línea celular, por lo cual no se ha podido establecer una vía canónica.

La enzima lipogénica Sintasa de Ácidos Grasos (FASN), también llamada antígeno oncogénico 519, se encuentra altamente expresada en tumores mamarios (Alo, et al. 1999); también se ha visto que la señalización dependiente de FASN regula la expresión, actividad y localización celular del oncogén HER2 en células de cáncer de mama (Vázquez-Martin et al. 2008). Basado en esto, el grupo de Khan en 2014 encontró que el tratamiento con RSV disminuye la expresión del oncogén HER2 por regulación negativa de FASN y de la ciclina D1 en una manera dependiente de la dosis en la línea celular de cáncer de mama SKBR-3, asociando esto con la disminución de la proliferación; por otro lado, el mismo tratamiento provoca una inhibición gradual de la fosforilación de Akt y un aumento en los niveles de su inhibidor, PTEN, lo que provoca alteraciones en la vía de Akt/PI3K/mTOR; además la combinación de RSV con rapamicina (un inhibidor de mTOR) aumenta el efecto de ésta, potenciando una disminución del crecimiento e inducción de apoptosis (Khan et al. 2014). Esto fue corroborado por Alayev en 2015 en las líneas celulares MCF-7 y MDA-MB-231, quien además encontró que la combinación de RSV con rapamicina, además de inducir apoptosis, bloquea la autofagia inducida por el

tratamiento con rapamicina, que es un efecto no deseado por el tratamiento con éste fármaco (Alayev et al. 2015)

La inducción de autofagia (esencial para la generación de varios fenotipos, entre ellos los tumorales) por RSV se da, al menos en las líneas celulares MCF-7 y SUM-159 así como en BCST (Breast Cancer Stem-Like Cells), sumprimiendo la vía de Wnt/ β -catenina, por aumento en la expresión de β -catenina (Fu et al. 2014).

Otros mecanismos también han sido propuestos, uno de ellos involucra a un receptor de superficie celular para el RSV, que fue identificado en la integrina $\alpha\beta v3$, el cual está asociado a la activación de la vía de las MAPK (Lin et al. 2006). En 2014, el grupo de Tang encontró que la disminución en la proliferación en la línea celular de cáncer de mama triple negativa MDA-MB-231 por RSV, se encuentra asociada con la disminución de la expresión de las ciclinas D1, D2 y E2, así como de la CDK2, CDK4 y CDK6. Sin embargo, no se encontró un incremento en la expresión de las proteínas Cip1/p21 y Kip1/p27 (Tang et al. 2014).

El estrés oxidativo ha sido también estudiado como posible mecanismo de inhibición de crecimiento por RSV. El estrés oxidativo juega un papel importante en la iniciación, promoción y progresión del cáncer debido a la inducción de daño al DNA e interfiriendo con diversas vías de transducción de señal (Klauning y Karmendulis, 2004). Se ha postulado que tanto la expresión disminuida o la baja actividad de enzimas antioxidantes es parcialmente responsable de la carcinogénesis, por lo que el aumento de la expresión de estas enzimas así como el aumento de su actividad se ha propuesto como una estrategia efectiva para la prevención y tratamiento contra el cáncer (Khan et al. 2010). Un claro ejemplo es que la inducción de la

actividad de la catalasa a través de progestina ha mostrado ser efectiva contra células de cáncer de mama, inhibiendo su proliferación (Petit et al. 2009). En un estudio realizado en diversos tipos de líneas celulares cancerosas que incluyó cáncer de mama, hepático y de próstata, se demostró que tanto la expresión como la actividad enzimática de SOD2 fue aumentada en las líneas celulares utilizadas después del tratamiento con RSV, aunque la expresión y actividad antioxidante de CAT y SOD1 apenas mostraron un aumento, mientras que no fueron observados cambios en la actividad y expresión de GPX1. El efecto es específico puesto que en líneas celulares no cancerosas no se observaron cambios (Asaduzzaman et al. 2013).

Fortaleciendo la hipótesis del estrés oxidativo en cáncer, un estudio de Singh en 2014 mostró que el tratamiento con RSV inhibe la carcinogénesis en células de epitelio mamario a través de la inducción de vías protectoras mediadas por NRF2 (Singh et al. 2014). NRF2 es un factor de transcripción importante que regula la defensa antioxidante en macrófagos y células epiteliales (Li et al. 2004).

Uno de los principales objetivos en la terapia contra el cáncer es impedir la proliferación de las células cancerosas, o bien, inducir apoptosis de manera específica a éstas sin dañar a las células normales. La apoptosis es un tipo de muerte celular que los organismos multicelulares utilizan para deshacerse de células no deseadas (Taylor et al. 2008). Durante el proceso apoptótico temprano, se puede observar por microscopía de luz un encogimiento celular y picnosis. Con el encogimiento celular, se condensa el citoplasma y los organelos se empaquetan más estrechamente. La picnosis es el resultado de la condensación de la cromatina,

la cual, es la característica más distintiva de la apoptosis (Elmore, 2007). Otra característica que define a este tipo de muerte celular es la hidrólisis extensiva de DNA nuclear en fragmentos de unos 200 pb (Williams et al. 1974).

