



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

**CONTROL EPIGENÉTICO MEDIADO POR RESVERATROL DEL GEN *ATP2A3*
HUMANO EN LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER DE MAMA**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Doctor en Ciencias

PRESENTA:

M. C. EDUARDO DE JESÚS IZQUIERDO TORRES

TUTOR PRINCIPAL:

DR. ÁNGEL ALFONSO ZARAIN HERZBERG
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:

DRA. MARCELA LIZANO SOBERÓN
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM
DR. ERNESTO SOTO REYES SOLÍS
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

Ciudad de México. Marzo, 2020



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.

CONTROL EPIGENÉTICO MEDIADO POR RESVERATROL DEL GEN *ATP2A3* HUMANO EN LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER DE MAMA

RECONOCIMIENTOS

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

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

Dr. Ángel Zarain Herzberg Facultad de Medicina, UNAM
Dra. Marcela Lizano Soberón Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM
Dr. Ernesto Soto-Reyes Solís Universidad Autónoma Metropolitana

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

El proyecto fue apoyado por DGAPA/PAPIIT IN217216, IV200218 e IN219219. Durante mis estudios de doctorado gocé de una beca CONACyT No. 434893. Se agradece al Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP) por el apoyo otorgado para asistir al Simposio internacional “Ganando la guerra contra el cáncer” en Buenos Aires, Argentina y al Congreso “Chromatin and epigenetics: from mechanism to function” en Múnich, Alemania.

El jurado del examen estuvo constituido por

Presidente	Dr. Armando Roberto Tovar Palacios	INCMNSZ
Vocal	Dr. Víctor Julián Valdés Rodríguez	IFC, UNAM
Vocal	Dr. Alfonso León del Río	IIB, UNAM
Vocal	Dra. Rocío Ángeles García Becerra	IIB, UNAM
Secretario	Dra. Mayra Furlán Magaril	IFC, UNAM

AGRADECIMIENTOS

A mi familia, mi mamá, papá, hermana y los niños, Sergito y Ale. Por el apoyo incondicional y estar siempre para levantarme el ánimo en todo momento.

A Dalia, porque fue mi acompañante durante la mayor parte de mis estudios de doctorado, quien estuvo conmigo en las buenas y en las malas, dándome siempre el cariño y comprensión que necesitaba.

A todas las personas y amigos que durante algún momento de esta etapa pasaron por el laboratorio, por hacer más amenas las a veces muy largas jornadas de trabajo, y además por el apoyo técnico al que mutuamente requeríamos en reiteradas ocasiones.

Al Dr. Zarain, por siempre estar atento tanto de mi progreso como de los demás estudiantes, por su disposición y apoyo durante mi formación académica.

A los miembros del jurado, por sus valiosos comentarios para la mejora de ésta tesis.

	Página
ÍNDICE	
Índice de figuras	ii
Índice de tablas	iii
Abreviaturas	iii
Resumen	vi
Abstract	vii
1. Introducción	1
2. Antecedentes	2
2.1 Señalización por calcio y la bomba SERCA	2
2.2 Generalidades del cáncer	5
2.2.1 Cáncer de mama	7
2.2.2 Líneas celulares de cáncer de mama	9
2.3 Alteraciones epigenéticas en el cáncer	11
2.3.1 Metilación del DNA	12
2.3.2 Modificaciones postraduccionales de las histonas: acetilación/desacetilación	14
2.4 Terapia epigenética del cáncer	17
2.4.1 inhibidores de DNMT	18
2.4.2 Inhibidores de HDAC	20
2.5 Los fitoestrógenos como remodeladores epigenéticos en cáncer	21
3. Planteamiento del problema	25
4. Hipótesis	25
5. Objetivo general	26
6. Objetivos particulares	26
7. Materiales y métodos	27
8. Resultados	37
8.1 Comparación de los efectos de TSA, 5-aza y RSV en viabilidad celular y apoptosis en células de cáncer de mama	37
8.2 Cambios en la expresión de los genes <i>ATP2A2</i> y <i>ATP2A3</i> por TSA, 5-azacitidina o RSV y su efecto en la homeostasis de calcio en células de cáncer de mama	39
8.3 Evaluación de la actividad de HDAC en respuesta a tratamiento con TSA o RSV en células de cáncer de mama.	41
8.4 Expresión de HDAC2 y patrón de acetilación global de la histona H3 inducidos por TSA o RSV en células de cáncer de mama	42

8.5 Localización de HDAC2 en células de cáncer de mama tratadas con TSA o RSV	44
8.6 Evaluación de la actividad de HAT en respuesta a tratamiento con TSA o RSV en células de cáncer de mama	46
8.7 Efecto de un inhibidor de p300 en la expresión de <i>ATP2A3</i> en células de cáncer de mama tratadas con TSA o RSV	47
8.8 Ocupancia relativa de las marcas H3K9Ac y H3K27Ac en una región del promotor de <i>ATP2A3</i> en células tratadas con TSA o RSV	48
8.9 Evaluación de la actividad de DNMT en respuesta a tratamiento con 5-aza o RSV en células de cáncer de mama	51
8.10 Expresión de las proteínas MBD2 y MeCP2 en células tratadas con 5-aza o RSV	52
8.11 Patrón de metilación del promotor de <i>ATP2A3</i> en líneas celulares de cáncer de mama	53
9. Discusión de resultados	55
10. Conclusiones	71
11. Perspectivas	72
12. Artículo publicado derivado de esta tesis	73
13. Artículos adicionales publicados durante los estudios de doctorado	84
14. Referencias bibliográficas	85

ÍNDICE DE FIGURAS	Página
Figura 1. Etapas de señalización mediada por Ca ²⁺ .	3
Figura 2. Incidencia y mortalidad de los 10 principales tipos de cáncer en México y a nivel mundial	7
Figura 3. Estructura de la cromatina de los promotores activos e inactivos	12
Figura 4. Metilación de citosinas	13
Figura 5. Representación esquemática de la estructura octamérica de las histonas	15
Figura 6. Vías celulares afectadas por los DNMTi y HDACi	17
Figura 7. Blancos celulares de los fitoestrógenos	23
Figura 8. Comparación de los efectos de TSA, 5-aza y RSV en A) viabilidad celular y B) apoptosis en células MCF-7 y MDA-MB-231	38
Figura 9. Cambios inducidos por TSA, 5-aza o RSV en la expresión de SERCA2 y SERCA3 en células MCF-7 y MDA-MB-231. A) Expresión a nivel de mRNA, B) Expresión a nivel de proteína	40
Figura 10. Actividad de HDAC en células tratadas con TSA o RSV. A) Inhibición de la actividad de HDAC en extractos nucleares de células MCF-7 y MDA-MB-231 tratadas con TSA o RSV. B) Inhibición de la actividad de HDAC por adición de RSV o TSA a extractos nucleares de células MCF-7	41
Figura 11. Cambios en los niveles de HDAC2 y en el patrón de acetilación global de H3 en respuesta a RSV en células MCF-7 y MDA-MB-231 tratadas con TSA o RSV	43

Figura 12. Localización celular de HDAC2 en células MCF-7 (A) y MDA-MB-231 (B) tratadas con TSA o RSV	45
Figura 13. Actividad de HAT en extractos nucleares de células MCF-7 y MDA-MB-231 tratadas con TSA o RSV	46
Figura 14. Expresión del mRNA de SERCA3 en presencia de un inhibidor de p300 en células MCF-7 y MDA-MB-231 tratadas con TSA o RSV	47
Figura 15. Experimentos de ChIP contra marcas de histonas asociadas con activación transcripcional y HDAC2	50
Figura 16. Actividad de DNMT en extractos nucleares de células MCF-7 y MDA-MB-231 tratadas con 5-aza o RSV	51
Figura 17. Western Blot mostrando los niveles de las proteínas MeCP2 y MBD2 en células de cáncer de mama tratadas con 5-aza o RSV	52
Figura 18. Patrón de metilación de CpG en la región -300 - +180 del promotor del gen ATP2A3 en líneas celulares de cáncer de mama	54
Figura 19. Eventos principales en el campo del RSV y la investigación en cáncer	69

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Subtipos moleculares de cáncer de mama y su perfil inmunohistoquímico	8
Tabla 2. Análisis de IHC de las células MCF-7 y MDA-MB-231	11
Tabla 3. Inhibidores de la metilación del DNA	19
Tabla 4. HDAC y algunos de sus inhibidores	21
Tabla 5. Secuencias de los primers utilizados para PCR	29

ABREVIATURAS

5-aza: 5-azacitidina

AML: Leucemia mieloide aguda

ATCC: American Type Culture Collection

ATP: Adenosín trifosfato

ATP2A1-3: Genes que codifican para las enzimas SERCA1-3 respectivamente

BSA: Albúmina de suero bovino

Ca²⁺: Ion calcio

[Ca²⁺]: Concentración intracelular de calcio

cDNA: DNA complementario

ChIP-seq: Inmunoprecipitación de cromatina acoplada a secuenciación

CpG: Citosina adyacente a una guanina

CSC: Células troncales cancerosas

DCIS: Carcinoma ductal in situ

DMSO: Dimetilsulfóxido

DNA: Ácido desoxirribonucleico

DNMT: DNA metil transferasa

DNMTi: Inhibidor de DNMT

EGCG: Epigallocatequin galato

EGF: Factor de crecimiento epidérmico

ER: Receptor de estrógenos alfa

HAT: Histona acetiltransferasa

HDAC: Histona desacetilasa

HDACi: Inhibidor de HDAC

HER2: Receptor 2 del EGF

IDC: Carcinoma ductal invasivo

ILC: Carcinoma lobular invasivo

LCIS: Carcinoma lobular in situ

MBD: Dominio de unión a metil-CpG

MDS: Síndrome mielodisplásico

MPT: Modificaciones postraduccionales

mRNA: RNA mensajero

PBS: Búfer fosfato salino

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PMCA: ATPasa de calcio de la membrana plasmática

pNA: P-nitroanilina

PR: Receptor de progesterona

PTEN: Fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa

qPCR: PCR cuantitativa
RE: Retículo Endoplásmico
RNA: Ácido ribonucleico
RNAi: RNA de interferencia
RS: Retículo Sarcoplásmico
RSV: Resveratrol
RT-PCR: PCR con transcriptasa reversa
SAH: S-adenosil monocisteína
SAM: S-adenosil metionina
SD: Desviación estándar
SDS: Dodecilsulfato sódico
SDS-PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS
SERCA: ATPasa de calcio del retículo sarco/endo plásmico
SFB: Suero fetal bovino
TET: Enzimas "Ten-eleven translocation"
Tg: Tapsigargina
TSA: Tricostatina A
TSS: Sitio del inicio de la transcripción
UPR: Respuesta a proteínas mal plegadas
UTR: Región no traducida

RESUMEN

El Resveratrol (RSV) es un fitoestrógeno que ha sido relacionado con la quimio-prevencción de varios tipos de cáncer. En este trabajo, mostramos un incremento inducido por RSV en la expresión del gen *ATP2A3* de hasta 6 veces, el cual produce apoptosis y cambios en el manejo intracelular de Ca^{2+} en las células de cáncer de mama MCF-7 y MDA-MB-231. Exploramos los cambios epigenéticos ocurridos en esta regulación positiva mediada por RSV, y los resultados indican que ésta correlaciona con la disminución de aproximadamente 50% en la actividad de HDAC y reducción en la expresión de HDAC2 nuclear y ocupancia sobre el promotor de *ATP2A3*, lo cual incrementó la acetilación global de la histona H3 y el enriquecimiento de la marca de histonas H3K27ac en el promotor de *ATP2A3* en células MDA-MB-231. También cuantificamos la actividad de HAT, encontrando que esta puede ser potenciada por el tratamiento con RSV; sin embargo, la inhibición farmacológica de p300, una de las principales HAT, no tuvo efectos significativos en la expresión del gen *ATP2A3* mediada por RSV.

