



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

FACULTAD DE MEDICINA

**SILENCIAMIENTO DEL GEN BIK/BH3 MEDIANTE RNAi Y SU PARTICIPACIÓN  
EN EL PROCESO DE APOPTOSIS CELULAR EN CANCER DE MAMA**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE

DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA

ARACELI RUBI VIEDMA RODRIGUEZ

DIRECTOR DE TESIS: DR. DIEGO JULIO ARENAS ARANDA

FACULTAD DE MEDICINA

COMITÉ TUTORAL: DR. ALEJANDRO GARCÍA CARRANCA

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

DR. FABIO SALAMANCA GÓMEZ

FACULTAD DE MEDICINA

**MEXICO, D.F. MARZO DEL 2014**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.

**SILENCIAMIENTO DEL GEN BIK/BH3 MEDIANTE RNAi Y  
SU PARTICIPACION EN EL PROCESO DE APOPTOSIS  
CELULAR EN CÁNCER DE MAMA**

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Posgrado en ciencias Biomédicas de la UNAM por el apoyo incondicional recibido durante el Doctorado

Apoyos recibos:

El presente trabajo de tesis fue apoyado por

El consejo Nacional de Ciencia y Tecnología a través de la beca No 215815 y la beca Mixta 46365 (España).

Al Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) a través de la beca con número de folio 2010049

A la beca complementaria de apoyo de movilidad estudiantil UNAM, por la compra del boleto de avión destino Madrid.

Al Dr. Diego Julio Arenas Aranda, por permitirme formar parte de su grupo de trabajo, por su tiempo, sugerencias durante esté proyecto de investigación y sobre todo por confiar en mí y apoyarme en todo momento.

A los miembros del comité tutorial Dr. Alejandro García Carranca y Dr. Fabio Salamanca por todas sus aportaciones al presente trabajo, por la confianza y el apoyo incondicional.

Al Dr. Luis Arturo Baiza Gutman por las sugerencias recibidas para éste presente trabajo.

A la M en C. Ruth Ruiz Garrido y el Dr. Miguel Velázquez Flores por la ayuda en el análisis de microarreglos y los datos bioinformáticos.

A los miembros del jurado de tesis por las sugerencias tan acertadas para esta presente tesis, a los doctores:

Dra. Martha Robles Flores

Dr. Diego Arenas Aranda

Dra. Marcela Lizano Soberón

Dr. Federico Ávila Moreno

Dr. Efraín Garrido Guerrero

## **AGRADECIMIENTOS PERSONALES**

Leer esto significa que la tesis por fin “ha terminado”, y este es el momento de agradecer a todas las personas que han participado de manera importante en la elaboración de esta tesis doctoral. Son muchas las personas que a lo largo de estos años del Doctorado incluso a lo largo de toda mi vida en curso han estado a mi lado animándome y dándome ilusiones para poder llegar a la meta, espero poder reflejar a toda esa gente mi más sincero agradecimiento por todo ello.

En especial a mi familia: mis papás y mi hermano por el apoyo incondicional a lo largo de todos estos años, finalmente es un logro compartido, así que lo logramos. Sin ustedes muchas cosas no hubieran sido posibles, mil gracias.

Al laboratorio de la unidad de Morfofisiología al Dr. Luis Arturo Baiza Gutman y a la Dra. Guadalupe Martínez Hernández, muchas gracias por haberme abierto las puertas de su laboratorio por integrarme como un miembro más y sobre todo por su amistad, mil gracias.

A todos mis compañeros y amigos del laboratorio de Morfofisiología del laboratorio 3, muchas gracias por compartir su amistad.

Al Maestro Héctor Barrera por todo su apoyo incondicional durante todo este tiempo, gracias.

A mis amigos y a todas aquellas personas que coincidieron y compartieron algún momento de mi vida conmigo.....gracias.

***“Con constancia y tenacidad se obtiene lo que se desea; la palabra imposible no tiene significado”. (Napoleón Bonaparte).***

# ÍNDICE GENERAL

Páginas

GLOSARIO.....	1- 2
RESUMEN.....	3-4
ABSTRACT.....	5-6
INTRODUCCIÓN	
CÁNCER	
Que es el cáncer?.....	7
Rasgos del cáncer.....	7-9
CANCER MAMARIO	
Cáncer de mama.....	9-10
Factores de riesgo.....	10
Incidencia del cáncer de mama.....	10-13
Patología del cáncer de mama.....	13-15
QUIMIOTERAPIA PARA EL CANCER MAMARIO	
Tamoxifen.....	15
Mecanismo de acción del estrógeno.....	16-21
Mecanismos de resistencia a Tamoxifen.....	21-23

## **APOPTOSIS**

**Apoptosis.....24**

**Características bioquímicas de la apoptosis.....24-25**

**Ruta extrínseca de la apoptosis.....25-26**

**Ruta intrínseca de la apoptosis.....27-31**

**Características químicas, bioquímicas de BIK.....32-34**

**JUSTIFICACIÓN.....35**

**ANTECEDENTES.....35**

**OBJETIVO GENERAL.....36**

**OBJETIVOS PARTICULARES.....36**

**HIPOTÉSIS.....36**

**ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....37-38**

**MATERIAL Y MÉTODOS.....39-52**

## **RESULTADOS**

**Determinación de la IC50 del TAM en la línea celular MCF-7.....53**

**Determinar si el TAM induce la expresión de Bik en la línea celular MCF-7.....54-55**

**Determinación de los tiempos de transfección para inhibir la expresión de Bik.....56**

**La supresión de Bik inhibe su expresión en respuesta a TAM.....57**

La supresión del gen Bik inhibe la pérdida del potencial de membrana ( $\Delta\Psi_m$ ) y la liberación del citocromo c (Cyt C).....	58-60
La Supresión de Bik protege contra la activación de caspasas y apoptosis.....	61-63
La baja expresión de Bik genera resistencia a TAM en células MCF-7 regulando miembros de la familia pro-apoptóticas y anti-apoptóticas.....	64-66
Determinación de la expresión génica global por microarreglos de expresión....	67-71
Predicción de las rutas celulares afectadas en la comparación de siRNAiBik/TAM y células expuestas con TAM.....	72
Análisis de rutas de señalización mediante el programa KEGG en células transfectadas con Bik expuestas a TAM.....	73-76
Validación del análisis de microarreglos.....	77-79
La supresión de BIK incrementa progresión del ciclo celular en respuesta a TAM.....	80-81
Análisis del Interactoma- <i>in silico</i> de otras moléculas implicadas en el control del ciclo celular .....	82
DISCUSIÓN.....	83-88
CONCLUSIONES.....	88-89
PERSPECTIVAS.....	89
BIBLIOGRAFIA.....	99-107
ANEXOS.....	99-108

## **GLOSARIO**

BH: Dominio de homología a BCL-2

BIK: BCL2-Interacting Killer

Ca<sup>+2</sup> Calcio

Cyt C: Citocromo C

DD: Dominios de muerte

DNA: ácido desoxiribonucleico

DISC: complejo de señalización inductor de muerte

E2: Estradiol

FACS: Citometría de flujo

FADD: dominio de muerte asociado a Fas

FLICA: inhibidores de caspasas marcados con fluorocromo

IFN $\gamma$ : Interferón gama

IA: inhibidor de aromatasas

KEGG: Enciclopedia de Genes y Genomas de Kyoto

MAPK: proteínas cinasas activadas por mitogénos

$\mu$ M. Microlitros

$\mu$ g: Microgramos

PBS: Solución amortiguadora de fosfatos

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PR: Receptor de progesterona

$\Psi\Delta$ : Pérdida del potencial de membrana mitocondrial

r.p.m: Revoluciones por minuto

RNAi: RNA de interferencia

RNAm: Ácido ribonucleico mensajero

RKTs: Receptores tirosina cinasa

STAT2: Transductor de señal y activador de la transcripción 2

SERMS: Modulador selectivo de los receptores estrogénicos

SDS: Dodecil sulfato de sodio

siRNA: RNA pequeño interferente

SFB: Suero fetal de bovino

TAM. Tamoxifen

## RESUMEN

El proceso de apoptosis es controlado por miembros de la familia de Bcl-2, dividida en tres diferentes subclases basadas en la conservación de los dominios de homología Bcl-2. En este sentido BIK miembro de la familia de proteínas BH3, es predominante su localización en el retículo endoplásmico (RE) e induce apoptosis a través de la ruta mitocondrial por movilización de  $Ca^{2+}$  del retículo endoplásmico a la mitocondria. En el presente estudio se determinó que la supresión del gen BIK promueve resistencia a Tamoxifen (TAM) en células de cáncer de mama MCF-7. Al respecto se empleó la transfección de RNAs interferentes (siRNAs) para silenciar la expresión del gen BIK sobre células MCF-7, para evaluar su respuesta a TAM. En este sentido los niveles de apoptosis celular, el potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) y la activación de caspasas fueron analizadas. Así mismo, con el fin de determinar el mecanismo molecular de resistencia a TAM se midió la expresión de algunas proteínas de la familia Bcl-2. Los datos de apoptosis celular presentaron un incremento en los niveles de expresión de BIK a una concentración de  $6.0 \mu\text{M}$  de TAM. Nuestros resultados indican que al suprimir la expresión del gen BIK mediante siRNAs en respuesta a TAM, se bloquea en un  $45 \pm 6.78\%$  el proceso de apoptosis. Además, fue posible identificar una reducción tanto del potencial de membrana mitocondrial ( $\Psi_M$ ), como la actividad total de caspasa. A nivel de proteína se demostró baja expresión de proteínas pro-apoptóticas como Bax, Bak y Puma, mientras que alta expresión de Bcl-2 y Mcl-1. Tales datos sugieren resistencia a TAM, regulando la vía intrínseca, indicando que BIK es factor importante en el proceso de apoptosis, el cual puede ejercer influencia en la ruta del retículo endoplásmico, regulando funcionalmente la integridad mitocondrial. En conjunto, nuestros resultados demuestran que BIK es un componente central de la muerte celular por apoptosis inducida por TAM en células de cáncer de mama MCF-7. Con la finalidad analizar otros posibles genes y rutas de

señalización afectados en resistencia a TAM, fue incluido un análisis de expresión masivo mediante microarreglos de expresión comparando células tratadas con TAM y células transfectadas con siRNA-BIK expuestas a TAM. A este respecto, las vías de señalización con mayor probabilidad de ser afectadas fueron MAPKs, IGF, JAK y STAT2 a partir de estas rutas, fueron seleccionados tres genes considerados de alta significancia en el análisis bio-informático de microarreglos: STAT-2, AKT-3 and 14-3-3-z. Estos genes fueron validados a nivel de la proteína mediante ensayos de Western Blot. Así mismo las vías de señalización afectadas, fueron predichas mediante el análisis de la base de datos de Kioto (KEGG), identificando distintos procesos de la biología del cáncer como la progresión y resistencia a TAM, como proliferación celular, inhibición de apoptosis y control del ciclo celular.

Adicionalmente, se realizó un análisis del ciclo celular encontrando que células transfectadas con siRNA-BIK expuestas a TAM incrementan la fase G2-M, mientras que no retienen en fase G0 a pesar de la exposición a TAM, en comparación con células tratadas sólo con TAM; en cuanto a viabilidad celular mediante ensayos de MTT, las células transfectadas con siRNA-BIK expuestas a TAM, poseen viabilidad celular semejante a células control. Con el objetivo de determinar otras moléculas implicadas en el control del ciclo celular bajo transfección siRNA-BIK expuestas a TAM, se llevo a cabo un análisis *in silico* del interactoma de la proteína 14-3-3-z, empleando para ello el programa HIPPIE (Base de datos de interacción de proteínas). Identificando que bajo dicha condición siRNA-BIK/TAM, Wee1 es el punto de convergencia, este dato sugiere que esta molécula permite la entrada a la fase G2/M, inhibiendo el efecto del TAM.

## ABSTRACT

The process of apoptosis is controlled by members of the Bcl-2 family is divided into three different subclasses based on the conservation of BCL-2 homology domains. BIK is a founding member of the BH3-only proapoptotic protein family. BIK is predominantly localized in the endoplasmic reticulum and induces apoptosis through the mitochondrial pathway by mobilizing calcium from the ER to the mitochondria. In this study, we determined that suppression of the death gene BIK promotes resistance to tamoxifen (TAM) in MCF-7 breast cancer cells. We utilized small interfering (siRNAs) to specifically knockdown BIK in MCF-7 cells and studied their response to TAM. Levels of cell apoptosis, the potential mitochondrial membrane ( $\Delta\Psi_m$ ), and the activation of total caspases were analyzed. Western blot analysis was used to determine the expression of some Bcl-2 family proteins. Flow cytometry studies revealed an increase in apoptosis levels in MCF-7 cells and a 2-fold increase in relative BIK messenger RNA (mRNA) expression at a concentration of 6.0  $\mu\text{M}$  of TAM. BIK silencing, with a specific RNAi, blocked TAM-induced apoptosis in  $45 \pm 6.78\%$  of cells. Also, it decreased mitochondrial membrane potential ( $\Psi_m$ ) and total caspases activity, and exhibited low expression of proapoptotic proteins Bax, Bak, Puma, and a high expression of Bcl-2 and Mcl-1. These suggest a resistance to TAM, regulating the intrinsic pathway and indicate that BIK comprises an important factor in the process of apoptosis, which may exert an influence the ER pathway, which regulates mitochondrial integrity. Taken together, our results show that BIK is a central component of the programmed cell death of TAM-induced MCF-7 breast cancer cells. In order to see other possible mechanisms of resistance to TAM a microarray analysis was performed comparing two experimental conditions: treated- TAM MCF-7 cells and siRNAiBIK-transfected MCF-7 cells in response to TAM. Some signaling pathways that were affected are MAPKs, IGF, and JAK- STAT. We selected three genes

considered central for the analysis of microarray: STAT-2, AKT-3 and 14- 3-3-z, which were validated at the protein level by western blot to confirm our data. Signaling pathways affected by KEGG database are involved in various processes in cancer biology as in progression and resistance to TAM and affect process such as proliferation, inhibition of apoptosis and cell cycle.

Our data demonstrate that BIK-transfected MCF-7 cells in response to TAM increase G2-M phase and were not retained in the Go-G1 phase despite exposure to TAM in comparison with those of TAM only-treated MCF-7 cells. In siRNAiBIK-transfected cells exposed to TAM had similar cell viability with respect to control cells. In order to identify other molecules involved in this process we performed an interactome using HIPPIE program (Human Integrated Protein-Protein Interaction reference) for predict which other molecules could regulate this process. We find that the condition siRNAiBIK- transfected cells exposed to TAM, Wee1 showed increased mRNA level, this data suggests that this molecule allow entry to the G2 / M phase to inhibit the effect of TAM.

# **INTRODUCCIÓN**

## **¿QUÉ ES EL CÁNCER?**

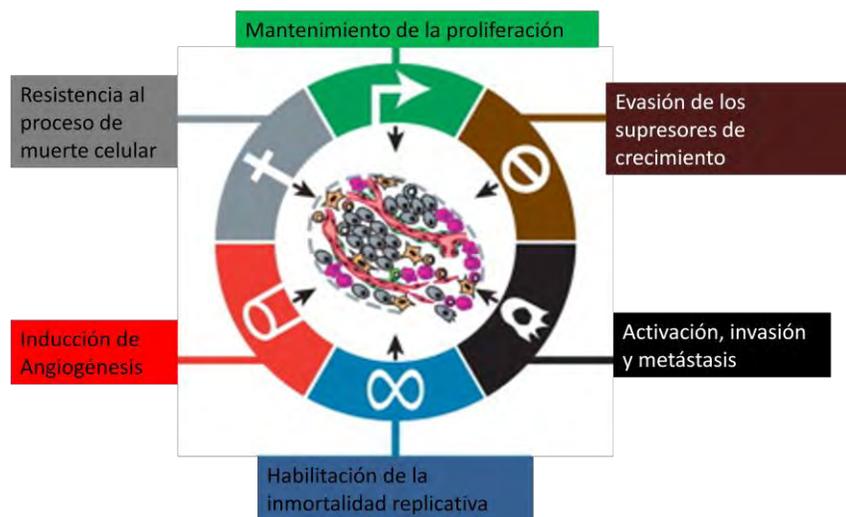
El cáncer es un proceso por el cual las células normales se transforman progresivamente a la malignidad; se requiere de la adquisición secuencial de mutaciones que surgen como consecuencia de daños en el genoma [1]. Este daño puede ser el resultado de procesos endógenos tales como errores en la replicación del DNA o la inestabilidad química intrínseca de ciertas bases del DNA que son afectadas por radicales generados durante el metabolismo. El daño en el DNA también puede resultar de las interacciones con agentes exógenos tales como radiación ionizante, radiación U.V y carcinogénicos químicos. Las células tienen sistemas de reparación de daño al DNA, pero por varias razones los errores ocurren y las mutaciones son introducidas al genoma de la célula [2].

La evolución de una célula normal a una maligna, implica un proceso por el cual los genes involucrados en los mecanismos homeostáticos normales que controlan la proliferación y la muerte celular sufren daños mutacionales que se traducen en la activación de genes que estimulan la proliferación o la protección contra la muerte celular. Una célula de cáncer se enfrenta a dos nuevos retos: tiene que superar la senescencia replicativa y convertirse en inmortal y debe obtener un suministro adecuado de nutrientes y oxígeno para mantener esta alta tasa de proliferación. Desde la perspectiva de la evolución darwiniana, aquí, la célula más fuerte es la que sobrevive para formar una nueva población de células genéticamente distintas, a las células de tumor [3].

## **RASGOS DEL CÁNCER**

Las células cancerosas tienen defectos en los circuitos de regulación que rigen la proliferación celular y la homeostasis. Hay más de 100 tipos diferentes de cáncer, y los subtipos de tumores se pueden encontrar dentro de los órganos específicos. En las células de cáncer hay siete alteraciones esenciales en la fisiología celular que determinan

colectivamente el crecimiento maligno (figura 1): la autosuficiencia en señales de crecimiento, la insensibilidad a las señales inhibitorias de crecimiento, la evasión de la muerte celular programada (apoptosis), el potencial de replicación ilimitado, la angiogénesis sostenida, la invasión de tejidos y metástasis y la reprogramación del metabolismo.

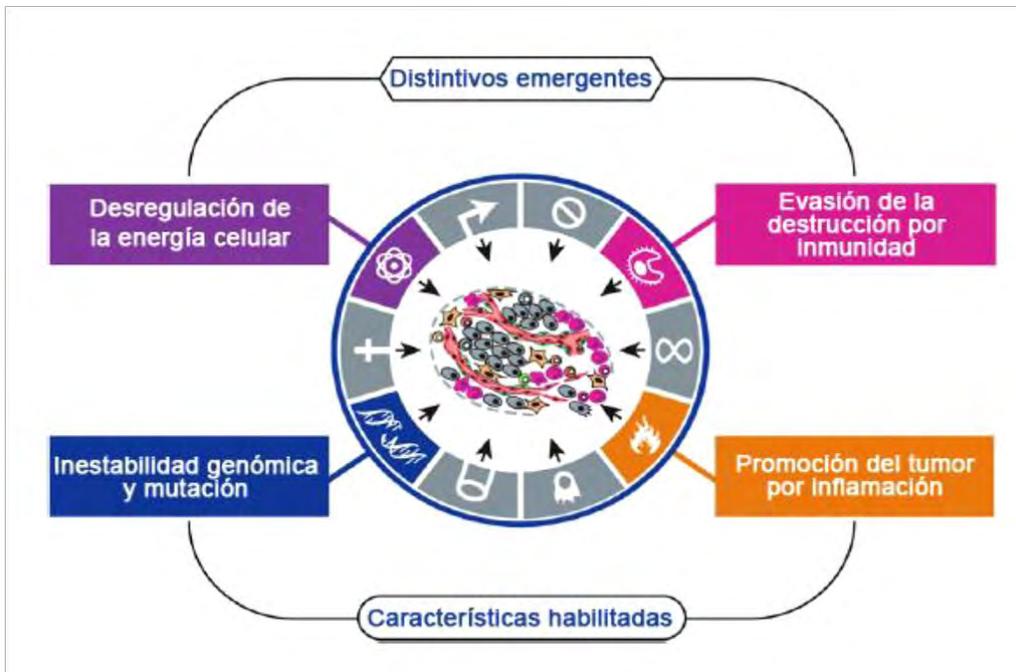


**Figura. 1. Modificada de Hanahan D y Weinberg RA [4]. Las seis características del cáncer que permiten el crecimiento tumoral y la metástasis.**

Dentro de estas características del cáncer, la inestabilidad genómica es aquella capaz de generar la diversidad genética que facilita su adquisición, una característica importante es la inflamación, la cual fomenta muchas de las demás funciones. El avance en los últimos años ha sumado dos nuevas características en las células cancerosas, la reprogramación de su energía metabólica y la evasión de la respuesta inmune, que es una capacidad recientemente aceptada dentro de las características del cáncer y muchos de sus mecanismos representan aún un gran misterio. Sin embargo, en la clínica esta característica, es bien clara desde hace mucho tiempo. Los tumores sólidos que logran desarrollarse han logrado, de alguna forma, eludir la detección de varias ramas del

sistema inmune o han sido capaces de limitar el alcance del exterminio inmunológico, y evitar su erradicación.

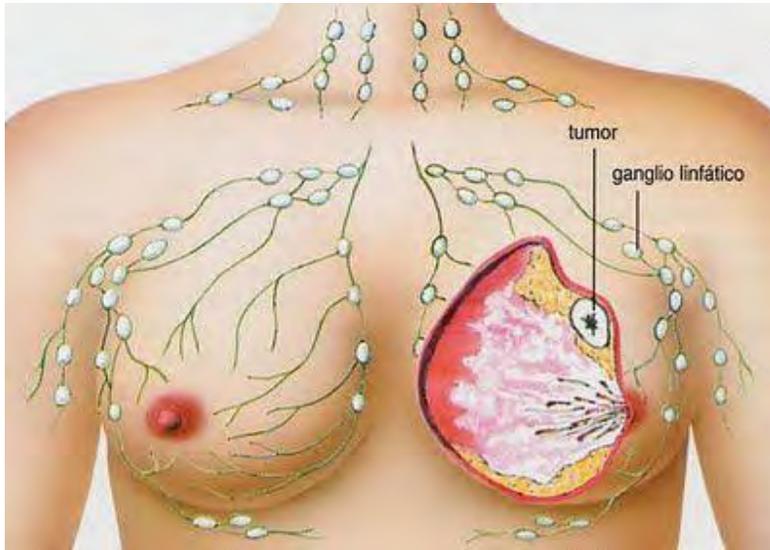
Las células cancerosas y los tumores exhiben otra dimensión de complejidad: poseen un amplio reclutamiento de células aparentemente normales, las cuales contribuyen a la adquisición de un “microambiente tumoral”. Por lo tanto reconocer la generalidad de estos conceptos afecta cada vez más el desarrollo de nuevos medios para tratar el cáncer humano (figura 2). [3]



**Figura 2. Modificada y tomada de Douglas Hanahan [3]. Características emergentes del cáncer de mama**

## **CÁNCER DE MAMA**

El cáncer de mama es una enfermedad considerada un desorden multifactorial causado tanto por factores genéticos como no genéticos; es el resultado de la transformación maligna de las células epiteliales que revisten los conductos o lobulillos de la glándula mamaria (figura 3). El cáncer puede ser causado por agentes que dañan a los genes involucrados en el control de la proliferación celular [5].



**Figura 3. Representación gráfica de cáncer de mama.**

### **FACTORES DE RIESGO DEL CÁNCER DE MAMA**

Muchos factores han sido implicados en su etiopatogénesis: esto incluye edad, genética historial genético familiar, dieta, alcohol, obesidad, inactividad física y factores endócrinos y externos [6].

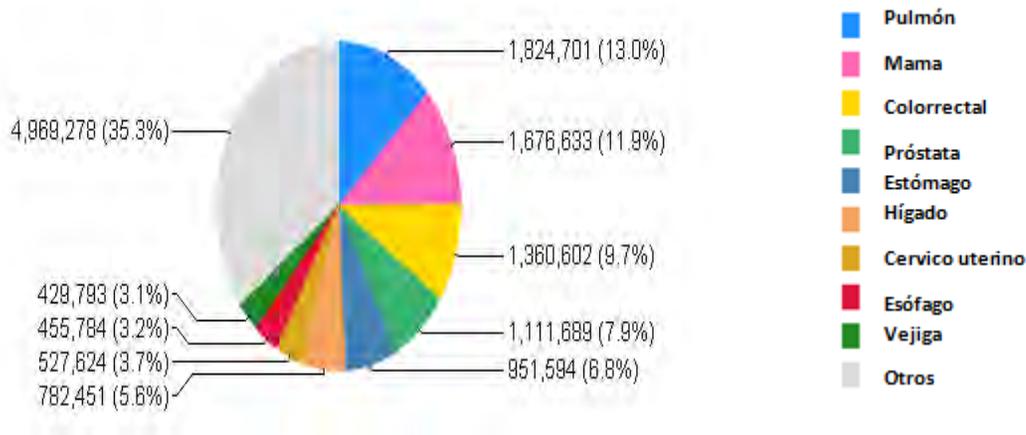
Los factores genéticos implicados incluyen mutaciones en la línea germinal en genes de alta penetrancia tales como **BRCA1**, **BRCA2**, **P53** y **PTEN**, así como la sobre-expresión del antígeno **HER-2/neu**. Hormonas esteroides endógenas y exógenas tales como estrógenos (E2) y progesterona (P), han sido implicadas en la patogénesis del cáncer de mama debido a sus efectos significativos en el crecimiento de la célula, diferenciación, función en la mama y otros tejidos [7, 8].

### **INCIDENCIA DEL CÁNCER DE MAMA**

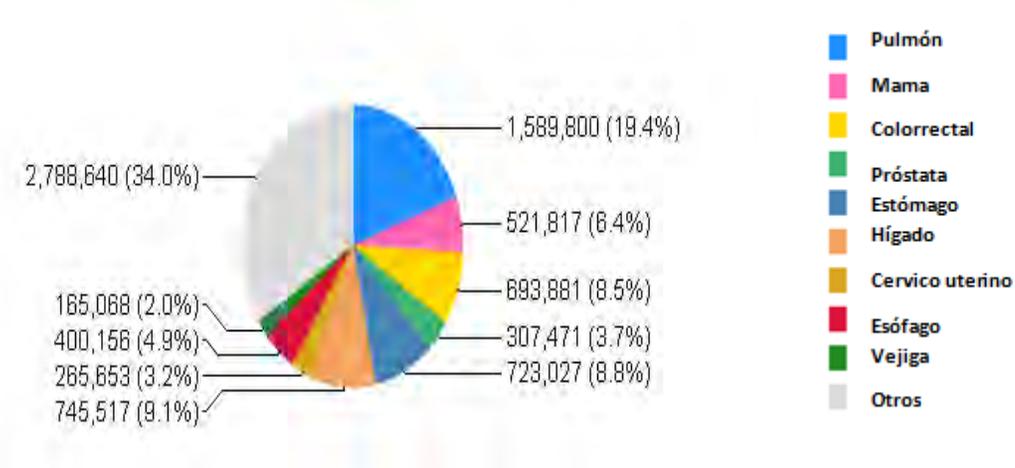
El cáncer de mama es la principal causa de muerte en países desarrollados y la segunda en los países en desarrollo [9, 10]. A nivel mundial, en el año 2008, se registraron 12.7 millones de nuevos casos y 7.6 millones de muertes por este tipo de cáncer; de los cuales el 56% de los casos y el 64% de las muertes ocurrieron en países en desarrollo. Los tipos

de cáncer más comunes son el pulmonar, de mama, colorrectal, de estómago y próstata. No obstante, los que causan más muerte son los cánceres de pulmón, estómago, hígado, colorrectal y el de mama (figura 4).

### Incidencia de cáncer



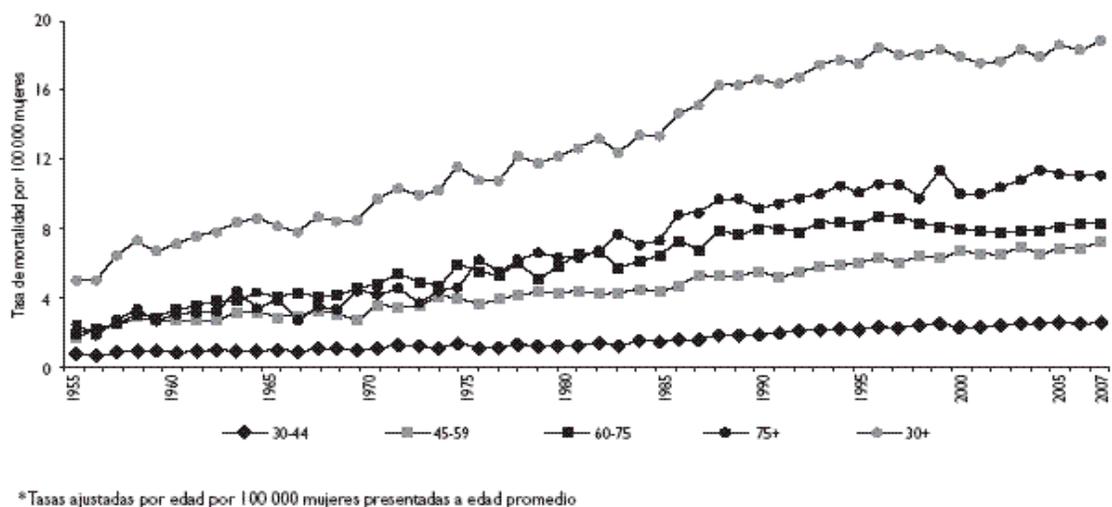
### Mortalidad del cáncer



**Figura 4. Incidencia y mortalidad del cáncer a nivel mundial, ambos sexos, tomado y modificado de GLOBOCAN (2008).**

En el 2008 se detectaron aproximadamente 690,000 casos en los países en desarrollo, dando un total de 1,38455 casos de cáncer de mama, lo que representa el 22.9% de los

casos detectados en mujeres. La incidencia a nivel mundial representa 38.9 casos por cada 100 mil mujeres; en países desarrollados los casos son detectados en un 66.4%, mientras que en países de desarrollo representan el 27.3%. La diferencia en los estilos de vida entre países desarrollados y en desarrollo puede afectar el patrón de incidencia del cáncer de mama. Entre los principales factores están los patrones reproductivos, la cobertura del sistema de salud y fondo genético [11]. Las muertes por cáncer de mama sumaron 458,503 en todo el mundo durante 2008, lo que representa el 13.7% de las muertes por cáncer. El cáncer de mama es el más diagnosticado en mujeres mexicanas, con 13,939 nuevos casos en 2008. El cáncer de mama afecta a las mujeres adultas de todos los niveles socio-económicos; con una incidencia aproximada de 25 por cada 100 mil mujeres en México [12]. Al respecto, la tasa de mortalidad se elevó de manera sostenida en las tres pasadas décadas. En 2008 se llegó a 5,217 defunciones, por lo que es la neoplasia que genera más muertes en las mujeres mexicanas; el 13% al 60 % de las mujeres que mueren tienen entre 30 y 59 años (figura 5 ) [13] [14].



**Figura 5. Gráfica tomada y adaptada de Knaul, 2008. [13] Mortalidad por tumores malignos de mama en México por grupo de edad 1995.**

Recientemente los datos registrados por el GLOBOCAN 2012, los casos de cáncer de mama han aumentado en 20% desde 2008, convirtiéndose en el segundo tipo de cáncer más común y frecuente entre mujeres a nivel mundial, de acuerdo con la Organización Mundial de la Salud. En 2012, 1.7 millones de mujeres fueron diagnosticadas con ese tipo de cáncer, mientras que 6.3 millones habían sido diagnosticadas con la enfermedad durante los 5 años previos. La mortalidad por cáncer de mama también se incrementó, aumentando 14% desde 2008, alcanzando un total de 522,000 muertes en 2012.

### **PATOLOGÍA DEL CÁNCER DE MAMA**

El 95% del cáncer de mama son carcinomas, que surgen de elementos tisulares epiteliales de la mama. El cáncer de mama puede ser dividido, carcinomas *in situ* y carcinomas invasivos (infiltrante) [15].

#### **Carcinoma no invasivo (*in situ*).**

- a) Carcinoma intraductal (o carcinoma ductal *in situ*): El carcinoma intraductal se consideraba una lesión rara; pero con el aumento del uso de la mamografía, que detecta lesiones precoces y pequeñas, hoy en día supone aproximadamente del 20 al 30% de los carcinomas de mama. Está constituido por una población maligna de células que carecen de la capacidad de invadir a través de la membrana basal y que por tanto son incapaces de producir metástasis a distancia. Existen 5 subtipos histológicos: comedocarcinoma, sólido, cribiforme, papilar y micropapilar.
- b) Carcinoma Lobulillar *in situ*: Se trata de una lesión histológicamente única que se manifiesta por la proliferación, en uno o más conductos terminales, acinos o ambos a la vez. Este tipo de carcinoma presenta células laxamente cohesionadas, con raras mitosis, núcleos ovalados redondos y nucléolos pequeños.
- c) Evolución de las lesiones *in situ* a carcinomas invasivos.

El carcinoma intraductal es un claro precursor del carcinoma invasivo; si bien los pasos iniciales de los caminos que llevan a la tumorigénesis mamaria todavía no están definidos, parece que prácticamente todos los cánceres de mama invasivos proceden de un carcinoma intraductal. La presencia de cambios cromosómicos compartidos tanto en el carcinoma intraductal como en el tejido maligno adyacente invasivo demuestra su relación clonal evolutiva [16]

Existen múltiples diferencias entre el tejido normal, las lesiones benignas y el carcinoma intraductal; tienen lugar desbalances cromosómicos, con pérdida o ganancia de múltiples *loci*, a medida que las lesiones hiperplásicas progresan hacia la invasividad. La pérdida de heterocigosidad se aprecia en un 70% de los tumores intraductales de alto grado, comparado con un 35% de hiperplasias con atipia [17]. Se han identificado marcadores moleculares relacionados con la tumorigénesis mamaria: el receptor de estrógenos está expresado en un 70% de los carcinomas intraductales; el proto-oncogén Her2/neu está expresado en el carcinoma lobulillar *in situ* y la hiperplasia lobulillar [18]. El riesgo de carcinoma invasivo tras un carcinoma lobulillar *in situ* está aumentado de 7 a 10 veces, pero estos carcinomas invasivos son en general ductales, y se diagnostican tanto en la mama afectada como en la contralateral, y en cualquier lugar de la mama a diferencia de los diagnosticados tras el carcinoma intraductal, que suelen diagnosticarse en el mismo lugar [19].

### **Tumores invasivos de la mama.**

**Carcinoma ductal infiltrante:** Es el tipo más frecuente de todos los cánceres mamarios. La mayoría exhibe un aumento del estroma denso del tejido fibroso, que da al tumor una alta consistencia. Histológicamente consiste en células malignas de revestimiento de los conductos dispuestas en cordones, nidos sólidos de células, túmulos, glándulas y masas anastomosadas, o mezclas de estos patrones. Las células invaden claramente el estroma

de tejido conectivo. Suele observarse la invasión de espacios perivasculares y perineurales, así como de vasos sanguíneos y linfáticos. En función de ambos parámetros, grado de atipia nuclear y diferenciación histológica definida por la formación de túbulo), se clasifican en bien diferenciados, moderadamente y pobremente diferenciados (Grado 1-2-3-4 respectivamente).

## **TAMOXIFEN**

Es un modulador selectivo del receptor de estrógenos usado comúnmente durante las dos últimas décadas para el tratamiento y prevención del cáncer de mama [20], mostrando eficacia en la reducción del riesgo de cáncer de mama cercana al 50% [21]. En 1998, la FDA (U.S.A) aprobó el uso de TAM para la prevención del cáncer de mama en mujeres con alto riesgo de desarrollar la enfermedad [22]. TAM actúa como anti-estrógeno en tejido mamario interfiriendo con la actividad de los estrógenos que promueven el crecimiento de las células cancerosas de mama. Debido a su efecto agonista parcial, TAM ejerce efectos beneficiosos sobre el metabolismo lipídico y óseo. El uso del TAM en pacientes con cáncer de mama, está recomendado para su aplicación durante 5 años, en dosis estándar de 20 mg/día. En el organismo el TAM es metabolizado en las células del hígado para producir tres distintos metabolitos: 4-hidroxi-TAM, N-dimetil-TAM y 4-hidroxi-N-dimetil-TAM. Sus tres metabolitos son consideradas SERMS (Moduladores selectivos de los receptores estrogénicos) [23], debido a su capacidad de unirse a los receptores de estrógenos en el DNA. En estudios *in vivo* se ha comprobado que los SERMs compiten con los estrógenos para unirse a sus receptores, resultando en una atenuación de la respuesta celular mediada por estrógenos. Al respecto, se ha observado que tanto la eficiencia como la toxicidad de TAM varían entre individuos, debido a que el metabolismo de TAM presenta una gran variabilidad interindividual [24]. Los principales citocromos

involucrados en su metabolismo son: CYP2D6, CYP2C9, CYP2C19, CYP2B6 y CYP1A2 (figura 6) [25].