Disturbios en la regulación del Ca^{2+} en el RE pueden inducir la respuesta a proteínas mal plegadas (UPR), perturbando eventos celulares que están estrechamente ligados con la muerte celular. Quizá, el vínculo más fuerte entre la regulación de Ca^{2+} en el RE y la muerte celular se encuentra en las proteínas de la familia de Bcl-2, muchas de las cuales residen, al menos en parte, en las membranas del RE. Proteínas anti-apoptóticas como Bcl-2 y Bcl-X reducen la concentración basal de Ca^{2+} en el RE, mientras que proteínas pro-apoptóticas como BAX tienen el efecto opuesto. Además, el knockout de los genes que codifican a las proteínas pro-apoptóticas BAX y BAK reduce la concentración de Ca^{2+} en el RE en el estado de reposo, aunque los mecanismos por los cuales las proteínas de la familia de Bcl-2 regulan la concentración de Ca^{2+} en el retículo no se entienden completamente (Kim et al. 2008).

Los defectos en el programa de apoptosis son uno de los mayores factores causales en el desarrollo y progresión del cáncer. La habilidad de las células tumorales para evadir la apoptosis puede jugar un papel importante en la resistencia a regímenes terapéuticos convencionales (Kasibhatla and Tseng, 2003). Las estrategias terapéuticas que restauran las vías de señalización que promueven la apoptosis hacia la normalidad tienen el potencial de eliminar a las células cancerosas, las cuales dependen de estos defectos para sobrevivir (Wong, 2011).

Los resultados de viabilidad celular y proliferación mostraron claramente que había una disminución del número de células después del tratamiento por RSV. Para identificar si ésta disminución se debía a que las células habían entrado en apoptosis, se llevó a cabo un ensayo colorimétrico para la detección de la actividad de la proteína caspasa-3 que es una proteína efectora tanto de la vía extrínseca como de la vía intrínseca de la apoptosis. Los valores de absorbancia muestran que hay actividad de caspasa-3 en las líneas celulares cancerosas que llega a ser hasta aproximadamente un 50% del valor de absorbancia que muestra el control positivo, que es la enzima caspasa-3 purificada en presencia del sustrato que puede hidrolizar. Esto concuerda con reportes previos donde en diversos modelos de cáncer tanto *in vitro* como *in vivo*, se ha visto que existe apoptosis inducida por RSV en cáncer de páncreas (Xu et al. 2015), nasofaríngeo (Cai et al. 2015), de pulmón (Lucas and Kolodziej, 2015), de ovario (Lang et al. 2015), de colon (Demoulin et al. 2015), de piel (Wu et al. 2015), de mama (Joe et al. 2002), leucemia (Peng et al. 2015), entre otros.

La regulación del Ca^{2+} intracelular es un mecanismo de señalización importante para la proliferación tanto en células normales como cancerosas. En células epiteliales normales, la concentración de Ca^{2+} libre es esencial para que las células entren a las fases S y M del ciclo celular. En cambio, las células cancerosas pueden pasar estas fases del ciclo celular con concentraciones de Ca^{2+} libre mucho menores, indicando el desarrollo de un mecanismo alternativo para cumplir los requerimientos de Ca^{2+} intracelular que den paso a las tasas mayores de síntesis de DNA y mitosis que son características de estas células (Taylor et a. 2008). La

expresión alterada de canales iónicos permeables a Ca^{2+} se ha identificado en varios tipos de cáncer de mama. En algunos casos, tales cambios están relacionados con el subtipo de cáncer de mama e incluso con el pronóstico para el paciente. Diversos modelos *in vitro* e *in vivo* han ayudado a identificar canales de Ca^{2+} específicos que tienen un papel importante en la proliferación e invasividad de las células de cáncer de mama. Sin embargo, algunos aspectos para el entendimiento del flujo de Ca^{2+} en cáncer de mama requieren investigación más profunda. Esto incluye la identificación de los mecanismos responsables para la expresión alterada y la estrategia terapéutica más efectiva para apuntar a las células de cáncer de mama a través de canales específicos de Ca^{2+} (Azimi et al. 2014). Aunque parece ser que las alteraciones en la señalización por Ca^{2+} no son el motor principal para la iniciación de la carcinogénesis de mama, estos cambios pueden ser explotados farmacológicamente para reducir la proliferación y metástasis de las células cancerosas de mama o incluso promover muerte celular. La remodelación de la señalización por Ca^{2+} parece ser distinta entre los diversos subtipos de cáncer de mama y pueden ser mediados a través de diferentes mecanismos con consecuencias diferentes (Taylor et al. 2008). Adicionalmente, algunas investigaciones revelan que el Ca^{2+} es un importante modulador positivo de la actividad del RE α en cáncer de mama (Leclercq, 2012).