Adicionalmente, también la actividad de las DNMTs se encuentra reducida en células tratadas con RSV, así como la expresión de las proteínas de unión de DNA metilado MeCP2 y MDB2. Sin embargo, el análisis del patrón de metilación del promotor del gen *ATP2A3* muestra que se encuentra hipometilado en ambas líneas celulares. En conjunto, los resultados de este trabajo ayudan a explicar, a nivel molecular, cómo el gen *ATP2A3* es regulado en células de cáncer de mama, y los beneficios del consumo de RSV que se han observado en datos epidemiológicos, estudios con animales y modelos *in vitro*.

ABSTRACT

Resveratrol (RSV) is a phytoestrogen which has been related to chemoprevention of several types of cancer. In this work, we show up to a 6-fold increased expression of *ATP2A3* gene induced by RSV that triggers apoptosis and changes of intracellular Ca^{2+} management in MCF-7 and MDA-MB-231 breast cancer cell lines. We explored epigenetic changes for this RSV-induced *ATP2A3* up-regulation. The results indicate that RSV-induced *ATP2A3* up-regulation correlates with about 50% of reduced HDAC activity and reduced nuclear HDAC2 expression and occupancy on *ATP2A3* promoter, increasing the global acetylation of histone H3 and the enrichment of histone mark H3K27ac on the proximal promoter of the *ATP2A3* gene in MDA-MB-231 cells. We also quantified HAT activity, finding that it can be boosted with RSV treatment; however, pharmacological inhibition of p300, one of the main HATs, did not have significant effects in RSV-mediated *ATP2A3* gene expression.

Additionally, DNMTs activities were also reduced in cells treated with RSV, as well as the expression of Methyl-DNA binding proteins MeCP2 and MBD2. However, analysis of the methylation pattern of *ATP2A3* gene promoter showed un-methylated promoter in both cell lines. Taken together, the results of this work help to explain, at the molecular level, how *ATP2A3* gene is regulated in breast cancer cells, and the benefits of RSV intake observed in epidemiological data, studies with animals, and *in vitro* models.

1. INTRODUCCIÓN

El ion Ca (Ca^{2+}) es un segundo mensajero utilizado por células eucariontes para regular de manera específica procesos celulares como la proliferación, muerte celular, transcripción, metabolismo, entre otros [1]. Uno de los componentes principales del sistema de señalización por Ca^{2+} es la bomba SERCA, una proteína que transporta Ca^{2+} hacia el lumen del retículo sarcoplásmico (RS) de células musculares y del retículo endoplásmico (RE) de todos los tipos celulares, mediante la hidrólisis de ATP, para restaurar el estado de reposo [2]. Tres genes diferentes (*ATP2A1-3*) codifican para diferentes isoformas de la proteína SERCA, las cuales se expresan en diferentes tejidos o estadios del desarrollo [3]. Las isoformas de SERCA1 (a y b) se expresan exclusivamente en músculo esquelético de contracción rápida [4]; SERCA2 tiene cuatro isoformas (a-d) que se expresan en músculo esquelético de contracción lenta, corazón, músculo liso y células hematopoyéticas [5, 6]. SERCA2b es la única isoforma que se expresa en todos los tejidos [5]. El gen *ATP2A3* codifica para 6 isoformas de SERCA3 (a-f) que se expresan en tejidos endoteliales y epiteliales, páncreas, plaquetas, timo, bazo, nódulos linfáticos, entre otros [7, 8]. Varios estudios han demostrado que la expresión de las proteínas SERCA2 y SERCA3 se ve alterada en varios tipos de cáncer, incluido el de mama [9-11]. Su expresión puede alterarse directamente por eventos de mutación, mediante mecanismos epigenéticos, por expresión alterada de factores de transcripción que modulen su expresión o mediante diversas vías de señalización [12].

Los fitoestrógenos son un grupo de sustancias derivadas de las plantas que son estructural o funcionalmente similares al estradiol [13]. Una característica de los fitoestrógenos es que poseen diversos blancos moleculares, entre los que se han propuesto a los mecanismos epigenéticos [14]. En células de cáncer de mama MCF-7 y MDA-MB-231 previamente observamos que el tratamiento con Resveratrol (RSV) aumenta la actividad de diversas caspasas y que la inducción de la expresión del gen *ATP2A3* es importante para la apoptosis inducida por RSV, ya que su silenciamiento por RNAi disminuye parcialmente la apoptosis inducida por éste [15].

2. ANTECEDENTES

2.1 SEÑALIZACIÓN POR CALCIO Y LA BOMBA SERCA

El Ca^{2+} es un segundo mensajero que regula procesos como la transcripción, contracción muscular (y motilidad en general), proliferación, muerte celular, metabolismo, entre otros [1]. La regulación precisa de esta señalización depende de proteínas efectoras que censan y transportan continuamente el Ca^{2+} entre compartimentos celulares como el citoplasma, el RE, la mitocondria, el aparato de Golgi, los lisosomas y el espacio extracelular. El sistema de señalización por Ca^{2+} puede dividirse en 4 etapas que se detallan en la Figura 1 [16].

En el espacio extracelular, las concentraciones de Ca^{2+} suelen encontrarse entre 1-2 mM, mientras que en el citosol pueden variar entre 10-100 nM en el estado de reposo, o 100-1000 nM en el estado activado. En el lumen del RE, organelo que es el principal reservorio intracelular de Ca^{2+} , su concentración está en el rango de 100-

500 μM [17]. La activación de un proceso específico depende de la magnitud de la elevación del Ca^{2+} citosólico, así como de la duración de dicho estímulo.

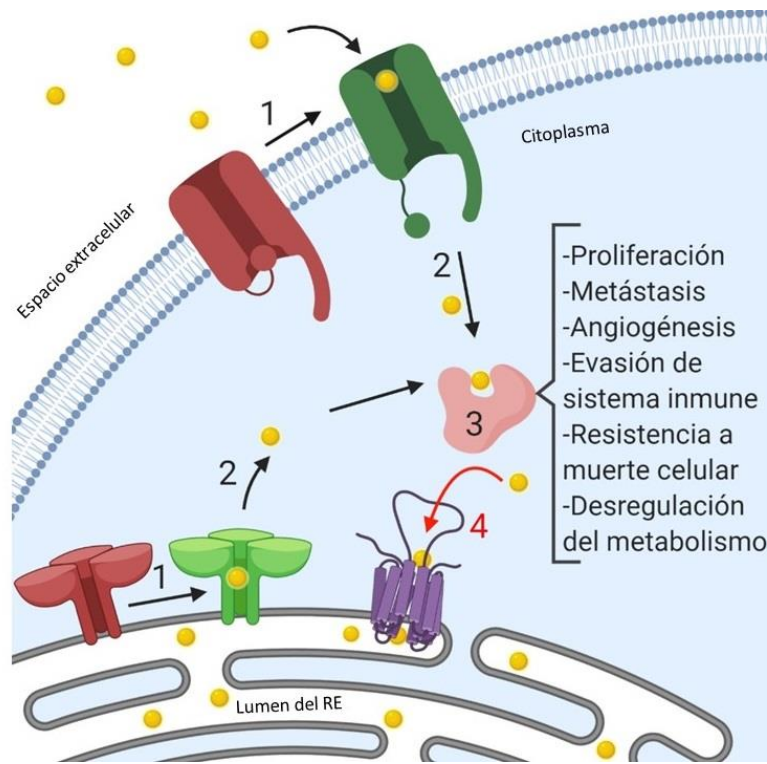


Figura 1. Etapas de señalización mediada por Ca^{2+} . 1) Identificación de un estímulo que genera señales para el transporte de Ca^{2+} a través de la activación de los canales de Ca^{2+} de membrana plasmática y del RE; 2) Los canales activos (en verde), permiten el flujo de Ca^{2+} del espacio extracelular y del RE hacia el citoplasma (etapa de activación); 3) Decodificación de la señal por proteínas efectoras de alta afinidad por Ca^{2+} . El aumento en las concentraciones de Ca^{2+} en el citoplasma activa una amplia variedad de vías de señalización dependientes de Ca^{2+} , las cuales pueden estar relacionadas con las características distintivas de las células tumorales; 4) Disminución del Ca^{2+} citosólico para restaurar el estado de reposo (etapa de desactivación). Este transporte, que es mediado principalmente por SERCA (morado), desactiva las vías de señalización dependientes de Ca^{2+} .