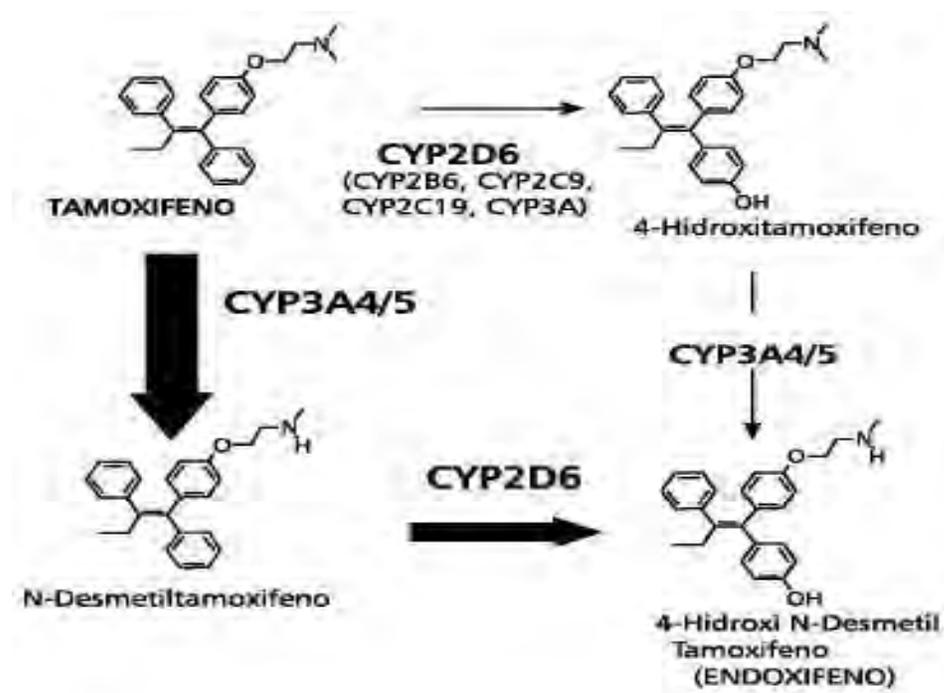


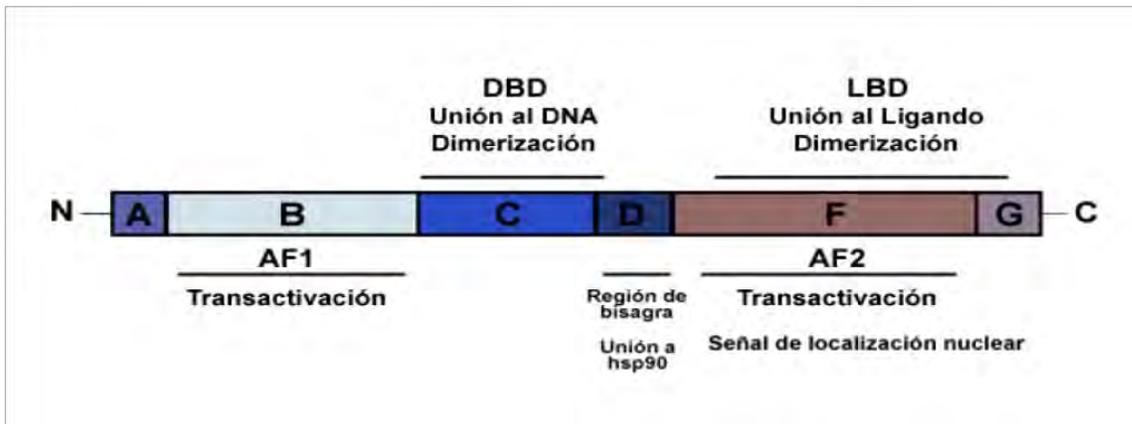
Figura 6. Metabolismo del TAM.

## MECANISMO DE ACCIÓN DEL ESTRÓGENO

Los receptores de estrógeno (RE) tienen un rol muy importante en el metabolismo celular, especialmente en la glándula mamaria. El efecto primario de los RE en el tejido mamario es mediar el efecto mitogénico del E2 (estradiol). En etapas tempranas del cáncer de mama, entre el 46 y el 77% de los carcinomas son positivos para RE [26].

El RE es una proteína perteneciente a la familia de receptores nucleares, la cual incluye también otros receptores de hormonas esteroideas, como el receptor de la vitamina D, retinoides, hormona tiroidea y algunos receptores huérfanos [27, 28]. Hasta hace pocos años se pensaba que todos los efectos debidos a estrógenos eran mediados por un sólo RE. Sin embargo, en 1995 fue descubierto un nuevo receptor de estrógeno al que se lo

denominó RE- $\beta$ , que tiene un peso molecular de 57 KDa [14, 29]. En consecuencia, este descubrimiento aumentó el nivel de complejidad de la fisiología de los estrógenos, sin mencionar que existen también receptores localizados en la membrana que median igualmente funciones de estas hormonas. Ambos receptores poseen funciones diferentes de acuerdo al tejido donde ejercen su acción. Funcionalmente, el RE- $\alpha$ , al igual que el resto de los receptores esteroideos, está organizado en 6 dominios denominados por letras de la “A” a la “F” (figura 7).



**Figura 7. Dominios funcionales del receptor de estrógeno. Organización del receptor de estrógeno en dominios funcionales al igual que el resto de los receptores esteroideos.**

La región A/B está localizada en el lado amino-terminal de la proteína y es la región menos conservada entre los distintos receptores nucleares. Este dominio contiene una función de activación de la transcripción génica (Activation Function 1 o AF-1) y varios sitios de fosforilación que son importantes en el proceso de activación de la proteína, especialmente en los procesos donde el receptor es activado en ausencia de estrógenos [30]. La región de unión al ADN, denominada dominio C, es la región más conservada entre los diferentes receptores nucleares, y está compuesta por nueve residuos de cisteína, de los cuales ocho están coordinados alrededor de dos iones de  $Zn^{2+}$  para formar dos “dedos de zinc” que le confieren al receptor la capacidad de unirse específicamente al ADN.

La unión a una secuencia específica en el ADN está determinada por la composición de aminoácidos localizada entre estos dos “dedos de zinc”, conocida como la caja P (P-box). Entre la región de unión al ADN y el dominio E/F, se encuentra la región D o región bisagra, la cual facilita los cambios conformacionales y el plegamiento de la molécula. Al igual que todas las proteínas que se localizan en el núcleo, el RE contiene una señal de localización nuclear (NLS) formada por residuos básicos. Finalmente, en el extremo carboxilo se encuentra la región E/F o dominio de unión al ligando, donde se une el estradiol (E2)[31]. Esta región, a pesar de estar conservada entre los diferentes receptores esteroideos, es altamente específica para la hormona, es decir que el receptor de estrógeno une estrógeno con alta afinidad, pero no otras hormonas esteroideas. El dominio E/F está también involucrado en otros procesos tales como activación de la transcripción en AF-2 (Activation Function 2), dimerización del receptor e interacción con otras proteínas co-activadoras o co-represoras de la transcripción y fosforilación.

La unión de la hormona al ser activada promueve la dimerización antes de unirse al DNA en la región específica [32].

La unión del estrógeno al receptor induce la fosforilación del mismo, alterando su conformación, desencadenando la dimerización del receptor y facilitando la unión del receptor a la región promotora de sus genes blanco. Mientras que el reclutamiento de coactivadores como por ejemplo AIB1 (SRC3) y otras proteínas con actividad de acetiltransferasa de histona ayudan a desenrollar la cromatina para que la transcripción se lleve a cabo [33]. En contraste la conformación del RE inducida por moduladores selectivos del receptor de estrógeno, como el TAM, ayuda al reclutamiento de co-represores y deacetilasas que inhiben la actividad transcripcional [34, 35].

El receptor de estrógenos en el núcleo puede modificar la transcripción de genes bajo distintos mecanismos. Entre ellos a través de interacciones proteína-proteína, el RE puede funcionar como un coactivador, uniéndose a otros factores de transcripción y

reclutando acetil-transferasas de histonas conformando complejos de unión a proteínas activadoras o sitios AP-1 del DNA [36]. De esta manera, el estrógeno ayuda a regular la expresión de muchos genes que cumplen un rol fundamental en la fisiología normal de la célula. El RE no sólo tiene la capacidad de aumentar la expresión de ciertos genes, sino que también posee la capacidad de disminuir y/o modular los patrones o niveles de expresión [37]. Estudios en células endoteliales y de cáncer mamario sugieren que existe una pequeña cantidad de RE que se localiza en citoplasma o unido a la membrana plasmática [38]. Estos receptores de estrógeno unidos a la membrana pueden explicar los efectos tempranos o no genómicos del estrógeno.

La ruta de señalización del estrógeno es también regulada por receptores de membrana tirosina cinasas, incluyendo el receptor de crecimiento epidérmico (EGFR) HER-2, y el receptor de crecimiento insulínico (IGFR-1) [39]

Estas rutas de señalización son activadas como resultado de la fosforilación del ER así como de sus co-activadores y co-represores en sitios múltiples para determinar sus funciones específicas. Esta activación del ER mediada por la señalización de EGFR es referida como activación del receptor independiente del ligando. La interacción de EGFR y ER se han establecido a través de algunos mecanismos. El estrógeno puede incrementar la expresión de varios ligandos tales como el factor de crecimiento transformante  $\alpha$  (TGF- $\alpha$ ) y el IGF1 el cual puede activar la ruta del receptor de factor de crecimiento epidermal [39-41]. Por otro lado la señalización del estrógeno regula la baja expresión de EGFR y HER-2, mientras que incrementa la expresión de IGF-1R [42, 43]. La activación de PI3K/AKT y la ruta de MAPK P42/p44 (proteínas cinasas activadas por mitógenos) es mediada por estos receptores que a su vez regula la baja expresión del ER y el receptor de progesterona (PR) [44-46].

Diversos estudios han sugerido que ER puede trabajar por mecanismos no transcripcionales. A este respecto bajos niveles de ER se han encontrados fuera del núcleo: en la membrana, citoplasma o incluso en la mitocondria, aunque la localización de este receptor permanece controversial. Algunas de las acciones no genómica del receptor parecen tener un rápido efecto transcripcional para activar la señalización mediada por factores de crecimiento incluyendo PI3K/AKT y la ruta Ras/p42/p44 MAPK[39]. A través de la actividad no genómica se puede alterar la expresión de genes regulados por factores de crecimiento. Finalmente la ruta del estrés cinasa vía p38 JNK (cinasa terminal c-JUN) puede también modular la función ER por fosforilación del ER y sus co-reguladores [47, 48] (Figura 8).

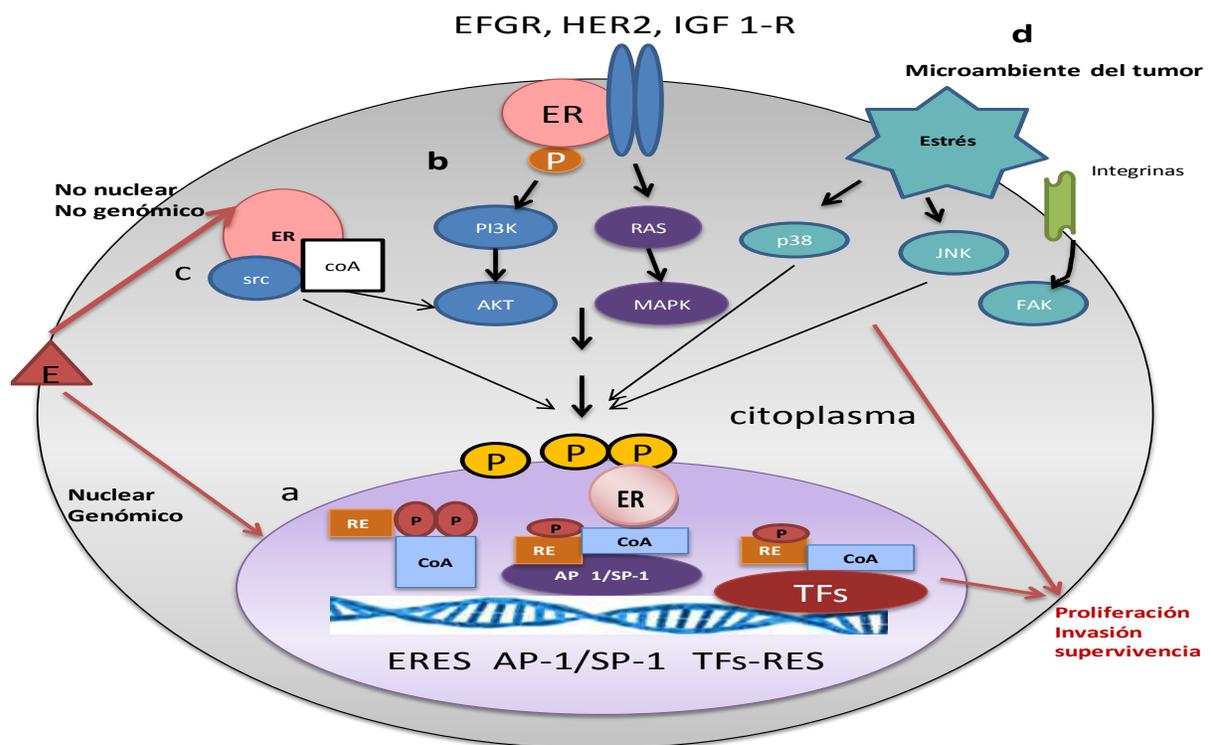


Figura 8. Tomado y modificado de Kent Osborne, 2010 [49]. Mecanismo de acción del receptor de estrógeno (ER) en cáncer de mama. Estrógeno (E)- unido ER, actuando como un factor de transcripción en el núcleo (actividad nuclear/genómica), se une a secuencias de DNA en regiones promotoras o directamente a elementos de respuesta a estrógenos (EREs). La vía Indirecta es la interacción proteína-proteína con otros factores de transcripción a sitios de respuesta al DNA

(complejos de transcripción AP-1/SP-1). Al unir el estrógeno, ER generalmente recluta complejos co-activadores (CoA) para inducir o modular la transcripción de genes, incluyendo genes codificantes para factores de transcripción y receptores tirosina cinasa (RTKs) (a). Un pequeño subtipo de ER están localizado fuera del nucleó o asociado a la membrana y en respuesta al estrógeno activa moléculas como RTKs (EGFR, HER2 y IGF1-R) b) moléculas co-activadoras (la familia Src) (c) Activación de múltiples rutas (Src, PI3K/AKT, y Ras/p42/44MAPK). La actividad no nuclear/ no genómica puede ser activada por TAM y es aumentada en presencia RTKs contribuyendo a la resistencia endocrina. En general las actividades de ER nuclear /genómica y no nuclear/ no genómica trabaja en manera cooperativa para proporcionar proliferación, supervivencia y estimula la invasión a la células cancerosas. Las señales de rutas relacionadas con estrés en el microambiente (FAK cinasa de adhesión focal, JNK cinasa N-terminal c-Jun. y p38 MAPK) puede modular componentes de la maquinaria transcripcional incluyendo el ER (d). Alteraciones en cada uno de estos elementos transcripcionales y elementos de señalización pueden mediar la resistencia a la terapia endocrina.

## **MECANISMOS DE RESISTENCIA A TAM**

### **Receptor de estrógenos y co-reguladores**

Como ya se ha mencionado la pérdida de expresión del ER $\alpha$  en tumores muestra un fenotipo de insensibilidad endocrina [50, 51]. Sin embargo la terapia basada en inhibir los receptores de factores de crecimiento puede reducir la expresión del ER y como consecuencia favorecer la sensibilidad endocrina. La expresión de variantes del ER, específicamente ER $\alpha$ 36 [52] se han sido implicado en reducir la respuesta endocrina. Por otro lado, la sobre-expresión del co-activador del ER AIB1 (también conocido como SRC3 o NCoA3)[34, 39, 53] se asocia con resistencia tanto clínica como experimental, así como la baja regulación del co-represor NCoR [54]. El ER y sus co-reguladores están íntimamente regulados por modificaciones postraduccionales. Los receptores de factores de crecimiento (EGFR/HER2, IGF1-R y FGRF(receptor del factor de crecimiento fibroblástico) y cinasas relacionadas a estrés (AKT, p42/p44, JNK, y P38 MAPKs, PKA (proteína cinasa A), PAK1 (Cinasa activada por P21), IKK( cinasa I $\kappa$ B), Src y CDK7 (ciclina dependiente de cinasa) regulan múltiples modificaciones pos-traduccionales como fosforilación, metilación, ubiquitinación y modificaciones pos-traduccionales del ER y sus

co-reguladores, todos estos tienen alguna influencia en la actividad del ER y sensibilidad a varias terapias endocrinas [39, 55, 56].

### **Ciclo celular**

La segunda categoría de resistencia endocrina incluye moléculas involucradas en respuestas biológicas y celulares para la terapia endocrina tales como inhibición de la proliferación celular e inhibición de apoptosis, la sobre expresión de reguladores positivos del ciclo celular, especialmente los que controlan la progresión de la fase G1 y la modulación negativa del ciclo celular se han investigados para interrumpir y bloquear los efectos antiproliferativos de terapia endocrina, llevando a resistencia [55, 57]. Por ejemplo la sobre-expresión de reguladores positivos como c-Myc, ciclina D y E, así como la activación de cinasas dependientes de ciclinas críticas para la fase G1. Resulta en resistencia endocrina. La reducción en la expresión de p21 y p27 así como la inactivación del supresor de tumor RB se han asociados con una pobre respuesta a terapia endocrina, específicamente a TAM [57, 58]. Consistente con el efecto citotóxico de la terapia endocrina, la sobre-expresión de señales de supervivencia celular y moléculas antiapoptóticas tales como Bcl-XI y el decremento en la expresión de moléculas proapoptóticas tales como BIK y caspasa 9 también llevan a resistencia endocrina [59].

### **Factores de crecimiento**

Es la tercera ruta involucrada en la resistencia endocrina. La activación de la señalización mediada por los receptores de factores de crecimiento vía PI3K/AKT es un importante modulador de estas moléculas apoptóticas /supervivencia, pero adicionalmente moléculas tales como NF $\kappa$ B se han implicado. También un tipo de autofagia muestra mediar la supervivencia [60].

La PI3K activa varias moléculas que intervienen en la progresión del ciclo celular y la supervivencia en células de cáncer de mama con RE positivos, además que estimula la actividad de transcripción del RE dependiente e independiente de los estrógenos. Experimentalmente, la activación de la vía de PI3K se ha asociado causalmente a resistencia *de novo* y adquirida al tratamiento endocrino. La disminución mediada por ARNi de *PTEN* y el sobre-expresión de oncogenes que activan la señalización de PI3K/AKT (por ejemplo, HER2, receptor del factor de crecimiento insulinoide de tipo 1 (IGF1R) y AKT1 mutado activado confieren resistencia a TAM, fulvestrant y privación estrogénica en células de cáncer de mama con RE positivos. En la mayoría de estos modelos, la inhibición de PI3K ha corregido la resistencia a antiestrógenos [39, 61] Los oncogenes de aumento de función y la pérdida de supresores tumorales en las células del cáncer de mama pueden conferir resistencia a antiestrógenos mediante la activación de PI3K. Por ejemplo, la sobre-expresión de HER2 predice una respuesta más débil al tratamiento neoadyuvante con IA (inhibidor de aromatasas) o TAM y un peor pronóstico después del tratamiento endocrino adyuvante comparado con los cánceres de mama con RE positivos / HER2 negativo[62-64]. Las pacientes con tumores con RE positivos que sobre-expresan FGFR1 presentan una menor supervivencia libre de recidiva (SLR) después del tratamiento adyuvante con TAM. Las pacientes con tumores con RE positivos/INPP4B deficiente presentan una menor supervivencia que las que tienen tumores con RE positivos/ INPP4B positivo. Aunque las mutaciones de pérdida de función en *PTEN* son raras en el cáncer de mama con RE positivos, en estudios inmunohistoquímicos (IHQ) se ha descrito una amplia variedad de pérdida de PTEN, pero no se ha constatado una asociación entre la concentración de PTEN y el pronóstico después del tratamiento con TAM.

## **APOPTOSIS**

La apoptosis o "muerte celular programada" es una forma de suicidio celular genéticamente definida, que ocurre de manera fisiológica durante la morfogénesis, la renovación tisular y en la regulación del sistema inmunitario. Determinados hechos celulares pueden ser explicados por cambios en la regulación de los genes responsables de la apoptosis, como es el caso de la transformación y la progresión tumoral. La apoptosis está controlada por toda una serie de factores reguladores que pueden tener efecto inhibitor (anti-apoptótico) o de bloqueo de este efecto protector (pro-apoptótico) [65]. Los mecanismos de apoptosis son altamente complejos y sofisticados, que involucran una cascada de eventos moleculares que son dependientes de energía. Hasta la fecha, las investigaciones indican que existen dos principales vías de apoptosis: La vía extrínseca o vía de receptores de muerte y la vía intrínseca o vía mitocondrial [66]. Sin embargo hay evidencia de que las dos vías están ligadas y que las moléculas en una vía pueden influenciar a otras [67].

## **CARACTERISTICAS BIOQUIMICAS DE LA APOPTOSIS**

Las células apoptóticas presentan varias modificaciones bioquímicas, tales como proteólisis de proteínas, entrecruzamiento de proteínas, ruptura del ADN y reconocimiento fagocítico [68].

Las caspasas son proteínas claves en la transducción y ejecución de la señal apoptótica inducida por la diversidad de estímulos. Son ampliamente expresadas en forma de zimógenos inactivos o pro enzimas, también llamadas procaspasas y una vez activadas activan a otras procaspasas, iniciando de ésta manera la cascada de proteasas.[69] Algunas caspasas pueden agregarse o bien auto-activarse. Esta cascada proteolítica, en

la cual una caspasa activa a otra caspasa, amplifica la vía de señalización apoptótica y así produce la rápida muerte celular [68].

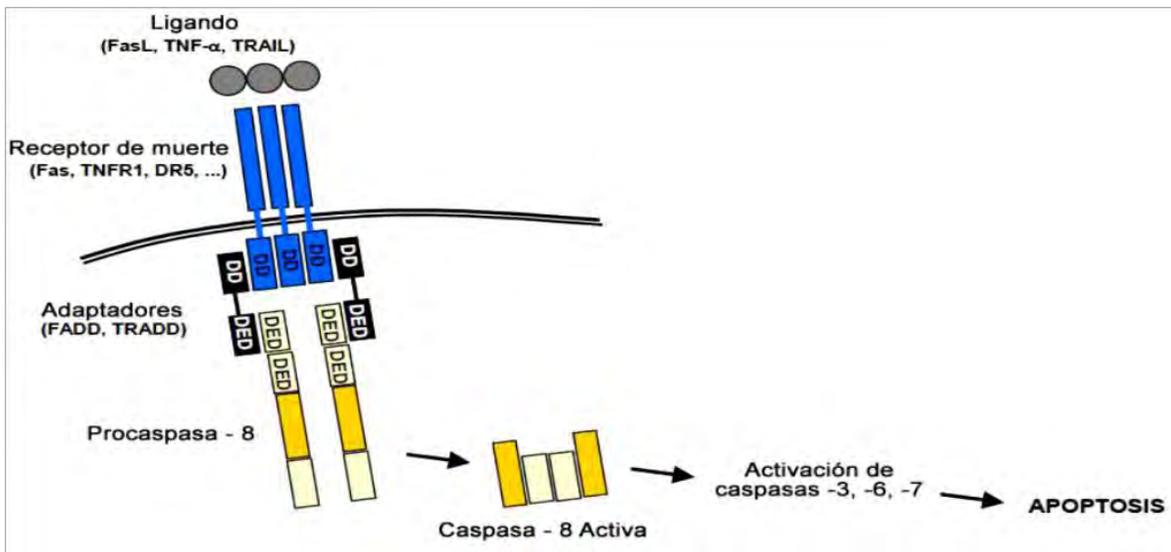
El término de Caspasa es derivado de “proteasas específicas de aspartato dependiente de cisteína” (Cystein- dependent aspartate- specific proteases) su actividad catalítica depende de un residuo de cisteína dentro de un sitio activo pentapéptido altamente conservado, y su acción proteolítica es específica dentro de un residuo de aspartato. Éstas tienen un residuo N – terminal donde se encuentra su pro-dominio seguido de una subunidad grande y otra pequeña, los cuales son a veces separados por un péptido vinculator. Las pro-caspasas son activadas por un procesamiento proteolítico entre la subunidad grande y la pequeña, el pro-dominio es frecuentemente removido, sin embargo no es necesaria durante la activación. La caspasa activa es entonces formada por un heterotetrámero que está formado por dos subunidades pequeñas y dos grandes. [70]

Actualmente se han sido identificado diez caspasas humanas y se han categorizadas como iniciadoras, efectoras e inflamatorias (Caspasa 2, 8, 9, 10), las iniciadoras tienen un pro-dominio largo. Las caspasas -8 y -10 poseen un dominio de muerte efector (DED) y un dominio de reclutamiento (CARD) en el caso de las caspasas (9 y 2). Éstas son reclutadas por este pro-dominio para luego ser activadas en complejos por la acción de un ligando en los receptores de muerte en la superficie celular [68]. Las caspasas efectoras (3, 6, 7) tienen un pro-dominio corto [68, 71, 72].

## **VIA EXTRÍNSECA DE LA POPTOSIS**

La vía extrínseca de la apoptosis es mediada por la activación de los llamados “receptores de muerte”, los cuales se encuentran en la superficie de la membrana celular y transmiten señales apoptóticas producida por la unión de un ligando específico. Los receptores de

muerte, pertenecen a la familia de los receptores de factor de necrosis tumoral (TNFR), una superfamilia de genes, que incluyen TNRF-1, Fas/CD95 y los receptores TRAIL como DR-4 y DR-5 [73]. Todos los receptores miembros de la familia TNFR tienen un subdominio extracelular rico en cisteína que le permite reconocer a su ligando con especificidad, dando como resultado la trimerización y activación del respectivo receptor de muerte [74]. La señalización subsecuente es mediada por el fragmento citoplásmico del receptor, el cual contiene una secuencia conservada denominada dominio de muerte (DD). Existen moléculas adaptadoras como FADD y TRADD las cuales poseen sus propios DDs por el cual son reclutados hacia los DDs del receptor activado, formando el complejo denominado DISC. Además de su DD, el adaptador FADD también contiene un dominio efector de muerte (DED), el cual a través de una interacción homotípica secuestra a la procaspasa-8 hacia el complejo DISC [66] (figura 9). La concentración local de varias moléculas de procaspasas-8 en el complejo DISC lleva a la activación autocatalítica y posterior liberación de caspasa-8. Ésta última a su vez, procesa caspasas efectoras las cuales subsecuentemente activarán sustratos específicos que finalizarán en la muerte celular. Un tipo diferente de vía extrínseca es aquel que no genera una señalización por caspasas, debido a que ésta puede no ser lo suficientemente fuerte para producir la muerte celular. En este caso, la señal necesita ser amplificada por una vía apoptótica dependiente de la mitocondria, que es proporcionar por un miembro de la familia Bcl-2 llamado Bid. Este es proteolizado por caspasa 8 y en su forma trunca (tBID) se transloca a la mitocondria donde actúa en paralelo con Bax y Bak, que al igual son miembros de la familia Bcl-2, finalmente induciendo liberación de una proteína denominada CytC y otros factores proapoptóticos hacia el citosol [75]



**Figura 9.** Esquema representativo de la interacción de la ruta intrínseca y extrínseca [68] Vía de los receptores de la muerte. Se inicia por la unión de ligandos extracelulares (como TNF-alfa, FasL o TRAIL) a sus receptores de la superficie celular (TNFR1, Fas, DR4 o DR5). Esta unión induce la activación de la caspasa 8, que a su vez actúa sobre las caspasas efectoras.

## RUTA INTRÍNSECA DE LA APOPTOSIS

Dentro de estos factores pro y anti-apoptóticos destaca el papel de la familia de Bcl-2 [76]. Todas las proteínas que pertenecen a esta familia contienen una combinación de los dominios BH1, BH2, BH3 y BH4 característica de su función y un dominio transmembrana para anclarse a la membrana externa mitocondrial de cara al citoplasma. La familia de proteínas Bcl-2 incluye tanto miembros inductores como inhibidores de apoptosis. En este sentido, los miembros de esta familia se caracterizan por dominios homólogos a Bcl-2 conocidos como dominios BH, los cuales se enumeran del 1 al 4. [77] De acuerdo con la presencia de tales dominios, dichas proteínas se dividen en tres subfamilias: **i)** miembros de función antiapoptótica denominada subfamilia Bcl-2 que incluye a los miembros Bcl-2, Bcl-xl, Bcl-w, Mcl-1 y A1, todos con los cuatro dominios BH, **ii)** miembros proapoptóticos: la subfamilia Bax que incluyen a Bax, Bok y Bak con tres dominios BH y la subfamilia BH3

que incluye a Bim, Bid, Bmf, Bad, BIK, PUMA (modulador de apoptosis sobre regulado por p53) y NOXA que poseen un dominio BH3. Estas proteínas son capaces de formar homodímeros o heterodímeros y de esta forma determinar la respuesta mitocondrial. Miembros antiapoptóticos como Bcl-2 o Bcl-X<sub>L</sub> tienen como función impedir la acción de las moléculas proapoptóticas, secuestrando a sus homólogos e impidiendo su cambio de conformación, su oligomerización o inserción en la membrana mitocondria [78, 79]. En los miembros antiapoptóticos de la familia Bcl-2 los dominios BH1, BH2 y BH3 estarían formando una estructura a modo de bolsillo hidrofóbico que ocultaría el dominio proapoptótico BH3 [80, 81] de forma que quedaría inhibido, impidiendo la oligomerización entre las proteínas proapoptóticas [82]. No obstante, se ha propuesto un mecanismo distinto por el cual las proteínas antiapoptóticas pueden bloquear la oligomerización de Bax y Bak, sin interferir en la interacción de éstas con otros miembros del grupo BH3 [83]. Se ha descrito también que Bcl-2 es capaz de regular la salida de calcio del retículo endoplásmico durante la muerte celular [84]. Por otro lado, se ha relacionado el aumento de la expresión de miembros antiapoptóticos de la familia de Bcl-2 con desequilibrio del estado redox hacia un ambiente reductor [85].

El producto del gen *bcl-x* relacionado con el gen *bcl-2*, puede funcionar como un regulador de la apoptosis independientemente de Bcl-2. Del procesamiento alternativo del transcrito *bcl-x*, resultan dos RNAm de tamaño distinto. El producto del RNAm más grande, Bcl-x<sub>L</sub>, es similar en tamaño y estructura a Bcl-2 y el más pequeño, Bcl-x<sub>S</sub>, inhibe la capacidad de Bcl-2 de aumentar la supervivencia [86]. *In vivo*, el RNAm de Bcl-x<sub>S</sub> se expresa en grandes cantidades en células que tienen alta tasa de recambio, como los linfocitos. Por el contrario, Bcl-x<sub>L</sub> se encuentra en tejidos que contienen células de larga vida, como el cerebro adulto. La expresión de Bcl-x<sub>S</sub> puede jugar un papel dominante respecto a Bcl-2 en la regulación de la muerte celular; un mecanismo por el cual podría formar un complejo

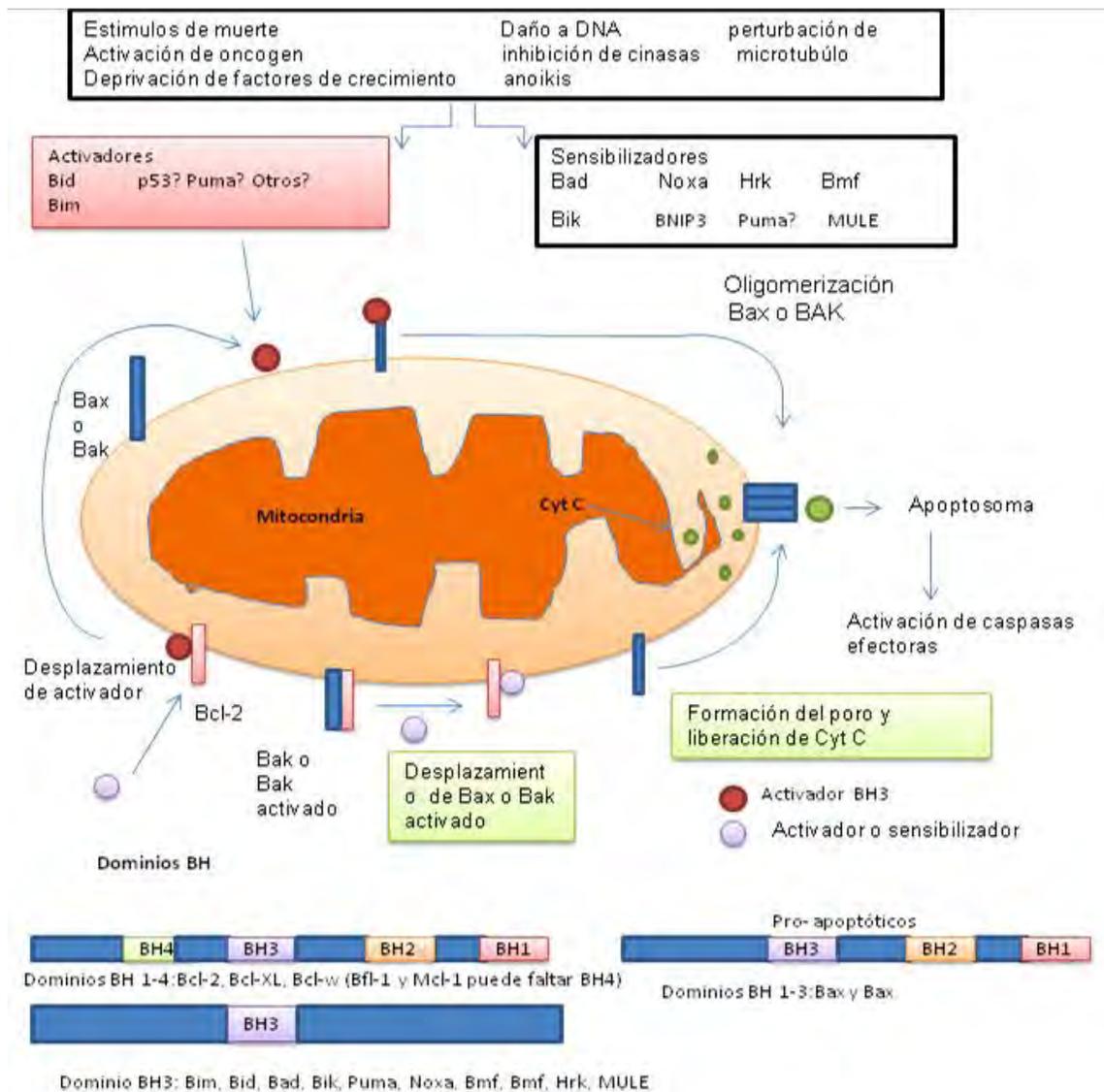
heterodimérico inactivo con Bcl-2. Una explicación alternativa sería que Bcl-xS y Bcl-xL podrían unirse directamente al mismo regulador de la apoptosis, como Bcl-2. Esta interacción sería debida al dominio amino-terminal, que muestra un alto grado de similitud entre Bcl-2, Bcl-xS y Bcl-xL [87] . También se ha planteado que Bcl-xL puede funcionar como un canal iónico que regula la permeabilidad de la mitocondria [80, 88, 89] . Dentro de los miembros pro-apoptóticos, los más importantes son Bax, Bid, Bad y Bak. Estas proteínas se encuentran de forma monomérica en el citosol [90] y pueden sufrir un cambio conformacional específico, en respuesta a una señal de estrés, que permita su oligomerización y su translocación a la mitocondria [91] promoviendo la liberación de proteínas mitocondriales pro-apoptóticas.

Aunque estas proteínas pueden tener funciones redundantes, se ha propuesto un mecanismo de regulación diferencial en función del estímulo apoptótico, de manera que una u otra sea la forma predominante [92, 93]. El mecanismo por el que Bax y Bak promueven la liberación de proteínas es objeto de estudio. Uno de los mecanismos escritos propone que, tras la oligomerización, forman un poro que permite la salida de proteínas que se localizan en el espacio intermembranal (figura 10) [94]. Este modelo supone la permeabilización, de la membrana externa, por lo que la membrana interna permanecería intacta, y no se altera el potencial, la cadena de transporte electrónico o el consumo de O<sub>2</sub> [95, 96]. Esta hipótesis se basa en la homología de estas proteínas con las toxinas bacterianas formadoras de poros, y la evidencia de que Bax es capaz de formar poros y de liberar Cyt c en liposomas artificiales [97]. Alternativamente, se ha propuesto que estas moléculas interaccionan con proteínas del complejo del poro, como el canal aniónico dependiente de voltaje (VDAC) [96, 98]. Por último se ha propuesto un mecanismo de permeabilización mitocondrial en el que las proteínas pro-apoptóticas inducen y estabilizan un aumento de la curvatura de la membrana mitocondrial externa

formando poros lipídicos [97, 99] . En el caso de Bax se ha propuesto que entre los mecanismos iniciadores de la translocación de esta proteína, podrían estar modificaciones del estado redox de la célula y modificaciones en el estado de fosforilación de esta proteína [100]. Bid se relaciona de forma crucial con la apoptosis mediada por receptores de muerte debido a que es fragmentado principalmente por caspasa 8 [101].

El fragmento resultante de la degradación, Bid truncado (tBid), se relocaliza rápidamente en la membrana mitocondrial externa, favoreciendo la permeabilidad de la membrana.