En varios reportes se ha estudiado el impacto que tienen diversos componentes del sistema de señalización por Ca^{2+} en la regulación intracelular de este catión en varios modelos de cáncer de mama. Algunos de estos componentes son la ATPasa de Ca^{2+} de la membrana plasmática en sus isoformas 2 y 4 (PMCA2 y PMCA4),

canales de Ca^{2+} insensibles a voltaje (VICC), canales de Ca^{2+} operados por voltaje, canales TRPC, canales TRPM, canales TRPV, canales de Ca^{2+} operados por ligando y canales de Ca^{2+} ORAI (Azimi et al. 2014; Curry et al. 2012; Sergeev and Rothen, 1998; Lee et al. 2005). A pesar de esto, no existen estudios que se enfoquen en el papel de la bomba SERCA en este proceso. Uno de los pocos reportes que existen es del grupo del Falcke en 2003, el cual estudió el efecto de la sobre-expresión de la bomba SERCA en el Ca^{2+} intracelular en ovocitos de *Xenopus*, además de desarrollar un modelo matemático que explique el comportamiento de este fenómeno. Ellos observaron, contrariamente a lo que se pensaba, que la sobre-expresión de SERCA provoca una disminución del periodo y un incremento en la amplitud de las ondas de Ca^{2+} ; así como un aumento en el contenido de Ca^{2+} en el RE. Aunque no se comenta nada acerca de si hubieron o no cambios en procesos como proliferación y muerte celular (Falcke et al. 2003).

La modulación celular de las características espacio-temporales de las oscilaciones de Ca^{2+} confiere especificidad y selectividad a las señales mediadas por Ca^{2+} , ya que las moléculas diana activadas por Ca^{2+} como las cinasas dependientes de calmodulina, calcineurina o PKC se activan de manera óptima a distintas frecuencias y amplitudes de las oscilaciones de Ca^{2+} (Pralong et al. 1994; Oancea and Meyer, 1998; De Koninck and Schulman, 1998). Esto puede llevar a la activación diferencial de factores de transcripción como NFAT, NF- κ B y otros, llevando a la modulación de expresión de genes por las oscilaciones de calcio (Dolmetsch et al. 1997; Li et al. 1998; Dolmetsch et al. 1998).

10. CONCLUSIONES

- ❖ El RSV disminuye la viabilidad celular y la proliferación en una manera dependiente de la dosis y del tiempo en las líneas celulares cancerosas MCF-7 y MDA-MB-231, mientras que en la línea celular control MCF-10A no se observaron cambios.
- ❖ El análisis de expresión de los genes Bcl-2, BIM y Ki67 sugiere que el efecto podría ser pro-apoptótico y/o inhibición de la proliferación.
- ❖ El RSV induce la expresión del mRNA de SERCA3 de una manera tipo celular dependiente y con un comportamiento transitorio, encontrándose mayor inducción en la línea celular MDA-MB-231, mientras que en las líneas MCF-7 y MCF-10A no se observaron cambios significativos. La expresión del mRNA de SERCA2b se mantiene relativamente constante en las tres líneas celulares, indicando posiblemente un mecanismo específico sobre la expresión de SERCA3.
- ❖ Los experimentos de apoptosis revelan que hay caspasa-3 activa en las líneas celulares cancerosas tratadas con RSV pero no en la línea celular control.
- ❖ Se observaron cambios en la concentración basal de Ca^{2+} en las 3 líneas celulares pero de manera diferencial, así como cambios en la capacidad de liberación/almacenamiento de Ca^{2+} en el RE.

11. PERSPECTIVAS

Los resultados mostrados en este trabajo muestran que la inducción de la expresión de SERCA3 por RSV es específica comparada con la isoforma ubicua SERCA2b. Sin embargo, no dejan claro el papel que tiene SERCA3 en la homeostasis de Ca^{2+} intracelular, así como su papel en la regulación de diversos procesos celulares fundamentales como la apoptosis y la proliferación celular, los cuales se vieron fuertemente afectados por el tratamiento con RSV, y que son fuertemente afectados en patologías como el cáncer.

Por esta razón, es importante profundizar sobre los mecanismos moleculares que los polifenoles, y en particular el RSV, tienen para poder revertir las características no deseadas que presentan las células cancerosas.