Los gradientes de concentración de Ca^{2+} en el citosol se mantienen por la actividad de varias proteínas, una de ellas es la bomba SERCA, una proteína que transporta

Ca^{2+} hacia el lumen del RE mediante la hidrólisis de ATP, para restaurar el estado de reposo. En humanos, las bombas SERCA son codificadas por tres genes: *ATP2A1*, 2 y 3, cada uno de los cuales codifica diferentes isoformas de la proteína SERCA1, 2 y 3 respectivamente [3]. Las isoformas de SERCA1 (a y b) se expresan en músculo esquelético de contracción rápida [4]; SERCA2 tiene cuatro isoformas (a-d) que se expresan en músculo esquelético de contracción lenta, corazón, músculo liso y células hemayopoyéticas [5, 6]. SERCA2b es la única isoforma que se expresa en todos los tejidos [5]. Las isoformas de SERCA3 (a-f) se expresan en tejidos endoteliales y epiteliales, páncreas, plaquetas, timo, bazo, nódulos linfáticos, entre otros [7, 8]. Todas las isoformas son funcionales y se diferencian entre ellas en el extremo carboxilo terminal, pues la edición alterna del RNA mensajero (mRNA) se da en el extremo 3'. Su peso molecular aproximado es de 110 KDa [2]. Sin embargo, a pesar del gran parecido en la secuencia de aminoácidos entre las diversas isoformas, sus propiedades bioquímicas son distintas. Por ejemplo, las isoformas de SERCA2 tienen una afinidad por Ca^{2+} ($K_{0.5} = 0.1 - 0.2 \mu\text{M}$) aproximadamente 6 veces mayor que las isoformas de SERCA3 ($K_{0.5} = 1.2 - 1.6 \mu\text{M}$); no obstante, las isoformas de SERCA3 tienen una velocidad de transporte de Ca^{2+} mayor [18], sugiriendo que cada isoforma se activa en un momento determinado y que no tienen redundancia funcional.

Particularmente, la expresión de SERCA3 se ha encontrado disminuida en diversos tipos de cáncer, como cáncer de pulmón, oral, colon y gástrico, tiroides, mama, entre otros [9, 19-22]. Se ha propuesto que la ausencia de mutaciones somáticas sobre el gen *ATP2A3* indica que éste no funciona como supresor tumoral pero que la

expresión incompleta del mismo es suficiente para modificar el ambiente celular y tisular que predispone al desarrollo del cáncer. Además, estos estudios sugieren que las mutaciones en los genes que codifican las bombas SERCA, así como cambios en su expresión, constituyen eventos tempranos en el proceso carcinogénico [23].

2.2 GENERALIDADES DEL CÁNCER

El cáncer es definido como un conjunto de enfermedades con características comunes, el crecimiento celular anormal es la principal de ellas. Ésta permite que las células tumorales sean independientes y móviles, pudiendo viajar grandes distancias y colonizar órganos distintos del cual se originaron [24].

En 2011, Hanahan y Weinberg enlistaron y explicaron las características que comparten las células cancerosas, las cuales les confieren grandes ventajas de supervivencia en comparación con las células normales. Estas características son:

- Señalización proliferativa sostenida
- Evasión de supresores del crecimiento
- Invasión y metástasis
- Inmortalidad replicativa
- Inducción de angiogénesis
- Resistencia a la muerte celular
- Evasión del sistema inmune
- Desregulación del metabolismo energético

Adicionalmente, las mutaciones e inestabilidad genómica, así como a la inflamación crónica, fueron propuestas como dos características (facilitadores) que permiten el desarrollo de tumores y favorecen la aparición de las 8 características anteriores [25].

Además, el cáncer es un problema de salud pública tanto en México como a nivel mundial (Figura 2). Su incidencia y mortalidad se encuentran en aumento por razones complejas. Ya que el cáncer una enfermedad que en mayor proporción afecta a personas adultas, el incremento en su incidencia está relacionado con el incremento mundial de la población, así como con el aumento en la esperanza de vida. También la prevalencia y distribución de los distintos factores de riesgo conocidos contribuyen a este fenómeno [26].

De entre los tipos de cáncer más comunes, el cáncer de mama es el más prevalente en mujeres, ocupando el 30% del total de nuevos casos diagnosticados; mientras que en hombres es el cáncer de próstata, con el 20%. En cuanto a mortalidad, el cáncer de pulmón y bronquios es el de peor pronóstico, puesto que tiene una mortalidad en ambos sexos del 24 y 23%, respectivamente [27].

En México, durante el 2018 se diagnosticaron 190,667 nuevos casos de cáncer, 85,616 correspondieron a hombres y 105,051 a mujeres. Los más comunes en hombres fueron cáncer de próstata (29.3%), colorrectal (9.1%), testicular (5.4%), pulmón (5.3%) y de estómago (4.6%); mientras que en mujeres fueron cáncer de mama (26%), tiroides (9.7%), cérvico-uterino (7.5%), útero (6.9%) y colorrectal (6.8%) [26].

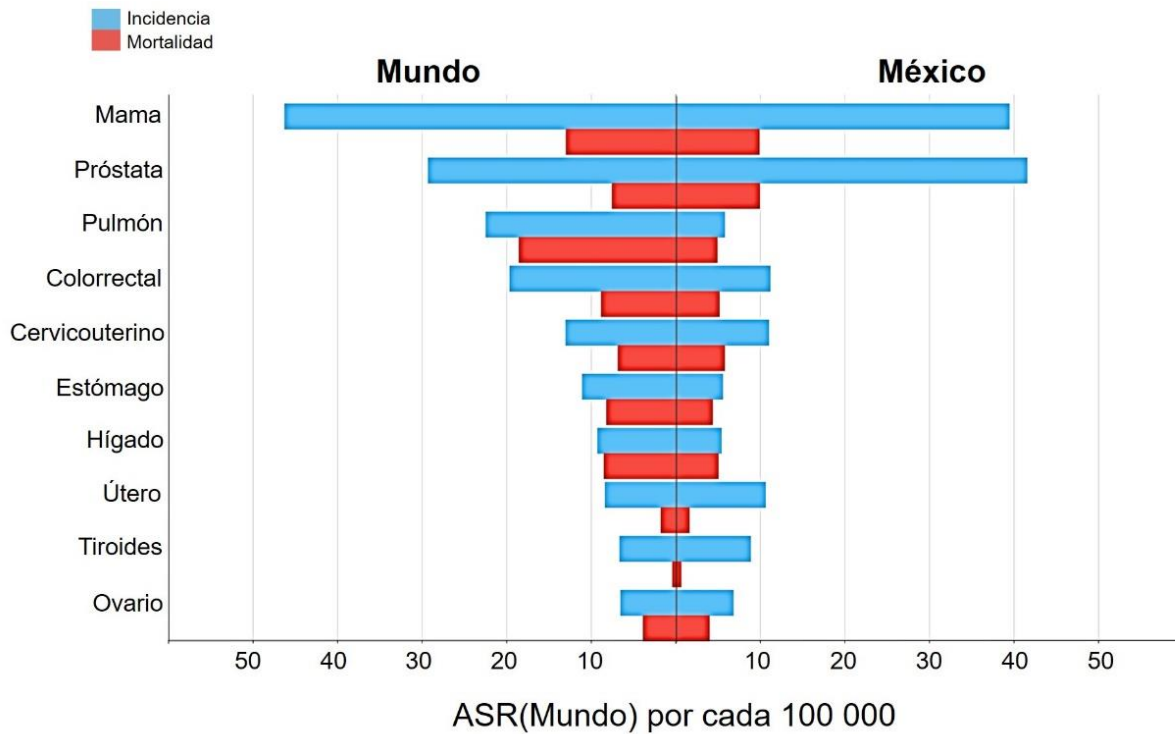


Figura 2. Incidencia y mortalidad de los 10 principales tipos de cáncer en México y a nivel mundial. Los datos fueron tomados de la base de datos de GLOBOCAN, y muestran la incidencia y mortalidad en ambos sexos y en personas con un rango de edad de 0-79 años por cada 100 mil habitantes, de los 10 tipos de cáncer más prevalentes a nivel mundial y en México durante el 2018.

2.2.1 CÁNCER DE MAMA

Como se mencionó anteriormente, el cáncer de mama es la neoplasia más frecuente en mujeres en México y a nivel mundial, de ahí la importancia de estudiarlo. Es una enfermedad heterogénea tanto a nivel clínico como molecular como lo indican los múltiples subtipos que existen [28]. Actualmente, en la práctica clínica se utiliza una clasificación que incluye subtipos que se dividen con base en sus características histológicas, los cuales son los siguientes:

- Carcinoma ductal in situ (DCIS, por sus siglas en inglés): se extiende a través de los ductos y distorsiona su arquitectura; puede progresar a cáncer invasivo y es unilateral:
- Carcinoma lobular in situ (LCIS): no distorsiona la arquitectura ductal; puede ser bilateral.
- Carcinoma ductal invasivo (IDC): se desarrolla a partir del DCIS; hay respuesta fibrosa para producir una masa; metástasis a través de los vasos linfáticos y la sangre.
- Carcinoma lobular invasivo (ILC): son células tumorales aisladas (con mutaciones en el gen CDH1) la respuesta fibrosa es mínima; la metástasis es preferentemente a través de vísceras [28, 29].

Sin embargo, también se ha realizado esfuerzos para complementar esta clasificación morfológica del cáncer de mama con una clasificación que incluya parámetros genéticos y moleculares, desarrollando una clasificación adicional que tiene valor muy importante en la predicción del comportamiento tumoral para poder tomar mejores decisiones de tratamiento. Esta clasificación se detalla en la Tabla 1.

Tabla 1. Subtipos moleculares de cáncer de mama y su perfil inmunohistoquímico (tomado y modificado de [28, 29]),

Perfil inmunohistoquímico	Luminal A	Luminal B	HER2/NEU	TIPO BASAL
ER, PR	ER y/o PR+	ER and/or PR+	ER-, PR-	ER-, PR-
HER2 y otros	HER2-, baja Ki67 (<14%) Activación de <i>ERS1</i> , <i>GATA3</i> , <i>FOXA1</i> , <i>XBP1</i> ; histología tubular cribiforme y lobular clásica	HER2+ o HER2- Ki67 = ≥14% Mutaciones en <i>PI3KCA</i> (40%); Mutaciones en <i>ESR1</i> (30-40%); Mutaciones en <i>ERBB2</i> y <i>ERBB3</i> ; histología lobular micropapilar y atípica	HER2+ Amplificación HER2 y GRB7; Mutaciones en <i>PIK3CA</i> ; <i>TOPO2</i> y/o amplificación MYC; histología lobular pleiomórfica y micropapilar	HER2- CK5/6 y/o EGFR+ Mutaciones en <i>TP53</i> ; inestabilidad genómica; Mutaciones en <i>BRCA</i> ; histología de tipo medular poco diferenciada

Adicionalmente, existe otro subtipo intrínseco de cáncer de mama, conocido como triple negativo. Este subtipo de cáncer es comúnmente utilizado como un sinónimo del tipo basal, sin embargo, aunque hay numerosas similitudes, existen algunas diferencias entre ellos. La mayoría de los cánceres triple negativos presentan un fenotipo basal y la mayoría de los tumores que expresan marcadores basales son triples negativos. Sin embargo, no todos los cánceres definidos como tipo basal carecen de ER, PR y HER2, y, por el contrario, no todos los cánceres triples negativos muestran un fenotipo basal [30].