Aunque el mecanismo de acción es poco conocido, se ha intentado explicar mediante la eliminación del extremo N-terminal, que le confiere mayor carácter hidrofóbico [102], así tBid se podría unir a algún factor que facilite su localización mitocondrial, como cardiolipina, un lípido excluido de la membrana mitocondrial que podría funcionar como receptor intracelular [103]. Se postula un mecanismo alternativo por el que tBid se inserta en la membrana mitocondrial debido a que el corte producido por caspasas provoca un aumento en la capacidad de oligomerización espontánea, permitiendo que se asocie con la membrana mitocondrial.



**Figura 10. Modificado y tomado de Joslyn K Brunelle [94]. La activación de señales de estrés apoptóticas desencadenan la activación de las proteínas BH3, las cuales interactúan con miembros antiapoptóticos como Bcl-2 y Mcl-1, los cuales se localizan en la membrana externa de la mitocondria, activando la liberación de factores proapoptóticos (Bax y Bak), insertándose en la membrana externa mitocondrial y promoviendo cambios conformacionales, dando como resultado la formación del poro mitocondrial y la liberación de factores apoptóticos**

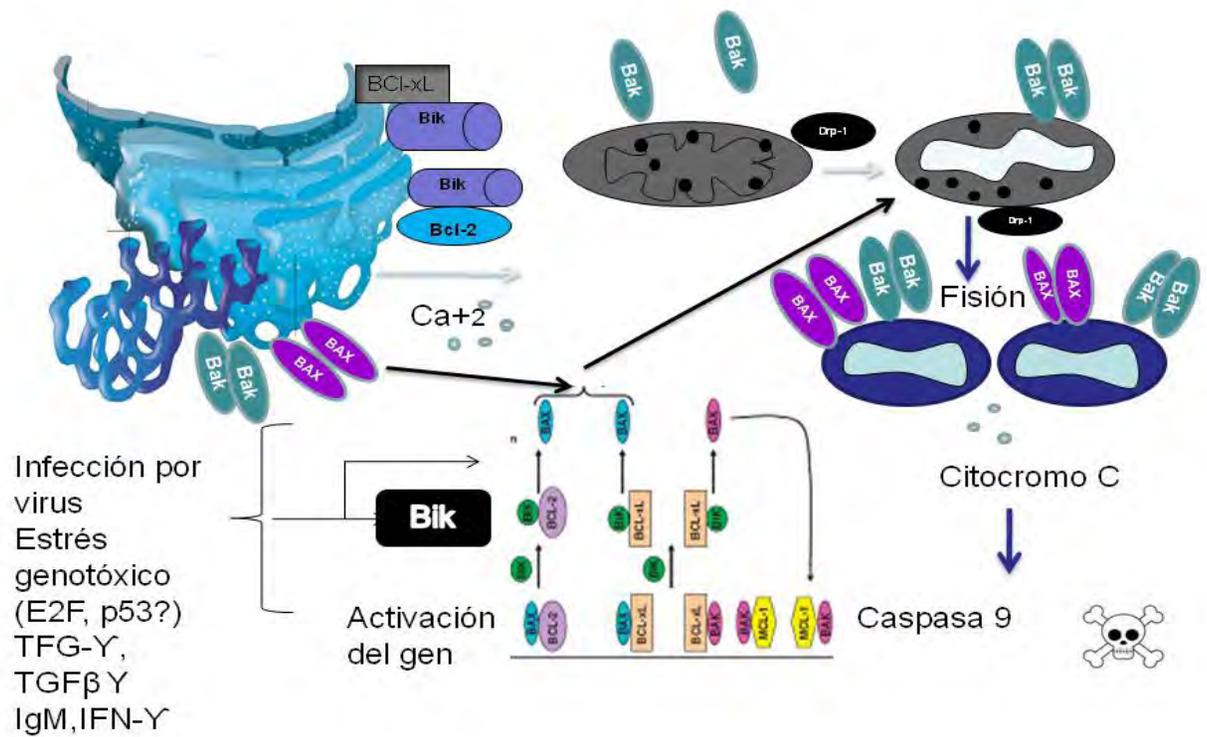
## CARACTERISTICAS QUIMICAS Y BIOQUIMICAS DE BIK

El gen BIK se localiza en el cromosoma 22q13.3, consta de 5 exones y 4 intrones. El dominio transduccional y el dominio BH3 fueron localizados en el exon 2 y 3 respectivamente. La proteína humana BIK está conformada de aproximadamente por 160 residuos de aminoácidos, contiene un dominio N-terminal transmembranal y un dominio del tipo BH3. En el análisis de la secuencia del genoma ha predicho la existencia de una isoforma más larga de aproximadamente 202 aminoácidos. Sin embargo, la existencia de una isoforma sigue sin confirmarse hasta la fecha. El modelaje computacional de la estructura secundario de la proteína sugiere que BIK está compuesta de seis alfa hélices con su respectivo dominio BH-3 expuesto [104]. Estudios de mutagénesis sitio-dirigida han demostrado que este dominio BH3 es crucial para la actividad apoptótica de la proteína[105].

BIK tiene fuerte actividad apoptótica en un gran número de tipos celulares *in vitro*. Se ha reportado su participación en apoptosis en células de melanoma humano [36], y se ha encontrado mutado en cáncer glíal, colorectal, mieloma y linfoma de células B [37-40]. La proteína hBIK es fosforilada en Thr (33) y Ser (35) por una caseína cinasa II. Evidencias experimentales han encontrado que mutaciones que previenen la fosforilación reducen la actividad de muerte y la interacción con proteínas anti-apoptóticas [106]. En cuanto a la regulación de la proteína, se sabe que la degradación vía proteosoma es el método más común para regular los niveles de proteína [107, 108]. BIK es una proteína proapoptótica se localiza en el retículo endoplásmico e induce apoptosis a través de la ruta mitocondrial que resulta de la liberación del Cyt C. La liberación de calcio del retículo endoplásmico es mediada por BIK y ha sido dependiente en la localización de la actividad conformacional de Bax/Bak en el retículo endoplásmico. Se ha demostrado que BIK induce la liberación de  $Ca^{+2}$  del retículo endoplásmico permitiendo el reclutamiento de la proteína mitocondrial

(DRP1) del citosol a la mitocondria, así como el remodelamiento de las crestas de la membrana mitocondrial interna [109], lo que provoca la liberación del Cyt C al espacio citoplasmático y causa la activación de la caspasa 9 y con ello la muerte celular (Figura 7)[110]. La salida de  $Ca^{2+}$  desde el RE ha demostrado ser la clave para el proceso apoptótico. Esto ha quedado evidenciado mediante estudios donde mediante agentes quelantes de  $Ca^{2+}$  se suprime la liberación de Cyt C por acción de BIK [95, 111]. También se ha observado cooperación entre BIK y la proteína Noxa que es otro miembro de la familia BH3-only. La expresión de Noxa por sí sola no parece ser suficiente para provocar la salida del Cyt C de la mitocondria, sin embargo la coexpresión de BIK y Noxa ha demostrado inducir la activación conformacional de la proteína Bax y la liberación del Cyt C. Aunque el mecanismo de esta cooperación entre estas dos proteínas BH3 only que están localizadas en diferentes organelos no es conocido, es posible que esté relacionado con la activación cooperativa de la proteína Bax por BIK y la liberación de la proteína Bak del complejo que forma con el miembro anti-apoptótico Mcl-1 por parte de Noxa ( Figura 11) [112, 113]. BIK está involucrado en etapas del desarrollo como la formación testicular y la espermatogénesis en donde la apoptosis juega un papel importante [114]. Las propiedades pro-apoptóticas de este gen se han relacionado con homeostasis tisular, inmunidad y supresión tumoral al igual que otros miembros de la familia Bcl-2 que comparten el dominio BH3 [112]. En estudios recientemente se reportó que la proteína BIK es capaz de inhibir la translocación de las cinasas activas ERK1/2 desde el citoplasma al núcleo en cultivos de células de epitelio de ratón cuando éstas son inducidas a apoptosis por medio de interferón gamma (IFN  $\gamma$ ) [115]. Este modelo muestra que BIK tiene más de un mecanismo para promover la apoptosis. Existen diversos reportes que sugieren que BIK podría servir como un gen supresor de tumores en tejidos específicos. BIK ha demostrado tener una alta expresión en tejido epitelial de riñón sano, mientras que en carcinomas renales la expresión del gen BIK se ha inactivado por pérdida

de la heterocigocidad en el locus de BIK o por silenciamiento epigenético a través de metilación [116]. Sin embargo, los mecanismos de BIK asociados a la apoptosis en respuesta a TAM en cáncer de mama aún no están claros, ya que un estudio previo de nuestro grupo de investigación, mediante el análisis de expresión por microarreglos sobre cáncer de mama tipo adenocarcinoma evidencio la sobreexpresión de BIK [117], por lo que el presente trabajo de investigación servirá para entender a profundidad los mecanismos moleculares asociados a BIK en respuesta a TAM.



**Figura 11. Mecanismos de apoptosis mediado por BIK (tomado y modificado de Chinnadurai) [118]. La activación de Bik es mediada por algunos factores como infección de virus, estrés genotóxico, TFG-γ, IgM, IFN-γ, que llevan a la muerte celular.**

## **JUSTIFICACIÓN**

El cáncer de mama es la neoplasia más común entre las mujeres a nivel mundial y en México es la primera causa de mortalidad en mujeres mayores de 25 años. Uno de los principales problemas en esta enfermedad es la resistencia a TAM, en pacientes que son receptor de estrógeno positivo. Se ha puesto mucha atención en blancos moleculares que regulan el proceso de apoptosis y recientemente se ha propuesto a BIK como un blanco molecular debido a su capacidad supresora de tumor; sin embargo investigaciones sobre el papel de BIK y sus efectos en la respuesta a TAM aún no se han explorado a fondo.

## **ANTECEDENTES**

Unos de los trabajos que dio pauta a mi proyecto de investigación fue lo encontrado en el por García y colaboradores en el trabajo titulado “A molecular analysis by gene expression profiling reveals BIK/NBK overexpression in sporadic breast tumor samples of Mexican females”. Mediante el uso de microarreglos de cDNA (DNA complementario) se identificaron dos grupos de tumores de acuerdo a su perfil de expresión, probablemente relacionados con la progresión del cáncer. Diez genes no se expresaron en tejido normal, pero sin embargo fueron expresados en algunos tumores. La expresión del gen proapoptótico BIK en particular fue alta en 14/15 tumores, con predominante expresión citoplasmática. El producto del gen BIK ha sido asociado con reversión tumoral en diferentes líneas celulares neoplásicas y se ha propuesto como terapia para inducir apoptosis en cánceres incluyendo el de mama. El trabajo anteriormente mencionado llevó a nuestro grupo a cuestionar si BIK está involucrado en otras funciones diferentes a su papel de la apoptosis en modelos de cáncer de mama. Por lo que el presente trabajo servirá para entender con más detalle los mecanismos moleculares de BIK en respuesta a TAM.

## **OBJETIVO**

Determinar el papel de la supresión de la expresión del gen BIK en el proceso de apoptosis celular en la línea celular MCF-7 expuestas a TAM.

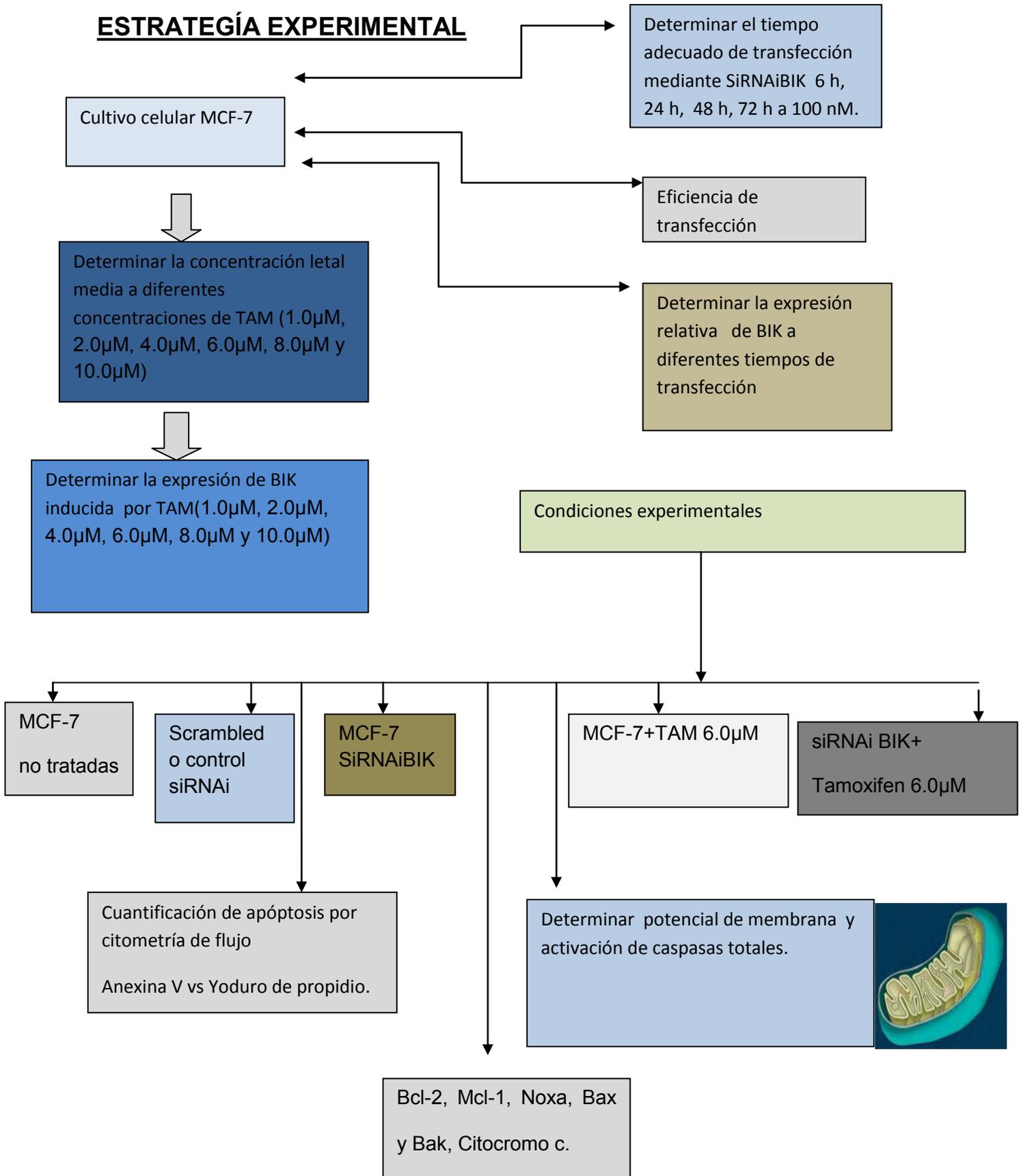
## **OBJETIVOS PARTICULARES**

1. Determinar si las células transfectadas con siRNAiBIK inhiben el proceso de apoptosis, el potencial de membrana y activación de caspasas en respuesta a TAM.
2. Analizar si la supresión de la expresión de BIK modula la expresión de proteínas que participan en el proceso de apoptosis Bcl-2, Bcl-xl, Mcl-1, Bax y Bak, Cyt C.
3. Realizar un análisis global de genes y rutas de señalización que participan en el proceso de resistencia a TAM.
4. Determinar si la supresión de la expresión de BIK en respuesta a TAM, participa en el control del ciclo celular permitiendo resistencia a TAM.

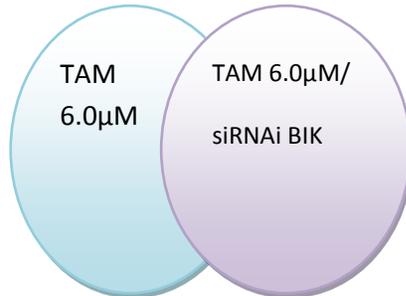
## **5. HIPÓTESIS**

La supresión de la expresión del gen BIK tiene un efecto anti-apoptótico, confiriendo a células de cáncer de mama MCF-7 resistencia al proceso de apoptosis y alterando vías de señalización implicadas en procesos de resistencia a TAM.

# ESTRATEGÍA EXPERIMENTAL



**Determinar por análisis de microarreglos aquellos genes que participan en el proceso de resistencia a Tamoxifen.**



Análisis de datos mediante el programa: Phanter, KEGG, cytoescape , HIPPIE.

**Validación de genes por western-blot STAT-2, AKT-3 y 14,3,3 z**

**Ciclo celular**

**Interactoma teórico 14, 3,3 z y su posible regulación en ciclo celular en la condición siRNAi BIK/TAM**

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

### **Cultivo celular de MCF-7 y determinación de la IC-50 del TAM**

Se utilizó la línea celular MCF-7, Se sembraron  $2 \times 10^6$  células en botellas de cultivo con una superficie de  $25 \text{ cm}^2$  fueron cultivadas en medio (DMEM-F12) con rojo fenol, suplementado con suero bovino fetal 10%, 2mM L-glutamina, penicilina 100 U/mL, estreptomicina 100µg/mL, y se mantuvieron en la incubadora a 37 °C, con atmósfera húmeda de 5% de  $\text{CO}_2$  en aire, hasta alcanzar del 80 al 100% de confluencia. Las células se despegaron con tripsina y fueron re-suspendidas en 1 ml de medio DMEMF12 con penicilina (100 U/ml, sigma), estreptomicina 100 µg/mL, L-glutamina (2mM, Sgma) y 10% de SFB inactivado. Las células se contaron para ser sembradas en placas de seis pozos y se cultivaron  $1 \times 10^6$  células, las cuales fueron tratadas con diferentes concentraciones de 4- OH-TAM (sigma Aldrich) (2.0 µM, 4.0µM, 6.0µM, 80µM y 10 µM) durante 24 h y se evaluó apoptosis por citometría de flujo con yoduro de propidio y anexina V.

### **Determinación de la expresión de BIK por RT-PCR tiempo real**

Se extrajo RNA de la línea celular MCF-7 en placas de seis pozos, se les agregó 400 µL de trizol y se recuperaron en tubos eppendor de 1 ml. Posteriormente se incubaron 5 min a temperatura ambiente, se agitaron en vortex, se agregaron 200 µl de cloroformo por cada ml de trizol, se agitaron fuertemente durante 15 seg y se mantuvieron a temperatura ambiente por 3 min. Se centrifugaron a 10000 rpm durante 15 min a 2° C, se recuperó la fase transparente (superior), se agregaron 500 µl de isopropanol por cada ml de trizol y se mantuvieron 10 min a temperatura ambiente mezclando suavemente. Las muestras se centrifugaron durante 10 min a 10000 rpm a 4° C. En las muestras donde se observó un botón al que se le agregó 1 ml de etanol al 75% y se mezcló en un vortex por 5 a 10

segundos. Luego, se centrifugó a 8,000 rpm durante 10 min a 4° C y se decantó el etanol sin perder el botón. Una vez decantado el etanol se dejó secar al aire hasta eliminar los restos del mismo (10 - 20 min). Las muestras se resuspendieron en H<sub>2</sub>O DEPC libre de DNAsas y RNAsas (20 a 40 µl), se agitaron en un vortex, se hicieron alícuotas en tubos estériles y se mantuvieron a -70° C. Por último, se utilizó una alícuota para verificar la concentración e integridad del RNA en un gel de agarosa al 2%.

Posteriormente se utilizó el kit First- Strand Síntesis SuperScript II (Invitrogen) para retrotranscribir el RNA en cDNA. Se utilizaron 5 µg de RNA total ajustados a 10 µl con agua desionizada, el procedimiento se realizó en condiciones estériles en una campana de flujo laminar. Se mezclaron los componentes del kit, First- Strand Síntesis SuperScript II en tubos libres de RNAsas de 0.2 ml con: 1 µl de dNTP Mix 10 mM y 1 µl de Oligo dT (0.5 µg/µl) 1 µl. Las muestras se incubaron por 5 min a 65 °C en el termociclador y se colocaron los tubos en una cama de hielo por 1 min. A cada tubo se adicionaron los siguientes componentes con el volumen indicado: 10X RT buffer 2 µl, 25 mM, MgCl<sub>2</sub> 4 µl y 0.1 M DDT 2 µl. Posteriormente los tubos se agitaron suavemente y se incubaron 2 min a 42° C, se adicionó 1 µl de enzima SuperScript II RT (50 unidades) a cada reacción y se incubaron por 50 min a 42° C. A continuación, los tubos se incubaron a 70° C durante 15 min y se colocaron en hielo por 5 min. Para concluir, se agregó a cada tubo 1 µl de RNasa H y se incubó a 37° C por 20 min, la concentración se ajustó a 50 ng/ml y los tubos se almacenaron a -70° C. Para analizar las diferencias entre los tratamientos, se amplificaron los genes HPRT (gen control) y BIK.

Tabla 1. Secuencias utilizadas para PCR- tiempo real

Primers	SECUENCIAS
HPRT	F 5'CCTCATGGACTGATTATGGACF3', R 5'CAGATTCAACTTGCGCTCATC3'.
BIK	F 5'GAG ACA TCT TGA TGG AGA CC3' R 5'TCT AAG AAC ATC CCT GAT GT3'.

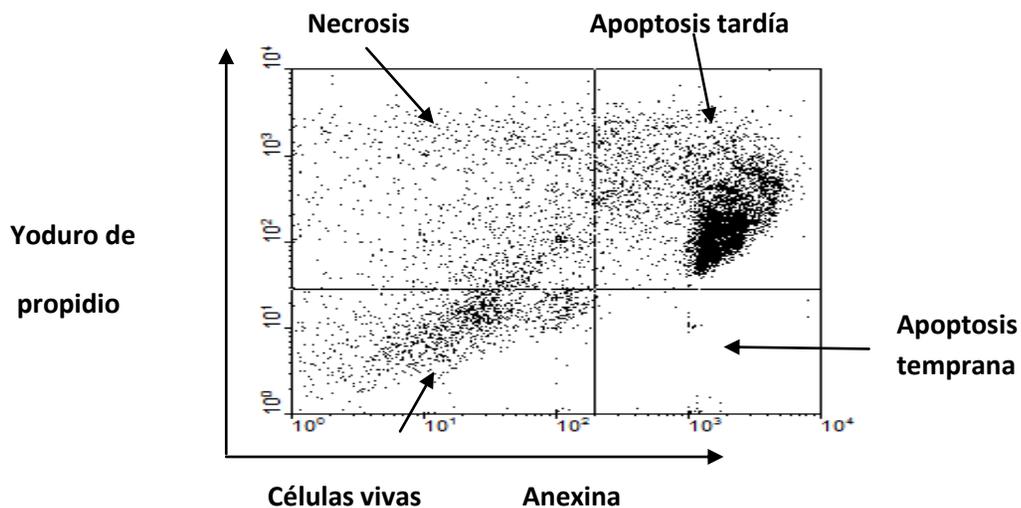
**PCR tiempo real de un solo paso.**

La concentración de cDNA se ajustó a 50 ng/ml, se realizó el análisis cuantitativo por PCR tiempo real de acuerdo a las instrucciones del KIT IQ Supermix. Se usaron sondas de BIK y HPRT (gen constitutivo) utilizando como fluorocromo el SYBRTM Green I (1X) (Amresco) como lo describe la literatura [119]. Se utilizó un termociclador de tiempo real, Rotor Gene RG 3000 (Corbett Research). La secuencia de las sondas de cada gen se presenta en la tabla 1.

**Determinación de apoptosis mediante citometría de flujo**

Se utilizó la línea celular MCF-7 tratadas con diferentes concentraciones de TAM 2.0  $\mu$ M, 4.0  $\mu$ M, 6.0  $\mu$ M, 8.0  $\mu$ M, 10.0  $\mu$ M y diferentes tratamientos experimentales ( células control, siRNAi control, siRNAi BIK, TAM 6.0  $\mu$ M, siRNAiBIK /TAM 6.0  $\mu$ M) para determinar apoptosis. Se recuperaron las células y se transfirió el medio de cultivo de las células adherentes a un tubo cónico de 15 ml y se colocó en hielo. Se lavaron las células de cultivo cuidadosamente con PBS 1X. Se retiró el sobrenadante agregándolo al tubo falcon de 15 ml. Posteriormente se añadió 2 ml de tripsina y se incubó hasta que las células se despegaron. Se agregó 1 ml de medio de cultivo DMEM al 5% de suero fetal bovino (SFB). Se centrifugó a 1500 rpm por 5 min a 4oC. Después se colocó el volumen de los pozos en un tubo para citometría de flujo (Falcon de 5ml policarbonato con tapa)

se centrifugó a 2000 rpm por 2 min a 4°C, el pellet celular se resuspendió en 500 µL de medio fresco sin suero. Se adicionaron 0.5 ml del buffer de unión y 1 µL del reactivo de anexina V-FITC y 5 µL de Ioduro de propidio, se incubó por 15 min a temperatura ambiente en oscuridad. Finalmente, la fluorescencia se midió en un citómetro de flujo (FACSCalibur, Becton y Dickinson) en donde se analizaron 10,000 eventos por experimento y a partir de las lecturas, el citómetro construye Dot plots que se usan para interpretar los resultados. La señal del FITC (fluorescencia en color verde) se detectó a 518 nm, el logaritmo de esta fluorescencia se representó en el eje de las X. La señal del yoduro de propidio se detectó a 620 nm y el logaritmo de ésta se representó en el eje de las Y. En el cuadrante inferior izquierdo aparecen las células viables, en el inferior derecho aparecen las células en apoptosis temprana, en el superior derecho apoptosis tardía y en el superior izquierdo necrosis Figura 12.



**Figura 12.** Representación de un análisis por citometría de flujo con células marcadas con yoduro de propidio y anexina-FITC.

## **Transfecciones transitorias**

Se sembraron 250,000 células de la línea MCF-7 con medio DMEM-F12 libre de antibióticos durante 24 h. Cuando las células alcanzaron un 40-60% de confluencia, se transfectaron con 100nmol/L siRNAi BIK, usando oligoduplex 5'AAGACCCCUCUCCAGAGACAU-3', 5'AAAUGUCUCUGGAGAGGGGUC-3' y como control una secuencia Scrambled (Silencer negative control # 3 siRNA Ambion). Compuesta de 19 pb, sin significancia homológica para alguna de la secuencia de genes de ratón, rata, o humano. Se usó el reactivo de Oligofectamina (Invitrogen) acorde al protocolo del fabricante. Posteriormente, 10 µL Oligofectamina se diluyó 7.5 veces en medio de Opti-MEM (Invitrogen) y se incubó a temperatura ambiente por 10 min. En un tubo separado, 5 µL de 50 µmol/L siRNA fueron diluidos en 425 µL de Opti-MEM. La Oligofectamina diluida 75µL fue añadida a la dilución siRNA y el complejo fue incubado por 20 min a temperatura ambiente. Las células se lavaron con OptiMEM y 2 ml de medio se incorporó a cada placa. La concentración final de los siRNABIK fue 100 mol/L. 6 h después de la transfección se adicionó 1.25 ml de medio con suero fetal de bovino al 20% a cada caja sin remover la mezcla de transfección durante 24-48 h de transfección.

## **Análisis citofluorométrico del potencial de membrana $\Delta\Psi_m$**

La transición de permeabilidad mitocondrial es un paso importante en la inducción de la apoptosis celular. Se utilizó el reactivo JC-1, como colorante catiónico (5,5', 6,6'-tetracloro-1, 1', 3,3'-tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine yoduro) el cual permite indicar la pérdida de la integridad funcional de la membrana mitocondrial. Esta sonda es un monómero que emite a una longitud de onda de 527 nm (verde), la cual cuando es excitada a 490 nm, forma agregados que se acumulan en la mitocondria y experimentan

un cambio en el espectro de emisión, hasta 590 nm (rojo). Para su procesamiento las células se lavaron mediante una solución amortiguada de lavado precalentada a 37°C, se centrifugaron 5 min a temperatura ambiente a 1500 rpm y se incubaron con 0.5 mL1X de JC-1. Posteriormente se incubaron las células a 37°C en una incubadora de CO<sub>2</sub> al 5% por 15 min, se centrifugaron por 5 min a 1500 rpm y se removió el sobrenadante, se resuspendió el pellet en 2 ml de medio de cultivo, para su posterior cuantificación en el FACs Scalibur, Se analizaron 10000 eventos por muestra, utilizando el software Cell Quest (Becton Dickinson).

### **Análisis de citometría de flujo para caspasas totales**

Las caspasas se detectaron por medio del kit (Vybrant<sup>®</sup> FAM poly-caspasas, Invitrogen), el cual detecta la actividad de las caspasas totales 1, 3, 4, 5, 6, 7, 8, y 9, mediante el empleo de un inhibidor fluorescente que marca las caspasas activas (FLICA). Cada FLICA contiene tres dominios distintos funcionalmente: a) el dominio fluorocromo (carboxifluoresceína o fluoresceína, FAM), b) el dominio de reconocimiento de la caspasa que comprende un péptido de tres o cuatro aminoácidos y c) el motivo de unión covalente que consiste en cloro- o fluoro-metil cetona (FMK) que se une a la cisteína de la respectiva caspasa formando tiometil cetona que inactiva irreversiblemente a la enzima [120]. FLICA penetra a través de la membrana plasmática de las células viables sin resultar tóxico para la célula. De hecho, estos inhibidores promueven la supervivencia de la célula protegiéndola de la apoptosis [121] y de la desintegración [122]. El motivo de reconocimiento del péptido de FLICA proporciona un nivel de especificidad entre el ligando y una caspasa particular. La exposición de células viables a FLICA resulta en la captación de este reactivo seguida de su unión covalente a caspasas activas dentro

de las células que están en proceso de apoptosis. El FLICA no unido se remueve de las células no apoptóticas que carecen de caspasas activas lavándolas con buffer de lavado. Las células se resuspendieron en 300 µl de medio de cultivo y se transfirieron a tubos de citometría de flujo; se añadieron 10 µl de la solución de trabajo 30X FLICA y se añadieron a las células MCF-7 en suspensión y estas fueron incubadas en la oscuridad por 1 h a 37 °c a 5 % de CO<sub>2</sub>. Posteriormente las células fueron lavadas dos veces con buffer de lavado 1x y fijadas adicionando 40 µL de paraformaldheido al 10%, durante 10 min a temperatura ambiente. Las células MCF-7 fueron lavadas y re-suspendidas en 400 µL de tampón de lavado 1x, finalmente se agregó 8 µL de yoduro de propidio para el análisis por citometría de flujo en el FACs scalibur. Se analizaron 10000 eventos por muestra, utilizando el software Cell Quest (Becton Dickinson).

## **Ensayo de MTT.**

### **Ensayos de citotoxicidad por MTT**

El método de citotoxicidad por MTT, consiste en un ensayo colorimétrico cuantitativo que mide la actividad metabólica de las células en fase de proliferación activa. Éste método se basa en la capacidad que presenta la succinato deshidrogenasa mitocondrial de las células eucariotas vivas para convertir el bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difeniltetrazolio (MTT) que es de color amarillo y actúa de sustrato, en un producto azul oscuro (formazano), lo cual se traduce en un incremento en los valores de absorbancia de la muestra, cuantificables mediante espectrofotometría. Al respecto existe gran correlación entre el número de células viables con la cantidad de MTT metabolizado. Para ello, se preparó una disolución de MTT a concentración de 5 mg/mL en medio de cultivo libre de rojo fenol.

Las células MCF-7 se sembraron a una densidad de 5000 células por pocillo en placas de 96 pocillos. Transcurridas 24, 48, 72 h de incubación, el medio de cultivo se sustituyó por 200  $\mu$ L de DMEM libre de suero y 50  $\mu$ L de solución de MTT (5 mg/mL) que fueron añadidos a cada pocillo. Transcurridas 4 h de incubación, se retiró el medio y se añadieron 100  $\mu$ L de dimetilsulfóxido (DMSO) a fin de solubilizar el formazano. La placa se leyó empleando un lector de placas a una longitud de onda de 570 nm.

### **Extracción de proteínas**

Las células se sembraron en placas de cultivo de 3.5 cm de diámetro a una densidad de  $1 \times 10^5$  células por placa. Se retiró el medio de cultivo y se lavaron las células dos veces con PBS 1X, las células fueron despegadas con tripsina-EDTA 0.25% (sigma) e incubó a 37 °C durante 3 min. Posteriormente se adicionó un volumen de medio DMEM: F12 suplementado al 10% con SFB y se aspiraron las células a un tubo eppendorf estéril de 1.5 ml. Las células se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 min, después se decantó el sobrenadante y lavó la pastilla dos veces con PBS 1X. Las células fueron resuspendidas en 100  $\mu$ L de buffer de lisis (RIPA-Tris buffer EGTA 2 mM; NaCl 316 mM; Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> 20 mM; NaF50 mM; Tris-HCl 20 mM; Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 100 mM, PMSF 100 mM y EDTA 100 mM; 0.1% de leupeptina y aprotinina 0.2% SDS y 2% Triton X-100) y mantenidas bajo constante movimiento por 2 h a 4°C. Subsecuentemente, la muestra fue centrifugada por 5 min a 20,800 rpm y el sobrenadante (30  $\mu$ g de proteína) fue desnaturalizado en muestra de Laemmli buffer y se almacenó a -30°C hasta su uso.

### **Electroforesis de proteínas en gel de poliacrilamida-SDS**

Para el desarrollo de ensayos de electroforesis vertical fueron preparados 2 geles de acrilamida: gel concentrador y gel separador. Respecto del primero se prepara mediante 10ml: Tris-HCL pH 8.8, 0.375M, Acrilamida 12%, SDS 10%, APS 10% tetrametilenetilendiamino (TEMED) 4 $\mu$ L, H<sub>2</sub>O destilada c.b.p., el cual se dejó a temperatura ambiente hasta polimerizar. Posteriormente se preparó el gel concentrador (10 ml: Tris-Hcl pH 6.8, 0.125 M, acrilamida 4%, SDS 10%, APS 10% TEMED 10  $\mu$ L, H<sub>2</sub>O c.b.p. A las muestras se adicionó un volumen de buffer de muestra (Tris 0.5 M pH 6.8, SDS 10%, glicerol, Azul de bromofenol al 0.4% en Tris 0.5 M pH6.9) y colocaron en baño de agua en ebullición durante 5 min. Después se montó el gel en la cámara de electroforesis y se adicionó buffer de corrida (Tris Base 25 mM), Glicina 192 mM, SDS 0.1%). Las muestras con 30  $\mu$ g de proteína se depositaron en el gel y se llevó a cabo la electroforesis a 150 V durante 2 h.

### **Electrotransferencia e Inmunodetección**

Las proteínas separadas se electrotransfirieron a membranas de Difluoruro de polivinilideno (PVDF) haciendo pasar corriente constante de 200 mA durante 2 horas en un buffer de transferencia (Tris- base 48 mM, Glicina 39 mM, Metanol 20%). Las membranas con las proteínas, electrotransferidas se tñieron con rojo de Ponceau S para confirmar que la carga de las proteínas era idéntico en todos los carriles. Las membranas se lavaron en PBS para eliminar el Ponceau S y se incubaron durante 90 min en Tris-solución salina tamponada (TBS) que contiene 5% de leche y 0.1% de Tween 20 para bloquear la unión inespecífica de los anticuerpos. Posteriormente, las membranas se incubaron durante 24 h a 4°C con el anticuerpo primario en TBS-tween 20 al 5% de leche descremada en polvo (Tabla No 2), después se lavaron e incubaron con anticuerpos

secundarios, conjugados con peroxidasa 1:10000. El exceso de anticuerpo fue retirado lavando 4 ocasiones con TBS-Tween (0.1%) por 10 min cada lavado.

<b>Anticuerpo</b>	<b>compañía</b>	<b>Concentración</b>
Bcl-2	Santa cruz	1:1000
MCI-1	Santa cruz	1:1000
Bax	Santa cruz	1:1000
Bak	Santa cruz	1:1000
BIK	ABCAM	1/100
Cyt C	Santa cruz	1:500
PUMA	Santa cruz	1:1000
STAT-2	Santa cruz	1:500
AKT-3	Cell signalling	1:500
14,3,3	ABCAM	1:500

Tabla 2. Anticuerpos utilizados para western-blot

### **Revelado de la membrana de PVDF**

Una vez lavadas las membranas con TBS-Twen se mezclaron por pipeteo suave 200 µL de luminol (sigma Aldrich) con 200 µL del sustrato para peroxidasa de rábano (Pierce) en un tubo eppendorf de 1.5 ml. Se dejó reposar 5 min a temperatura ambiente la mezcla y se agregaron 100 µl de esta mezcla al PVDF; después ésta se cubrió con un cuadro de

acetato para esparcir la mezcla por toda la membrana. Posteriormente se colocó una película fotográfica (Kodak) sobre el papel acetato y todo se colocó en una cámara de revelado para Western blot, usando un tiempo de exposición de 40 – 1 min dependiendo la proteína a detectar. La película fotográfica se enjuagó medio minuto con solución de revelado y posteriormente se pasó a una solución fijadora por 30 seg y se enjuagó con agua destilada. Las transferencias se sometieron a análisis densitométrico y los datos se analizaron utilizando el software GraphPad Prism 5. (GraphPad software, San Diego, CA, EE.UU). El análisis de western blot se repitió tres veces.

### **Análisis de expresión mediante microarreglos cDNA**

Se procedió a extraer el RNA mediante la metodología descrita anteriormente. Se utilizaron oligos de 50-mer Humanos 10K de MWGBiotech Oligo Bio Sets (Alemania), resuspendidos en una solución Micro spotting 50  $\mu$ M (ArrayIt Brand Products).