12. BIBLIOGRAFÍA

- Ahmed, S.A., Gogal, R.M. and Walsh, J.E. (1994). "A new rapid and simple nonradioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes: An alternative to [3H]thymidine incorporation assays" *J. Immunol. Meth.* 170, 211–24.
- Alayev A, et al. (2015). "The Combination of Rapamycin and Resveratrol Blocks Autophagy and Induces Apoptosis in Breast Cancer Cells" *Journal of Cellular Biochemistry* 116:450–457.
- Alkhalaf M, et al. (2008). "Resveratrol-induced Apoptosis in Human Breast Cancer Cells Is Mediated Primarily through the Caspase-3-dependent Pathway" *Archives of Medical Research* (39): 162e168.
- Alo PL, Visca P, Trombetta G, et al. (1999). "Fatty acid synthase (FAS) predictive strength in poorly differentiated early breast carcinomas" *Tumori*; 85:35–40.
- Asaduzzaman K. et al. (2013). "Regulatory effects of resveratrol on antioxidant enzymes: A mechanism of growth inhibition and apoptosis induction in cancer cells" *Mol. Cells* 35; 219-225.
- Athar M. et al. (2007). "Resveratrol: A review of preclinical studies for human cancer prevention" *Toxicology and Applied Pharmacology* (224): 274–283.
- Azimi I. et al. (2014). "Calcium influx pathways in breast cancer: opportunities for pharmacological intervention" *British Journal of Pharmacology* (171) 945–960.
- Ben-Porath, I. and RA Weinberg. (2004). "When cells get stressed: an integrative view of cellular senescence" *J. Clin. Invest.* 113:8–13 doi:10.1172/JCI200420663.
- Benz, C.C. (1998). "Transcription factors and breast cancer" *Endocrine-Related Cancer* (5); 271-282.
- Berridge MJ, Martin D. Bootman and H. Llewelyn Roderick (2003). "Calcium signaling: dynamics, homeostasis and remodeling" *Nature Reviews*; (4): 517-529.
- Berridge MJ, Peter Lipp and Martin D. Bootman (2000). "The versatility and universality of calcium signaling" *Nature Reviews*; (1): 11-21.
- Bilal, I et al. (2014). "Phytoestrogens and prevention of breast cancer: the contentious debate". *World J Clin Oncol*; 5(4): 705-712.
- Bobe R et al. (2004). "Identification, expression, function, and localization of a novel (sixth) isoform of the human sarco/endoplasmicreticulum Ca²⁺ATPase 3 gene" *J Biol Chem.* Jun 4;279(23):24297-306.
- Bobe R. et al. (2005). "How many Ca(2)+ATPase isoforms are expressed in a cell type? A growing family of membrane proteins illustrated by studies in platelets". *Platelets.* 2005 May-Jun;16(3-4):133-50.

- Borge P.D. Jr. and B.A. Wolf (2003). "Insuline receptor substrate 1 regulation or sarco-endoplasmic reticulum calcium ATPase 3 in insulin-secreting beta-cells" *J Biol Chem* 278(13): 11359-68.
- Brandl CJ, deLeon S, Martin DR, MacLennan DH. (1987). "Adult forms of the Ca²⁺ATPase of sarcoplasmic reticulum. Expression in developing skeletal muscle" *J Biol Chem*. Mar 15;262(8):3768-74.
- Brandl CJ, Green NM, Korczak B, MacLennan DH. (1986). "Two Ca²⁺ ATPase genes: homologies and mechanistic implications of deduced amino acid sequences" *Cell*. Feb 28;44(4):597-607.
- Brini Marisa and Ernesto Carafoli (2009) "Calcium Pumps in health and disease" *Physiol Rev* (89): 1341–1378
- Brouland J. P., P. Gelebart, et al. (2005). "The loss of sarco/endoplasmic reticulum calcium transport ATPase 3 expression is an early event during the multistep process of colon carcinogenesis" *Am J Pathol* 167(1): 233-42.
- Cai Y. et al. (2015). "Resveratrol inhibits proliferation and induces apoptosis of nasopharyngeal carcinoma cell line C666-1 through AMPK activation" *Die Pharmazie - An International Journal of Pharmaceutical Sciences* 70(6):399-405.
- Chávarri-Guerra, Y. et al. (2012). "Breast cancer in Mexico: a growing challenge to health and the health system" *Lancet Oncol* (13): e335–43.
- Chen F.P. and M.H. Chien (2014). "Phytoestrogens induce differential effects on both normal and malignant human breast cells in vitro" *climacteric*;17:682–691.
- Chomczynski P, and Sacchi N. (1987). "Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction" *Anal Biochem*.162(1):156-9.
- Contreras-Leal E, Ángel Zarain-Herzberg and J.S. García (2010) "Enfermedades asociadas con mutaciones y cambios en la expresión de las ATPasas--Ca²⁺ del retículo sarco(endo)plásmico". *Rev Med UV*, Julio - Diciembre 2010.
- Cornejo, K.M. et al. (2014). "Theranostic and molecular classification of breast cancer" *Arch Pathol Lab Med* (138); 44-56.
- Curry M.C. et al. (2012). "Distinct Regulation of Cytoplasmic Calcium Signals and Cell Death Pathways by Different Plasma Membrane Calcium ATPase Isoforms in MDA-MB-231 Breast Cancer Cells" *The journal of biological chemistry* 287(34); 28598–28608.
- Dally S. et al. (2006) "Ca²⁺-ATPases in non-failing and failing heart: evidence for a novel cardiac sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase 2 isoform (SERCA2c)" *Biochem J*. Apr 15;395(2):249-58.
- De Abreu, F.B. et al. (2014). "Personalized theory for breast cancer" *Clin Genet*, (86); 62–67.
- De Koninck P and Schulman H. (1998). "Sensitivity of CaM kinase II to the frequency of Ca²⁺ oscillations" *Science*. Jan 9;279(5348):227-30.
- De Meis L and A.L. Vianna (1979). "Energy interconversion by the Ca²⁺-dependent ATPase of the sarcoplasmic reticulum" *Annu Rev Biochem* (48): 275-92.