El cáncer de mama triple negativo se caracteriza por tener un perfil inmunohistoquímico ER-, PR-, HER2-. Es de alto grado; alto índice de Ki67; presenta una histología de tipo especial (metaplásico, adenoide quístico, medular y secretor); y es de mal pronóstico a excepción de algunos tipos especiales [28]

2.2.2 LINEAS CELULARES DE CANCER DE MAMA

La primera línea celular de cáncer de mama en ser establecida fue la línea BT-20 en 1958 [31]. Actualmente, existen decenas de líneas celulares de cáncer de mama, cada una con sus características particulares y representativas de los distintos subtipos de cáncer de mama, reflejando la heterogeneidad de esta enfermedad [32]. Sin embargo, a pesar de la gran cantidad de líneas celulares disponibles, aproximadamente dos tercios de las investigaciones *in vitro* en cáncer de mama se han realizado en 3 de ellas: MCF-7, T47D y MDA-MB-231 [31].

Las líneas celulares luminales se caracterizan por ser positivas a la expresión de RE y/o PR. Estas células aún presentan cierto grado de diferenciación y características epiteliales, por lo que son menos propensas a presentar migración, debido a las uniones estrechas célula-célula [31]. De manera general, las células con fenotipo luminal B son más agresivas e invasivas que las luminal A, esto debido a que presentan sobre-expresión de HER2, la cual está asociada con la regulación negativa del ER [31]. Por otro lado, las células triples negativas, como su nombre lo indica, son negativas para la expresión de ER/PR/HER2 [31].

Se ha reportado que las líneas celulares de cáncer de mama acumulan daño al DNA que no es detectado tumores de pacientes, esto puede ser debido a que normalmente son derivadas de tumores invasivos de alto grado, los cuales son más propensos a acumular aberraciones genómicas. Sin embargo, han mostrado ser un modelo factible para estudiar esta patología [31].

En la Tabla 2 se pueden observar las características de las células MCF-7 y MDA-MB-231, son de tipo luminal A y triple negativo, respectivamente. El cáncer de mama de tipo luminal A es el más frecuentemente diagnosticado, ocupando aproximadamente el 63% de los nuevos casos, mientras que el cáncer de mama tipo triple negativo ocupa alrededor del 10%, siendo éste último el subtipo más agresivo que se conoce [33]. Esto último resalta la importancia de la utilización de éstas dos líneas celulares en el estudio del cáncer de mama. También existen líneas celulares que se utilizan comúnmente como modelo de tejido epitelial mamario normal (por ejemplo, MCF10-A) [34], sin embargo, su perfil genético (ER-, PR-,

HER2-), así como otras características, ponen en duda que sean un modelo factible de tejido normal [35].

Tabla 2. Análisis de IHC de las células MCF-7 y MDA-MB-231 [36].

Línea celular	Tumorigénica	ER/PR/HER2	Subtipo molecular
MCF-7	Sí	+/+/-	Luminal A
MDA-MB-231	Sí	-/-/-	Triple negativa

2.3 ALTERACIONES EPIGENÉTICAS EN EL CÁNCER

El cáncer es visto como un conjunto de enfermedades con características comunes [25], las cuales se desarrollan por un proceso conocido como carcinogénesis, que puede ser impulsado por anomalías genéticas progresivas, alteraciones en el microambiente y/o selección clonal y presencia de células troncales cancerosas (Cancer Stem Cells, CSC) [37]. Sin embargo, el creciente reconocimiento de la importancia de los cambios epigenéticos en la carcinogénesis ha conducido al cambio en los enfoques utilizados para descubrir genes afectados en este proceso [38], reconociéndose a la pérdida de regulación epigenética, la cual conduce a una expresión génica aberrante, como una característica de la progresión del cáncer [34]. La epigenética se define como los cambios heredables en la expresión de los genes que no están acompañados por cambios en la secuencia del DNA [39]. Estas alteraciones involucran modificaciones covalentes de los aminoácidos en las histonas en las cuales el DNA está enrollado, así como cambios en el estado de metilación de citosinas en las islas CpG dentro del mismo DNA, entre otras [40].

Una de las formas por las cuales actúan los mecanismos epigenéticos es mediante el remodelaje de la cromatina (Figura 3).

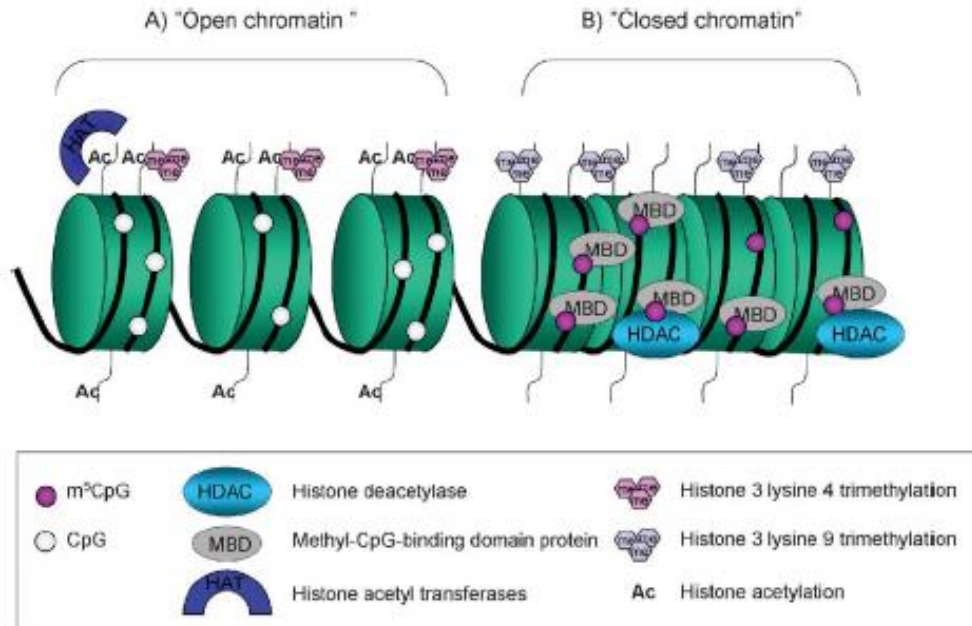


Figura 3. Estructura de la cromatina de los promotores activos e inactivos. A) La cromatina transcripcionalmente activa se caracteriza por tener citosinas no metiladas y colas de histonas acetiladas. B) Cuando las citosinas se metilan, se unen las MBDs (methyl-CpG-binding domain proteins) que atraen a las HDAC que remueven los grupos acetilo de las colas de las histonas, lo cual resulta en la formación de heterocromatina (tomado de [40]).

2.3.1 METILACIÓN DEL DNA

Las moléculas diana para la metilación del DNA en mamíferos son las citosinas en los dinucleótidos CpG. En vertebrados, la 5-metil citosina (5mC, producto de la reacción de metilación), se encuentra de manera predominante en los dinucleótidos CpG. Los sitios del genoma donde normalmente se localizan estos dinucleótidos son regiones transcripcionalmente silenciadas como centrómeros, telómeros y transposones [40, 41]. Las regiones con alta densidad de CpG metiladas también

se han asociado con alta ocupancia de nucleosomas [41]. La generación de la 5mC se explica en la Figura 4.

Durante la replicación del DNA, los patrones de metilación son copiados desde las hebras parentales a las hebras recién sintetizadas, principalmente por la actividad de las DNA metiltransferasas (DNMT)1. Sin embargo, en células madre embrionarias, células cancerosas y durante el desarrollo, puede ocurrir metilación en sitios que previamente no lo estaban, este proceso es llamado “metilación *de novo*” y es mediado por las DNMT3a y las DNMT3b [40, 42]; además existe la DNMT3L, que está involucrada en procesos de embriogénesis, impronta e inactivación del cromosoma X a través de su interacción con la desacetilasa de histonas (HDAC)1 y de ser cofactor de la DNMT3a [43-45].

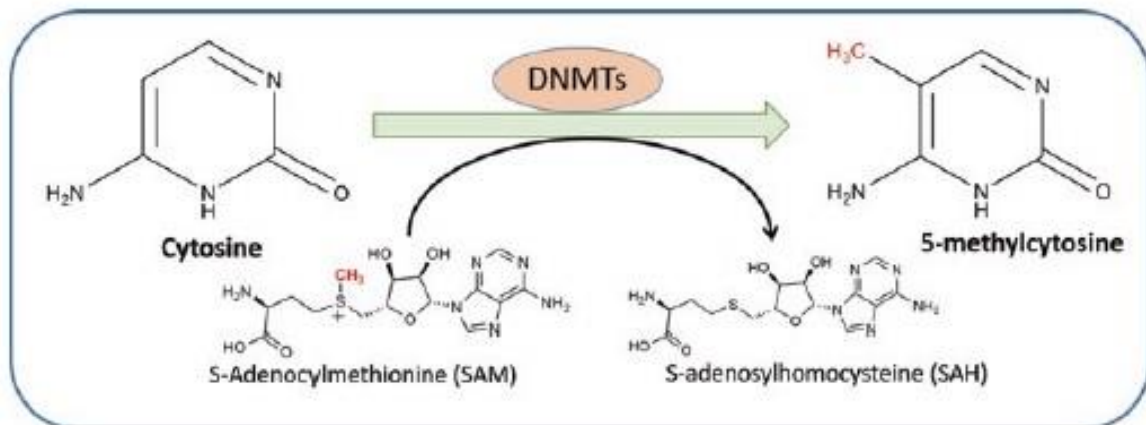


Figura 4. Metilación de citosinas. Los residuos de citosinas en el DNA son convertidos a 5-metilcitosina por las DNA metiltransferasas (DNMT). El grupo metilo es donado por el donador universal de metilos S-adenosilmetionina (SAM), el cual es convertido a S-adenosilhomocisteína (SAH) (tomado de [46]).

La metilación del DNA, la estructura de la cromatina, y el silenciamiento de genes están interconectados en los mamíferos. Esto se conoce desde hace años, donde los primeros estudios revelaron, por ejemplo, que los altos niveles de metilación de los sitios CpG coinciden con regiones heterocromáticas [47]. Las enzimas TET, oxidasas que promueven la “demetilación” de la 5mC a través de un mecanismo de reacción complejo, apoyan la relevancia de la metilación activa en diversos entornos biológicos en ausencia de replicación celular [48].