Los portaobjetos de 25x75 mm (SuperAmine TeleChem Internacional INC), fueron impresos por duplicado y fijados a 80 °C durante 4 horas. Para la prehibridación los portaobjetos se rehidrataron con vapor de agua a 60 °C y se fijaron con dos ciclos de luz UV (1200J). Después de hervirlos durante dos minutos a 92 °C, los portaobjetos se lavaron con etanol al 95% durante un minuto y se prehibridaron en soluciones de SSC 5X, SDS 0,1% y 1% de BSA durante una hora a 42 °C. Las láminas se lavaron y secaron antes del proceso de hibridación (procedimientos estándar del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM). La síntesis de cDNA, la impresión de las matrices y los microarreglos se realizaron en el Instituto de Fisiología Celular (IFC) de la UNAM. Los procedimientos se describen a continuación.

### **Marcaje del cDNA e hibridación de los microarreglos de DNA**

En la misma reacción se sintetizó y se marcó el cDNA con los fluoróforos dUTP-Cy3 o dUTP-Cy5, mediante el kit CyScribe First-Strand cDNA (Amersham). Para ello se utilizó un total de 10 µg de RNA total.

La incorporación de fluoróforo se analizó mediante el uso de la absorbancia a 555 nm para Cy3 y 655 nm para Cy5. Cantidades iguales de cDNA marcado fueron sometidas a hibridación en una solución UniHyb (TeleChem Internacional INC) sobre la matriz del microarreglo durante 14 horas a 42 °C.

### **Lectura del microarreglo**

Cada laminilla fue escaneada bajo 2 longitudes de onda (532 y 635 nm) en un escáner con microscopía confocal. En este equipo las moléculas Cy3 y Cy5 son excitadas mediante el uso de un láser, donde la fluorescencia emitida es capturada y transformada en una imagen que muestra los sitios de hibridación o reconocimiento específico de secuencias. Por cada uno de los microarreglos de expresión fueron obtenidas 2 imágenes, una para el fluoróforo Cy3 y otra para el fluoróforo Cy5; en esta etapa se debe ajustar la intensidad del láser y la sensibilidad de los fotomultiplicadores de tal forma que ambas imágenes muestren valores de fluorescencia total similares. Las imágenes escaneadas fueron procesadas en el lector Virtek Chip mediante el uso del Array Pro Analyzer software (Media Cybernetics). Este programa localiza a cada spot o punto sobre el microarreglo con ayuda de una trama programada (o retícula) y calcula la densidad promedio de cada una de estas señales, así como del área que rodea a cada spot. Una vez obtenida la imagen se debe considerar la aplicación de un filtro para depurar las

pequeñas imperfecciones o señales no deseadas; posteriormente se genera una retícula en la que se definen las áreas que se van a cuantificar. Definida la retícula, se determina la zona de inclusión o exclusión y el área para calcular la señal de fondo de cada una de las imágenes tratando de eliminar los puntos que no mostraron una hibridación adecuada. Definidos estos parámetros, el programa calcula las intensidades medias (densidad de los pixeles en el área definida), dando como resultado una tabla con las coordenadas y los valores de las densidad tanto del fondo como de cada uno de los spots sobre el microarreglo. Todos los puntos y sus replicas técnicas son individualmente evaluados de acuerdo a algunos parámetros matemáticos que permiten discriminar niveles de variabilidad inaceptable. Los puntos que no cumplen con estos criterios son excluidos durante el análisis estadístico. La razón entre los niveles de fluorescencia emitida por Cy3 y Cy5 en cada spot o punto representa la expresión relativa de los transcritos de RNA que son comparados de manera competitiva sobre el microarreglo que está siendo analizado. Después de realizar todas las operaciones, se agrega la descripción que existe para cada uno de los genes y se puede generar una base de datos que nos permita conocer la función, el proceso biológico y la localización celular de cada uno de los genes identificados en el microarreglo.

### **Análisis de datos KEGG**

Para determinar la interacción de genes y rutas moleculares potencialmente alteradas en células transfectadas con BIK expuestas a TAM, se usó la base de datos KEGG (Kyoto Encyclopedi of Genes and Genomes) <http://www.genome.jp/kegg/pathway.html>. Los valores de corte para la inclusión para este análisis fue una expresión diferencial con un valor de 2.0 y como mínimo siete interacciones (Base de datos Hippe).

### **Análisis para el interactoma 14, 3, 3, z**

El análisis de datos de proteínas se realizó con la base de datos HIPPIE la cual integra información de HPRD, BioGRID, IntAct, MINT, Rual05, Lim06, Bell09, Stelzl05, DIP, BIND, Colland04, Lehner04, Albers05, MIPS, Venkatesan09, Kaltenbach07 y la base de datos Nakayama02. El análisis se realizó con la plataforma bioinformática de código abierto Cytoscape y BisoGenet Plugin, usando la identificación de proteínas como nodos y la adición de los bordes de la siguiente manera: Organismo > Homo sapiens, identificación de sólo proteínas; ajuste de datos > interacciones proteína-proteína; todas las fuentes de datos y todos los métodos experimentales; métodos > adición de los bordes que conectan los nodos de entrada y de salida > Proteínas.

### **Análisis estadístico**

Se utilizó un análisis de ANOVA de una vía con la prueba de Tukey y prueba T-student.

## RESULTADOS

### Determinación de la IC50 del TAM en la línea celular MCF-7

El análisis se llevó a cabo en la línea celular MCF-7 tratada con diferentes concentraciones de TAM (1.0  $\mu\text{M}$ , 2.0  $\mu\text{M}$ , 4.0  $\mu\text{M}$ , 6.0  $\mu\text{M}$ , 8.0  $\mu\text{M}$  y 10.0  $\mu\text{M}$ ), durante 24 h de tratamiento, utilizando como control células MCF-7 no tratadas. Los resultados obtenidos demuestran que la IC50 se encontró a una concentración de 6.0  $\mu\text{M}$ , por lo que a partir de esta concentración se realizaron los experimentos posteriores. Los datos fueron procesados mediante el análisis de apoptosis por citometría de flujo y representados de manera gráfica (Figura 13).

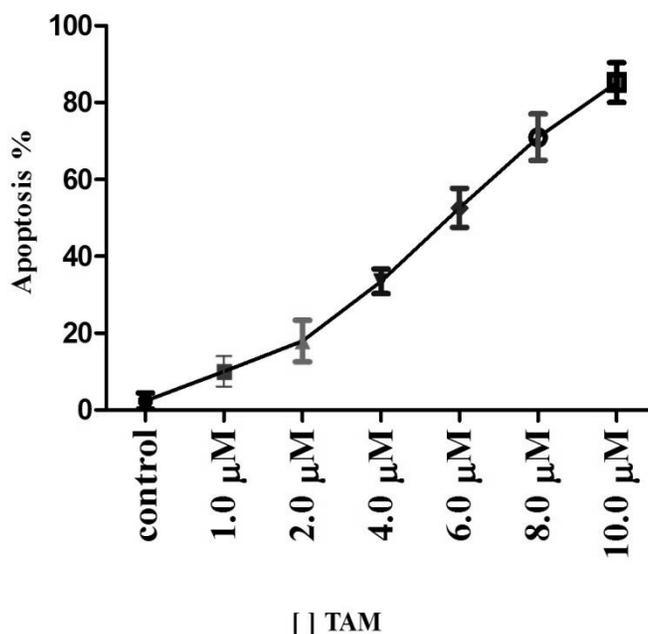
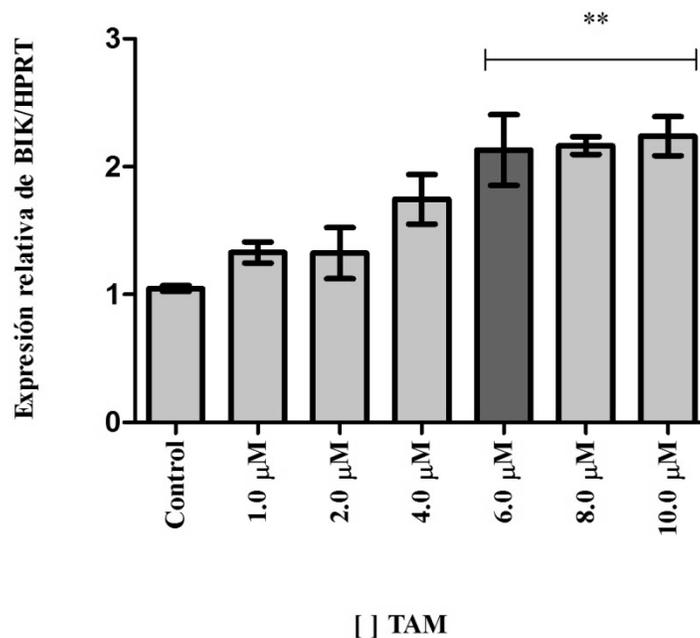


Figura 13. Determinación de la CL50 de TAM. Gráfico representativo de al menos tres repeticiones con resultados similares.

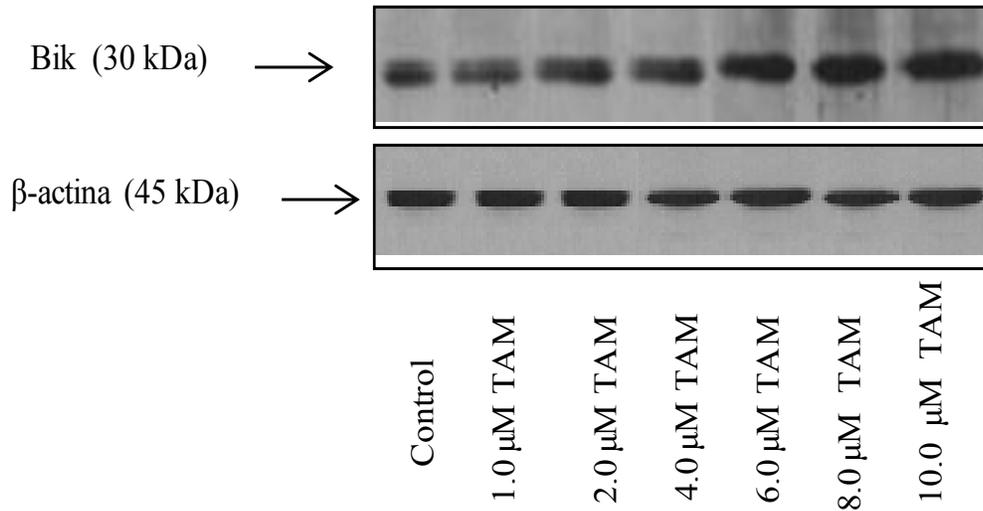
## TAM induce la expresión de BIK en la línea celular MCF-7

Algunos anti-estrogénos como Fulvestran y TAM activan transcripcionalmente la expresión del gen BIK. Para identificar la concentración que induce la expresión de BIK, las células MCF-7 se trataron con diferentes concentraciones de TAM (1.0  $\mu$ M, 2.0  $\mu$ M, 4.0  $\mu$ M, 6.0  $\mu$ M, 8.0  $\mu$ M y 10.0  $\mu$ M) durante 24 h, y el cambio de expresión de los transcritos de BIK fue determinado usando PCR tiempo real (RT-PCR) normalizando con el gen HPRT (figura 14A). La máxima expresión de BIK obtenida fue a una concentración de 6.0 $\mu$ M de TAM; no mostrando cambios estadísticamente significativos a concentraciones mayores de 8.0  $\mu$ M y 10  $\mu$ M. Estos resultados confirman que la expresión de BIK es regulado transcripcionalmente por TAM. Los datos se confirmaron mediante el análisis de Western-Blot (figura 14B).

**A**



**B**



**Figura 14. Los niveles del RNAm y los niveles de proteína de BIK se incrementaron en las células MCF-7 tratadas con TAM (TAM).** A) Células MCF-7 fueron tratadas con TAM durante 24 h y se sometieron a análisis de RT-PCR tiempo real, normalizando con HPRT. Cada valor representa la media, error estándar de la media (SE) (barras) de tres experimentos independientes \* P <0,05, de acuerdo con la prueba de la t de Student. B) se prepararon lisados celulares y se sometieron al análisis de Western Blot para BIK y β-actina como control. Gráfico representativo de al menos tres repeticiones con resultados similares.

## Determinación de los tiempos de transfección para inhibir la expresión de BIK

Se evaluó por PCR tiempo real el tiempo óptimo de transfección de siRNAiBIK, normalizando con el gen constitutivo HPRT. Se realizó una curva de interferencia del gen BIK a diferentes intervalos de tiempo 6h, 24 h, 48 h y 72 h a una concentración de 100 nM, utilizando como control negativo una secuencia de siRNAi, que no presenta homología con algún gen de mamífero conocido (scrambled). Los resultados muestran que a partir de 24 h se redujo de manera significativa la expresión del gen en un  $50 \pm 2.3$  %, y a un tiempo de 48 h el decremento en los niveles de expresión de BIK fue de  $43 \% \pm 4.56$  y a partir de las 72 h la expresión de BIK nuevamente empezó a incrementar. Por lo que se decidió trabajar con transfecciones de 24 h para su posterior tratamiento (Figura 15).

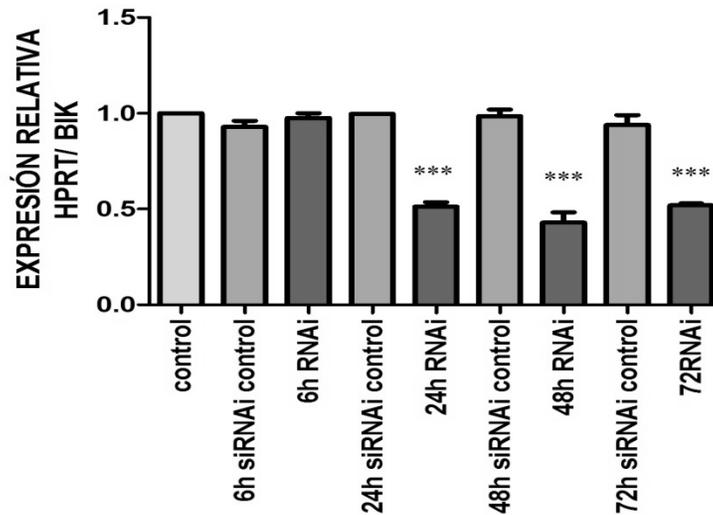


Figura 15. Curva de SiRNAi para el gen BIK a diferentes intervalos de tiempo: 6hrs, 24hrs, 48 hrs y 72 hrs. Expresión relativa HPRT /BIK, los grupos se analizaron por ANOVA de una vía con la prueba de Tukey. \* P <0,05; \*\* p <0,01; \*\*\* p <0,001 frente a no tratada.

## Supresión de la expresión BIK inhibe su expresi

Para evaluar si la expresión de BIK fue bloqueada por los niveles de expresión del RNAm y de la proteína BIK, se transfirieron células MCF-7 con siRNAiBIK, TAM 6.0µM y siRNAiBIK /TAM 6.0µM. El análisis de RT-PCR mostró un incremento de dos veces en la expresión de BIK en los controles, mientras que la supresión de BIK bloqueó el efecto de TAM. Estos datos se corroboraron mediante el análisis de Western Blot, mostrando resultados similares (figura 16 ). Estos resultados sugieren que la respuesta mediada por anti-estrógenos.

**A**

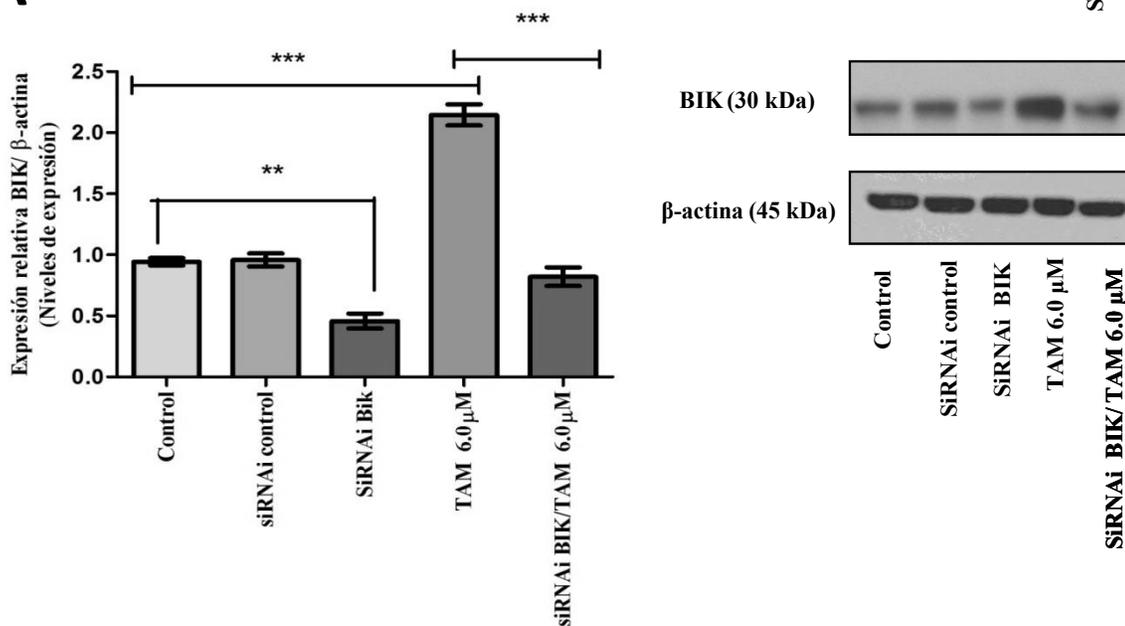
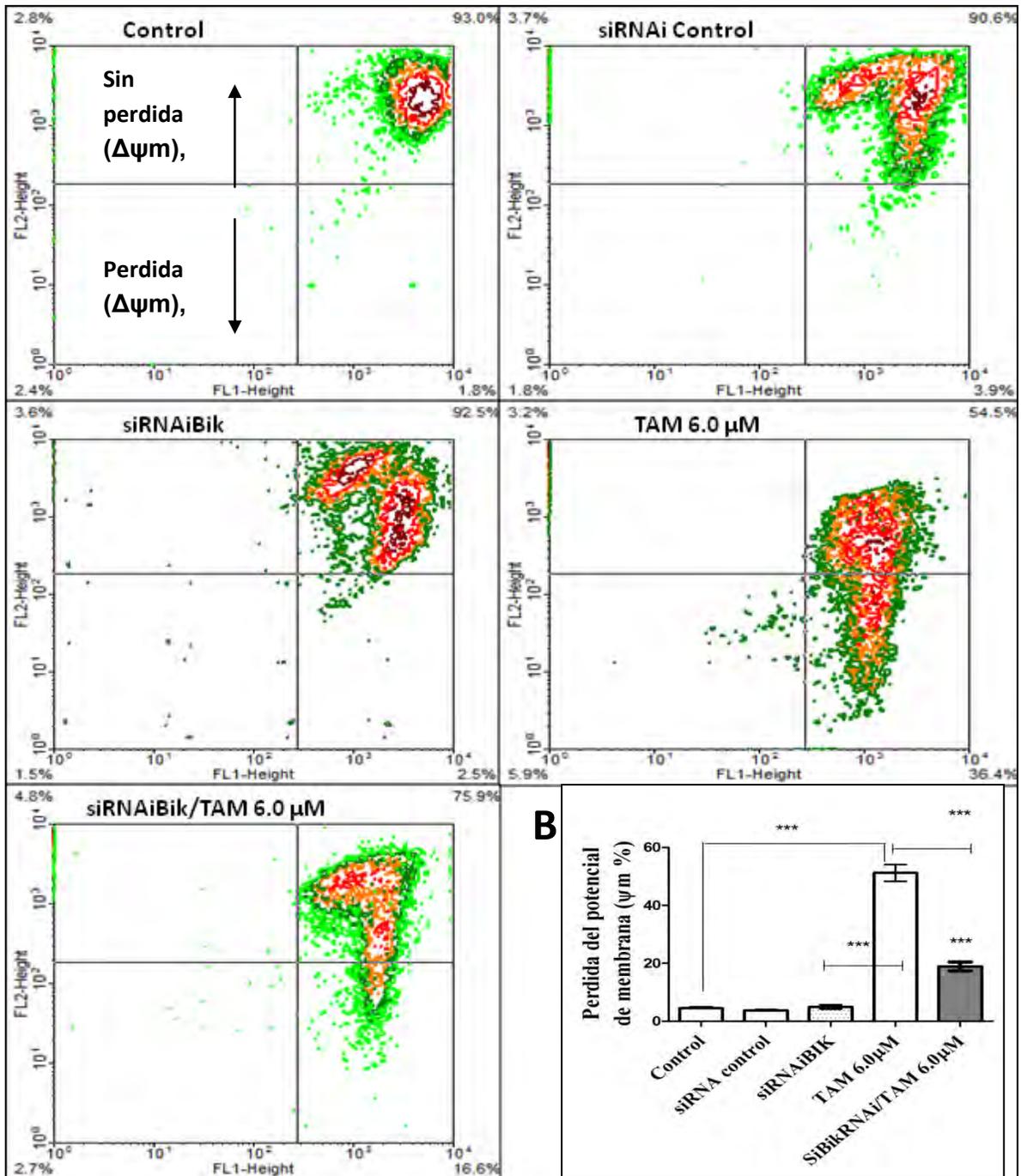


Figura 16. Supresión de BIK en la línea de cáncer de mama humano MCF-7. A) Las células fueron transfectadas transitoriamente con siRNAi (BIK). Las células se cultivaron en presencia ó ausencia de 6,0 µM de TAM (TAM) durante 24 h, seguido de la evaluación de la expresión de BIK por RT-PCR tiempo real y por análisis de Western Blot. Los grupos se analizaron por ANOVA de una vía con la prueba de Tukey. \* P <0,05; \*\* p <0,01; \*\*\* p <0,001 frente al grupo no tratado. Se muestra el gráfico representativo de tres experimentos independientes realizados por triplicado.

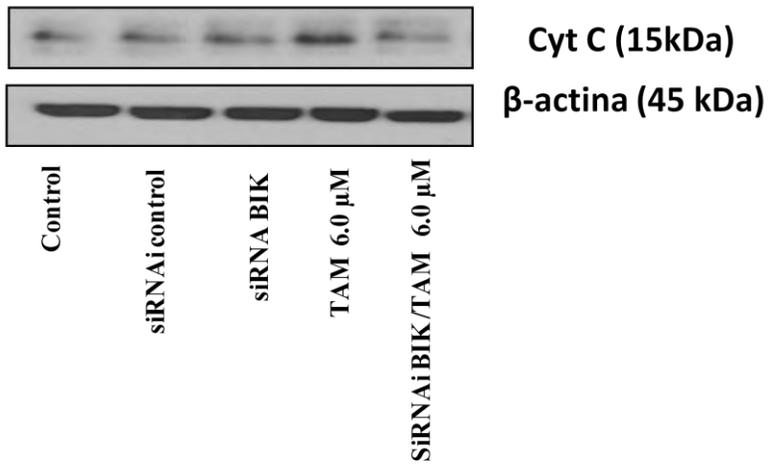
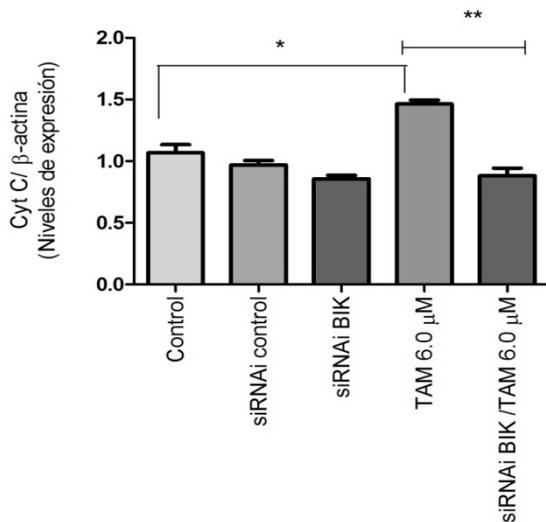
## **La supresión del gen BIK en respuesta a TAM inhibe la pérdida del potencial de membrana ( $\Delta\psi_m$ ) y la liberación del Cyt C.**

El  $\Delta\psi_m$  es un factor importante para la liberación de proteínas mitocondriales tales como Cyt C. Cuando éste se encuentra en el citosol puede llevar a la activación de la cascada de caspasas a la subsecuente muerte. Se midió la pérdida del  $\Delta\psi_m$  por tinción con JC-1 1x. Los resultados demuestran que con células control, siRNA control y siRNAi BIK, no se encontró pérdida del  $\Delta\psi_m$ , sin embargo en el grupo expuesto a TAM 6.0  $\mu\text{M}$  se observó una pérdida del  $\Delta\psi_m$  de un  $52.3\% \pm 4.56\%$ , sin embargo en el grupo de células siRNAi BIK /TAM 6.0  $\mu\text{M}$  sólo un  $20.2 \pm 3.59\%$ , de las células perdió su  $\Delta\psi_m$  (figura 17 A Y B). Estos resultados indican que BIK podría participar en la pérdida del  $\Delta\psi_m$  modulando algunas proteínas anti-apoptóticas y pro-apoptóticas que regulan la formación del poro mitocondrial. La relación entre el  $\Delta\psi_m$  y la iniciación de apoptosis es incierta, sin embargo un cambio en el  $\Delta\psi_m$  podría estar asociado con la liberación del Cyt C, y probablemente con la iniciación de la apoptosis. Para corroborar este dato se midió el Cyt C por análisis de western blot. En las células MCF-7 deficientes en BIK y expuestas a TAM 6.0  $\mu\text{M}$  no se observó un incremento en la liberación del Cyt C con respecto al grupo tratado sólo con TAM 6.0  $\mu\text{M}$  (figura 18 A Y B), sugiriendo resistencia al proceso de apoptosis.

**A**



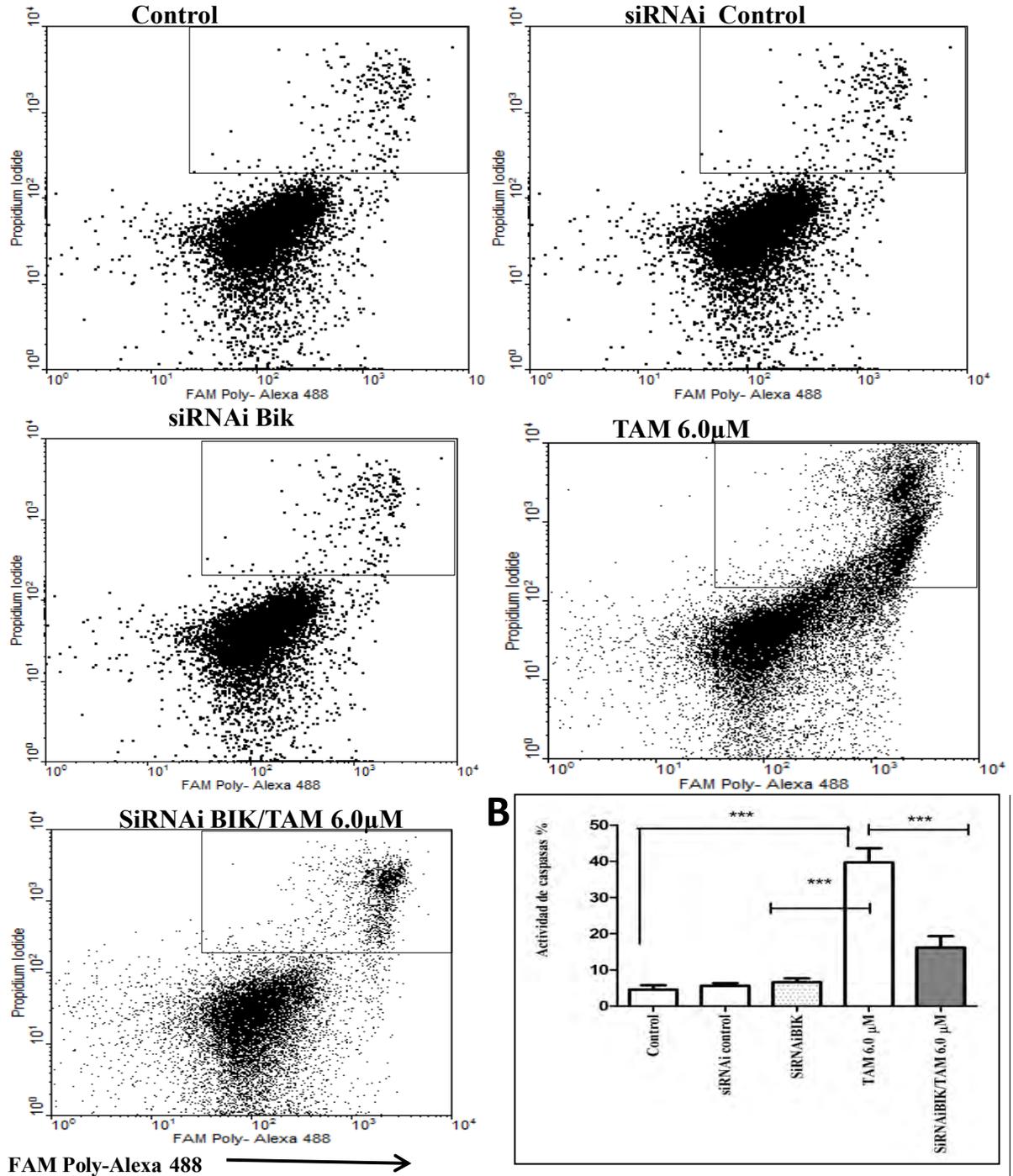
**Figura 17.** La supresión de BIK en respuesta a TAM no altera el  $\Psi_m$ . (A) Células MCF-7 (control, siRNAi control, siRNA-BIK, TAM 6.0 $\mu$ M, siRNA-BIK/TAM 6.0 $\mu$ M) fueron teñidas con JC-1 para determinar la pérdida del  $\Psi_m$  usando citometría de flujo. La fluorescencia de JC-1 es vista en los canales FI-2 (rojo) y FI-1 (verde). (B) Gráfico representativo de intensidad de fluorescencia. Un experimento representativo de al menos tres experimentos independientes, con resultados similares. Los grupos fueron analizados por Anova de una cola con prueba de Tukey. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ , comparando con el grupo control.

**A****B**

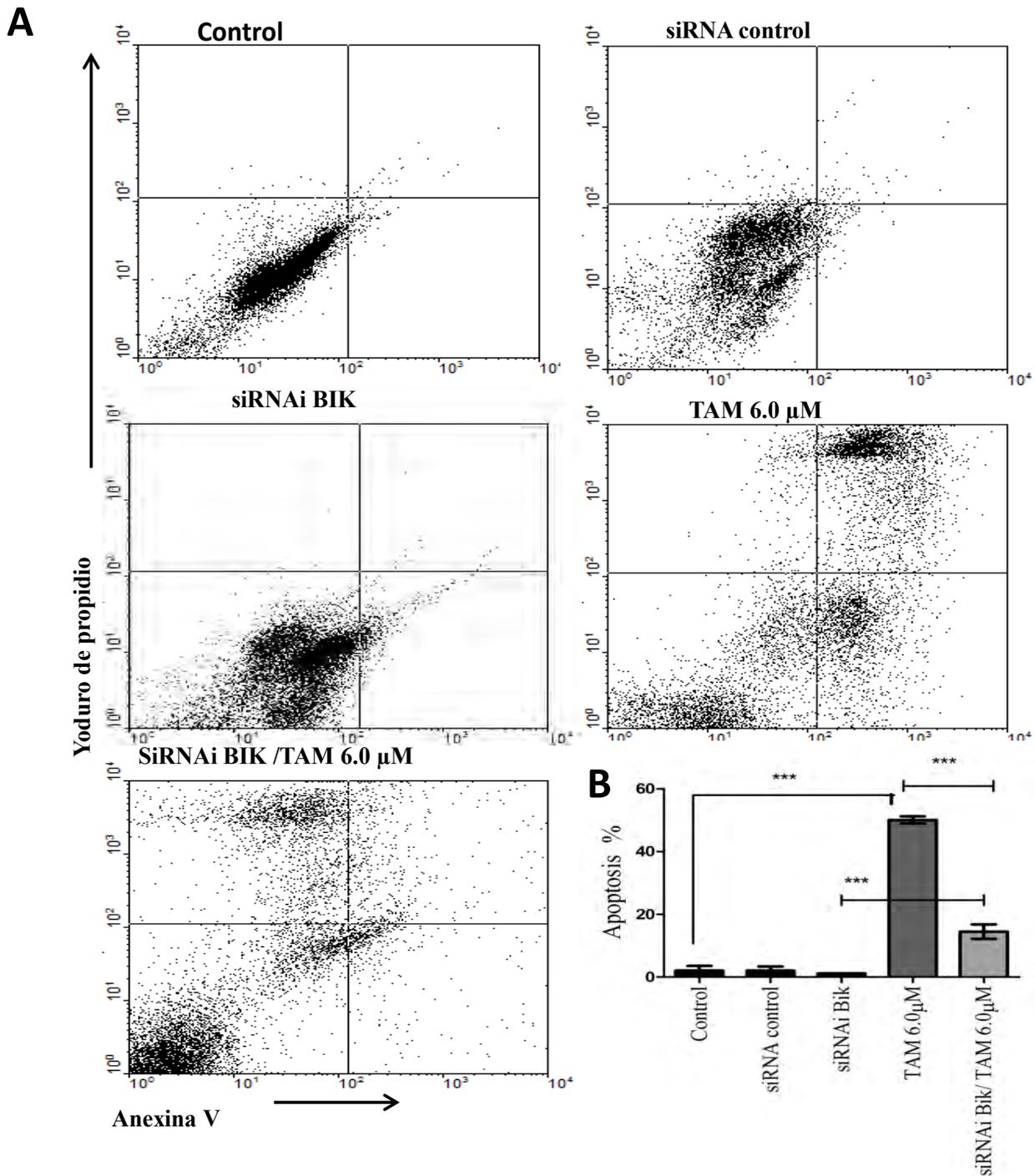
**Figura 18 . Células MCF-7 tranfectadas con BIK expuestas a TAM no promueve la liberación del Cyt C en respuesta a TAM. (A) las células fueron lisadas y preparadas para análisis de western-blot para CytC utilizando como control  $\beta$ -actina. B) Análisis densitométrico de los niveles de expresión de Cyt C. Los grupos fueron analizados por un Anova de una cola con prueba de Tukeys. \*p<0.05; \*\*p>0.01; \*\*\*p<0.001 comparando con el grupo control.**

## **La Supresión de BIK en respuesta a TAM protege contra la activación de caspasas y apoptosis**

La actividad de las caspasas desempeña un papel central como ejecutores de la muerte celular por apoptosis y por lo tanto, son sobre reguladas durante este proceso. Por medio del análisis de citometría de flujo se midió la actividad de las caspasas totales mediante el ensayo de FAM poly-caspasas (Invitrogen). Se encontró que en el grupo expuesto a TAM 6.0  $\mu$ M la activación de caspasas fue de un  $50.81 \pm 9.17$  % con respecto a los grupos control, siRNA control y siRNAi BIK; sin embargo en el grupo transfectado con siRNAiBIK y expuesto a TAM 6.0 $\mu$ M sólo se observó un 16.69% de activación de caspasas, confiriendo este último grupo resistencia a la muerte celular mediada por TAM (Figura 19 A y B). Con el objetivo de corroborar el dato anterior, se evaluó apoptosis por tinción de yoduro de propidio y anexina V. Se encontró que en los grupos control, siRNAi control y siRNAi BIK el proceso de apoptosis tardía, fue menor al 5%, mientras que en el grupo tratado con TAM 6.0  $\mu$ M a 24 h la apoptosis tardía fue de un  $49.7\% \pm 6.78$  %. En el grupo transfectado con siRNAiBIK y expuesto a TAM 6.0 $\mu$ M, sólo un 11% tuvieron apoptosis tardía, y un 19% fueron células necróticas (Figura 20 A Y B). Con estos resultados se puede concluir que la ausencia de BIK es capaz de generar resistencia a TAM.