- De Meis L., A.P. Arruda et al. (2003). "The thermogenic function of the sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺ ATPase of normal and hyperthyroid rabbit" *Ann N Y Acad Sci* (986): 481-8.
- Demoulin B. et al. (2015). "Resveratrol induces DNA damage in colon cancer cells by poisoning topoisomerase II and activates the ATM kinase to trigger p53-dependent apoptosis" *Toxicol In Vitro*. 29(5):1156-1165.
- Dode L¹, De Greef C, Mountian I, Attard M, Town MM, Casteels R, Wuytack F. (1988) "Structure of the human sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase 3 gene. Promoter analysis and alternative splicing of the SERCA3 pre-mRNA". *J Biol Chem*. May 29;273(22):13982-94.
- Dolmetsch RE, Lewis RS, Goodnow CC, Healy JI. (1997). "Differential activation of transcription factors induced by Ca²⁺ response amplitude and duration" *Nature*. Apr 24;386(6627):855-8.
- Dolmetsch RE¹, Xu K, Lewis RS. (1998). "Calcium oscillations increase the efficiency and specificity of gene expression" *Nature*. 1998 Apr 30;392(6679):933-6.
- Duffy, C. et al. (2007). "Implications of phytoestrogens intake for breast cancer" *CA Cancer J Clin* (57): 260–277.
- Dworkin, A.M. et al. (2009). "Epigenetics alterations in the breast: implications for breast cancer detection, prognosis and treatment" *Seminars in Cancer Biology* (19); 165–171.
- Elmore, S. (2007). "Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death" *Toxicol Pathol*; 35(4): 495–516.
- Endo Y. et al. (2004). "Sarcoendoplasmic reticulum Ca(2+) ATPase type 2 downregulated in human oral squamous cell carcinoma". *Int J Cancer* 110(2): 225-31.
- F. Wuytack, L. Raeymaekers, L. Missiaen (2002). "Molecular physiology of the SERCA and SPCA pumps" *Cell Calcium* 32(5–6), 279–305.
- Falcke M. et al. (2003). "Modeling the Dependence of the Period of Intracellular Ca²⁺ Waves on SERCA Expression" *Biophysical Journal* (85): 1474–1481.
- Flores Peredo L and Zarain-Herzberg A. (2012) "Expresión de los genes SERCA en cáncer gastrointestinal humano: Diferenciación celular y cáncer con énfasis en el manejo de calcio". Editorial académica española.
- F-P. Chen and M-H. Chien (2014). "Phytoestrogens induce differential effects on both normal and malignant human breast cells *in vitro*". *Climacteric* 17(6): 682-691.
- Fu Y, et al. (2014). "Resveratrol Inhibits Breast Cancer Stem-Like Cells and Induces Autophagy via Suppressing Wnt/b-Catenin Signaling Pathway" *PLoS One* 9(7): e102535.
- Fucito A. et al. (2007). "Genetic and epigenetic alterations in breast cancer: What are the perspectives for clinical practice?" *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* (40): 565–75.
- García-Becerra R et al. (2013). "Mechanisms of resistance to endocrine therapy in breast cancer: focus on signalling pathways, miRNAs and genetically based resistance" *Int. J. Mol. Sci.* 14, 108-145.

- Gelebart P. et al. (2002). "Expression of endomembrane calcium pumps in colon and gastric cancer cells. Induction of SERCA3 expression during differentiation" *J Biol Chem* 277(29): 26310-20.
- Ghoncheh, M et al. (2015). "Incidence and Mortality of Breast Cancer and their Relationship with the Human Development Index (HDI) in the World in 2012" *Asian Pac J Cancer Prev.* 16(18):8439-43.
- Gniadecki R. and B. Gajkowska (2003). "Intracellular calcium pool emptying induces DNA synthesis in HaCaT Keratinocytes" *Exp Dermatol* 12(4): 453-9.
- Gogada, R. et al. (2012). "BIM, a proapoptotic protein, upregulated via transcription factor E2F1-dependent mechanisms, functions as a prosurvival molecule in cancer" *J. Biol. Chem.* doi: 10.1074/jbc.M112.386102.
- Gottesman M. et al. (2002). "Mechanisms of cancer drug resistance" *Annu. Rev. Med.* 53: 615–27.
- Heather B. Patisaul* and Wendy Jefferson (2010). "The pros and cons of phytoestrogens" *Front Neuroendocrinol*, 31(4): 400–419.
- Holohan C. et al. (2013). "Cancer drug resistance: an evolving paradigm" *Nature Rev Cancer* 13; 714-726.
- Housman G. et al. (2014). "Drug resistance in cancer: an overview" *Cancers* 6; 1769-1792.
- Inesi G¹, Lewis D, Ma H, Prasad A, Toyoshima C. (2006) "Concerted conformational effects of Ca²⁺ and ATP are required for activation of sequential reactions in the Ca²⁺+ATPase (SERCA) catalytic cycle" *Biochemistry*. Nov 21;45(46):13769-78.
- Joe A.K. et al. (2002). "Resveratrol induces growth inhibition, S-phase arrest, apoptosis, and changes in biomarker expression in several human cancer cell lines" *Clin Cancer Res*; 8:893-903.
- Joe AK, Hui L and Suzui M (2002). "Resveratrol induces growth inhibition, S-phase arrest, apoptosis, and changes in biomarker expression in several human cancer cell lines" *Clin Cancer Res*; (8); 893-903.
- Jones LJ, Gray M, Yue ST, Haugland RP, Singer VL, (2001), "Sensitive determination of cell number using the CyQUANT cell proliferation assay" *J Immunol Methods* 254:85-98
- Kasibhatla, S. and B. Teng. (2003). "Why Target Apoptosis in Cancer Treatment?" *Molecular Cancer Therapeutics* (2); 573–580.
- Khan A, et al. (2014). "Resveratrol suppresses the proliferation of breast cancer cells by inhibiting fatty acid synthase signaling pathway" *Cancer Epidemiology* 38; 765–772.
- Khan, M.A., Tania, M., Zhang, D.Z., and Chen, H.C. (2010). "Antioxidant enzymes and cancer" *Chin. J. Cancer Res.* 22; 87-92.
- Kim, I. et al. (2008). "Cell death and endoplasmic reticulum stress: disease relevance and therapeutic opportunities" *Nat Rev* (7): 1013-1030.
- Klaunig, J.E., and Kamendulis, L.M. (2004). "The role of oxidative stress in carcinogenesis" *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 44; 239-267.