Se sabe que la mayoría de los sitios CpG se encuentran metilados a lo largo del genoma. Sin embargo, existen regiones con alta densidad de CpG, denominadas “islas CpG”, las cuales coinciden en localización con aproximadamente la mitad de los promotores de los genes, y éstas regiones se encuentran no metiladas en condiciones normales, y por lo tanto son activas transcripcionalmente [41]. Diversos estudios han mostrado que una hipometilación global, así como hipermetilación focalizada en promotores y elementos enhancers de genes supresores tumorales, son características comunes entre varios tipos de cáncer [49].

2.3.2 MODIFICACIONES POSTRADUCCIONALES DE LAS HISTONAS: ACETILACIÓN/DESACETILACIÓN

Un mecanismo importante que regula la función de genomas eucariontes son las modificaciones postraduccionales (MPT) de las proteínas histonas que empaquetan el DNA dentro del núcleo de las células. Este complejo macromolecular es conocido como cromatina [50]. Se ha postulado que las MPT en las histonas actúan por

separado y conjuntamente para formar un lenguaje o “código” que es leído por proteínas especializadas para facilitar las funciones río abajo de la cromatina [51]. Las histonas forman nucleosomas, que están envueltos por DNA. El nucleosoma es la unidad básica de la estructura de la cromatina y comprende un núcleo de histonas octamérico abrazado por 147 pares de bases de DNA organizadas en 1.65 vueltas super-helicoidales. Cada núcleo contiene dos copias de las siguiente cuatro histonas: H2A, H2B, H3 y H4 (Figuras 5A y 5B) [52]. La asociación entre los nucleosomas y el DNA es muy importante para la regulación de la expresión génica. La asociación muy estrecha entre los nucleosomas y el DNA resulta en la condensación de la cromatina, que confiere una estructura no permisiva para la maquinaria de transcripción, que no puede unirse al DNA, suprimiendo la expresión génica [53].

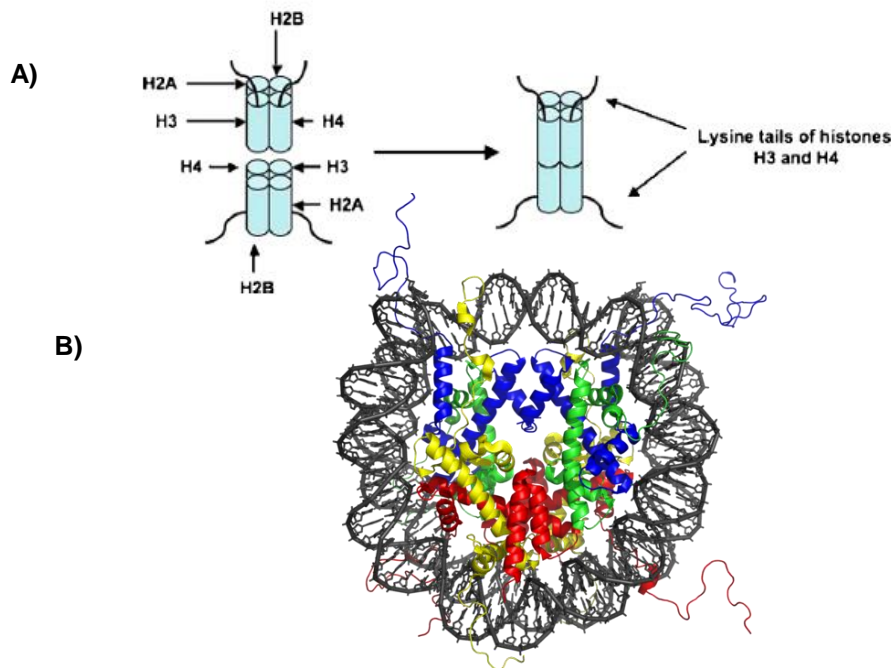


Figura 5. Representación esquemática de la estructura octamérica de las histonas. No se muestra el DNA enrollado a su alrededor (A). Estructura del nucleosoma. Esta consiste las histonas H2A (amarilla), H2B (roja), H3 (azul) y H4 (verde); y DNA (B) (tomado de [52]).

La acetilación de los residuos de lisina presentes en las colas externas de las histonas H3 y H4 tiende a reducir las interacciones entre el DNA y los nucleosomas, permitiendo el acceso a la maquinaria de transcripción [52]. Hay al menos tres posibles mecanismos para interpretar este fenómeno. La acetilación, por sí misma, puede neutralizar las interacciones electrostáticas entre los residuos de lisina en las colas externas de las histonas y los enlaces fosfodiéster [54]. Adicionalmente, estas acetilaciones inducen cambios conformacionales en el nucleosoma, que tiende a plegarse asumiendo una configuración de hélice alfa [55]. El tercer mecanismo posible asume que las colas acetiladas de las histonas funcionan como mediadores para el contacto entre el DNA nucleosomal y factores de transcripción [56].

La acetilación de histonas es llevada a cabo por una familia de enzimas llamada histonas (o lisinas) acetil-transferasas (HAT), de las cuales la principal es p300 [57]. La reacción opuesta, la desacetilación de histonas, la realizan las desacetilasas de histonas (HDAC), y su actividad está relacionada con el silenciamiento de los genes debido a la generación de heterocromatina [58]

Tanto las MPT en las histonas como la metilación del DNA en regiones regulatorias son conocidas por estar alteradas en células cancerosas. Se ha demostrado recientemente que tanto la pérdida de acetilación de histonas específicas, como las marcas de metilación pueden predecir la evolución del paciente con carcinoma humano [59]. La pérdida de acetilación en lisinas se ha identificado como uno de los eventos más tempranos en el silenciamiento de genes [60].

2.4 TERAPIA EPIGENÉTICA DEL CÁNCER

Las anomalías epigenéticas en cáncer pueden afectar a genes involucrados en diferentes y fundamentales vías celulares que incluyen el control del ciclo celular, apoptosis, respuesta inmune, angiogénesis, invasión celular tumoral y metástasis [25]. Sin embargo, estas pueden ser revertidas por inhibidores farmacológicos de las enzimas que son responsables del establecimiento/mantenimiento de las marcas epigenéticas (Figura 6) [61]. Aunque estas marcas son heredables, el hecho de que sean reversibles sugiere implicaciones interesantes para ser usadas como terapia [62].

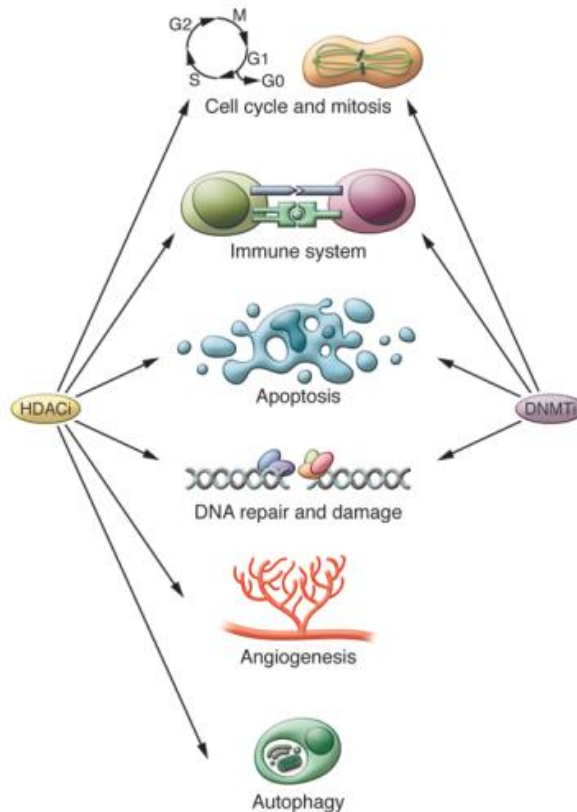


Figura 6. Vías celulares afectadas por los DNMTi y HDACi (tomado de [63]). La metilación de DNA y la acetilación de proteínas cumplen un papel muy importante en la regulación de múltiples vías celulares, las cuales pueden ser afectadas por DNMTi y HDACi.

Los compuestos y fármacos que modifican el epigenoma son una modalidad novedosa y promisorio para el tratamiento contra el cáncer, pero no todos los pacientes alcanzan los mismos beneficios de la terapia epigenética, y las respuestas a menudo no son evidentes hasta después de varios meses. La identificación de buenos biomarcadores predictivos para la terapia epigenética sería de gran valor ya que los pacientes con mínimas posibilidades de respuesta podrían evitar el tratamiento a largo plazo con fármacos ineficaces y de efectos secundarios desagradables, ofreciéndoles estrategias terapéuticas alternativas [63]

Estudios *in vivo* e *in vitro* han mostrado efectos prometedores cuando se combinan fármacos epigenéticos con otros tratamientos contra el cáncer, tales como agentes quimioterapéuticos convencionales como la doxorubicina, etopósido, gemcitabina y docetaxel [61].

Los fármacos epigenéticos que actualmente se están evaluando en ensayos clínicos pueden dividirse en dos clases principales: los reprogramadores amplios y las terapias dirigidas. Dentro de los reprogramadores se encuentran los inhibidores de DNMT (DNMTi) y los inhibidores de HDAC (HDACi) [64].

2.4.1 INHIBIDORES DE DNMT

Hay dos clases de DNMTi: análogos de nucleósidos y no análogos. Los análogos de nucleósido tienen un anillo de citosina modificado que está unido a una ribosa o desoxirribosa. Estos son metabolizados por cinasas que convierten los nucleósidos en nucleótidos para su incorporación al DNA o RNA. Se cree que la metilación del DNA se inhibe cuando estos compuestos se incorporan al DNA, se unen

covalentemente a las DNMT, inhibiendo su actividad e induciendo su degradación [62]. Actualmente, hay también varios no análogos de nucleósido conocidos por inhibir la metilación del DNA, pero sólo pocos de ellos han llegado a ensayos clínicos (Tabla 3). Estos podrían ser más útiles en los ensayos clínicos que los análogos de nucleósido debido a que actúan directamente uniéndose al sitio catalítico de las metiltransferasas, sin incorporarse al DNA [60].

Tabla 3. Inhibidores de la metilación del DNA (Modificado de [60]).