**A**

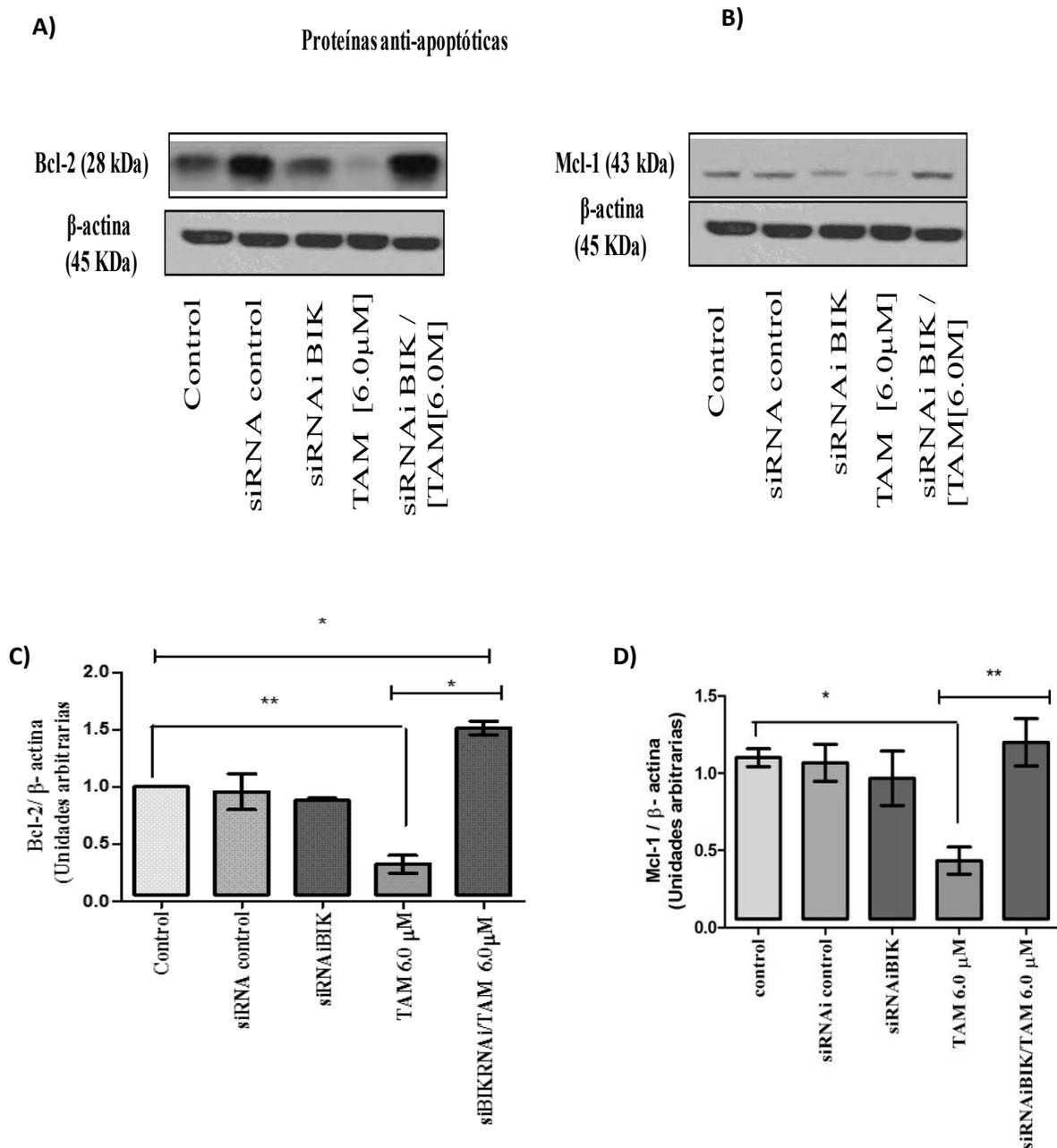
**Figura 19.** La supresión de BIK no altera la activación de caspasas y el proceso de apoptosis en respuesta a TAM. (A) Células control, siRNAi control, siRNAiBIK, TAM 6.0µM, siRNAiBIK/TAM 6.0µM fueron marcadas con ioduro de propidio (IP) y activación de caspasas (FAM-VAD-FMK). (B) Representación gráfica de intensidades de fluorescencia de activación de caspasas. Los resultados son representativos de tres experimentos independientes. Los grupos fueron analizados por ANOVA de una cola con una prueba de Tukey. \*p < 0.05; \*\*P < 0.001; \*\*\*p < 0.001 con respecto a los grupos control.



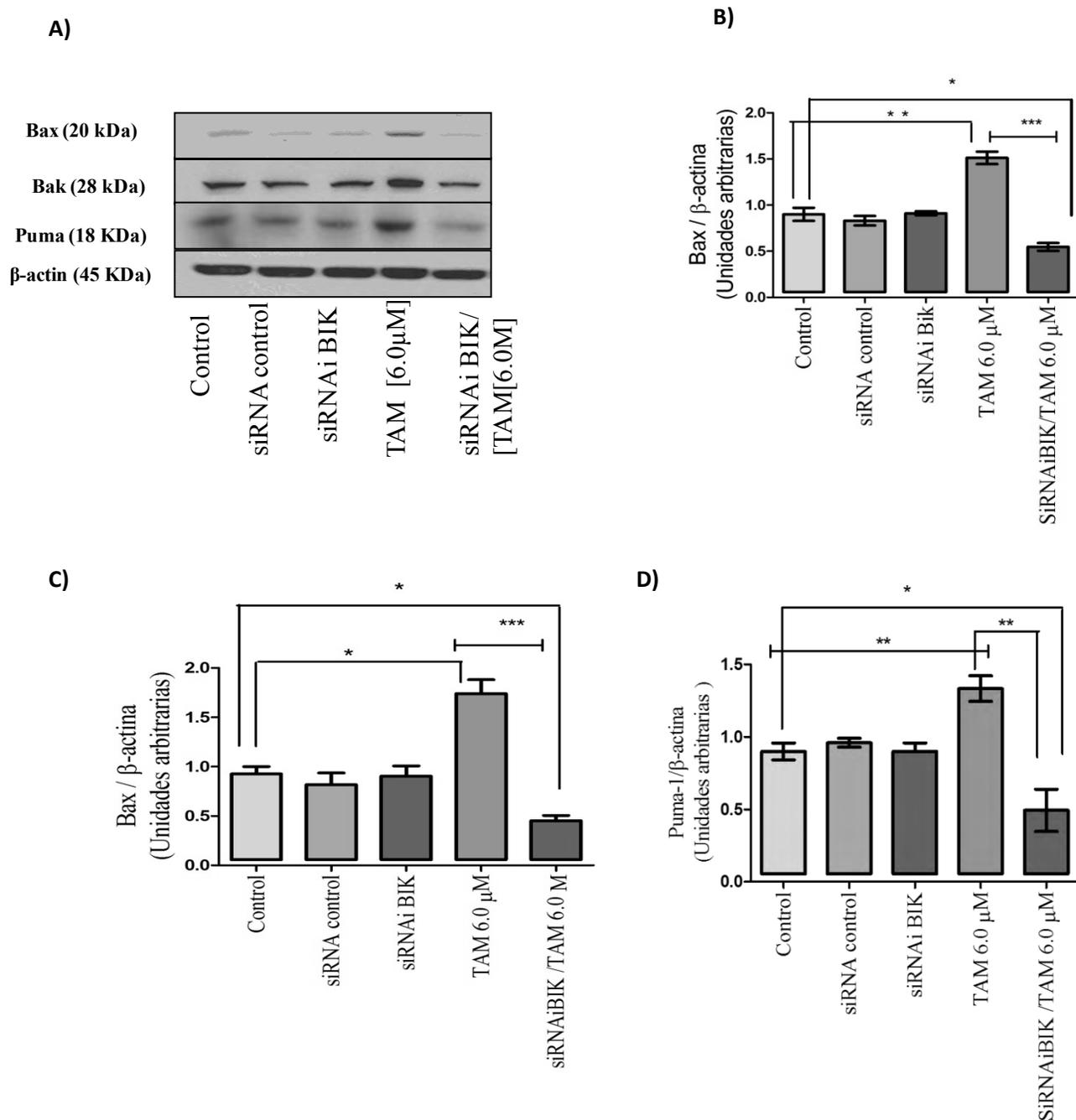
**Figura 20.** La supresión de BIK promueve inhibición del proceso de apoptosis (A) Determinación de apoptosis por anexina y ioduro de propidio (IP) (B) Representación gráfica de intensidades de fluorescencia para yoduro de propidio y Anexina. Los resultados son representativos de tres experimentos independientes. Los grupos fueron analizados por ANOVA de una cola con prueba de Tukey. \* $p < 0.05$ ; \*\* $P < 0.001$ ; \*\*\* $p < 0.001$  con respecto a grupos control.

## **La baja expresión de BIK genera resistencia a TAM en células de cáncer de mama MCF-7, regulando miembros de la familia pro-apoptóticas y anti-apoptóticas**

Para investigar los mecanismos moleculares de la proteína BIK, en el proceso de apoptosis inducida por TAM, se determinó la expresión de proteínas anti-apoptóticas y pro-apoptóticas mediante el análisis de western-blot. Los niveles de expresión de Bcl-2 y Mcl-1 en células transfectadas con siRNAiBIK expuestas a TAM 6.0  $\mu$ M fueron altos en comparación con el grupo tratado sólo con TAM (figura 23), mientras que los niveles de proteínas pro-apoptóticas como Bax, Bak y Puma incrementó su expresión en células tratadas con TAM 6.0  $\mu$ M favoreciendo la apoptosis, mientras que en células transfectadas con siRNAiBIK expuestas a TAM 6.0  $\mu$ M su expresión fue semejante a los grupos controles inhibiendo el proceso de apoptosis (figura 24 A, B, C y D). Estos experimentos sugieren que la baja expresión de BIK puede generar un proceso de resistencia debido a la baja expresión de moléculas que promueven la formación del poro mitocondrial tales como Bax y Bak aumentando la síntesis de proteínas anti-apoptóticas como Bcl-2 y Mcl-1.



**Figura 23. Las Proteínas anti-apoptóticas Bcl-2 y Mcl-1 se sobreexpresan en células MCF-7 transfectadas con siRNAiBIK expuestas a TAM. Las células MCF-7 fueron incubadas por 48h, y fueron analizadas por western blot. A) y B) western blots representativos de al menos tres experimentos independientes con resultados similares. C) y D) La intensidad de banda de Bcl-2 y Mcl-1 fue cuantificada por análisis densitométrico. Los grupos fueron analizados por análisis de la varianza ANOVA con una prueba de Tukey's. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$  vs control.**



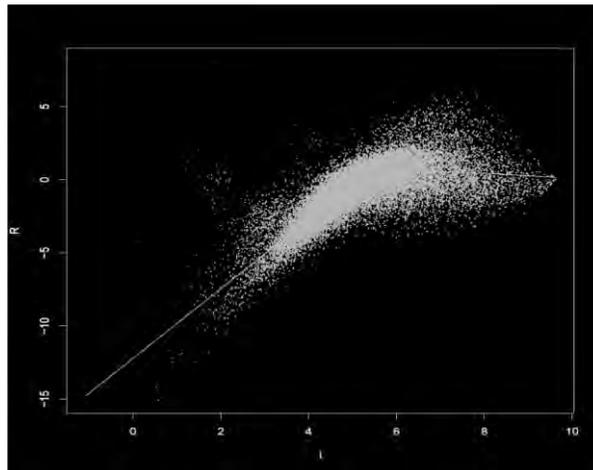
**Figura 24.** La supresión de BIK regula negativamente proteínas pro-apoptóticas en respuesta a TAM. La expresión de Proteínas anti-apoptóticas Bax, Bak y Puma es disminuida en células MCF-7 transfectadas con siRNAiBIK expuestas a TAM. Las células MCF-7 fueron incubadas por 48 h, y fueron analizadas por western blot. A) Dot Blots representativos de al menos tres experimentos independientes con resultados similares. B), C) y D) La intensidad de banda de Bax, Bak y Puma fue cuantificada por análisis densitométrico. Los grupos fueron analizados por análisis de la varianza ANOVA con una prueba de Tukey's. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$  vs control.

## Determinación de la expresión génica global por microarreglos de expresión

Con los resultados previos nosotros encontramos que BIK juega un papel fundamental en resistencia a TAM. Bajo este criterio nosotros realizamos un análisis de microarreglos para encontrar algunos genes modificados en otros mecanismos de resistencia a TAM.

Se realizó un análisis de microarreglos, comparando el grupo siRNAiBIK/TAM y células expuestas con TAM. El análisis de la expresión de genes fue realizado mediante el uso de genArise (programa estadístico), desarrollado en la Unidad de Informática del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM (<http://www.ifc.unam.mx/genarise>).

GenArise es una herramienta para el análisis de los datos de microarreglos de doble color, su objetivo es identificar cuáles genes se expresan de manera diferencial mediante el cálculo de una intensidad definida como puntuación z-score (figura 25).



**Figura 25. Representación gráfica de niveles de expresión génica obtenida a partir de datos normalizados derivados de los microarreglos. Los valores se presentan sin ningún tipo de normalización o corrección, donde R es la diferencia del logaritmo en base 2 ( $\log_2$ ) de la intensidad de fluorescencia entre Cy3 y Cy5, mientras que es la suma en logaritmo base 10 ( $\log_{10}$ ) de Cy3 y Cy5. La línea muestra la tendencia de patrones de sobre y sub-expresión de genes.**

Para la obtención de los genes diferencialmente expresados en la comparación siRNAiBIK/TAM y células expuestas con TAM se tomaron como líneas de corte los siguientes parámetros: que los genes seleccionados tuvieran un cambio en su expresión igual o mayor a 2, un valor de p ajustado igual o menor a 0.05 y un valor de B mayor o igual a 3 lo que nos da un valor de confianza del 95%. El parámetro estadístico B fue considerado como criterio de selección en comparación con el parámetro p en el sentido de que minimiza la probabilidad de seleccionar genes como falsos positivos dando una mayor confianza estadística [123]. Estas condiciones de alta astringencia permitieron seleccionar de forma única los genes con mayor significancia estadística y dejar fuera a los genes posibles falsos positivos. De estos resultados se encontró un total de 1755 genes sobre-expresados y 943 genes de baja expresión de los cuales fueron seleccionados con base a su asociación con cáncer 160 genes totales de los cuales 82 fueron sobrerregulados y 78 disminuyeron su expresión (Tabla 3).

### **Predicción de las rutas celulares afectadas en la comparación de siRNAiBIK/TAM y células expuestas con TAM**

Con los resultados de microarreglos, se llevó a cabo un análisis de enriquecimiento de rutas de señalización mediante KEGG pathway <http://www.genome.jp/kegg/pathway.html>, y se seleccionaron aquellas rutas que participan en resistencia a TAM (Tabla 4), agrupándolas de mayor a menor, por el número de genes que participan en dicha ruta y su mayor p-value. Las rutas con cambios significativos fueron las siguientes: MAPK cinasas, IGF-1 y STAT-JAK, las cuales están relacionadas con la evasión de la apoptosis, proliferación y desregulación en el ciclo celular (Figura 26, 27,28, y 29).

### Cambios de expresión obtenidos en la comparación TAM y siRNAiBIK/TAM

Nombre del gen	Zscore	Nombre del gen	Zscore
Baja expresión		Sobre-expresión	
HMGB1	-2.03509411	XIAP	2.000040102
GABPA	-2.172255529	PLSCR1	2.000127134
ALDOB	-2.054779426	MAGEA4	2.000212711
EEF1A1	-2.051129906	VASP	2.000722198
HSPA5	-2.049898623	GNAO1	2.00090725
ANXA5	-2.227103239	NF2	2.003723353
BUB1B	-2.02226208	DLG1	2.004333208
GZMB	-2.060565242	SDC2	2.004418232
SMAD4	-2.166133109	LARP6	2.00496754
CASP4	-2.356073926	HSP90AA1	2.005015812
MTA1	-2.235505907	PLG	2.005604233
MAPK3	-2.367761809	MAFG	2.005830848
SPARC	-2.356817481	<b><u>STAT2</u></b>	2.006873018
RAC1	-2.156388479	SMARCA4	2.007723768
MAPK13	-2.49310867	BACH1	2.00778297
PDPK1	-2.374495191	RPS3A	2.008390566
RPS6KA3	-2.010945359	TXN	2.00984147
SPTBN1	-2.418818855	POU2F2	2.010100456
SRF2	-2.415416218	RPS6KB1	2.010494594
ATXN1	-2.390864533	RBBP8	2.011466136
PSM2	-2.309996721	DAZ1	2.011822708
BECN1	-2.481643834	CBLB	2.012664839
TIAM1	-2.037301312	CFTR	2.013414426
UB2U2	-2.069334541	BLM	2.013468628
TPT1	-2.003159019	BRCA2	2.013542986
RNF2	-2.096392822	TRDMT	2.013825689
CBX4	-2.264785642		2.01391913

APPBP2	-2.011597129	PTPNA	2.017386613
DNM1L	-2.78079132	WEE1	2.017903267
CIAO1	-2.115528672	ARHGEF6	2.018767082
<b><u>AKT3</u></b>	-2.065638189	EXOSC8	2.020279044
AF3L2	-2.006451938	RABGAP1L	2.020482899
PLK2	-2.309075405	NAPA	2.022678414
ARIH2	-2.243152875	EHMT2	2.023477041
RBM39	-2.040228309	PPIG	2.023580277
SRSF11	-2.466626645	VPRBP	2.026526137
AKAP9	-2.687869053	PDCD5	2.027691681
GRHPR	-2.194861454	HNRNPUL1	2.027834159
MED27	-2.082847095	BCAS2	2.027874156
ZNF263	-2.466918359	CORO1A	2.02826555
TRAPPC3	-2.07490615	CD2BP2	2.029882883
APP	-2.840576675	SETDB1	2.031251029
RNF115	-2.956814135	ULK2	2.032833979
TAF5L	-2.402913192	BRE	2.033070608
PSAT1	-2.240217033	USP16	2.033667057
PHLDA1	-2.602179628	ARF1P2	2.033698381
MKRN1	-2.058833055	CHMP4A	2.033851523
GEMIN5	-2.07573111	CENPJ	2.034862354
FBXW11	-2.458456839	MYO5C	2.035171331
CHMP2B	-2.674808415	PIAS4	2.035806109
LRIF1	-2.123241679	CXXC5	2.039847244
FAM20C	-2.11608159	SIRT1	2.03996947
C19orf60	-2.060650757	CHFR	2.040968196
AZIN1	-2.592780897	TCEB3B	2.041810081
SNX9	-2.095542026	ZCCHC10	2.041849098
MRPL44	-2.40827836	CSAD	2.042545465
ARRDC3	-2.308424236	ZNF440	2.043152172
CAMKID	-2.027952902	LZTS2	2.04567344
ANAPC5	-2.604415137	MOAP1	2.046763058
ANAPC7	-2.018709785	DYX1C1	2.047518606
SOX6	-2.292752161	DGCR6L	2.049013275

XRN1	-2.142137952	SPATA24	2.050439628
RRN3	-2.120160907	NADK	2.051804637
TRIM9	-2.248928424	IFT20	2.051832103
LRRK2	-2.218337869	KIF15	2.05287927
ZNF830	-2.03170208	APP	2.053843027
FBXO32	-2.619781515	ODF2L	2.054036548
PCGF5	-2.166539853	MED	2.054533453
EEF1G	-2.382906256	DYNLL2	2.056357466
ARGB	-2.033151009	RICTOR	2.056783357
UBE2S	-2.028714905	PRKACA	2.057527794
FAM210	-2.037230048	NME1	2.057928057
FTH1	-2.435209529	BANP	2.059501155
H3F3B	-2.083384956	<b><u>YWHADZ</u></b>	2.059613651
NME1	-2.063277218		
TWF2	-2.181373245		
CORT	-2.606870347		
CCDC158	-2.889380733		
SRP9	-2.563148585		
AIDA	-2.515336286		
PI3KR3	-2.801710848		

**Tabla 3. Genes sobreexpresados y de baja expresión en la comparación TAM y siRNAiBIK/TAM. Genes señalados en negritas son aquellos seleccionados para su análisis de validación fuera del microarreglo de expresión.**

ID	Pathways	Number of genes	p-value	Genes
hsa04010	MAPK signaling pathway	16	3.58E-01	DUSP6, FGF5, RAC1, MAPK3, NF1, STMN1, DUSP16, DUSP4, KRAS, RASA1, AKT3, CACNB2, TAB2, PRKACA, MAPK13, RPS6KA3
hsa04910	Insulin signaling pathway	13	1.93E-02	KRAS, PPP1R3B, AKT3, PYGL, RPS6KB1, PRKAR2A, MAPK3, PRKACA, PDPK1, CALM1, GCK, SLC2A4, PRKAR1A
hsa04630	Jak-STAT signaling pathway	9	3.42E-01	IL7R, PRL, AKT3, IL7, IL6ST, PIAS4, IL15, STAT2, IL11RA
hsa04520	Adherens junction	8	3.27E-02	MAPK3, MET, SNAI2, CTNNB1, SMAD4, PVRL2, RAC1, FARP2
hsa04012	ErbB signaling pathway	8	5.70E-02	KRAS, MAPK3, NRG4, AKT3, NRG2, PAK6, AREG, RPS6KB1
hsa04110	Cell cycle	8	2.43E-01	WEE1, ANAPC2, YWHAZ ANAPC5, ORC1L, SMAD4 BUB1B, CDK6
hsa04310	Wnt signaling pathway	8	4.85E-01	FZD2, CTBP2, FBXW11 RAC1, PRKACA, CTNNB1 SMAD4, NFAT5
hsa04150	mTOR signaling pathway	7	1.11E-02	MAPK3, ULK2, PDPK1, AKT3 RPS6KA3, ULK3, RPS6KB1
hsa04370	VEGF signaling pathway	7	7.98E-02	KRAS, MAPK3, SPHK2 MAPK13, AKT3, NFAT5, RAC-1
hsa04070	Phosphatidylinositol signaling system	7	8.87E-02	PLCD4, CALM1, PIP5K1B IMPA2, PIK3C2A, DGKB PIK3C3
hsa04210	Apoptosis	6	3.16E-01	PRKAR2A, ENDOG, PRKACA AKT3, CYCS, PRKAR1A
hsa04140	Regulation of autophagy	5	2.05E-02	MAPK3, ULK2, PDPK1, AKT3 RPS6KA3, ULK3, RPS6KB1
hsa04340	Hedgehog signaling pathway	4	2.90E-01	KAT2A, JAG2, CTBP2
hsa04350	TGF-beta signaling pathway	3	8.28E-01	MAPK3, SMAD4, RPS6KB1

**Tabla 4. Rutas de señalización asociadas con resistencia a TAM.**

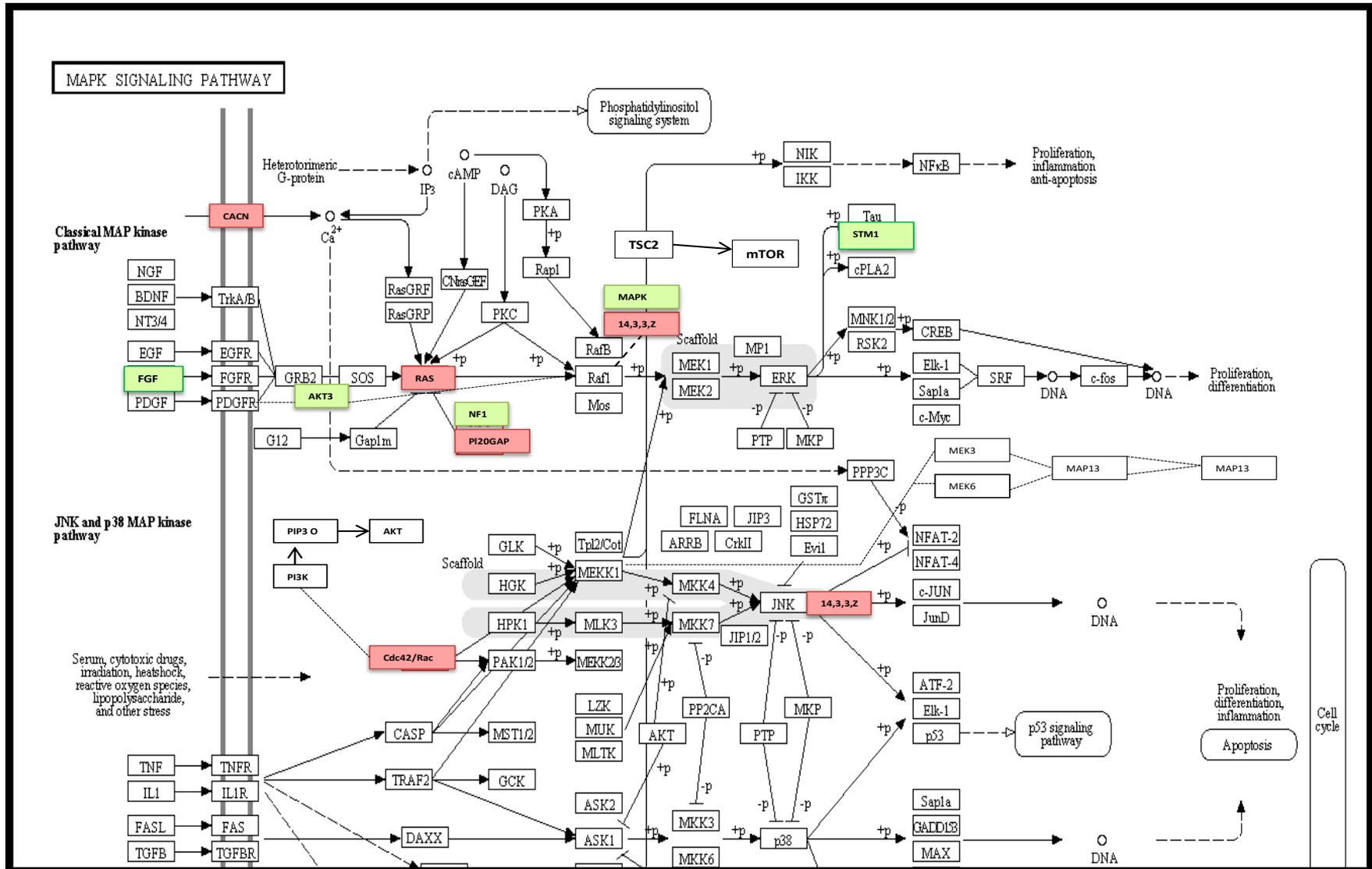


Figura 26. Ruta de señalización de MAPK. En color rojo se muestra patrón de genes con alta expresión y verde genes de baja expresión. Mediante el uso del software KEEG.



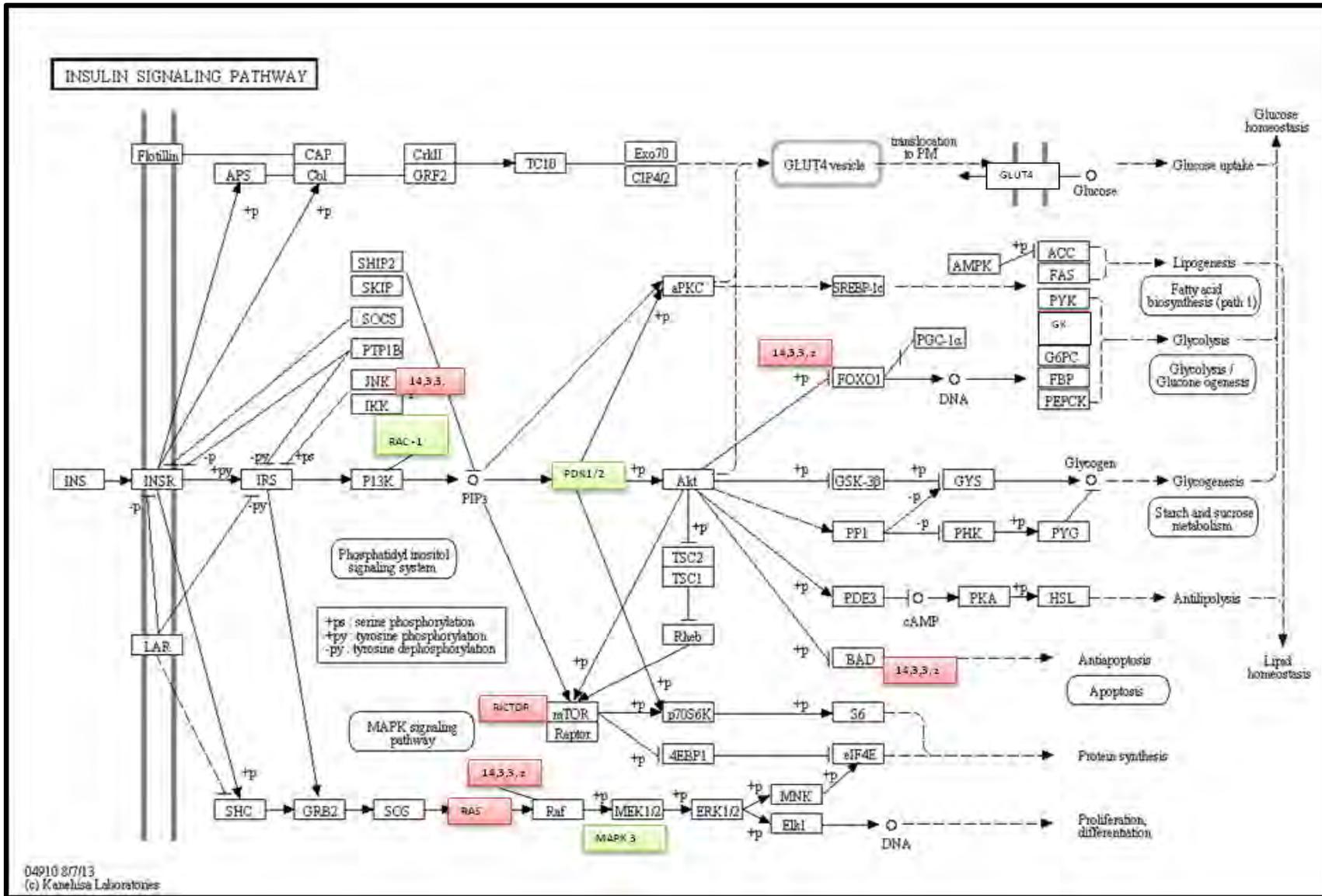
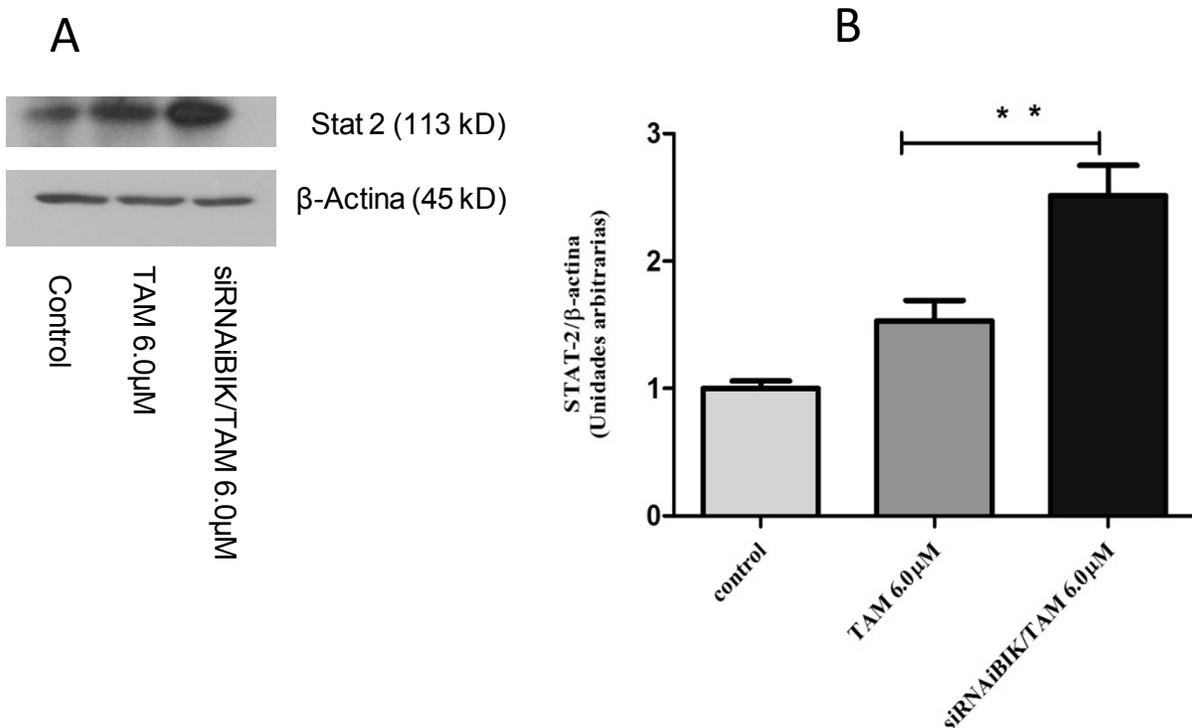


Figura 28. Ruta de señalización insulina en color rojo se muestra patrón de genes con alta expresión y verde genes de baja expresión. Mediante el uso del software KEEG.



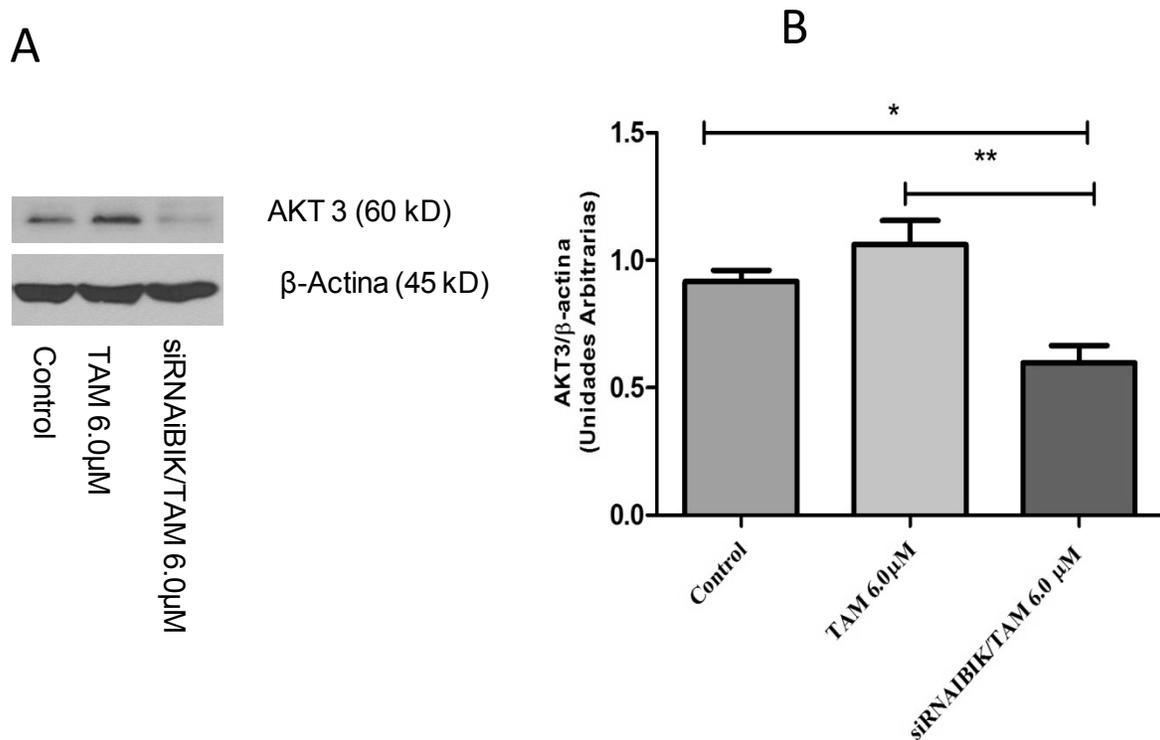
## Validación del análisis de microarreglos

Para validar los resultados por el análisis de expresión en los microarreglos, se midió la expresión de las siguientes proteínas AKT3, STAT-2 y 14-3-3-z; las cuales participan en la promoción de la tumorigenesis y la progresión de células de cáncer de mama. Se realizó el análisis por western blot comparando tres condiciones: células control, TAM 6.0µM y siRNAiBIK/ TAM 6.0 µM. Al determinar la expresión a nivel de la proteína, se obtuvo una sobre-expresión de la proteína STAT2 en el grupo siRNAiBIK/ TAM 6.0µM, en comparación con los grupos: control y TAM 6.0µM (Figura 30 A y B).



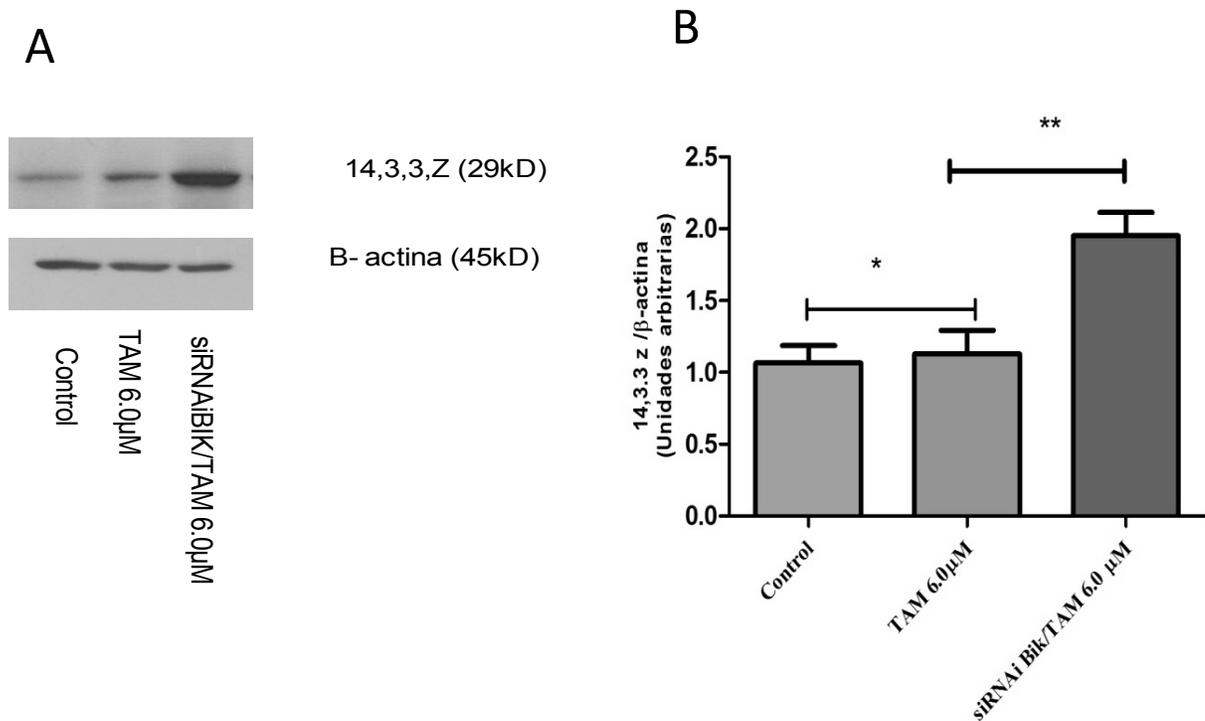
**Figura 30. STAT-2 es sobre-expresada en células transfectadas con BIK expuestas a TAM. A) Las células MCF-7 fueron incubadas por 48 h, y fueron analizadas por western blot. Gráfica representativa de al menos tres experimentos independientes con resultados similares. B) La intensidad de banda de STAT-2 fue cuantificada por análisis densitométrico. Los grupos fueron analizados por análisis de la varianza ANOVA con una prueba de Tukey's. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$  vs control.**

Se ha correlacionado la expresión de la proteína AKT3, con la progresión del cáncer. Por lo que se realizó un análisis de western blot, para medir su expresión. Se encontró que en las células siRNABI/TAM 6.0µM hay una disminución en la expresión de AKT-3 en comparación con los grupos control y TAM 6.0µM (figura 31 A y B).