- Korczak B¹, Zarain-Herzberg A, Brandl CJ, Ingles CJ, Green NM, MacLennan DH. (1988). "Structure of the rabbit fast-twitch skeletal muscle Ca²⁺-ATPase gene" *J Biol Chem*. Apr 5;263(10):4813-9.
- Korosec B. et al. (2006). "Alterations in the ATP2A2 gene in correlation with colon and lung cancer" *Cancer Genet Cytogenet* 171(2): 105-11.
- Korosec B. et al. (2008). "Alterations in genes encoding sarcoplasmic-endoplasmic reticulum Ca(2+) pumps in association with head and neck squamous cell carcinoma" *Cancer Genet Cytogenet* 181(2): 112-8.
- Korosec B. et al. (2009). "ATP2A3 gene is involved in cancer susceptibility. *Cancer Genet Cytogenet* 188(2): 88-94.
- Kovács T et al. (2001). "All three splice variants of the human sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase 3 gene are translated to proteins: a study of their co-expression in platelets and lymphoid cells". *Biochem J*. Sep 15;358(Pt 3):559-68.
- Lang F. et al. (2015). "Apoptotic Cell Death Induced by Resveratrol Is Partially Mediated by the Autophagy Pathway in Human Ovarian Cancer Cells" *PLoS One* DOI: 10.1371/journal.pone.0129196.
- Le corre L. et al. (2005). "Resveratrol and breast cancer chemoprevention: molecular mechanisms" *Mol Nutr Food Res* (49): 462 – 471.
- Lee W.J. et al. (2005). "Plasma membrane calcium-ATPase 2 and 4 in human breast cancer cell lines" *Biochemical and Biophysical Research Communications* (337) 779–783.
- León-Galicia et al. (2013). "Resveratrol induces downregulation of DNA repair genes in MCF-7 human breast cancer cells" *European Journal of Cancer Prevention* (22):11–20.
- Lequercq G. (2012). "Calcium-induced activation of estrogen receptor alpha – New insight" *Steroids* 77: 924–927.
- Li N. et al. (2004). "Nrf2 is a key transcription factor that regulates antioxidant defense in macrophages and epithelial cells: Protecting against the proinflammatory and oxidizing effects of diesel exhaust chemicals" *J Immunol*; 173: 3467-3481.
- Li W et al. (1998). "Cell-permeant caged InsP3 ester shows that Ca²⁺ spike frequency can optimize gene expression" *Nature*. 1998 Apr 30;392(6679):936-41.
- Li Y. et al. (2006). "Resveratrol-Induced Cell Inhibition of Growth and Apoptosis in MCF7 Human Breast Cancer Cells Are Associated With Modulation of Phosphorylated Akt and Caspase-9" *Applied Biochemistry and Biotechnology* (135): 181-92.
- Lin HY et al. (2006). "Integrin alphaVbeta3 contains a receptor site for resveratrol. *FASEB J*; 20:1742–1744.
- Lipskaia L., J.S. Hulot, and A.M. Lompre (2007). "Role of sarco/endoplasmic reticulum calcium content and calcium ATPase activity in the control of cell growth and proliferation" *Pflugers Arch* 457(3): 673-85.
- Liu L. H., G. P. Boivin, et al. (2001). "Squamous cell tumors in mice heterozygous for a null allele of *Atp2a2*, encoding the sarco(endo)plasmic

reticulum Ca²⁺-ATPase isoform 2 Ca²⁺ pump”.. J Biol Chem 276(29): 26737-40.