Inhibidor	Ensayo clínico	Análogo de nucleósido
5-azacitidina	Fase I, II y III, enfermedades hematológicas	Sí
5-aza-2'-desoxicitidina	Fase I, II y III, enfermedades hematológicas, cáncer cervical y cáncer de pulmón de células no pequeñas	Sí
5-fluoro-2'-desoxicitidina	Fase I	Sí
5,6-dihidro-5-azacitidina	Fase I y II, cáncer de ovario y linfomas	Sí
Zebularina	Preclínico	Sí
Hidralacina	Fase I, cáncer cervical	No
Procainamida	Preclínico	No
Epigallocatequin galato, EGCG	Preclínico	No
Psammaplina	Preclínico	No
RG108	Preclínico	No

Los dos inhibidores de DNMTs más comúnmente investigados son los análogos de nucleósido 5-azacitidina (5-aza) y 5-aza-2'-desoxicitidina (decitabina) [65]. La 5-aza fue aprobada por la FDA para el tratamiento del síndrome mielodisplásico (MDS), además se han realizado ensayos clínicos utilizando este compuesto contra diferentes tumores sólidos. La 5-aza tiene dos diferentes mecanismos de acción: se

incorpora al DNA y RNA; el tratamiento con 5-aza en células de mamíferos también conduce a tRNAs y rRNAs defectuosos, interfiriendo con la síntesis de proteínas, se le ha asociado con reordenamiento cromosomal y con citotoxicidad [66].

2.4.2 INHIBIDORES DE HDAC

Las 18 HDAC humanas conocidas hasta ahora están agrupadas en dos familias y cuatro clases que difieren entre sí en términos de estructura y actividad biológica. La familia Rpd3/Hda1 (clásica) está compuesta de la clase I (HDAC1, HDAC2, HDAC3 y HDAC8), clase IIa (HDAC4, HDAC5, HDAC7 y HDAC9), clase IIb (HDAC6 y HDAC10) y la clase IV (HDAC11). Las HDAC de clase III (SIRT1-SIRT7) comprenden a las sirtuínas, las cuales son dependientes de NAD⁺ para su función [67]. Los inhibidores de HDAC (HDACi) se dividen en cuatro grupos: ácidos grasos de cadena corta, derivados de hidroxamatos, tetrapéptidos cíclicos y benzamidas [60]. Los efectos de los HDACi parecen promover arresto en el ciclo celular en G1 o G2/M, así como apoptosis y diferenciación celular [62]. Algunos HDACi se muestran en la Tabla 4. En algunos casos, el arresto del crecimiento es inducido a bajas dosis y la apoptosis a altas dosis; en otros casos el arresto del crecimiento precede a la apoptosis. Sin embargo, las células pueden estar sometidas a apoptosis sin sufrir cambios significativos en el perfil del ciclo celular [68]. El estudio de los HDACi se está moviendo rápidamente hacia una nueva etapa de desarrollo con resultados clínicos prometedores, sobre todo en la terapia contra el cáncer. El Vorinostat (SAHA) y la romidepsina (FK228) han sido aprobados por la FDA para el tratamiento del linfoma cutáneo de células T, y SAHA se ha probado también en ensayos clínicos contra cáncer de mama [69]. Hay pruebas de una sinergia

potencial entre la inhibición de HDAC en combinación con muchos quimioterapéuticos y compuestos biológicamente activos anti-cáncer en estudios preclínicos. Esto sugiere que las estrategias enfocadas en la combinación de terapias deben ser un punto importante en la investigación a futuro [70]. Varios estudios, realizados principalmente en enfermedades hematológicas como leucemia mieloide aguda (AML), sugieren que el tratamiento combinado de agentes hipometilantes con HDACi puede ser clínicamente efectivo [71].

Tabla 4. HDAC y algunos de sus inhibidores (tomado y modificado de [40, 63, 72, 73].

Clase (localización)	HDAC	Inhibidores
I (núcleo)	HDAC1	Depsipéptido SK-7041 SK-7068 SB-379872-A
	HDAC2	
	HDAC3	
	HDAC8	
II a (núcleo y citoplasma)	HDAC4	Ácido valproico Butirato SAHA TSA Trapoxina PXD101
	HDAC5	
	HDAC7	
	HDAC9	
II b (principalmente citoplasma)	HDAC6	Tubacina
	HDAC10	
IV (núcleo)	HDAC11	
III (núcleo)	SIRT1-7	Nicotinamida, splitomicina

2.5 LOS FITOESTRÓGENOS COMO REMODELADORES EPIGENÉTICOS EN CÁNCER

Los fitoestrógenos son un grupo de sustancias químicas derivadas de las plantas que son estructural o funcionalmente al estradiol. Estas moléculas han generado interés en el área de la oncología debido a que una serie de datos epidemiológicos sugieren un menor riesgo de desarrollar cáncer de mama en mujeres que habitan en países con alto consumo de fitoestrógenos [13, 14]. Además, la tasa de cáncer de mama entre inmigrantes de países con alto consumo de fitoestrógenos hacia países de bajo consumo ha ido en aumento, sugiriendo que los cambios en el estilo de vida, incluyendo los cambios en la dieta podrían jugar un papel importante en la carcinogénesis de mama [13, 14]. Adicionalmente, en otros estudios epidemiológicos y meta-análisis se ha reportado que la ingesta de isoflavonas y lignanos (dos tipos de fitoestrógenos) o el consumo de soya (una fuente de fitoestrógenos) están asociados a un menor riesgo de desarrollar cáncer de pulmón [74, 75], gástrico [76], próstata y testicular [77-79], tiroides [80], útero [81], endometrio [82] y ovario [83].

En los últimos años se ha hecho hincapié en estudiar cómo los mecanismos epigenéticos están involucrados en el desarrollo y progresión del cáncer, muchos de estos estudios han incluido a los fitoestrógenos para intentar determinar si son o no útiles para su prevención o incluso su tratamiento [14, 69, 84-86]. Los fitoestrógenos tienen múltiples blancos celulares, algunos de ellos se observan en la Figura 7. Sin embargo, nos enfocaremos en la evidencia que existe sobre los fitoestrógenos como modulares de la transcripción a través de mecanismos epigenéticos.

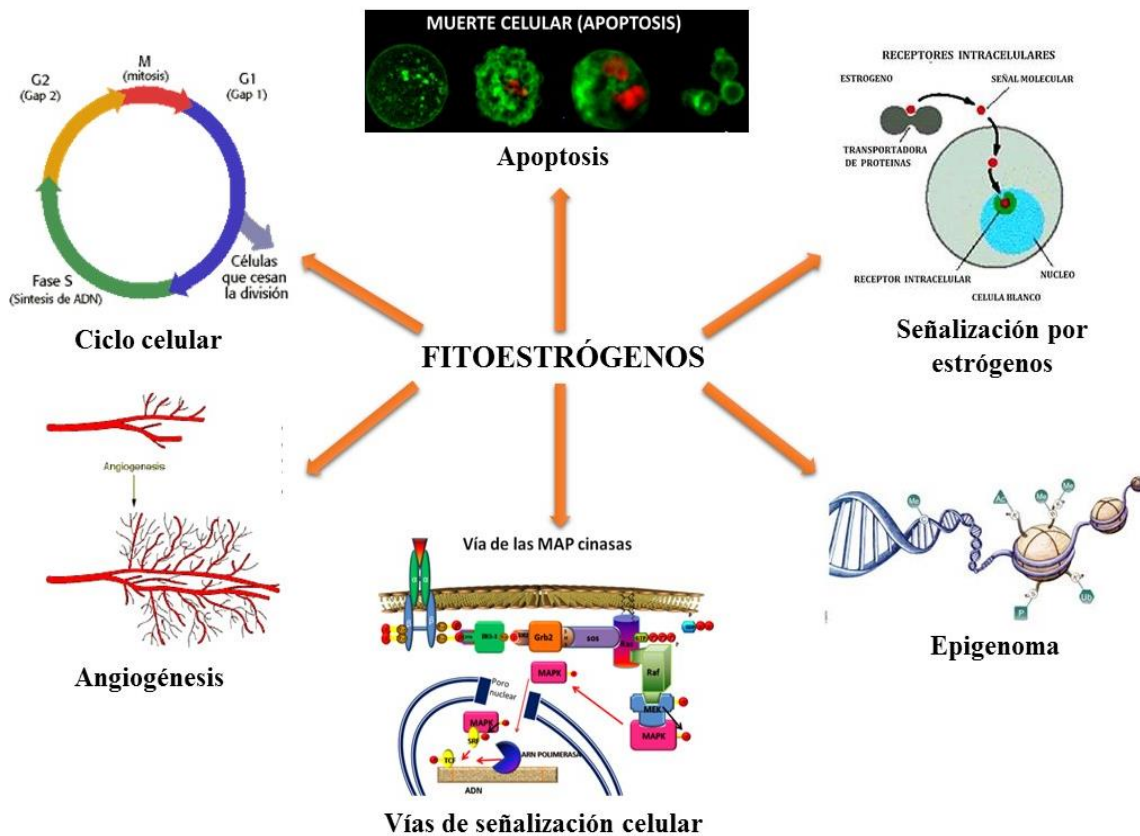


Figura 7. Blancos celulares de los fitoestrógenos. Los efectos de los fitoestrógenos incluyen actividades estrogénicas o anti-estrogénicas, modulación de vías de señalización, regulación del ciclo celular, inhibición enzimática, propiedades antioxidantes, angiogénesis y alteraciones epigenéticas.

Se ha visto que en células de cáncer de mama negativas para el receptor de estrógenos alfa (ER- α), dosis de 20-40 $\mu\text{mol/L}$ de genisteína estimulan la expresión de los supresores tumorales p21 y p16, lo cual fue asociado con una disminución en la actividad de HDAC [87]. Además, se vio que la genisteína y el RSV pueden reactivar la expresión del ER- α en células deficientes de éste a través del enriquecimiento de las marcas de acetilación en su promotor proximal, así como disminución en la expresión y actividad de proteínas involucradas en procesos de

metilación [88-90]. Adicionalmente, en las células de cáncer de mama MCF-7 y MDA-MB-231 se demostró que la genisteína, la curcumina y el RSV disminuyen la expresión de DNMT1, HDAC1 y MeCP2, proteínas que están involucradas con el establecimiento de heterocromatina y por lo tanto represión transcripcional, y además este efecto estuvo asociado con la reactivación en la expresión de p21 [91].