**Figura 31. AKT3 disminuye en células transfectadas con BIK expuestas a TAM. A)** Las células MCF-7 fueron incubadas por 48h, y fueron analizadas por western blot. Gráfica representativa de al menos tres experimentos independientes con resultados similares. **B)** La intensidad de banda de AKT3 fue cuantificada por análisis densitométrico. Los grupos fueron analizados por análisis de la varianza ANOVA con una prueba de Tukey's. \*p<0.05; \*\*p<0.01;\*\*\*p<0.001 vs control.

La proteína 14-3-3- z es codificada por el gen YMHADZ, participa en la regulación del ciclo celular, induciendo un mayor crecimiento e inhibiendo apoptosis mediada por estrés, eventos que resultan ser mediadores de resistencia a TAM. Se analizó en el sistema la expresión de 14-3-3-z, por medio de western blot, observándose que en los grupos control y el tratado con TAM no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la expresión de la proteína; sin embargo en las células siRNABIK/TAM 6.0  $\mu$ M hubo una sobre-expresión de 14-3-3-z sugiriendo inhibición del proceso de apoptosis (figura 32 A y B).



**Figura 32. La proteína 14, 3,3 Z es sobre-expresada en células transfectadas con BIK expuestas a TAM. A) Las células MCF-7 fueron incubadas por 48h, y fueron analizadas por western blot. Gráfica representativa de al menos tres experimentos independientes con resultados similares. B) La intensidad de banda de 14, 3,3 Z fue cuantificada por análisis densitométrico. Los grupos fueron analizados por análisis de la varianza ANOVA con una prueba de Tukey's. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$  vs control.**

### **La supresión de BIK incrementa progresión del ciclo celular en respuesta a TAM**

Uno de los mecanismos implicados en la resistencia a TAM, es el descontrol en el ciclo celular. Con la finalidad de corroborar este dato se determinó la participación de BIK en la progresión del ciclo celular, en el grupo de células tratadas con TAM se encontró una acumulación en la fase G0/G1 con respecto a los grupos control y siRNAiBIK/TAM 6.0  $\mu$ M y una correspondiente reducción en el porcentaje de células que entran a la fase S del  $40 \pm 2.23$ ; mientras con células siRNAi/TAM 6.0  $\mu$ M la fase G0/G1 no hubo una retención en la fase del ciclo (figura 33), Además se observó un incremento en la fase G2-M con respecto a los grupos control y TAM. Estos resultados sugieren que la supresión de la expresión de BIK tiene un papel en la progresión del ciclo celular en respuesta a TAM induciendo la proliferación y como resultado la inhibición del proceso de apoptosis. Con la finalidad de analizar si los resultados del ensayo del ciclo celular reflejan las diferencias en la viabilidad celular se realizó un ensayo de MTT a diferentes tiempos: 24 h, 48 h y 72 h. En las células expuestas a TAM la viabilidad celular disminuyó en un 50% con respecto a las células control, en un tiempo de 24 h y a partir de las 48 h y 72 h se muestra una considerable reducción en la viabilidad celular. Mientras que el grupo siRNAiBIK/TAM presentaron una viabilidad celular similar con respecto al grupo control, lo cual sugiere una inhibición del efecto de TAM debido a la supresión de la expresión de BIK (figura 34).

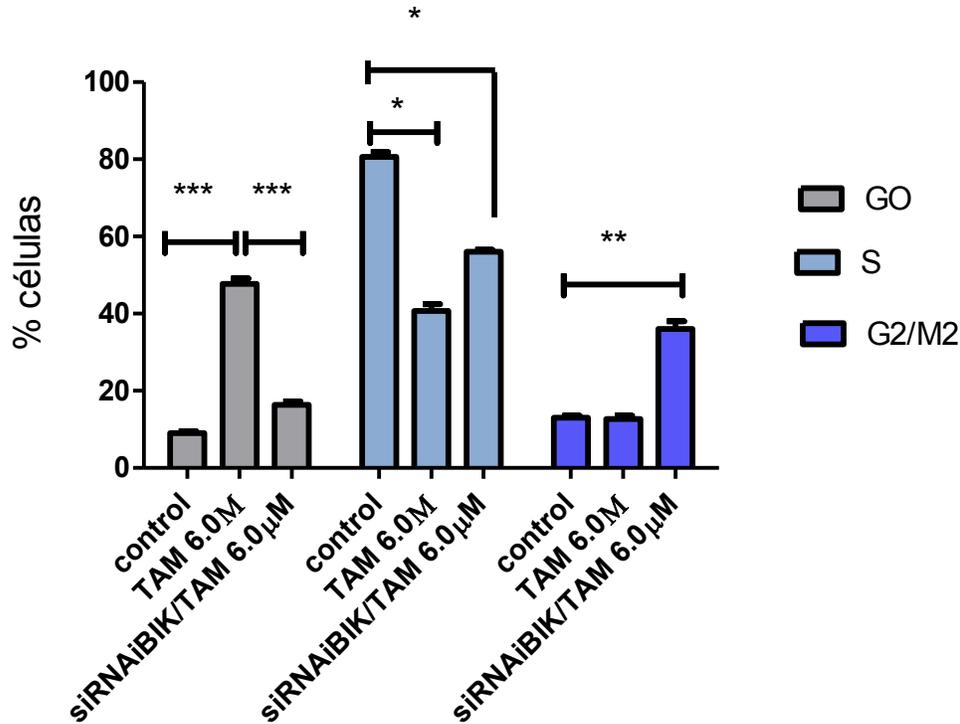


Figura 33. La ausencia de BIK en respuesta a TAM no retiene en la fase G0 y favorece la entrada a la fase G2/M. Los datos fueron procesados mediante el análisis de citometría de flujo por tinción de yoduro de propidio y representados de manera gráfica, figura representativa de al menos tres experimentos independientes. Los grupos fueron analizados por análisis de la varianza ANOVA con una prueba de Tukey's. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$  vs control.

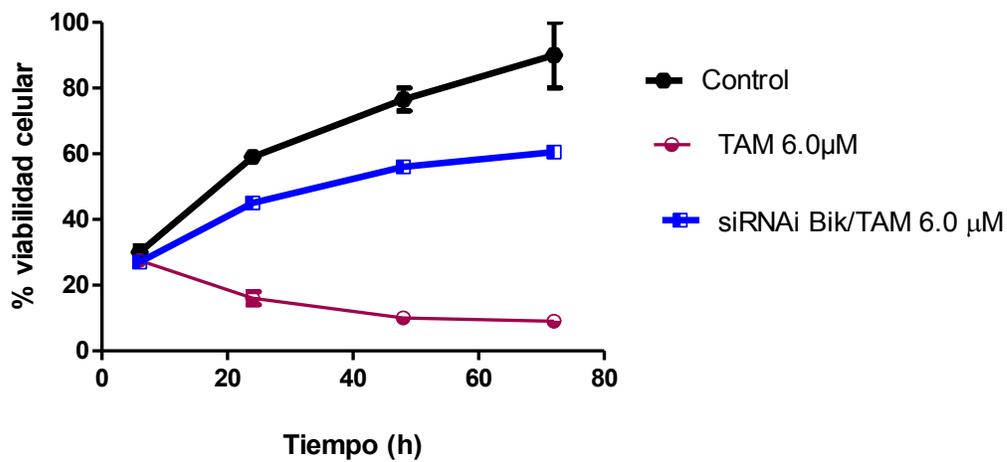


Figura 34. Viabilidad celular por ensayos de MTT a diferentes intervalos de tiempo 24 h ,48 h, y 72 h.

## Análisis del Interactoma-*in silico* de otras moléculas implicadas en el control del ciclo celular

Con el propósito de ampliar nuestra perspectiva de otras moléculas que podrían regular el ciclo celular y tener una posible explicación hipotética del incremento en la fase G2-M del ciclo celular, se realizó el análisis del interactoma teórico para determinar la implicación de 14-3-3-z en el control del ciclo celular en la condición siRNA-BIK/TAM 6.0µM, utilizando el programa HIPPIE <http://cbdm.mdc-berlin.de/tools/hippie/>. En este interactoma se encontró que WEE1 mostró cambios a nivel de RNAm lo cual podría favorecer de manera importante la entrada al ciclo celular en la fase G2-M (Figura 35).

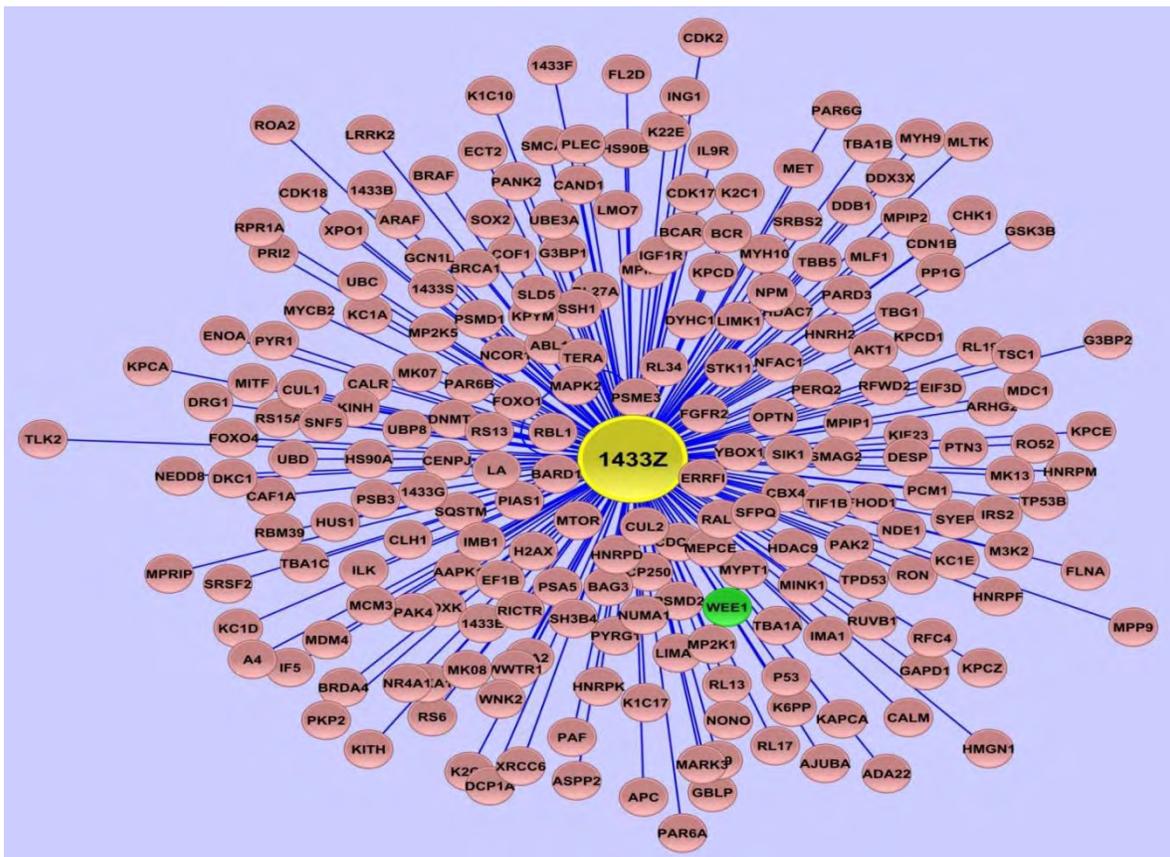


Figura 35. Interactoma teórico de 14,3,3 z y su regulación en el ciclo celular en la condición de siRNAiBIK/TAM.

## **DISCUSIÓN**

El cáncer de mama es la neoplasia del género femenino más frecuentemente detectada en todo el mundo. El (ER) se expresa en un 60-70% de este tipo de tumores de mama [124, 125]. Se considera una neoplasia heterogénea a nivel clínico, histológico y molecular. Sin embargo, a pesar de los estudios individuales se han identificado algunas moléculas clave y mecanismos celulares responsables de la resistencia el principal fármaco empleado para el tratamiento de cáncer de mama es el TAM.

Una molécula de interés para nuestro grupo de investigación ha sido BIK, previamente asociado con regresión tumoral demostrado para diferentes líneas celulares, la cual ha sido propuesta como terapia para inducir apoptosis en cáncer incluyendo tumores de mama. Sin embargo, nuestro grupo y trabajos previos de investigación han obtenido altos niveles de la proteína BIK en cáncer de mama [117], cáncer pulmón y células linfoblásticas derivadas de pacientes con anemia de Fanconi [126]. El hecho de que algunos estudios encuentren a este gen sobre-expresado fue una de las evidencias que llevó a la realización del presente trabajo de investigación, con la finalidad de estudiar a fondo las posibles funciones de BIK en respuesta a TAM.

Trabajos previos han encontrado que la proteína BIK es inducible por inanición de estrógenos o mediante el tratamiento con Fulvestran y TAM, lo cual ha sugerido que tiene un papel crítico en la apoptosis inducida por anti-estrógenos en células de cáncer de mama [127, 128]. El TAM es el tratamiento más comúnmente usado para pacientes que son ER- positivos. Aunque la eficacia del TAM se ha atribuido para arrestar el crecimiento del tumor e inducir apoptosis por inhibición de la señalización del receptor de estrógenos[22, 129], sin embargo los mecanismos moleculares permanecen no del todo entendidos. El presente estudio, demostró que la supresión de la expresión del gen BIK promueve resistencia a TAM en células MCF-7 de cáncer de mama. Se encontró que la

exposición a diferentes concentraciones de TAM lleva al incremento de la expresión de BIK posiblemente por cambios en las rutas transcripcionales.

Estudios previos han determinado que ciertos fármacos, citocinas e infección por virus afecta factores de transcripción, tales como E2F y p53, promoviendo activación transcripcional del gen BIK [130, 131]. Cabe destacar que Mathai *et al* 2002, encontraron que la expresión de BIK en células epiteliales humanas depende de p53, sin embargo otros autores no han logrado identificar elementos funcionales de interacción con p53 en el promotor de BIK [130].

En células MCF-7 tratadas con TAM se estudió el efecto de la interferencia de BIK. Se encontró que estas células fueron resistentes al proceso de apoptosis, lo cual se determinó mediante el análisis de apoptosis,  $\Delta\Psi_m$  y activación de caspasas. Debido a que la relación entre el  $\Delta\Psi_m$  y la apoptosis es incierta, se midieron los niveles de expresión del Cyt C, observándose que las células transfectadas con siRNAiBIK expuestas a TAM, sufre un decremento, en su expresión, con relación al grupo tratado sólo con TAM, confiriendo resistencia al proceso de apoptosis.

Con el objetivo de determinar el mecanismo molecular de resistencia a TAM mediada por BIK, se evaluaron algunos miembros de la familia Bcl-2. Así mismo demostramos una baja expresión de proteínas pro-apoptóticas Bax, Bak y Puma, en contraste con una alta expresión de proteínas anti-apoptóticas Bcl-2 y Mcl-1 en células transfectadas siRNA-BIK y expuestas a TAM. Estas dos últimas proteínas se han involucrado en la prevención de la liberación del Cyt C [66, 132]. Nuestros datos demuestran que BIK es un importante factor en el proceso de apoptosis inducido por TAM, el cual puede regular la integridad mitocondrial por modulación de proteínas pro-apoptóticas y anti-apoptóticas; Sin embargo, es necesario realizar más estudios para entender cómo BIK regula resistencia al proceso de apoptosis. Nuestros resultados demuestran que el silenciamiento genético de BIK exhibe efectos anti-apoptóticos en células MCF-7 tratadas con TAM. En trabajos previos

han estudiado algunos mecanismos de resistencia, recientemente se ha propuesto que BIK es regulado por miembros de la familia src, utilizando fibroblastos de ratón transformados en un modelo v-Src, demuestran que la resistencia es dependiente de Src, basándose en su capacidad para inhibir la ruta mitocondrial de la apoptosis mediante el aumento de la velocidad de degradación de la proteína BIK. Este efecto se basa en la activación de la vía Ras-Raf-Mek1/2-Erk1/2, y en la fosforilación del residuo Thr124 en BIK, lo cual conduce a la ubiquitinación en el residuo Lys33 de BIK y su posterior degradación por el proteasoma, lo cual favorece a la progresión tumoral [133, 134].

Actualmente se han estudiado varios mecanismos de resistencia a TAM como son mecanismos farmacológicos, pérdida o modificación en la expresión del ER, alteraciones en las proteínas de co-regulación, desregulación en diferentes vías de señalización que participan en procesos celulares como: la supervivencia, proliferación, estrés, ciclo celular, inhibición de la apoptosis, autofagia, expresión alterada de microRNAs [135, 136].

Con el fin de establecer posibles mecanismos asociados a la resistencia a TAM se realizó un análisis de microarreglos comparando dos condiciones TAM y SiRNA BIK/TAM. En este análisis encontramos algunas rutas de señalización que participan en procesos de resistencia, las cuales fueron agrupadas por el número de genes involucrados en dicha ruta y su valor de p, los resultados demuestran que se presentó un mayor número de genes involucrados, en tres rutas: MAPK, IGF y JAK-STAT (Tabla No 5).

La vía MAPK está involucrada en diferentes procesos celulares tales como proliferación, diferenciación, regulación del ciclo celular y apoptosis jugando un papel importante en el desarrollo y progresión del cáncer, así como participando en la respuesta a tratamientos tales como TAM y quimioterapia por fármacos oncológicos [137]. Estudios previos han demostrado que la activación de Ras/Raf-1/MAPK resulta de la sobreexpresión de HER2, la cual se asocia con pobre pronóstico, especialmente en pacientes tratados con

TAM[138]. Nuestro análisis de expresión por microarreglos el gen RAS se encontró sobreexpresado. En este sentido, se conoce que Ras regula la expresión de moléculas que contribuyen al desarrollo del cáncer y resistencia mediada por TAM en células transfectadas con BIK como CDc42/RAC, P120GAP y 14-3-3-z esta última proteína regula diferentes rutas de señalización como IGF -1 y ciclo celular. Otra ruta de señalización alterada mediante nuestro análisis de expresión por microarreglos fue la vía JAK-STAT, representando un mecanismo principal de señalización hacia una amplia gama de citocinas y factores de crecimiento que favorecen el micro-ambiente pro-tumoral [139]. Esta ruta tiene comunicación cruzada con la vía de cinasa de fosfatidil inositol (PI3K). PI3K también puede estimular a la GTPasa Rac que es capaz de activar los eventos de señalización de la vía JAK/STAT [140].

Por otro lado, para validar nuestro análisis de expresión por microarreglos se evaluaron los niveles de las siguientes proteínas: AKT3, STAT-2 y 14,3,3 z; las cuales participan en promover la tumorigenesis y progresión de células de cáncer de mama.

STAT2 representa un factor de transcripción necesario en la señalización en la vía IFN- $\alpha/\beta$  promoviendo carcinogénesis a través de la activación de mediadores pro-inflamatorios [141]; en nuestros datos STAT2 es una molécula sobre-expresada en la condición siRNAiBIK/TAM la cual sugiere favorecer el proceso de carcinogénesis.

Adicionalmente, la expresión de la proteína AKT3, se ha correlacionado con la progresión del cáncer, trabajos previos han encontrado que células estrógeno negativas poseen alta expresión en correlación con fenotipo de mayor agresividad tumoral [142]. En nuestros datos AKT-3 muestra una baja expresión en la condición siRNAi BIK/TAM; sin embargo, trabajos previos en células endoteliales humanas y ratones deficientes en AKT3, han sugerido que la inhibición de AKT3 causa autofagia debido al incremento en la formación de fagosomas independiente de la vía AKT1/mTOR [143]. Cabe resaltar que la autofagia

ha tomado mucho auge por su participación en la resistencia a TAM, lo cual permitiría explicar nuestros datos. Una proteína adicional, que se validó es la proteína 14, 3, 3, z, la cual carece de actividad enzimática endógena; sin embargo funciona para formar homodimeros o heterodimeros que se unen a través de motivos de serina-treonina fosforilada a proteínas blancas [144]. A través de sus uniones con otras proteínas 14-3-3-z ha sido implicada en la regular diversos procesos celulares, incluyendo apoptosis, señales de estrés, progresión del ciclo celular, transcripción, metabolismo e integridad del citoesqueleto, lo cual sugiere que esta molécula puede ser blanco, para múltiples rutas de cáncer [145, 146]. Varios grupos han encontrado que ensayos con baja expresión de la proteína 14-3-3-z se reduce el crecimiento y sensibiliza a las células en la inducción de apoptosis por vía mitocondrial, la cual resulta como un mediador de resistencia a TAM, mediante la regulación con otras rutas que controlan proliferación y progresión del cáncer. En células transfectadas con siRNAiBIK expuestas a TAM, la expresión de la proteína 14-3-3-z, fue alta lo cual implicaría un proceso de resistencia mediado por TAM. Una de las señales de supervivencia por las que actúa la proteína 14-3-3z para inhibir apoptosis es mediante la unión y el secuestro de las proteínas pro-apoptóticas y FOXO. Por lo tanto, las proteínas 14-3-3-z median un equilibrio integral entre la supervivencia celular y la muerte celular [147]. Al evaluar la posible regulación en el ciclo celular, se encontró que células deficientes en BIK expuestas a TAM no retienen a las células en la fase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> y el número de células que entran a la fase G<sub>2</sub>-M es mayor en comparación a los grupos control y TAM. Con el fin de tener una predicción *in silico* de posibles moléculas implicadas en el control del ciclo celular, se obtuvo un interactoma teórico para determinar la implicación de 14-3-3-z en el ciclo celular en la condición siRNAi BIK/TAM 6.0μM. En este interactoma se puede observar que 14-3-3-z interacciona con otras proteínas como FOX 1 para regular el ciclo celular en la fase G<sub>2</sub>-M, donde previamente se ha descrito que Wee1 favorece la fase del ciclo G<sub>2</sub>/M, en el análisis de microarreglos

de pudo contrastar que esta proteína se encuentra sobre-expresada a nivel del mensajero en la condición siRNAi BIK/TAM 6.0 $\mu$ M [148]. Esto favorecería la entrada a mitosis mediante un mecanismo que está regulado por la actividad de un complejo llamado MPF; durante la interfase la cinasa Wee1 fosforila e inhibe el complejo MPF (factor promotor de mitosis). Esta fosforilación se elimina por la fosfatasa Cdc25 activando la entrada en mitosis [149]. La Cdc25 también está sujeta a fosforilaciones negativas cuando el genoma está dañado o no se ha completado la replicación. Bajo tales circunstancias la proteína Cdc25 es fosforilada por las cinasas Chk1 y Cds1 (Chk2)[150]. Por tanto, la transición G2 / M está muy regulada para asegurar que la información genética esté intacta. La falta de coordinación adecuada de estos eventos también puede conducir a la muerte celular o a la inestabilidad genómica. Wee1 se sobre-expresa en varios tipos de cáncer [151]. Se ha encontrado resistencia a terapias a base de cisplatino, Esto sucede por múltiples mecanismos entre las alteraciones en cinasas que regulan el arresto en la fase G2-M del ciclo celular. La sobre-expresión de wee1 y CHK1 ocurre comúnmente en células resistentes a cisplatino[152] y en nuestros datos del interactoma teórico wee1 está sobre-expresado generando resistencia en células transfectadas con siRNAiBIK expuestas a TAM. Con todo lo anterior, nuestros datos sugieren su evaluación como criterios de elección para un mejor esquema de tratamiento a mujeres con este tipo de neoplasias estrógeno dependientes (RE positivas).

## **CONCLUSIONES**

- Nuestros resultados mostraron que la supresión del gen BIK exhibió efectos antiapoptóticos en células MCF-7 tratadas con TAM.

- Se determinó que en células transfectadas con RNAi expuestas a TAM se afectaron varias rutas como MAPK, IGF, JAK-STAT y ciclo celular, que regulan resistencia endocrina.
- Nuestros datos pueden ser útiles para futuros estudios, para establecer los mecanismos de regulación de la resistencia TAM en el cáncer de mama en mujeres que sean receptor de estrógeno positivo.

### **PERPSPECTIVAS**

- Generar una línea celular resistente a TAM y compararla con células transfectadas con siRNAiBIK expuestas con TAM.
- Seleccionar tumores de pacientes que tengan una baja expresión de BIK y ver sus posibles mecanismos de resistencia a TAM.
- Profundizar y estudiar algunas rutas de señalización que fueron modificadas en el análisis de KEGG mediante el uso de inhibidores.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Lazebnik Y: **What are the hallmarks of cancer?** *Nat Rev Cancer* 2010, **10**(4):232-233.
2. Bertram JS: **The molecular biology of cancer.** *Mol Aspects Med* 2000, **21**(6):167-223.
3. Hanahan D, Weinberg RA: **Hallmarks of cancer: the next generation.** *Cell* 2011, **144**(5):646-674.
4. Hanahan D, Weinberg RA: **The hallmarks of cancer.** *Cell* 2000, **100**(1):57-70.
5. Kanda Y, Mitani K, Tanaka T, Tanaka K, Ogawa S, Yazaki Y, Hirai H: **Subcellular localization of the MEN, MLL/MEN and truncated MLL proteins expressed in leukemic cells carrying the t(11;19)(q23;p13.1) translocation.** *Int J Hematol* 1997, **66**(2):189-195.
6. Dumitrescu RG, Cotarla I: **Understanding breast cancer risk -- where do we stand in 2005?** *J Cell Mol Med* 2005, **9**(1):208-221.
7. Altucci L, Addeo R, Cicatiello L, Dauvois S, Parker MG, Truss M, Beato M, Sica V, Bresciani F, Weisz A: **17beta-Estradiol induces cyclin D1 gene transcription, p36D1-p34cdk4 complex activation and p105Rb phosphorylation during mitogenic stimulation of G(1)-arrested human breast cancer cells.** *Oncogene* 1996, **12**(11):2315-2324.
8. Lewis-Wambi JS, Jordan VC: **Estrogen regulation of apoptosis: how can one hormone stimulate and inhibit?** *Breast Cancer Res* 2009, **11**(3):206.
9. Jemal A, Thomas A, Murray T, Thun M: **Cancer statistics, 2002.** *CA Cancer J Clin* 2002, **52**(1):23-47.
10. McKean-Cowdin R, Feigelson HS, Ross RK, Pike MC, Henderson BE: **Declining cancer rates in the 1990s.** *J Clin Oncol* 2000, **18**(11):2258-2268.
11. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D: **Global cancer statistics.** *CA Cancer J Clin* 2011, **61**(2):69-90.
12. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM: **Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008.** *Int J Cancer* 2010, **127**(12):2893-2917.
13. Knaul FM, Nigenda G, Lozano R, Arreola-Ornelas H, Langer A, Frenk J: **Breast cancer in Mexico: a pressing priority.** *Reprod Health Matters* 2008, **16**(32):113-123.
14. Nilsson S, Makela S, Treuter E, Tujague M, Thomsen J, Andersson G, Enmark E, Pettersson K, Warner M, Gustafsson JA: **Mechanisms of estrogen action.** *Physiol Rev* 2001, **81**(4):1535-1565.
15. Richie RC, Swanson JO: **Breast cancer: a review of the literature.** *J Insur Med* 2003, **35**(2):85-101.
16. Cleton-Jansen AM, Collins N, Lakhani SR, Weissenbach J, Devilee P, Cornelisse CJ, Stratton MR: **Loss of heterozygosity in sporadic breast tumours at the BRCA2 locus on chromosome 13q12-q13.** *Br J Cancer* 1995, **72**(5):1241-1244.
17. O'Connell P, Pekkel V, Fuqua SA, Osborne CK, Clark GM, Allred DC: **Analysis of loss of heterozygosity in 399 premalignant breast lesions at 15 genetic loci.** *J Natl Cancer Inst* 1998, **90**(9):697-703.
18. Rudas M, Neumayer R, Gnant MF, Mittelbock M, Jakesz R, Reiner A: **p53 protein expression, cell proliferation and steroid hormone receptors in ductal and lobular in situ carcinomas of the breast.** *Eur J Cancer* 1997, **33**(1):39-44.
19. Salvadori B, Bartoli C, Zurrada S, Delledonne V, Squicciarini P, Rovini D, Barletta L: **Risk of invasive cancer in women with lobular carcinoma in situ of the breast.** *Eur J Cancer* 1991, **27**(1):35-37.
20. Osborne CK: **Tamoxifen in the treatment of breast cancer.** *N Engl J Med* 1998, **339**(22):1609-1618.

21. Vogel VG, Costantino JP, Wickerham DL, Cronin WM, Cecchini RS, Atkins JN, Bevers TB, Fehrenbacher L, Pajon ER, Jr., Wade JL, 3rd *et al*: **Effects of tamoxifen vs raloxifene on the risk of developing invasive breast cancer and other disease outcomes: the NSABP Study of Tamoxifen and Raloxifene (STAR) P-2 trial.** *JAMA* 2006, **295**(23):2727-2741.
22. Fisher B, Costantino JP, Wickerham DL, Redmond CK, Kavanah M, Cronin WM, Vogel V, Robidoux A, Dimitrov N, Atkins J *et al*: **Tamoxifen for prevention of breast cancer: report of the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project P-1 Study.** *J Natl Cancer Inst* 1998, **90**(18):1371-1388.
23. Hoskins JM, Carey LA, McLeod HL: **CYP2D6 and tamoxifen: DNA matters in breast cancer.** *Nat Rev Cancer* 2009, **9**(8):576-586.
24. Blankson EA, Ellis SW, Lennard MS, Tucker GT, Rogers K: **The metabolism of tamoxifen by human liver microsomes is not mediated by cytochrome P450IID6.** *Biochem Pharmacol* 1991, **42 Suppl**:S209-212.
25. Singh MS, Francis PA, Michael M: **Tamoxifen, cytochrome P450 genes and breast cancer clinical outcomes.** *Breast* 2011, **20**(2):111-118.
26. Hewitt SC, Korach KS: **Estrogen receptors: structure, mechanisms and function.** *Rev Endocr Metab Disord* 2002, **3**(3):193-200.
27. Tsai MJ, O'Malley BW: **Molecular mechanisms of action of steroid/thyroid receptor superfamily members.** *Annu Rev Biochem* 1994, **63**:451-486.
28. Kuiper GG, Enmark E, Pelto-Huikko M, Nilsson S, Gustafsson JA: **Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996, **93**(12):5925-5930.
29. Saunders PT: **Oestrogen receptor beta (ER beta).** *Rev Reprod* 1998, **3**(3):164-171.
30. Tora L, White J, Brou C, Tasset D, Webster N, Scheer E, Chambon P: **The human estrogen receptor has two independent nonacidic transcriptional activation functions.** *Cell* 1989, **59**(3):477-487.
31. Moras D, Gronemeyer H: **The nuclear receptor ligand-binding domain: structure and function.** *Curr Opin Cell Biol* 1998, **10**(3):384-391.
32. Freedman LP: **Anatomy of the steroid receptor zinc finger region.** *Endocr Rev* 1992, **13**(2):129-145.
33. McKenna NJ, Xu J, Nawaz Z, Tsai SY, Tsai MJ, O'Malley BW: **Nuclear receptor coactivators: multiple enzymes, multiple complexes, multiple functions.** *J Steroid Biochem Mol Biol* 1999, **69**(1-6):3-12.
34. Shou J, Massarweh S, Osborne CK, Wakeling AE, Ali S, Weiss H, Schiff R: **Mechanisms of tamoxifen resistance: increased estrogen receptor-HER2/neu cross-talk in ER/HER2-positive breast cancer.** *J Natl Cancer Inst* 2004, **96**(12):926-935.
35. Smith CL, Nawaz Z, O'Malley BW: **Coactivator and corepressor regulation of the agonist/antagonist activity of the mixed antiestrogen, 4-hydroxytamoxifen.** *Mol Endocrinol* 1997, **11**(6):657-666.
36. Kushner PJ, Agard DA, Greene GL, Scanlan TS, Shiau AK, Uht RM, Webb P: **Estrogen receptor pathways to AP-1.** *J Steroid Biochem Mol Biol* 2000, **74**(5):311-317.
37. Frasar J, Danes JM, Komm B, Chang KC, Lyttle CR, Katzenellenbogen BS: **Profiling of estrogen up- and down-regulated gene expression in human breast cancer cells: insights into gene networks and pathways underlying estrogenic control of proliferation and cell phenotype.** *Endocrinology* 2003, **144**(10):4562-4574.
38. Levin ER: **Integration of the extranuclear and nuclear actions of estrogen.** *Mol Endocrinol* 2005, **19**(8):1951-1959.

39. Schiff R, Massarweh SA, Shou J, Bharwani L, Mohsin SK, Osborne CK: **Cross-talk between estrogen receptor and growth factor pathways as a molecular target for overcoming endocrine resistance.** *Clin Cancer Res* 2004, **10**(1 Pt 2):331S-336S.
40. Lee AV, Cui X, Oesterreich S: **Cross-talk among estrogen receptor, epidermal growth factor, and insulin-like growth factor signaling in breast cancer.** *Clin Cancer Res* 2001, **7**(12 Suppl):4429s-4435s; discussion 4411s-4412s.
41. Nicholson RI, Hutcheson IR, Britton D, Knowlden JM, Jones HE, Harper ME, Hiscox SE, Barrow D, Gee JM: **Growth factor signalling networks in breast cancer and resistance to endocrine agents: new therapeutic strategies.** *J Steroid Biochem Mol Biol* 2005, **93**(2-5):257-262.
42. Yarden RI, Wilson MA, Chrysogelos SA: **Estrogen suppression of EGFR expression in breast cancer cells: a possible mechanism to modulate growth.** *J Cell Biochem Suppl* 2001, **Suppl 36**:232-246.
43. Newman SP, Bates NP, Vernimmen D, Parker MG, Hurst HC: **Cofactor competition between the ligand-bound oestrogen receptor and an intron 1 enhancer leads to oestrogen repression of ERBB2 expression in breast cancer.** *Oncogene* 2000, **19**(4):490-497.
44. Bayliss J, Hilger A, Vishnu P, Diehl K, El-Ashry D: **Reversal of the estrogen receptor negative phenotype in breast cancer and restoration of antiestrogen response.** *Clin Cancer Res* 2007, **13**(23):7029-7036.
45. Cui X, Zhang P, Deng W, Oesterreich S, Lu Y, Mills GB, Lee AV: **Insulin-like growth factor-I inhibits progesterone receptor expression in breast cancer cells via the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/mammalian target of rapamycin pathway: progesterone receptor as a potential indicator of growth factor activity in breast cancer.** *Mol Endocrinol* 2003, **17**(4):575-588.
46. Creighton CJ, Fu X, Hennessy BT, Casa AJ, Zhang Y, Gonzalez-Angulo AM, Lluch A, Gray JW, Brown PH, Hilsenbeck SG *et al*: **Proteomic and transcriptomic profiling reveals a link between the PI3K pathway and lower estrogen-receptor (ER) levels and activity in ER+ breast cancer.** *Breast Cancer Res* 2010, **12**(3):R40.
47. Wu RC, Qin J, Yi P, Wong J, Tsai SY, Tsai MJ, O'Malley BW: **Selective phosphorylations of the SRC-3/AIB1 coactivator integrate genomic responses to multiple cellular signaling pathways.** *Mol Cell* 2004, **15**(6):937-949.
48. Lee H, Bai W: **Regulation of estrogen receptor nuclear export by ligand-induced and p38-mediated receptor phosphorylation.** *Mol Cell Biol* 2002, **22**(16):5835-5845.
49. Osborne CK, Schiff R: **Mechanisms of endocrine resistance in breast cancer.** *Annu Rev Med* 2011, **62**:233-247.
50. Encarnacion CA, Ciocca DR, McGuire WL, Clark GM, Fuqua SA, Osborne CK: **Measurement of steroid hormone receptors in breast cancer patients on tamoxifen.** *Breast Cancer Res Treat* 1993, **26**(3):237-246.
51. Gutierrez MC, Detre S, Johnston S, Mohsin SK, Shou J, Allred DC, Schiff R, Osborne CK, Dowsett M: **Molecular changes in tamoxifen-resistant breast cancer: relationship between estrogen receptor, HER-2, and p38 mitogen-activated protein kinase.** *J Clin Oncol* 2005, **23**(11):2469-2476.
52. Shi L, Dong B, Li Z, Lu Y, Ouyang T, Li J, Wang T, Fan Z, Fan T, Lin B *et al*: **Expression of ER- $\alpha$ 36, a novel variant of estrogen receptor  $\alpha$ , and resistance to tamoxifen treatment in breast cancer.** *J Clin Oncol* 2009, **27**(21):3423-3429.