- Liu L.H., et al. (2001). “Squamous cell tumors in mice heterozygous for a null allele of Atp2a2, encoding the sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺-ATPase isoform 2 Ca²⁺ pump” J Biol Chem, 2001. 276(29): p. 26737-40.
- Lucas I.K. and Kolodziej H. (2015). “Trans Resveratrol Induces Apoptosis through ROS-Triggered Mitochondria-Dependent Pathways in A549 Human Lung Adenocarcinoma Epithelial Cells” *Planta Med*81(12-13):1038-1044.
- Lytton J, Zarain-Herzberg A, Periasamy M, MacLennan DH. (1989). “Molecular cloning of the mammalian smooth muscle sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺-ATPase.” J Biol Chem. Apr 25;264(12):7059-65.
- MacLennan D.H., William J.R and N.M. Green (1997). “The mechanism of Ca²⁺ transport by Sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺ ATPases” J. Biol. Chem. 272:28815-28818.
- Martin V et al. (2002). “Three novel sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase (SERCA) 3 isoforms. Expression, regulation, and function of the membranes of the SERCA3 family” J Biol Chem. 2002 Jul 5;277(27):24442-52.
- Matsumoto A. et al. (2015). “Biological markers of invasive breast cancer” *Jpn J Clin Oncol.* pii: hyv153.
- Milán F. et al. (2008). “Resveratrol: nuevos retos en el tratamiento antienvjecimiento” *Salud Estética* (5): 66-70.
- Moldovan, L. et al. (2013). “Classification of breast carcinomas according to gene expression profiles” *Journal of Medicine and Life* 6 (1); 14-17.
- Monteith G.R., D. McAndrew et al. (2007). “Calcium and cancer: Targeting Ca²⁺ transport” *Nat Rev Cancer* 7(7); 519-30.
- Nicholson, D.W., et al. (1995). “Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis” *Nature*, 376, 37-43.
- Oancea E and Meyer T. (1998). “Protein kinase C as a molecular machine for decoding calcium and diacylglycerol signals” *Cell*. Oct 30;95(3):307-18.
- Osborne C. and R Schiff. (2011). “Mechanisms of Endocrine Resistance in Breast Cancer” *Annu. Rev. Med.* 62:233–47.
- Pacifico F.L. et al. (2003). “The expression of the sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPases in thyroid and its down-regulation following neoplastic transformation” *J Mol Endocrinol* 30(3): 399-409.
- Papoutsis A.J. et al. (2010). “Resveratrol Prevents Epigenetic Silencing of BRCA-1 by the Aromatic Hydrocarbon Receptor in Human Breast Cancer Cells” *J Nutr* (140): 1607–1614.
- Papp B. and J.P. Brouland (2011). “*Altered Endoplasmic Reticulum Calcium Pump Expression during Breast Tumorigenesis.* *Breast Cancer (Auckl)* 5: 163-74.
- Paredes, R.M. et al. (2008). “Chemical calcium indicators. *Methods* (46): 143-151.

- Park SJ¹ et al. (2012) “Resveratrol ameliorates aging-related metabolic phenotypes by inhibiting cAMP phosphodiesterases” *Cell*. Feb 3;148(3):421-33. doi: 10.1016/j.cell.2012.01.017.
- Patisaul HB and Jefferson W. (2010). “The pros and cons of phytoestrogens” *Front Neuroendocrinol.* (4):400-19. doi: 10.1016/j.yfrne.2010.03.003.
- Peng D.Y. et al. (2015). “Resveratrol-downregulated phosphorylated liver kinase B1 is involved in senescence of acute myeloid leukemia stem cells” *J Huazhong Univ Sci Technol [Med Sci]* 35(4): 485-489.
- Persidis A. (1999). “Cancer multidrug resistance” *Nature Biotechnology* 17; 94–9.
- Petit, E., Courtin, A., Kloosterboer, H.J., Rostène, W., Forgez, P., and Gompel, A. (2009). “Progestins induce catalase activities in breast cancer cells through PRB isoform: correlation with cell growth inhibition” *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 115; 153-160.
- Pfaffl M.W. (2001). “A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR” *Nucleic Acids Res.* May 1;29(9):e45.
- Pozo-Guisado E, et al. (2002). “The antiproliferative activity of resveratrol results in apoptosis in MCF-7 but not in MDA-MB-231 human breast cancer cells: cell-specific alteration of the cell cycle” *Biochemical Phar* (64); 1375-1386.
- Pozo-Guisado E, et al. (2005). “Resveratrol-induced apoptosis in MCF-7 human breast cancer cells involves a caspase-independent mechanism with downregulation of Bcl-2 and NF-κB” *Int. J. Cancer:* (115); 74–84.
- Pozo-Guisado et al. (2002). “The antiproliferative activity of resveratrol results in apoptosis in MCF-7 but not in MDA-MB-231 human breast cancer cells cell-specific alteration of the cell cycle” *Biochem Pharmacology* (64): 1375-86.
- Pralong WF, Spät A, Wollheim CB (1994). “Dynamic pacing of cell metabolism by intracellular Ca²⁺ transients” *J Biol Chem.* Nov 4;269(44):27310-4.
- Rice S and Whitehead SA. (2006) “Phytoestrogens and breast cancer--promoters or protectors?” *Endocr Relat Cancer.* (4):995-1015. Review.
- Roderick H. L. and S. J. Cook (2008). “Ca²⁺ signaling checkpoints in cancer: remodeling Ca²⁺ for cancer cell proliferation and survival” *Nat Rev Cancer* 8(5); 361-75.
- Sajish, M. & P. Schimmel (2014). “A human tRNA synthetase is a potent PARP1- activating effector for resveratrol”. *Nature* doi:10.1038/nature14028.
- Sareen D, et al. (2007). “Mitochondria, calcium and calpain are key mediators of resveratrol-induced apoptosis in breast cancer” *Mol Pharmacol* (72):1466–1475.
- Sareen D. et al. (2007). “Mitochondria, calcium and calpain are key mediators of resveratrol-induced apoptosis in breast cancer” *Mol Pharmacol* (72): 1466-75.
- Scholzen, T. and J, Herdes. (2000). “The Ki-67 Protein: From the Known and the Unknown” *Journal of cellular physiology* (182):311–322.
- Sergeev I.N. and W.B. Rothen. (1998). “Regulation of Intracellular Calcium in Human Breast Cancer Cells” *Endocrine* 9(3): 321-327.