Mediante análisis *in silico* se observó que el RSV tenía potencial de unirse al sitio catalítico de diversas HDAC de clases I y II, y experimentalmente se determinó que disminuye la actividad de todas las HDAC conocidas en un modelo de hepatoblastoma, además de disminuir la proliferación de estas células en una manera dosis-dependiente [92]. Otro blanco del RSV es el gen *Nrf2*, que se encuentra silenciado en cáncer de mama y que codifica para un factor de transcripción que funciona como regulador de la respuesta antioxidante. Se observó que el RSV puede reactivar la expresión de *Nrf2*, así como de sus genes blanco en modelos *in vitro* e *in vivo* a través de la disminución de la metilación en la región proximal de su promotor, además de disminuir la expresión del microRNA miR-93, el cual puede unirse al 3-UTR del mensajero de *Nrf2*, inhibiendo su traducción [93].

Adicionalmente, el RSV puede anular la actividad del complejo MTA1/HDAC, el cual mantiene silenciado al supresor tumoral PTEN en células de cáncer de próstata, reestableciendo su expresión y activando la expresión de Bax y p21, promoviendo apoptosis [94]; por otro lado, la combinación de RSV y pterostilbeno puede reestablecer la expresión del ER- α en células de cáncer de mama deficientes de éste, a través del aumento en actividad de las enzimas HAT y del enriquecimiento de las marcas de eucromatina H3K9ac y H4ac en su promotor [89].

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Previamente, hemos demostrado que el RSV es capaz de inducir selectivamente la expresión del gen *ATP2A3* (pero no de *ATP2A2*) en células de cáncer de mama, y que este incremento es importante para la apoptosis inducida por RSV en este modelo [15]. Sin embargo, se desconocen los eventos moleculares detrás de este efecto, y en general los mecanismos encargados de regular la expresión de los genes *SERCA* en cáncer de mama. El RSV ha mostrado, entre sus diversos mecanismos de acción, la capacidad de ser regulador epigenético de la expresión de varios genes a través de cambios en los niveles de proteínas involucradas en la metilación del DNA, MPT de histonas y/o microRNAs. La expresión de *SERCA3* en cáncer de mama podría funcionar como un marcador de pronóstico debido a que su expresión correlaciona de manera inversamente proporcional con el grado histológico del tumor, es decir, a mayor grado histológico, la expresión de *SERCA3* es menor, y este fenómeno se puede observar desde lesiones benignas, en las cuales la expresión de *SERCA3* ya se encuentra disminuida comparada con el tejido normal [9]. Adicionalmente, se ha visto que, en pacientes con cáncer de colon o carcinoma hepatocelular, aquellos que presentan tumores con alta expresión del gen *ATP2A3* tienen una mayor supervivencia a 10 años [95, 96].

4. HIPÓTESIS

El RSV modula la expresión del gen *ATP2A3* en líneas celulares de cáncer mama a través de modificaciones epigenéticas que incluyen el aumento en la acetilación en la histona H3, así como disminución de la metilación de su promotor proximal.

5. OBJETIVO GENERAL

Caracterizar los cambios epigenéticos que median la alteración en la expresión del gene *ATP2A3* mediados por RSV en las líneas celulares de cáncer de mama MCF-7 y MDA-MB-231.

6. OBJETIVOS PARTICULARES

- ❖ Caracterizar el efecto del RSV, DNMTi y HDACi en: viabilidad celular, apoptosis y flujo intracelular de Ca^{2+} .
- ❖ Comparar el efecto del RSV, TSA y 5-aza en la expresión del mRNA los genes *ATP2A2* y *ATP2A3*.
- ❖ Evaluar la actividad de HDAC, HAT y DNMT en extractos nucleares de células de cáncer de mama tratadas con RSV.
- ❖ Medir los niveles de las proteínas de HDAC2, H3ac, MeCP2 y MBD2 en extractos nucleares de células de cáncer de mama tratadas con RSV.
- ❖ Evaluar el efecto del RSV en el establecimiento de las marcas de eucromatina H3K9ac y H3K27ac; así como la ocupancia de HDAC2 en el promotor proximal de *ATP2A3*.
- ❖ Analizar el estado de metilación del promotor proximal del gen *ATP2A3* en líneas celulares de cáncer de mama cuando son tratadas con RSV.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivos celulares

Las líneas celulares correspondientes a adenocarcinoma mamario MCF-7 (luminal A) y MDA-MB-231 (triple negativo) fueron adquiridas de ATCC y su identidad se verificó por el Laboratorio de Diagnóstico Genómico del Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN). Fueron crecidas en medio DMEM suplementado con 10% de SFB, kanamicina y antibiótico antimicótico para evitar contaminación, 5% de CO₂ y 37°C conforme a las indicaciones del proveedor.

Tratamientos farmacológicos

La concentración de RSV utilizada en todos los experimentos fue de 50 µM y el tiempo de tratamiento fue de 72 h, esta decisión fue tomada con base en experimentos previos que no se detallan en este trabajo. El RSV fue disuelto en etanol absoluto y las células consideradas como control fueron tratadas solamente con el vehículo. Para el caso de los tratamientos con TSA, las concentraciones utilizadas para la caracterización de los efectos de ésta en viabilidad celular y apoptosis fueron de 50, 100 y 150 nM; con 5-aza se utilizaron concentraciones de 1, 3 y 5 µM. TSA fue disuelta en DMSO y 5-aza en PBS. En todos los casos, se realizó cambio de medio de cultivo con fármaco cada 24 h. El compuesto C646 se disolvió en DMSO a su máxima concentración de 25 mM y posteriormente se preparó una solución stock de trabajo 10 mM.

Ensayos de viabilidad celular

Un total de 10^4 células de cada línea celular fueron sembradas en placas de 96 pozos, cuando alcanzaron 60% de confluencia fueron aplicados los tratamientos con las distintas concentraciones y tiempos de RSV, TSA o 5-aza. Al terminar el tiempo de incubación, se agregó el reactivo Prestoblue Cell Viability Reagent en una relación 1:10 en medio de cultivo y se incubó a 37°C por 15 min. La medición de fluorescencia se realizó en un Multilabel counter Victor 2 I420. La longitud de onda de excitación para el Prestoblue Cell Viability Reagent es de 560 nm y la de emisión de 590 nm.

Ensayos de actividad de caspasas

Las células control y tratadas por 72 h con RSV, TSA o 5-aza se cosecharon mecánicamente y fueron sometidas a centrifugación durante 5 min a 10,000 rpm. Las células fueron después resuspendidas en búfer de lisis y se incubaron por 20 min en hielo y los lisados fueron centrifugados a 12,000 rpm por 15 minutos. Los sobrenadantes fueron transferidos a tubos nuevos. La proteína total se cuantificó por espectrofotometría. La reacción consistió en incubar durante 2 h 50 µg de proteína total con búfer de ensayo y 10 µL del sustrato hidrolizable por la caspasa 3 [97]. Este sustrato contiene el péptido acetil-Asp-Glu-Val-Asp p-nitronilida (pNA), el cual tiene una alta absorbancia a 405 nm.

Purificación de RNA total y PCR en tiempo real

La extracción de RNA total se realizó por el método orgánico [98]. La calidad de éste se evaluó mediante electroforesis en gel desnaturizante de agarosa con formaldehído y se cuantificó por espectrofotometría con la relación de absorbancia 280/260 nm mayor o igual a 1.8 como RNA de buena calidad. 1 µg de RNA total fue tomado para la síntesis de cDNA mediante la reacción de transcripción reversa con la enzima M-MLV en un volumen final de 20 µl. Posteriormente, para evaluar el efecto de los tratamientos sobre los cultivos celulares se realizó la amplificación de los genes de interés mediante RT-PCR, a través de cuantificación relativa normalizando cada muestra contra dos genes de expresión ubicua (β -actina y GAPDH). Las secuencias de cada par de primers se muestran en la Tabla 5. Del gen *ATP2A2* se amplificó solamente la isoforma SERCA2b por ser de expresión ubicua en todos los tipos celulares. Para amplificar SERCA3 se flanqueó una porción del mRNA que es común en todas las isoformas (a-f).

Tabla 5. Secuencias de los primers utilizados para RT-PCR

Nombre del primer	Secuencia 5'-3'	Tamaño de producto de PCR(bp)
hSERCA2b (qPCR)	F: CGAACCCCTTGCCACTCATCTTC R: TGCCGAGAACGAGCAGGATTTG	189
h-panSERCA3 (qPCR)	F: CAGGGGACATTGTAGAAGTGGC R: TGGTCACGGACACAGATTCAC	126
hSERCA3 promotor (ChIP)	F: CAGATCCCACCCCTAGCAG R: TGCAGAGGGGAAACTGAGAC	116
h β -actin (qPCR)	F: TGAAGGTGACAGCAGTCGGTTG R: GGCTTTTAGGATGGCAAGGGAC	146
hATP2A3 BSP (Secuenciación con BSP)	F: GGTTTAGGAGAGTTTAGAGGAG R: CCAAATACCCCAAAAA CATCC	709

(F= Forward; R= Reverse).

Análisis de los resultados de PCR en tiempo real.

Los datos de amplificación fueron obtenidos por triplicado de cada una de las muestras, se convirtieron en logaritmo y se analizaron los valores de Ct (ciclo umbral o threshold) mediante el método de $\Delta\Delta Ct$ (Pfaffl M.W., 2001), con datos de Ct con $SD \leq 0.5$ entre los triplicados de cada muestra procedente de tres experimentos independientes, utilizando la siguiente ecuación [99]:

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

Los valores normalizados contra la expresión de β -actina son los que se presentan en la sección de resultados.

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

Las líneas celulares control y tratadas con RSV, TSA o 5-aza por 72 h fueron cargadas en placas p-100 con el fluoróforo FURA-2, AM a una concentración final de (5 μM) y 0.001% de ácido plurónico en medio Krebs-Ringer-Hepes-Glucosa (NaCl 120 mM, KH_2PO_4 1.2 mM, $MgSO_4$ 1.2 mM, KCl 4.75 mM, glucosa 10 mM, Hepes 20 mM, $CaCl_2$ 1.27 mM, albúmina sérica bovina 0.05%, pH 7.4), durante 45 minutos a 37°C en una atmósfera de 5% de CO_2 . Después de la incubación, las células fueron lavadas dos veces con PBS. A continuación, las células fueron despegadas con tripsina/EDTA al 0.025%, fueron resuspendidas nuevamente en Krebs y centrifugadas a 3,000 rpm por 3 minutos, el sobrenadante se descartó y se lavó dos veces más. El pellet de células fue homogenizado en 2 ml de Krebs para proceder

a la lectura en agitación constante mediante un espectrofluorómetro, el cual registra los cambios de fluorescencia con excitación a 340 nm y emisión de 510 del fluoróforo. La cuantificación se hizo de acuerdo con la siguiente ecuación:

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

Donde K_d es la constante de disociación del fluoróforo, Sf_2 es la intensidad máxima de la fluorescencia para cero Ca^{2+} obtenida a la longitud de onda utilizada para monitorear el Ca^{2+} libre, Sb_2 es la intensidad mínima de fluorescencia a condiciones saturantes de Ca^{2+} (obtenida a la misma longitud de onda que Sf_2), R_{min} y R_{max} son los valores de fluorescencia obtenidos en condiciones de Ca^{2+} cero y saturantes, respectivamente [100].