53. Osborne CK, Bardou V, Hopp TA, Chamness GC, Hilsenbeck SG, Fuqua SA, Wong J, Allred DC, Clark GM, Schiff R: **Role of the estrogen receptor coactivator AIB1 (SRC-3) and HER-2/neu in tamoxifen resistance in breast cancer.** *J Natl Cancer Inst* 2003, **95**(5):353-361.
54. Lavinsky RM, Jepsen K, Heinzl T, Torchia J, Mullen TM, Schiff R, Del-Rio AL, Ricote M, Ngo S, Gemsch J *et al*: **Diverse signaling pathways modulate nuclear receptor recruitment of N-CoR and SMRT complexes.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998, **95**(6):2920-2925.
55. Musgrove EA, Sutherland RL: **Biological determinants of endocrine resistance in breast cancer.** *Nat Rev Cancer* 2009, **9**(9):631-643.
56. Ali S, Coombes RC: **Endocrine-responsive breast cancer and strategies for combating resistance.** *Nat Rev Cancer* 2002, **2**(2):101-112.
57. Span PN, Tjan-Heijnen VC, Manders P, Beex LV, Sweep CG: **Cyclin-E is a strong predictor of endocrine therapy failure in human breast cancer.** *Oncogene* 2003, **22**(31):4898-4904.
58. Butt AJ, McNeil CM, Musgrove EA, Sutherland RL: **Downstream targets of growth factor and oestrogen signalling and endocrine resistance: the potential roles of c-Myc, cyclin D1 and cyclin E.** *Endocr Relat Cancer* 2005, **12 Suppl 1**:S47-59.
59. Riggins RB, Bouton AH, Liu MC, Clarke R: **Antiestrogens, aromatase inhibitors, and apoptosis in breast cancer.** *Vitam Horm* 2005, **71**:201-237.
60. Zhou Y, Yau C, Gray JW, Chew K, Dairkee SH, Moore DH, Eppenberger U, Eppenberger-Castori S, Benz CC: **Enhanced NF kappa B and AP-1 transcriptional activity associated with antiestrogen resistant breast cancer.** *BMC Cancer* 2007, **7**:59.
61. Campbell RA, Bhat-Nakshatri P, Patel NM, Constantinidou D, Ali S, Nakshatri H: **Phosphatidylinositol 3-kinase/AKT-mediated activation of estrogen receptor alpha: a new model for anti-estrogen resistance.** *J Biol Chem* 2001, **276**(13):9817-9824.
62. Ellis MJ, Tao Y, Young O, White S, Proia AD, Murray J, Renshaw L, Faratian D, Thomas J, Dowsett M *et al*: **Estrogen-independent proliferation is present in estrogen-receptor HER2-positive primary breast cancer after neoadjuvant letrozole.** *J Clin Oncol* 2006, **24**(19):3019-3025.
63. De Laurentiis M, Arpino G, Massarelli E, Ruggiero A, Carlomagno C, Ciardiello F, Tortora G, D'Agostino D, Caputo F, Canello G *et al*: **A meta-analysis on the interaction between HER-2 expression and response to endocrine treatment in advanced breast cancer.** *Clin Cancer Res* 2005, **11**(13):4741-4748.
64. Arpino G, Green SJ, Allred DC, Lew D, Martino S, Osborne CK, Elledge RM: **HER-2 amplification, HER-1 expression, and tamoxifen response in estrogen receptor-positive metastatic breast cancer: a southwest oncology group study.** *Clin Cancer Res* 2004, **10**(17):5670-5676.
65. Ellis RE, Yuan JY, Horvitz HR: **Mechanisms and functions of cell death.** *Annu Rev Cell Biol* 1991, **7**:663-698.
66. Zhang H, Nimmer PM, Tahir SK, Chen J, Fryer RM, Hahn KR, Iciek LA, Morgan SJ, Nasarre MC, Nelson R *et al*: **Bcl-2 family proteins are essential for platelet survival.** *Cell Death Differ* 2007, **14**(5):943-951.
67. Igney FH, Krammer PH: **Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis.** *Nat Rev Cancer* 2002, **2**(4):277-288.
68. Elmore S: **Apoptosis: a review of programmed cell death.** *Toxicol Pathol* 2007, **35**(4):495-516.
69. Earnshaw WC, Martins LM, Kaufmann SH: **Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis.** *Annu Rev Biochem* 1999, **68**:383-424.

70. Tahir SK, Yang X, Anderson MG, Morgan-Lappe SE, Sarthy AV, Chen J, Warner RB, Ng SC, Fesik SW, Elmore SW *et al*: **Influence of Bcl-2 family members on the cellular response of small-cell lung cancer cell lines to ABT-737.** *Cancer Res* 2007, **67**(3):1176-1183.
71. Slee EA, Adrain C, Martin SJ: **Executioner caspase-3, -6, and -7 perform distinct, non-redundant roles during the demolition phase of apoptosis.** *J Biol Chem* 2001, **276**(10):7320-7326.
72. Cohen GM: **Caspases: the executioners of apoptosis.** *Biochem J* 1997, **326** ( Pt 1):1-16.
73. Ashkenazi A: **Targeting death and decoy receptors of the tumour-necrosis factor superfamily.** *Nat Rev Cancer* 2002, **2**(6):420-430.
74. Naismith JH, Sprang SR: **Modularity in the TNF-receptor family.** *Trends Biochem Sci* 1998, **23**(2):74-79.
75. Luo X, Budihardjo I, Zou H, Slaughter C, Wang X: **Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors.** *Cell* 1998, **94**(4):481-490.
76. Plesnila N, Zinkel S, Amin-Hanjani S, Qiu J, Korsmeyer SJ, Moskowitz MA: **Function of BID -- a molecule of the bcl-2 family -- in ischemic cell death in the brain.** *Eur Surg Res* 2002, **34**(1-2):37-41.
77. Neel BD, Aouacheria A, Nouvion AL, Ronot X, Gillet G: **Distinct protease pathways control cell shape and apoptosis in v-src-transformed quail neuroretina cells.** *Exp Cell Res* 2005, **311**(1):106-116.
78. Desagher S, Martinou JC: **Mitochondria as the central control point of apoptosis.** *Trends Cell Biol* 2000, **10**(9):369-377.
79. Wyllie AH: **Apoptosis: cell death under homeostatic control.** *Arch Toxicol Suppl* 1987, **11**:3-10.
80. Muchmore SW, Sattler M, Liang H, Meadows RP, Harlan JE, Yoon HS, Nettlesheim D, Chang BS, Thompson CB, Wong SL *et al*: **X-ray and NMR structure of human Bcl-xL, an inhibitor of programmed cell death.** *Nature* 1996, **381**(6580):335-341.
81. Liang H, Fesik SW: **Three-dimensional structures of proteins involved in programmed cell death.** *J Mol Biol* 1997, **274**(3):291-302.
82. Chipuk JE, Bouchier-Hayes L, Green DR: **Mitochondrial outer membrane permeabilization during apoptosis: the innocent bystander scenario.** *Cell Death Differ* 2006, **13**(8):1396-1402.
83. Ruffolo SC, Shore GC: **BCL-2 selectively interacts with the BID-induced open conformer of BAK, inhibiting BAK auto-oligomerization.** *J Biol Chem* 2003, **278**(27):25039-25045.
84. Foyouzi-Youssefi R, Arnaudeau S, Borner C, Kelley WL, Tschopp J, Lew DP, Demaurex N, Krause KH: **Bcl-2 decreases the free Ca<sup>2+</sup> concentration within the endoplasmic reticulum.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000, **97**(11):5723-5728.
85. Ellerby LM, Ellerby HM, Park SM, Holleran AL, Murphy AN, Fiskum G, Kane DJ, Testa MP, Kayalar C, Bredesen DE: **Shift of the cellular oxidation-reduction potential in neural cells expressing Bcl-2.** *J Neurochem* 1996, **67**(3):1259-1267.
86. Cottet S, Schorderet DF: **Triggering of Bcl-2-related pathway is associated with apoptosis of photoreceptors in Rpe65<sup>-/-</sup> mouse model of Leber's congenital amaurosis.** *Apoptosis* 2008, **13**(3):329-342.
87. Boise LH, Gonzalez-Garcia M, Postema CE, Ding L, Lindsten T, Turka LA, Mao X, Nunez G, Thompson CB: **bcl-x, a bcl-2-related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death.** *Cell* 1993, **74**(4):597-608.
88. Minn AJ, Velez P, Schendel SL, Liang H, Muchmore SW, Fesik SW, Fill M, Thompson CB: **Bcl-x(L) forms an ion channel in synthetic lipid membranes.** *Nature* 1997, **385**(6614):353-357.

89. Vander Heiden MG, Chandel NS, Williamson EK, Schumacker PT, Thompson CB: **Bcl-xL regulates the membrane potential and volume homeostasis of mitochondria.** *Cell* 1997, **91**(5):627-637.
90. Wolter KG, Hsu YT, Smith CL, Nechushtan A, Xi XG, Youle RJ: **Movement of Bax from the cytosol to mitochondria during apoptosis.** *J Cell Biol* 1997, **139**(5):1281-1292.
91. Gross A, Jockel J, Wei MC, Korsmeyer SJ: **Enforced dimerization of BAX results in its translocation, mitochondrial dysfunction and apoptosis.** *EMBO J* 1998, **17**(14):3878-3885.
92. Ke N, Godzik A, Reed JC: **Bcl-B, a novel Bcl-2 family member that differentially binds and regulates Bax and Bak.** *J Biol Chem* 2001, **276**(16):12481-12484.
93. Mandic A, Viktorsson K, Heiden T, Hansson J, Shoshan MC: **The MEK1 inhibitor PD98059 sensitizes C8161 melanoma cells to cisplatin-induced apoptosis.** *Melanoma Res* 2001, **11**(1):11-19.
94. Brunelle JK, Letai A: **Control of mitochondrial apoptosis by the Bcl-2 family.** *J Cell Sci* 2009, **122**(Pt 4):437-441.
95. Tsujimoto Y, Shimizu S: **Bcl-2 family: life-or-death switch.** *FEBS Lett* 2000, **466**(1):6-10.
96. Tsujimoto Y, Shimizu S: **VDAC regulation by the Bcl-2 family of proteins.** *Cell Death Differ* 2000, **7**(12):1174-1181.
97. Kuwana T, Mackey MR, Perkins G, Ellisman MH, Latterich M, Schneider R, Green DR, Newmeyer DD: **Bid, Bax, and lipids cooperate to form supramolecular openings in the outer mitochondrial membrane.** *Cell* 2002, **111**(3):331-342.
98. Shimizu S, Narita M, Tsujimoto Y: **Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC.** *Nature* 1999, **399**(6735):483-487.
99. Basanez G, Sharpe JC, Galanis J, Brandt TB, Hardwick JM, Zimmerberg J: **Bax-type apoptotic proteins porate pure lipid bilayers through a mechanism sensitive to intrinsic monolayer curvature.** *J Biol Chem* 2002, **277**(51):49360-49365.
100. Hsu YT, Youle RJ: **Bax in murine thymus is a soluble monomeric protein that displays differential detergent-induced conformations.** *J Biol Chem* 1998, **273**(17):10777-10783.
101. Li H, Zhu H, Xu CJ, Yuan J: **Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis.** *Cell* 1998, **94**(4):491-501.
102. Kudla G, Montessuit S, Eskes R, Berrier C, Martinou JC, Ghazi A, Antonsson B: **The destabilization of lipid membranes induced by the C-terminal fragment of caspase 8-cleaved bid is inhibited by the N-terminal fragment.** *J Biol Chem* 2000, **275**(30):22713-22718.
103. Esposti MD, Erler JT, Hickman JA, Dive C: **Bid, a widely expressed proapoptotic protein of the Bcl-2 family, displays lipid transfer activity.** *Mol Cell Biol* 2001, **21**(21):7268-7276.
104. McDonnell JM, Fushman D, Milliman CL, Korsmeyer SJ, Cowburn D: **Solution structure of the proapoptotic molecule BID: a structural basis for apoptotic agonists and antagonists.** *Cell* 1999, **96**(5):625-634.
105. Chittenden T, Flemington C, Houghton AB, Ebb RG, Gallo GJ, Elangovan B, Chinnadurai G, Lutz RJ: **A conserved domain in Bak, distinct from BH1 and BH2, mediates cell death and protein binding functions.** *EMBO J* 1995, **14**(22):5589-5596.
106. Verma S, Zhao LJ, Chinnadurai G: **Phosphorylation of the pro-apoptotic protein BIK: mapping of phosphorylation sites and effect on apoptosis.** *J Biol Chem* 2001, **276**(7):4671-4676.
107. Nikrad M, Johnson T, Puthalalath H, Coultas L, Adams J, Kraft AS: **The proteasome inhibitor bortezomib sensitizes cells to killing by death receptor ligand TRAIL via BH3-only proteins Bik and Bim.** *Mol Cancer Ther* 2005, **4**(3):443-449.

108. Zhu H, Zhang L, Dong F, Guo W, Wu S, Teraishi F, Davis JJ, Chiao PJ, Fang B: **Bik/NBK accumulation correlates with apoptosis-induction by bortezomib (PS-341, Velcade) and other proteasome inhibitors.** *Oncogene* 2005, **24**(31):4993-4999.
109. Germain M, Mathai JP, McBride HM, Shore GC: **Endoplasmic reticulum BIK initiates DRP1-regulated remodelling of mitochondrial cristae during apoptosis.** *EMBO J* 2005, **24**(8):1546-1556.
110. Mathai JP, Germain M, Shore GC: **BH3-only BIK regulates BAX,BAK-dependent release of Ca<sup>2+</sup> from endoplasmic reticulum stores and mitochondrial apoptosis during stress-induced cell death.** *J Biol Chem* 2005, **280**(25):23829-23836.
111. Shimizu S, Tsujimoto Y: **Proapoptotic BH3-only Bcl-2 family members induce cytochrome c release, but not mitochondrial membrane potential loss, and do not directly modulate voltage-dependent anion channel activity.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000, **97**(2):577-582.
112. Willis SN, Adams JM: **Life in the balance: how BH3-only proteins induce apoptosis.** *Curr Opin Cell Biol* 2005, **17**(6):617-625.
113. Willis SN, Chen L, Dewson G, Wei A, Naik E, Fletcher JI, Adams JM, Huang DC: **Proapoptotic Bak is sequestered by Mcl-1 and Bcl-xL, but not Bcl-2, until displaced by BH3-only proteins.** *Genes Dev* 2005, **19**(11):1294-1305.
114. Erlacher M, Michalak EM, Kelly PN, Labi V, Niederegger H, Coultas L, Adams JM, Strasser A, Villunger A: **BH3-only proteins Puma and Bim are rate-limiting for gamma-radiation- and glucocorticoid-induced apoptosis of lymphoid cells in vivo.** *Blood* 2005, **106**(13):4131-4138.
115. Mebratu YA, Dickey BF, Evans C, Tesfaigzi Y: **The BH3-only protein Bik/Blk/Nbk inhibits nuclear translocation of activated ERK1/2 to mediate IFNgamma-induced cell death.** *J Cell Biol* 2008, **183**(3):429-439.
116. Sturm I, Stephan C, Gillissen B, Siebert R, Janz M, Radetzki S, Jung K, Loening S, Dorken B, Daniel PT: **Loss of the tissue-specific proapoptotic BH3-only protein Nbk/Bik is a unifying feature of renal cell carcinoma.** *Cell Death Differ* 2006, **13**(4):619-627.
117. Garcia N, Salamanca F, Astudillo-de la Vega H, Curiel-Quesada E, Alvarado I, Penaloza R, Arenas D: **A molecular analysis by gene expression profiling reveals Bik/NBK overexpression in sporadic breast tumor samples of Mexican females.** *BMC Cancer* 2005, **5**:93.
118. Chinnadurai G, Vijayalingam S, Rashmi R: **BIK, the founding member of the BH3-only family proteins: mechanisms of cell death and role in cancer and pathogenic processes.** *Oncogene* 2008, **27 Suppl 1**:S20-29.
119. Livak KJ, Schmittgen TD: **Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method.** *Methods* 2001, **25**(4):402-408.
120. Hawkins CJ, Ekert PG, Uren AG, Holmgren SP, Vaux DL: **Anti-apoptotic potential of insect cellular and viral IAPs in mammalian cells.** *Cell Death Differ* 1998, **5**(7):569-576.
121. Budihardjo I, Oliver H, Lutter M, Luo X, Wang X: **Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis.** *Annu Rev Cell Dev Biol* 1999, **15**:269-290.
122. Smolewski P, Grabarek J, Phelps DJ, Darzynkiewicz Z: **Stathmo-apoptosis: arresting apoptosis by fluorochrome-labeled inhibitor of caspases.** *Int J Oncol* 2001, **19**(4):657-663.
123. Tai YC, Speed TP: **On gene ranking using replicated microarray time course data.** *Biometrics* 2009, **65**(1):40-51.
124. Lim E, Metzger-Filho O, Winer EP: **The natural history of hormone receptor-positive breast cancer.** *Oncology (Williston Park)* 2012, **26**(8):688-694, 696.
125. Masood S: **Estrogen and progesterone receptors in cytology: a comprehensive review.** *Diagn Cytopathol* 1992, **8**(5):475-491.

126. Prieto-Remon I, Sanchez-Carrera D, Lopez-Duarte M, Richard C, Pipaon C: **BIK (NBK) is a mediator of the sensitivity of Fanconi anaemia group C lymphoblastoid cell lines to interstrand DNA cross-linking agents.** *Biochem J* 2012, **448**(1):153-163.
127. Hur J, Chesnes J, Coser KR, Lee RS, Geck P, Isselbacher KJ, Shioda T: **The Bik BH3-only protein is induced in estrogen-starved and antiestrogen-exposed breast cancer cells and provokes apoptosis.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004, **101**(8):2351-2356.
128. Fu Y, Li J, Lee AS: **GRP78/BiP inhibits endoplasmic reticulum BIK and protects human breast cancer cells against estrogen starvation-induced apoptosis.** *Cancer Res* 2007, **67**(8):3734-3740.
129. Weng SC, Kashida Y, Kulp SK, Wang D, Brueggemeier RW, Shapiro CL, Chen CS: **Sensitizing estrogen receptor-negative breast cancer cells to tamoxifen with OSU-03012, a novel celecoxib-derived phosphoinositide-dependent protein kinase-1/Akt signaling inhibitor.** *Mol Cancer Ther* 2008, **7**(4):800-808.
130. Mathai JP, Germain M, Marcellus RC, Shore GC: **Induction and endoplasmic reticulum location of BIK/NBK in response to apoptotic signaling by E1A and p53.** *Oncogene* 2002, **21**(16):2534-2544.
131. Hur J, Bell DW, Dean KL, Coser KR, Hilario PC, Okimoto RA, Tobey EM, Smith SL, Isselbacher KJ, Shioda T: **Regulation of expression of BIK proapoptotic protein in human breast cancer cells: p53-dependent induction of BIK mRNA by fulvestrant and proteasomal degradation of BIK protein.** *Cancer Res* 2006, **66**(20):10153-10161.
132. Simonian PL, Grillot DA, Nunez G: **Bak can accelerate chemotherapy-induced cell death independently of its heterodimerization with Bcl-XL and Bcl-2.** *Oncogene* 1997, **15**(15):1871-1875.
133. Lopez J, Hesling C, Prudent J, Popgeorgiev N, Gadet R, Mikaelian I, Rimokh R, Gillet G, Gonzalo P: **Src tyrosine kinase inhibits apoptosis through the Erk1/2- dependent degradation of the death accelerator Bik.** *Cell Death Differ* 2012, **19**(9):1459-1469.
134. Ballesta A, Lopez J, Popgeorgiev N, Gonzalo P, Doumic M, Gillet G: **Data-driven modeling of SRC control on the mitochondrial pathway of apoptosis: implication for anticancer therapy optimization.** *PLoS Comput Biol* 2013, **9**(4):e1003011.
135. Chang J, Fan W: **Endocrine therapy resistance: current status, possible mechanisms and overcoming strategies.** *Anticancer Agents Med Chem* 2013, **13**(3):464-475.
136. Garcia-Becerra R, Santos N, Diaz L, Camacho J: **Mechanisms of Resistance to Endocrine Therapy in Breast Cancer: Focus on Signaling Pathways, miRNAs and Genetically Based Resistance.** *Int J Mol Sci* 2012, **14**(1):108-145.
137. McGlynn LM, Kirkegaard T, Edwards J, Tovey S, Cameron D, Twelves C, Bartlett JM, Cooke TG: **Ras/Raf-1/MAPK pathway mediates response to tamoxifen but not chemotherapy in breast cancer patients.** *Clin Cancer Res* 2009, **15**(4):1487-1495.
138. Elledge RM, Green S, Ciocca D, Pugh R, Allred DC, Clark GM, Hill J, Ravdin P, O'Sullivan J, Martino S *et al*: **HER-2 expression and response to tamoxifen in estrogen receptor-positive breast cancer: a Southwest Oncology Group Study.** *Clin Cancer Res* 1998, **4**(1):7-12.
139. Borges S, Moudilou E, Vouyovitch C, Chiesa J, Lobie P, Mertani H, Raccurt M: **Involvement of a JAK/STAT pathway inhibitor: cytokine inducible SH2 containing protein in breast cancer.** *Adv Exp Med Biol* 2008, **617**:321-329.
140. Crawley AM, Vranjkovic A, Faller E, McGuinty M, Busca A, Burke SC, Cousineau S, Kumar A, Macpherson PA, Angel JB: **Jak/STAT and PI3K signaling pathways have both common and distinct roles in IL-7-mediated activities in human CD8+ T cells.** *J Leukoc Biol* 2014, **95**(1):117-127.

141. Gamero AM, Young MR, Mentor-Marcel R, Bobe G, Scarzello AJ, Wise J, Colburn NH: **STAT2 contributes to promotion of colorectal and skin carcinogenesis.** *Cancer Prev Res (Phila)* 2010, **3**(4):495-504.
142. Faridi J, Wang L, Endemann G, Roth RA: **Expression of constitutively active Akt-3 in MCF-7 breast cancer cells reverses the estrogen and tamoxifen responsiveness of these cells in vivo.** *Clin Cancer Res* 2003, **9**(8):2933-2939.
143. Corum DG, Tschlis PN, Muise-Helmericks RC: **AKT3 controls mitochondrial biogenesis and autophagy via regulation of the major nuclear export protein CRM-1.** *FASEB J* 2014, **28**(1):395-407.
144. Muslin AJ, Tanner JW, Allen PM, Shaw AS: **Interaction of 14-3-3 with signaling proteins is mediated by the recognition of phosphoserine.** *Cell* 1996, **84**(6):889-897.
145. van Hemert MJ, Steensma HY, van Heusden GP: **14-3-3 proteins: key regulators of cell division, signalling and apoptosis.** *Bioessays* 2001, **23**(10):936-946.
146. Tzivion G, Gupta VS, Kaplun L, Balan V: **14-3-3 proteins as potential oncogenes.** *Semin Cancer Biol* 2006, **16**(3):203-213.
147. Neal CL, Yao J, Yang W, Zhou X, Nguyen NT, Lu J, Danes CG, Guo H, Lan KH, Ensor J *et al*: **14-3-3zeta overexpression defines high risk for breast cancer recurrence and promotes cancer cell survival.** *Cancer Res* 2009, **69**(8):3425-3432.
148. Coleman TR, Dunphy WG: **Cdc2 regulatory factors.** *Curr Opin Cell Biol* 1994, **6**(6):877-882.
149. Baldin V, Ducommun B: **Subcellular localisation of human wee1 kinase is regulated during the cell cycle.** *J Cell Sci* 1995, **108** ( Pt 6):2425-2432.
150. Lee J, Kumagai A, Dunphy WG: **Positive regulation of Wee1 by Chk1 and 14-3-3 proteins.** *Mol Biol Cell* 2001, **12**(3):551-563.
151. Ghiasi N, Habibagahi M, Rosli R, Ghaderi A, Yusoff K, Hosseini A, Abdullah S, Jaberipour M: **Tumour suppressive effects of WEE1 gene silencing in breast cancer cells.** *Asian Pac J Cancer Prev* 2013, **14**(11):6605-6611.
152. Pouliot LM, Chen YC, Bai J, Guha R, Martin SE, Gottesman MM, Hall MD: **Cisplatin sensitivity mediated by WEE1 and CHK1 is mediated by miR-155 and the miR-15 family.** *Cancer Res* 2012, **72**(22):5945-5955.

## ANEXOS

### Artículo publicado para obtener el grado

1. **Rubí Viedma-Rodríguez**, Alejandro García Carranca, Luis Arturo Baiza Gutman, Fabio Salamanca Gómez, Leticia Moreno Fierros and Diego Arenas Aranda: **Suppression of the death gene *BIK* is a critical factor for resistance to tamoxifen in MCF-7 breast cancer cells.** Int J Oncol. 2013 Dec; 43(6):1777-86.

### Artículos enviados

2. **Rubí Viedma- Rodriguez**, Luis Baiza-Gutman, Fabio Salamanca- Gómez Ruiz Esparza-Garrido R, Velázquez-Flores MÁ, Mariana Diaz-Zaragoza, Martínez-Hernández MG and Diego Arenas-Aranda. **An overview of mechanisms associated with resistance to tamoxifen in estrogen receptor-positive breast cancer (review).** Enviado a la revista Oncology Reports
3. **Rubí Viedma-Rodríguez**, Ruiz Esparza-Garrido R, Velázquez-Flores MA, Luis Arturo Baiza Gutman, Fabio Salamanca Gómez and Diego Arenas Aranda. **Low expression of Bik affects some signalling pathways that regulate endocrine resistance in tamoxifen treatment in MCF-7 cells.** Enviado a la revista Plos One.

## Suppression of the death gene BIK is a critical factor for resistance to tamoxifen in MCF-7 breast cancer cells

RUBÍ VIEDMA-RODRIGUEZ<sup>1,4</sup>, LUIS ARTURO BAIZA-GUTMAN<sup>4</sup>, ALEJANDRO GARCÍA-CARRANCA<sup>2</sup>, LETICIA MORENO-FIERROS<sup>3</sup>, FABIO SALAMANCA-GÓMEZ<sup>1</sup> and DIEGO ARENAS-ARANDA<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Unit of Medical Research in Human Genetics, Medical National Center, Century XXI, Mexican Institute of Social Insurance; <sup>2</sup>Cancer Biomedical Research Unit, National Cancer Institute and Biomedical Research Institute, National Autonomous University of Mexico, Mexico City; <sup>3</sup>Biomedicine Unit; <sup>4</sup>Morphophysiology and Function Unit, Faculty of Higher Studies Iztacala, National Autonomous University of Mexico, Iztacala, Mexico

Received July 15, 2013; Accepted August 29, 2013

DOI: 10.3892/ijo.2013.2127

**Abstract.** Apoptosis is controlled by the BCL-2 family of proteins, which can be divided into three different subclasses based on the conservation of BCL-2 homology domains. BIK is a founding member of the BH3-only pro-apoptotic protein family. BIK is predominantly localized in the endoplasmic reticulum (ER) and induces apoptosis through the mitochondrial pathway by mobilizing calcium from the ER to the mitochondria. In this study, we determined that suppression of the death gene *Bik* promotes resistance to tamoxifen (TAM) in MCF-7 breast cancer cells. We utilized small interfering (siRNA) to specifically knockdown BIK in MCF-7 cells and studied their response to tamoxifen. The levels of cell apoptosis, the potential mitochondrial membrane ( $\Delta\Psi_m$ ), and the activation of total caspases were analyzed. Western blot analysis was used to determine the expression of some BCL-2 family proteins. Flow cytometry studies revealed an increase in apoptosis level in MCF-7 cells and a 2-fold increase in relative BIK messenger RNA (mRNA) expression at a concentration of 6.0  $\mu$ M of TAM. BIK silencing, with a specific RNAi, blocked TAM-induced apoptosis in 45 $\pm$ 6.78% of cells. Moreover, it decreased mitochondrial membrane potential ( $\Psi_m$ ) and total caspase activity, and exhibited low expression of pro-apoptotic proteins BAX, BAK, PUMA and a high expression of BCL-2 and MCL-1. The above suggests resistance to TAM, regulating the intrinsic pathway and indicate that BIK comprises an important factor in the process of apoptosis, which may exert

an influence the ER pathway, which regulates mitochondrial integrity. Collectively, our results show that BIK is a central component of the programmed cell death of TAM-induced MCF-7 breast cancer cells. The silencing of *BIK* gene will be useful for future studies to establish the mechanisms of regulation of resistance to TAM.

### Introduction

Apoptosis, a genetically programmed cell death, is conserved among eukaryotes. It is important during embryonic development to ensure organogenesis and adulthood for maintenance of cellular homeostasis (1,2). Alterations in this process can lead to pathological conditions such as cancer and degenerative diseases. Apoptosis is controlled by the BCL-2 family of proteins, this family can be divided into three different subclasses based on conservation of the BCL-2 homology (BH1-4) domains: multidomain anti-apoptotic proteins (BCL-2, BCL-XL, MCL-1, BCL-W, and Bfl-1/A1); multidomain pro-apoptotic proteins (BAX and BAK), and BH3-only pro-apoptotic proteins (BID, BAD, BIM, PUMA, NOXA and BIK) (3).

BH3-only proteins may function as death sensors that mediate the activation of the mitochondrial apoptosis pathway in response to oncogenic stress signals or DNA damage (4). Notably, BH3-only proteins are not able to kill cells that lack BAX and BAK, indicating that BH3-only proteins function upstream of these proteins (5). BIK induces apoptosis in a variety of eukaryotic cells and is non-essential for animal development (6,7). BIK is a pro-apoptotic tumor suppressor in several human tissues and its expression in cancers is prevented by chromosomal deletions of the BIK locus or by epigenetic silencing (3,8,9).

Several anticancer drugs transcriptionally activate the *BIK* gene through transcriptional pathways dependent on factors such as E2F and p53 (8,10-14). *Bik* has also been used as a therapeutic molecule in gene therapy-based approaches to treat difficult cancers. However, the relation between BIK and the resistance to TAM is poorly understood. TAM is widely

*Correspondence to:* Dr Diego Arenas-Aranda, Unit of Medical Research in Human Genetics, Medical National Center, Century XXI, Mexican Institute of Social Insurance, Cuauhtemoc Avenue 330, Mexico City 06729, Mexico  
E-mail: arenasdi@gmail.com

*Key words:* breast cancer, tamoxifen, BIK, apoptosis

employed in chemotherapy for breast cancer. In MCF-7 breast cancer cells, TAM inhibits cell proliferation and induces oxidative stress (OS) and apoptosis via mitochondria-dependent mechanisms by estrogen receptor-dependent modulation of gene expression (14,15). In the present study, we investigated the relationship between BIK and treatment with TAM in MCF-7 human breast cancer cells.

## Materials and methods

**Cell cultures.** MCF-7 human breast cancer cells (American Type Culture Collection, ATCC, Manassas, VA, USA) were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium F12 (DMEM; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) containing penicillin (100 U/ml) and streptomycin (100 µg/ml) (Life Technologies Inc. BLR, Grand Island, NY, USA).

The cells were grown in 75-cm<sup>2</sup> tissue culture flasks in (5% CO<sub>2</sub>) at 37°C and routinely passaged when confluent. Before each experiment, cells were seeded in 3.5-cm diameter tissue culture plates (5% CO<sub>2</sub>).

**Half maximal effective concentration (EC<sub>50</sub>) of TAM.** TAM (TAM citrate; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) stock solution was prepared in 2% ethanol. MCF-7 cells were exposed to different concentrations of TAM (1.0, 2.0, 4.0, 6.0, 8.0 and 10.0 µM) at 37°C for 24 h. Apoptosis of the cells was measured by flow cytometry by Annexin V-fluorescein isothiocyanate (FITC)/propidium iodide (PI) staining (BioLegend, San Diego, CA, USA).

**Suppression of Bik expression with small interfering RNA interference (siRNAi).** Cells were plated in antibiotic-free DMEM-F12 at a density of 2.5x10<sup>5</sup> cells and when 50% confluence was reached, the cells were transfected with oligofectamine reagent (Invitrogen) and 100 nmol/l BikRNAi (oligoduplex 5'-AAG ACCCCUCUCCAGAGACAU-3',N5' or AAAUGUCUCUGG AGAGGGGUC-3') (Labs and Integrated DNA Technologies, IDT) or control sequence-scrambled (Silencer Negative Control #3 siRNA, Ambion) composed of a 19 bp scrambled sequence without significant homology to any known gene sequences from mouse, rat or human. Briefly, 10 µl oligofectamine was diluted 7.5-fold in Opti-MEM and incubated at room temperature for 10 min. In parallel, a separate tube, 5 µl of 50 µmol/l siRNA, was diluted in 425 µl of Opti-MEM. Diluted oligofectamine (75 µl) was added to the diluted siRNA and the complex was incubated for 20 min at room temperature. Cells were washed with 2 ml of Opti-MEM. The siRNA + oligofectamine complex (500 µl) was added gently to the dish. The final concentration of siRNA was 100 nmol/l. After 6 h, 1.25 ml of 3X serum medium was added to the dish without removing the transfection mix. The medium was exchanged for serum-containing medium after 6 h and the cells were further cultured for 48 h. The experiments were repeated two to three times.

**Western blot analysis.** MCF-7 cell groups (non-treated, scrambled, siRNA BIK and siRNA BIK with TAM) were cultured overnight at room temperature in 3.5-cm diameter tissue culture plates at a density of 1x10<sup>5</sup> cells/plate. Cells

were transferred into 100 µl of lysis buffer (RIPA-Tris buffer:EGTA 2 mM; NaCl 316 mM; Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> 20 mM; NaF 50 mM; Tris-HCl 20 mM; Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 100 mM, PMSF 100 mM, and EDTA 100 mM; 0.1% of leupeptin and aprotinin, 0.2% SDS and 2% Triton X-100) and maintained under constant shaking for 2 h at 4°C. Subsequently, the sample was centrifuged for 5 min at 20,800 rpm and the supernatant (30 µg of protein) was denatured in Laemmli sample buffer, resolved through 12% SDS polyacrylamide gels, and electroblotted onto polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes. Blots were stained with Ponceau S to confirm that protein loading was identical in all lanes. Membranes were soaked in PBS to remove the Ponceau S and incubated for 90 min in Tris-buffered saline (TBS) containing 5% dried skimmed milk and 0.1% Tween-20 to block the non-specific protein binding sites. Subsequently, the membranes were incubated for 14 h at 4°C with the primary antibody 1:1,000: BCL-2; MCL-1; BAX; BAK; PUMA, and cytochrome c (Cyt C), from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA). BIK 1:100 from Abcam was diluted in 0.1% TBS-Tween-20 including 5% dried skimmed milk, then washed and incubated with peroxidase-conjugated secondary antibodies 1:10,000. Protein was detected using an ECL Western blot detection kit (Millipore). The blots were subjected to densitometry analysis and data were analyzed using GraphPad Prism5 software (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Western blot analyses were repeated three times.

**Real-time quantitative RT-PCR.** RNA from all samples was amplified by RT-PCR assay in a rotor gene Real-Time apparatus (Cobbe Research 2004) utilizing the Superscript III Platinum One-step qRT-PCR kit (Invitrogen). The 25 µl reaction buffer contained 100 ng of total RNA, 1X Superscript III Platinum One-step qRT-PCR reaction mix, and 0.4 µM of each of the primers. The primers were employed for *HPRT* gene amplification (13) and *BIK* gene (forward 5' GAG ACA TCT TGA TGG AGA CC3', reverse 5' TCT AAG AAC ATC CCT GAT GT3'). The following thermal profile was used: a single cycle of reverse transcription (RT) for 15 min at 50°C; another cycle of 2 min at 95°C followed by 45 amplification cycles of 20 sec at 95°C, and 1 min at 57°C. Threshold cycle (TC) value of BIK was normalized to *HPRT* (16).

**Flow cytometry.** Annexin V-FITC/PI double staining was used to detect the apoptosis index. Briefly, the MCF-7 human breast cancer cells (1x10<sup>6</sup> cells/ml) were harvested by trypsinization and washed twice with cold PBS (0.15 mol/l, pH 7.2). The cells were centrifuged at 2,500 rpm for 5 min; then, the supernatant was discarded and the pellet was resuspended in 1X binding buffer (10 mM HEPES/NaOH, pH 7.4, 140 mM NaCl, and 2.5 mM CaCl<sub>2</sub>), at a density of 1.0x10<sup>6</sup> cells/ml, 100 µl of the sample was transferred into a 5 ml culture tube and incubated in the dark with 5 µl of FITC-conjugated Annexin V staining solutions (Biolegend, San Diego, CA, USA) and 5 µl of PI staining solutions; for 15 min at room temperature. Later, 400 µl of 1X binding buffer was added to each sample tube and the samples were analyzed by FACSCalibur flow cytometry (Becton-Dickinson) using Cell Quest Research software (Becton-Dickinson).