- Shi Y, et al. (2011). "Resveratrol induces apoptosis in breast cancer cells by E2F1-mediated up-regulation of ASP1" *Oncology reports* (25): 1713-1719.
- Singh B. et al. (2014). "Resveratrol inhibits estrogen-induced breast carcinogenesis through induction of NRF2-mediated protective pathways" *Carcinogenesis* 35 (8); 1872–1880.
- Suman Rice and Saffron A Whitehead (2006). "Phytoestrogens and breast cancer: promoters or protectors?" *Endocrine related cancer* (13): 995–1015.
- Taherian-Fard, A. et al. (2014). "Breast cancer classification: linking molecular mechanisms to disease prognosis" *Briefings in bioinformatics* <http://dx.doi.org/10.1093/bib/bbu020>.
- Tang Y et al. (2014). "Anti-proliferative and gene expression actions of resveratrol in breast cancer cells *in vitro*" *Oncotarget* 5 (24): 12891 – 12907.
- Taylor T. et al. (2008). "Calcium signalling and T-type calcium channels in cancer cell cycling" *World J Gastroenterol*; 14(32): 4984-4991.
- Taylor, R.C. et al. (2008). "Apoptosis is a mode of cell death that is used by multicellular organisms to dispose of unwanted cells in a diversity of settings" *Nat Rev Mol Cell Bio* (9): 231-241.
- Tennen RI¹, Michishita-Kioi E, Chua KF. (2012) "Finding a target for resveratrol" *Cell*. Feb 3;148(3):387-9. doi: 10.1016/j.cell.2012.01.032.
- Toyoshima C¹, Mizutani T. (2004). "Crystal structure of the calcium pump with a bound ATP analogue" *Nature*. Jul 29;430(6999):529-35. Epub 2004 Jun 30.
- Tsujimoto, Y (1998). "Role of Bcl-2 family proteins in apoptosis: apoptosomes or mitochondria?" *Genes to Cells* (3); 697–707.
- Vázquez-Martin A, Colomer R, Brunet J, Lupu R, Menendez JA. (2008). "Overexpression of fatty acid synthase gene activates HER1/HER2 tyrosine kinase receptors in human breast epithelial cells" *Cell Prolif* 41: 59–85.
- Williams, J. R., Little, J. B. & Shipley, W. U. (1974). "Association of mammalian cell death with a specific endonucleolytic degradation of DNA" *Nature* 252, 754–755.
- Wong, R.S. (2011). "Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment" *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* 30: 87-101.
- Wu Z. et al. (2015). "Resveratrol inhibits the proliferation of human melanoma cells by inducing G1/S cell cycle arrest and apoptosis" *Mol Med Rep* 11(1):400-404.
- Xu Q. et al. (2015). "Resveratrol in the treatment of pancreatic cancer" *Ann. N.Y. Acad. Sci* doi: 10.1111/nyas.12837.
- Yang DJ, et al. (2001). "In vivo and in vitro measurement of apoptosis in breast cancer cells using annexin V" *Cancer biotherapy & radiopharmaceuticals* 16 (1); 73-83.
- Zarain-Herzberg A, Alvarez-Fernández G. (2002). "Sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺-ATPase-2 gene: structure and transcriptional regulation of the human gene." *ScientificWorldJournal*. May 29;2:1469-83.
- Zarain-Herzberg A, MacLennan DH, Periasamy M. (1990). "Characterization of rabbit cardiac sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺(+)-ATPase gene" *J Biol Chem*. Mar 15;265(8):4670-7.

- Ziauddin M. et al. (2014). "Emerging strategies to overcome resistance to endocrine therapy for breast cancer" *Cancer Metastasis Rev* 33:791–807.
- Ziegler, R (2004). "Phytoestrogens and breast cancer". *Am J Clin Nutr*;(79): 183–4.