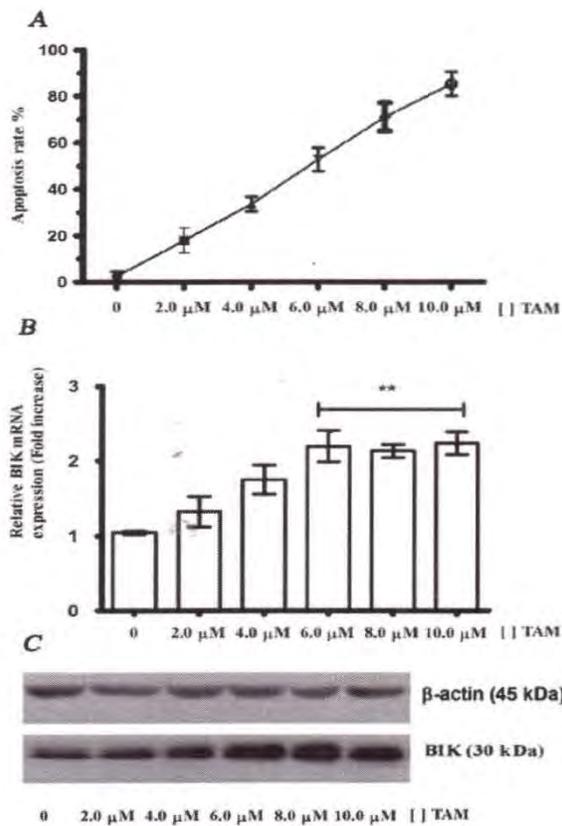


Figure 1. The messenger RNA (mRNA) and protein levels of Bik were increased in MCF-7 cells treated with tamoxifen (TAM). (A) MCF-7 cells were treated with TAM by determining  $\text{EC}_{50}$ . (B) MCF-7 cells were treated with TAM for 24 h and subjected to RT-PCR analyses. (C) Cell lysates were prepared and subjected to western blot analyses for Bik and  $\beta$ -actin as a control; one representative of at least three independent experiments with similar results is shown. Each value represents the mean  $\pm$  standard error of the mean (SE) (bars) of three independent experiments. \* $p < 0.05$ , according to the Student's t-test.

**Mitochondrial membrane potential of MCF-7 cells.** The mitochondrial membrane potential ( $\Delta\Psi_m$ ) was measured with JC-1 (5, 5, 6, 6-tetrachloro-1, 1, and 3, 3-tetraethyl-benzimidazolyl-carbo cyanine iodide) to signal the loss of ( $\Delta\Psi_m$ ). MCF-7 cells (non-treated, scrambled, siRNA BIK, and siRNA BIK with TAM) were harvested; equal numbers of cells ( $1 \times 10^6$ ) were incubated with JC-1 at 2.5  $\mu\text{g/ml}$  in 1 ml of PBS for 30 min at 37°C with moderate shaking. Cells were then centrifuged 1,600 rpm at 4°C for 5 min, washed twice with ice-cold PBS, resuspended in 200  $\mu\text{l}$  of PBS, and analyzed on a flow cytometer (Becton-Dickinson). We detected green fluorescence at excitation/emission wavelengths of 485/530 nm and red fluorescence at excitation/emission wavelengths of 550/595 nm utilizing CellQuest Research software.

**Caspase assay.** Caspases were detected by means of the Vybrant FAM Poly Caspases assay kit, which detects active

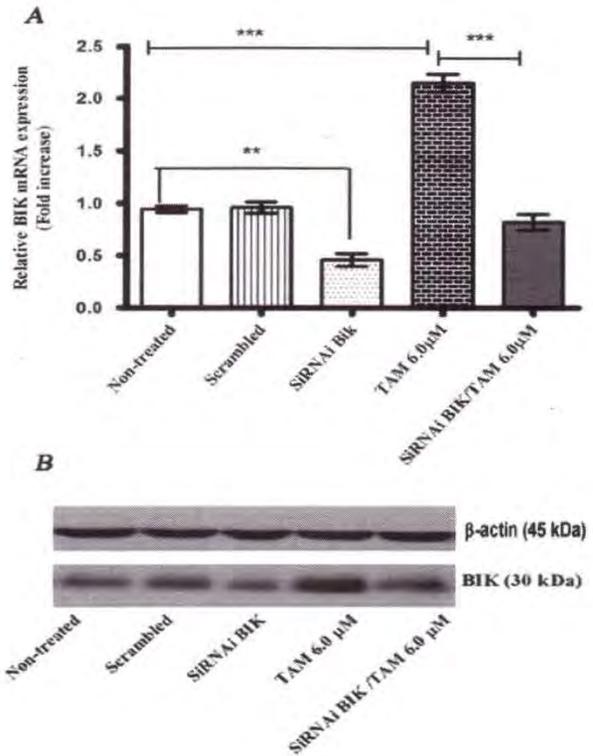


Figure 2. Transfection and silencing of Bik in the human breast cancer line MCF-7. (A and B) Cells were transiently transfected with Bik-specific (BIK) or sequence-scrambled control and then cultured in the presence or absence of 6.0  $\mu\text{M}$  of tamoxifen (TAM) for 24 h, followed by evaluation of expression of Bik and  $\beta$ -actin (as control) by real-time RT-PCR and western blot analysis. The groups were analyzed by one-way ANOVA with the Tukey's test. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$  vs. non-treated. Representative figures of three independent experiments carried out in triplicate are shown.

caspases by employing the FAM-VAD-FMK reagent, a fluorescently labeled inhibitor of such enzymes (FLICA). Briefly, 10  $\mu\text{l}$  aliquots of 30X FLICA working solution was added to MCF-7 cells in suspension and these were incubated in the dark for 1 h at 37°C and 5%  $\text{CO}_2$ . After two washes with Wash Buffer 1X (supplied by the manufacturer), the samples were fixed by adding 40  $\mu\text{l}$  of 10% formaldehyde solution (supplied by the manufacturer) for 10 min at room temperature. Then, MCF-7 cells were again washed and resuspended in 400  $\mu\text{l}$  of Wash Buffer 1X containing 8  $\mu\text{l}$  of PI for FACS analysis.

**Statistical analysis.** Results were expressed as the means  $\pm$  standard error of the mean (SEM). All data were statistically analyzed using one- or two-way analysis of variance (ANOVA) for repeated measurements, followed by the post hoc Tukey's test. Fisher's post hoc analysis was also utilized to analyze differences between groups. Analysis was performed employing GraphPad Prism5 statistical software (GraphPad Software). Differences of  $p < 0.05$  were considered statistically significant.

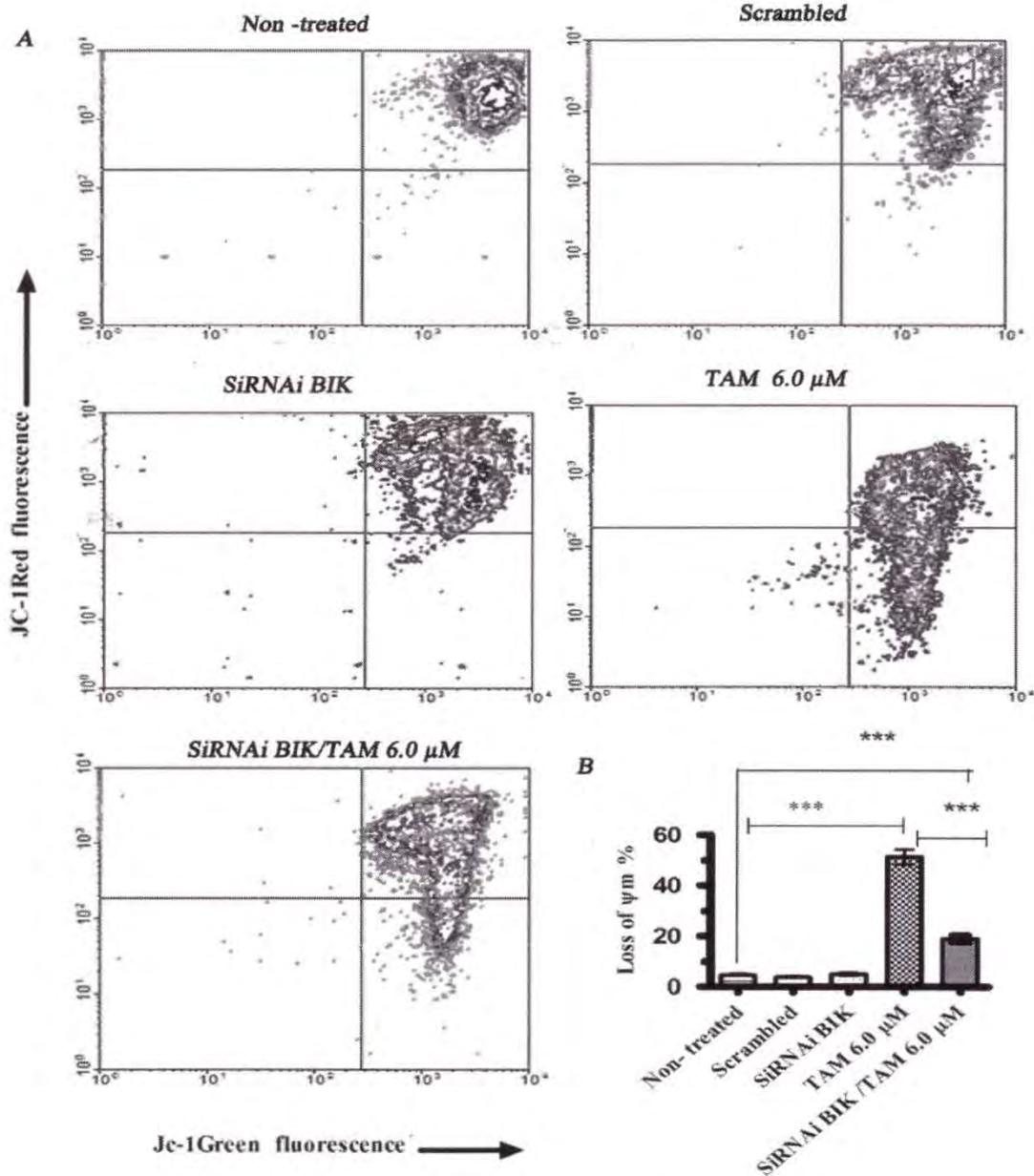


Figure 3. Suppression of Bik expression does not alter the mitochondrial membrane potential. (A) MCF-7 cells [non-treated, scrambled, siRNAiBIK, siRNAiBIK/tamoxifen (TAM), and TAM] were stained with JC-1 for loss of  $\Delta\Psi_m$  using flow cytometry. JC-1 fluorescence is seen in both the FL-2 (red) and FL-1 channels (green). In FL-1 channels are cells with low levels of  $\Delta\Psi_m$ , while FL-2 channel indicates cells with stable levels of  $\Delta\Psi_m$ . (B) Representative graphic of fluorescence intensities. One representative of at least three independent experiments with similar results is shown. The groups were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) with the Tukey's test. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$  vs. non-treated. Representative figures of three independent experiments carried out in triplicate are shown.

## Results

*TAM induces apoptosis and increases the levels of BIK mRNA and its protein in MCF-7 cells.* In breast cancer and breast cell lines, TAM-induced apoptosis is mediated by the estrogen receptor. To identify whether the expression of the *BIK* gene

and BIK protein in MCF-7 cells are enhanced during TAM induced apoptosis, we incubated these cells for 24 h at different concentrations of TAM (range, 1-10  $\mu$ M). Flow cytometry data indicated that TAM increased the levels of apoptosis (Fig. 1A) and an EC<sub>50</sub> of 6.0  $\mu$ M was obtained. RT-PCR and western blot analysis assays revealed that the expression of BIK mRNA and

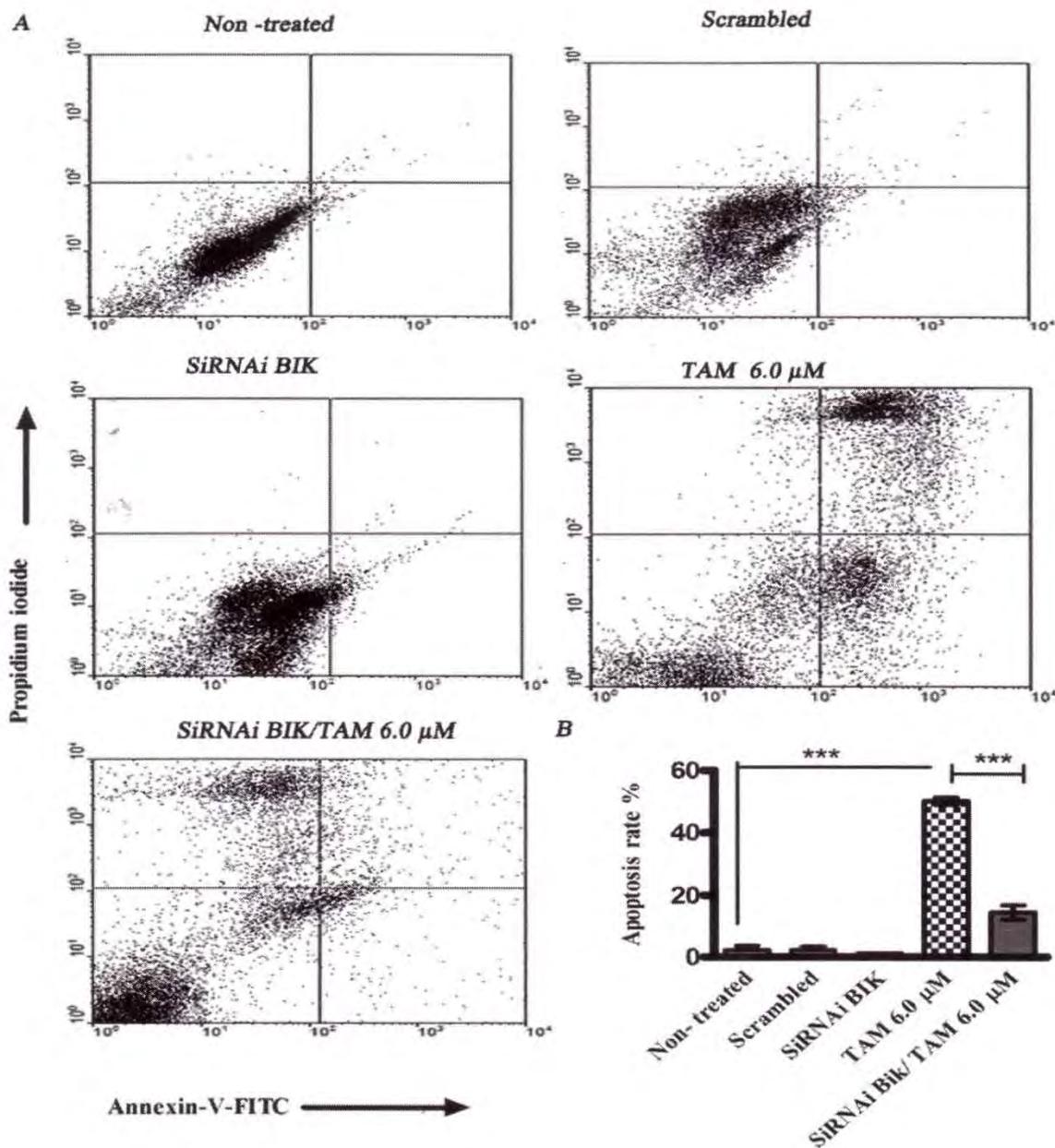


Figure 5. Suppression of the Bik gene promotes inhibition of caspase activity. (A) MCF-7 [non-treated, scrambled, siRNAiBIK, siRNAiBIK/tamoxifen (TAM), and TAM] were then labeled with the FAM-VAD-FMK probe and PI for determination of caspase activation. The samples were analyzed on a flow cytometer with 488 nm excitation using 530 nm band pass and 670 nm long pass emission filters. (B) Representative graphic of fluorescence intensities. Results are representative of three independent experiments. The groups were analyzed by one-way ANOVA with the Tukey's test. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$  vs. non-treated. Representative figures of three independent experiments carried out in triplicate are shown.

## Discussion

The *Bik* gene has been associated with tumor reversion in different cell lines and was proposed as therapeutic for inducing apoptosis in cancer, including breast tumors (6,9,18); however, our group and others have obtained high BIK levels in breast cancer, non-small cell lung cancer (NSCLC), and

lymphoblastoid cell lines derived from patients with Fanconi anemia (19,20).

The BH3-only BIK protein, which is inducible by estrogen starvation and fulvestran treatment, has been suggested to play a critical role in anti-estrogen-induced apoptosis in breast cancer cells (18,21). The anti-estrogen TAM is the most commonly used treatment for estrogen receptor-positive

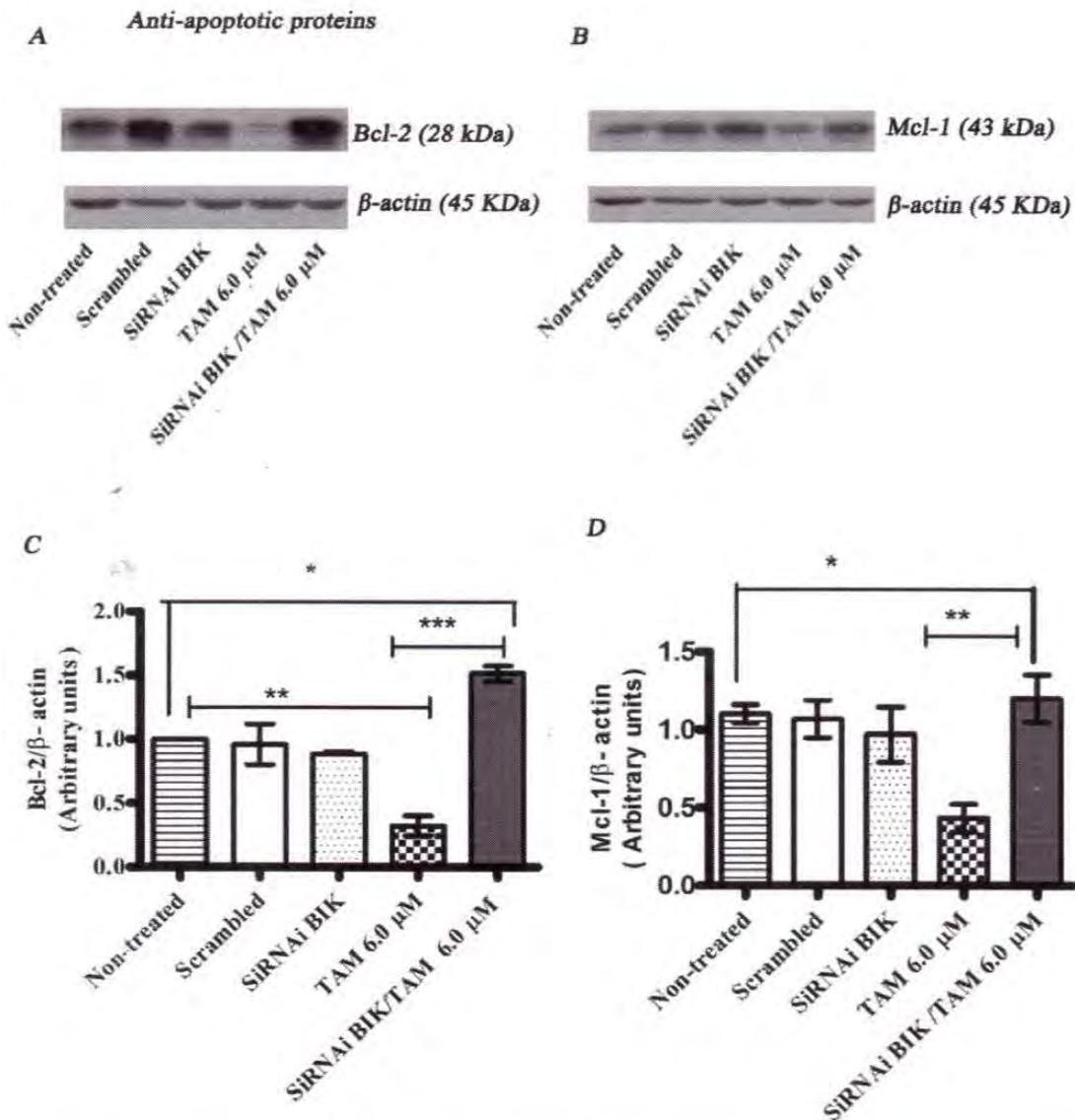


Figure 7. Anti-apoptotic proteins are highly expressed in MCF cells transfected with BIK and treated with TAM. (A and B) MCF-7 cells were incubated for 48 h, cell lysates were prepared from the cells, and subjected to western blot analyses for Bcl-2, and Mcl-1. One representative of at least three independent experiments with similar results is shown. (C and D) Band intensity in Bcl-2, and Mcl-1 was quantified by densitometric analysis. The groups were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) with the Tukey's test. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$  vs. non-treated. Representative figures of three independent experiments carried out in triplicate are shown.

Annexin V and PI test,  $\Delta\Psi_m$  and caspase activation. Because the relation between  $\Delta\Psi_m$  and apoptosis is uncertain, we measured the Cyt C, levels of protein expression were found to be similar in transfected and control cells and that TAM treatment increases Cyt C in non-transfected cells, but not in BIK-siRNA transfected cells. With the aim of determining the molecular mechanisms of resistance to TAM mediated by BIK, we evaluated some BCL-2 family proteins. We found low expression of BAX, BAK and PUMA pro-apoptotic proteins and high expression of some anti-apoptotic proteins, such as BCL-2 and MCL-1 in BIK siRNA-transfected cells

after treatment with TAM, the latter two proteins have been shown to be involved in the prevention of Cyt C release (26,27). Our present data demonstrated that Bik is an important factor in the apoptosis process induced by TAM, which may regulate mitochondrial integrity by modulation of pro- and anti-apoptotic proteins; however, it is necessary to conduct more studies in order to understand BIK-mediated resistance to TAM-induced apoptosis.

Our results showed that suppression of the *BIK* gene exhibited anti-apoptotic effects in TAM-treated MCF-7 cells. Our data would be useful for future studies to establish

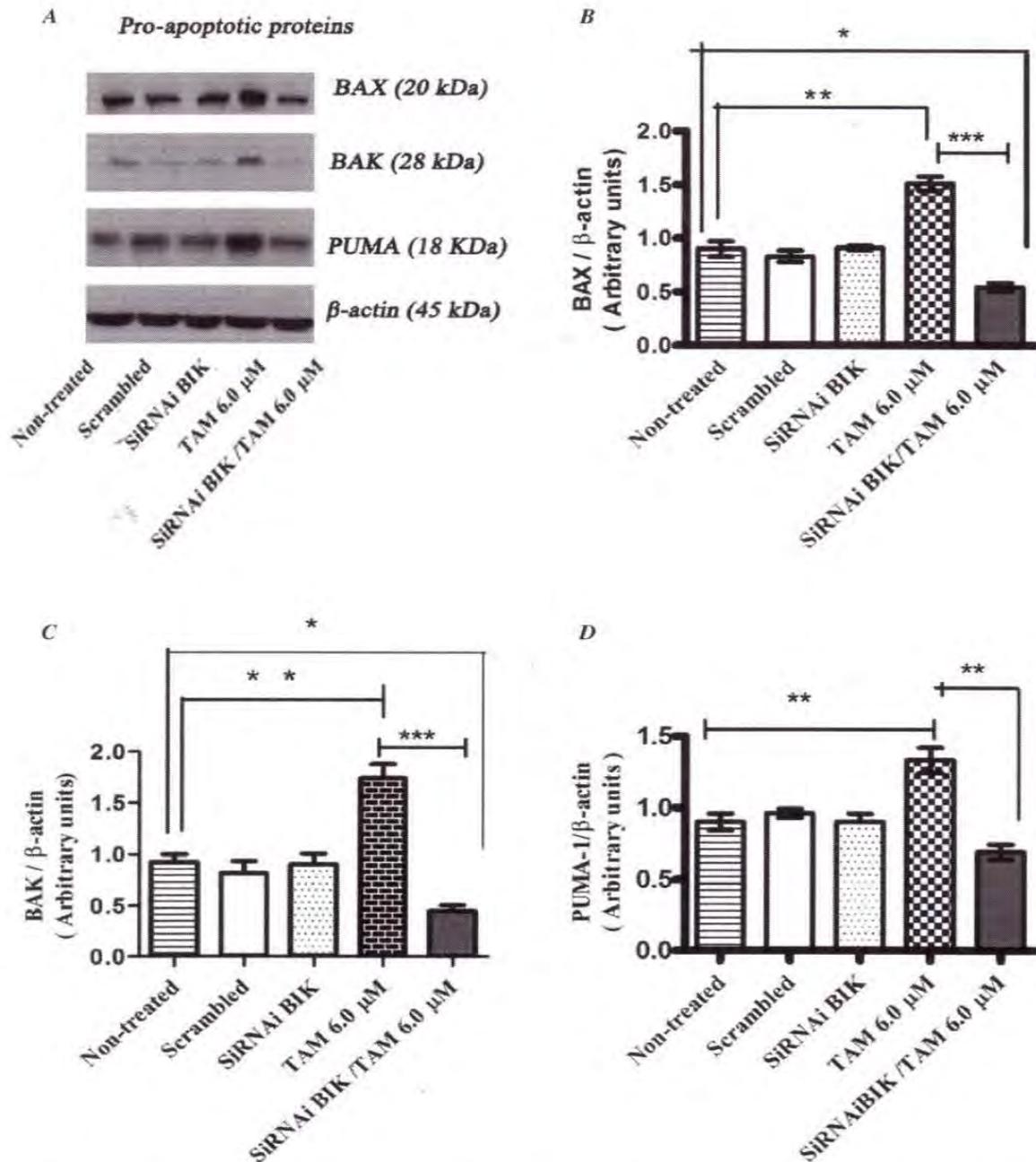


Figure 8. Suppression of BIK regulated negatively pro-apoptotic proteins in MCF-7 cells treated with TAM. (A) MCF-7 cells were incubated for 48 h, cell lysates were prepared from the cells, and subjected to western blot analyses for BAX, BAK and PUMA. One representative of at least three independent experiments with similar results is shown. (B, C and D) Band intensity in BAX, BAK and PUMA was quantified by densitometric analysis. The groups were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) with the Tukey's test. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$  vs. non-treated; n.s., not significant. Representative figures of three independent experiments carried out in triplicate are shown.

the mechanisms of regulation of TAM resistance in breast cancer. In women with this neoplasm and with positive estrogen receptor, it would be important to determine BIK protein levels to define whether or not TAM would be the appropriate treatment.

#### Acknowledgements

This study was performed in partial fulfillment of the requirements for the PhD degree in Biomedical Sciences of R.V.-R. at the Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM),

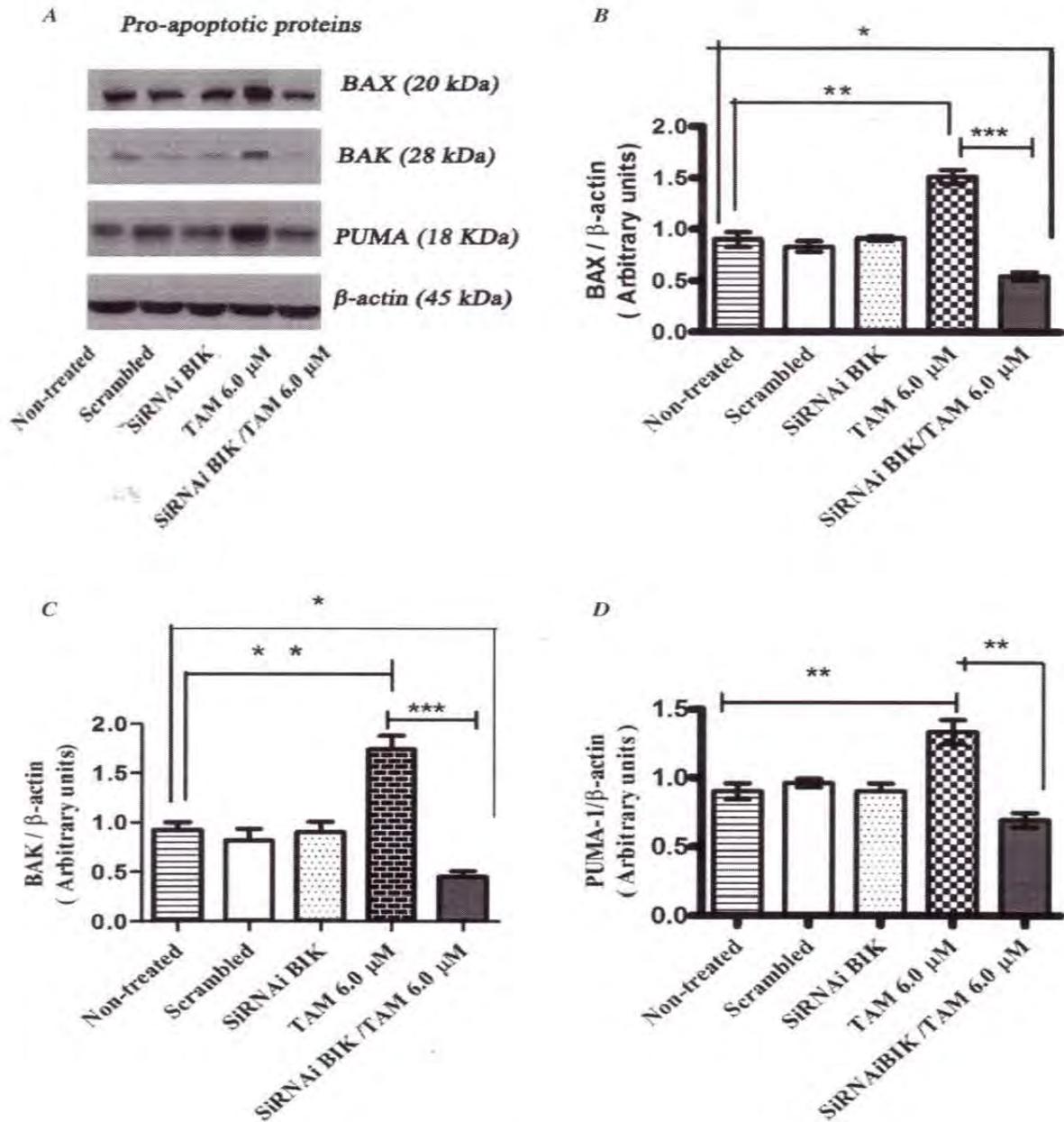


Figure 8. Suppression of BIK regulated negatively pro-apoptotic proteins in MCF-7 cells treated with TAM. (A) MCF-7 cells were incubated for 48 h, cell lysates were prepared from the cells, and subjected to western blot analyses for BAX, BAK and PUMA. One representative of at least three independent experiments with similar results is shown. (B, C and D) Band intensity in BAX, BAK and PUMA was quantified by densitometric analysis. The groups were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) with the Tukey's test, \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$  vs. non-treated; n.s., not significant. Representative figures of three independent experiments carried out in triplicate are shown.

the mechanisms of regulation of TAM resistance in breast cancer. In women with this neoplasm and with positive estrogen receptor, it would be important to determine BIK protein levels to define whether or not TAM would be the appropriate treatment.

#### Acknowledgements

This study was performed in partial fulfillment of the requirements for the PhD degree in Biomedical Sciences of R.V.-R. at the Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM),

with a doctoral fellowship provided by CONACyT-México (grant no. 207148). This study was supported by grants Salud-2007-785-063 from CONACyT-México.

## References

- Elmore S: Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol* 35: 495-516, 2007.
- Zhao X, Wang L, Sun Y, *et al*: The endoplasmic reticulum (ER)-target protein Bik induces Hep3B cell apoptosis by the depletion of the ER Ca<sup>2+</sup> stores. *Mol Cell Biochem* 312: 33-38, 2008.
- Lan KL, Yen SH, Liu RS, Shih HL, Tseng FW and Lan KH: Mutant Bik gene transferred by cationic liposome inhibits peritoneal disseminated murine colon cancer. *Clin Exp Metastasis* 24: 461-470, 2007.
- Sturm I, Stephan C, Gillissen B, *et al*: Loss of the tissue-specific proapoptotic BH3-only protein Nbk/Bik is a unifying feature of renal cell carcinoma. *Cell Death Differ* 13: 619-627, 2006.
- Gillissen B, Essmann F, Graupner V, *et al*: Induction of cell death by the BH3-only Bcl-2 homolog Nbk/Bik is mediated by an entirely Bax-dependent mitochondrial pathway. *EMBO J* 22: 3580-3590, 2003.
- Chinnadurai G, Vijayalingam S and Rashmi R: BIK, the founding member of the BH3-only family proteins: mechanisms of cell death and role in cancer and pathogenic processes. *Oncogene* 27 (Suppl 1): S20-S29, 2008.
- Chinnadurai G, Vijayalingam S and Gibson SB: BNIP3 subfamily BH3-only proteins: mitochondrial stress sensors in normal and pathological functions. *Oncogene* 27 (Suppl 1): S114-S127, 2008.
- Zou Y, Peng H, Zhou B, *et al*: Systemic tumor suppression by the proapoptotic gene bik. *Cancer Res* 62: 8-12, 2002.
- García N, Salamanca F, Astudillo-de la Vega H, *et al*: A molecular analysis by gene expression profiling reveals Bik/NBK overexpression in sporadic breast tumor samples of Mexican females. *BMC Cancer* 5: 93, 2005.
- Real PJ, Sanz C, Gutierrez O, Pipaon C, Zubiaga AM and Fernandez-Luna JL: Transcriptional activation of the proapoptotic bik gene by E2F proteins in cancer cells. *FEBS Lett* 580: 5905-5909, 2006.
- Mathai JP, Germain M, Marcellus RC and Shore GC: Induction and endoplasmic reticulum location of BIK/NBK in response to apoptotic signaling by E1A and p53. *Oncogene* 21: 2534-2544, 2002.
- Boyd JM, Gallo GJ, Elangovan B, *et al*: Bik, a novel death-inducing protein shares a distinct sequence motif with Bcl-2 family proteins and interacts with viral and cellular survival-promoting proteins. *Oncogene* 11: 1921-1928, 1995.
- Hur J, Bell DW, Dean KL, *et al*: Regulation of expression of BIK proapoptotic protein in human breast cancer cells: p53-dependent induction of BIK mRNA by fulvestrant and proteasomal degradation of BIK protein. *Cancer Res* 66: 10153-10161, 2006.
- Nikrad M, Johnson T, Puthalalath H, Coultas L, Adams J and Kraft AS: The proteasome inhibitor bortezomib sensitizes cells to killing by death receptor ligand TRAIL via BH3-only proteins Bik and Bim. *Mol Cancer Ther* 4: 443-449, 2005.
- Monick MM, Powers LS, Butler NS and Hunninghake GW: Inhibition of Rho family GTPases results in increased TNF-alpha production after lipopolysaccharide exposure. *J Immunol* 171: 2625-2630, 2003.
- Schmittgen TD and Livak KJ: Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc* 3: 1101-1108, 2008.
- Gottlieb E, Armour SM, Harris MH and Thompson CB: Mitochondrial membrane potential regulates matrix configuration and cytochrome c release during apoptosis. *Cell Death Differ* 10: 709-717, 2003.
- Hur J, Chesnes J, Coser KR, *et al*: The Bik BH3-only protein is induced in estrogen-starved and antiestrogen-exposed breast cancer cells and provokes apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 2351-2356, 2004.
- Prieto-Remon I, Sanchez-Carrera D, Lopez-Duarte M, Richard C and Pipaon C: BIK (NBK) is a mediator of the sensitivity of Fanconi anemia group C lymphoblastoid cell lines to interstrand DNA cross-linking agents. *Biochem J* 448: 153-163, 2012.
- Mebratu YA, Schwalm K, Smith KR, Schuyler M and Tesfaigzi Y: Cigarette smoke suppresses Bik to cause epithelial cell hyperplasia and mucous cell metaplasia. *Am J Respir Crit Care Med* 183: 1531-1538, 2011.
- Fu Y, Li J and Lee AS: GRP78/BiP inhibits endoplasmic reticulum BIK and protects human breast cancer cells against estrogen starvation-induced apoptosis. *Cancer Res* 67: 3734-3740, 2007.
- Weng SC, Kashida Y, Kulp SK, *et al*: Sensitizing estrogen receptor-negative breast cancer cells to tamoxifen with OSU-03012, a novel celecoxib-derived phosphoinositide-dependent protein kinase-1/Akt signaling inhibitor. *Mol Cancer Ther* 7: 800-808, 2008.
- Fisher B, Costantino JP, Wickerham DL, *et al*: Tamoxifen for prevention of breast cancer: report of the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project P-1 Study. *J Natl Cancer Inst* 90: 1371-1388, 1998.
- Musgrove EA and Sutherland RL: Biological determinants of endocrine resistance in breast cancer. *Nat Rev Cancer* 9: 631-643, 2009.
- Mandlekar S and Kong AN: Mechanisms of tamoxifen-induced apoptosis. *Apoptosis* 6: 469-477, 2001.
- Simonian PL, Grillot DA and Nunez G: Bak can accelerate chemotherapy-induced cell death independently of its heterodimerization with Bcl-XL and Bcl-2. *Oncogene* 15: 1871-1875, 1997.
- Zhang H, Nimmer PM, Tahir SK, *et al*: Bcl-2 family proteins are essential for platelet survival. *Cell Death Differ* 14: 943-951, 2007.