Ensayos de actividad de HDAC y HAT

Se realizó la purificación de extractos nucleares, de los cuales 50 μ g fueron incubados durante una hora con un sustrato específico para ser reconocido y cortado por todas las HDAC y HAT. La cuantificación se realizó midiendo los cambios en la absorbancia de las células tratadas con RSV o TSA comparados con los valores de las células tratadas solamente con el vehículo. El sustrato está acoplado a un compuesto que tiene alta absorbancia a 405 nm o 440 nm cuando se encuentra libre (debido al corte producido por las HDAC o HAT, respectivamente).

Ensayos de actividad de DNMT

Se realizó la purificación de extractos nucleares, de los cuales 20 µg se incubaron en una placa de 96 pozos con una superficie recubierta con un sustrato rico en citosinas y en presencia de S-adenosil metionina, durante 1.5 h a 37°C. Posteriormente, los pozos se lavaron y se incubó en agitación con un anticuerpo de captura contra 5mC a temperatura ambiente por 1 hora. Se lavó de nuevo, se agregó un anticuerpo de detección contra 5mC y se incubó a temperatura ambiente por 30 min. Al finalizar la incubación, los pozos se lavaron 3 veces, se agregó una solución reveladora y se cuantificaron los cambios en absorbancia a 450 nm.

Western Blot

Se separaron por SDS-PAGE 50 µg de extractos nucleares o 100 µg de proteína total) provenientes de células control y tratadas con RSV o TSA en un gel al 12%. Las proteínas separadas fueron transferidas a una membrana de PVDF durante 4 horas a 350 mA en una cámara de transferencia húmeda. Las membranas fueron bloqueadas por 2 horas con leche al 5% en TBS y posteriormente lavadas con TBS + 0.15% de Tween previo a la hibridación con los anticuerpos. Las diluciones de anticuerpos primarios utilizadas fueron de 1:5,000 para TFIIB, 1:10,000 para HDAC2, 1:500 para H3Ac, 1:5000 para SERCA2, 1:500 para SERCA3, 1:1000 para MeCP2 y 1:500 para MBD2, todos ellos disueltos en TBS-T + BSA e incubados por toda la noche a 4°C en agitación. Se lavaron las membranas con TBS-T y se procedió a incubar por una hora con su respectivo anticuerpo secundario. Para revelar se utilizó un reactivo quimioluminiscente (Pierce) y un escáner LICOR. Las imágenes se obtuvieron utilizando el software Imagen Studio Lite Ver 5.2

Inmunofluorescencia y microscopía confocal

Las células MCF-7 y MDA-MB-231 se sembraron en portaobjetos de cultivo de 8 cámaras a una densidad de 5×10^4 células/ml. Se trataron durante 72 horas con 50 nM de TSA o 50 μ M de RSV. Al término del tratamiento, las células fueron fijadas con paraformaldehído al 1% en PBS por 10 min a temperatura ambiente. Las células fijadas se lavaron con PBS y se permeabilizaron con Tritón X-100 al 1% por 5 minutos, seguido por el bloqueo de sitios de interacción inespecíficos con 3% de BSA/PBS. Después de lavar, se incubó con un anticuerpo contra HDAC2 diluido en PBS con BSA 1% durante toda la noche a 4°C. Al término de la incubación, las células se lavaron con PBS y se incubó con Alexa Fluor 488 conjugado con anti rabbit por 2 horas a temperatura ambiente. Después, las cámaras fueron incubadas con DAPI por 5 min a temperatura ambiente, se lavó y se procedió a la examinación en un microscopio confocal Nikon AIR – STORM. Las imágenes fueron analizadas con el software ImageJ.

Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP)

Las células control y tratadas con RSV o TSA sembradas en placas de 100 mm fueron fijadas con búfer de crosslinking (formaldehído al 11%, NaCl 100 mM, EGTA 0.5 mM y HEPES 50 mM pH 8.0) por 10 minutos en agitación. La reacción de crosslinking se detuvo adicionando glicina a una concentración final de 125 mM y en agitación por 5 min. Las células fueron lavadas 2 veces con PBS + 1 mM PMSF frío, cosechadas mecánicamente y se centrifugaron a 4,000 rpm durante 3 min a

4°C. La cromatina se obtuvo utilizando búfer de lisis (SDS 1%, EDTA 10 Mm pH 8.0, Tris-HCl 50 mM Ph 8.0) con inhibidores de proteasas. La cromatina fue fragmentada utilizando un sonicador Bioruptor con 8 ciclos de sonicación con 15 segundos encendido y 30 segundos apagado entre cada pulso. El tamaño de los fragmentos sonicados se evaluó por electroforesis en gel de agarosa al 1.5% después de haber sometido la cromatina a digestión con RNAsa A por 1 hora a 37°C y toda la noche con proteinasa K a 55°C.

Posteriormente, cantidades iguales de cromatina de cada condición experimental fueron utilizadas para inmunoprecipitar con 2 µg de anticuerpo contra H3K9ac, H3K27ac o HDAC2 durante toda la noche en agitación a 4°C. Los inmunoprecipitados e inputs fueron purificados de acuerdo con las indicaciones del proveedor (One Day ChIP kit) con pequeñas modificaciones. El enriquecimiento relativo se determinó mediante PCR punto final y PCR en tiempo real utilizando un par de primers que flanquean la región del promotor proximal del gen *ATP2A3* de humano que va desde -258 hasta -142.

Análisis de los resultados de PCR en tiempo real para ChIP

La ocupancia relativa de las marcas de histonas inmunoprecipitadas en el locus de interés se calculó utilizando la siguiente ecuación:

$$2^{(CtCtINeg - CtTarget)}$$

Donde CtCtINeg y CtTarget son los ciclos umbrales promedio de PCR realizada por triplicados en muestras de DNA purificado del control negativo (anticuerpo anti-IgG) y de las marcas de interés (H3K9ac y H3K27ac), respectivamente.

Secuenciación de DNA modificado con bisulfito de sodio

Las células MCF-7 y MDA-MB-231 se cultivaron bajo condiciones normales y se extrajo el DNA genómico de 100,000 células para tratarlo con bisulfito de sodio con el kit EZ DNA Methylation-Direct kit. Se utilizó 1 µl de DNA genómico convertido para realizar una PCR utilizando primers específicos para amplificar la región del promotor desde -300 hasta +180. Los primers se diseñaron utilizando el programa Methyl primer express software. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo utilizando la enzima Kappa DNA polymerase con una incubación inicial de 5 min a 94°C; seguida de 45 ciclos de 40 segundos a 94°C, 30 segundos a 63°C y 60 segundos a 60°C; con una extensión final de 5 min a 72°C. El producto de PCR fue purificado a partir de un gel de agarosa y clonado utilizando el plásmido CloneJET PCR cloning. Se transformaron bacterias *Escherichia coli* DH5α con el producto de ligación, y las clonas positivas fueron seleccionadas por PCR utilizando primers específicos para la secuencia del vector utilizado para la clonación. Los plásmidos purificados de las clonas positivas se mandaron a secuenciar a la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular, UNAM. Los datos de secuenciación fueron analizados con el software Chromas y el análisis de metilación de los sitios CpG del promotor se realizó con el software BISMA.

Análisis estadístico

Los resultados de todos los experimentos son expresados como la media de 3 experimentos independientes (n=3) ± desviación estándar (SD). Los valores fueron comparados con análisis de varianza (ANOVA) con el software GraphPad Prism 6,

aplicando la prueba de Dunnet que compara varios grupos contra el control. En las gráficas, el asterisco (*) denota valores estadísticamente significativos con $p \leq 0.05$ comparados con el control correspondiente de cada experimento.

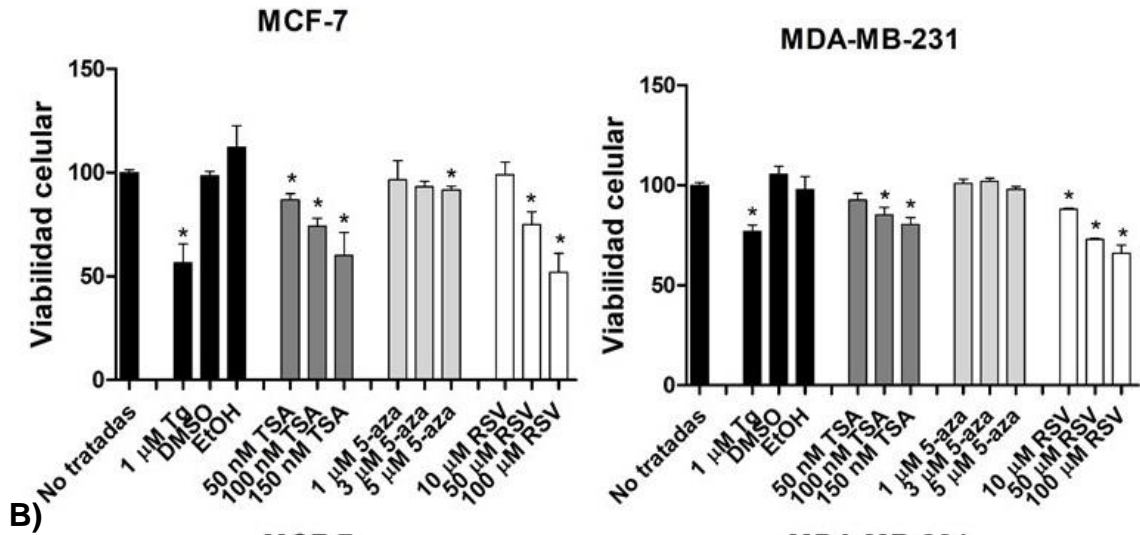
8. RESULTADOS

8.1 Comparación de los efectos de TSA, 5-aza y RSV en viabilidad celular y apoptosis en células de cáncer de mama

Debido a que parte de este trabajo se centra en proponer al RSV como un inhibidor de HDAC y/o de DNMT, procedimos a comparar el efecto de éste con un HDACi (TSA) y un DNMTi (5-aza) en viabilidad celular y apoptosis. Los resultados muestran que la 5-aza no provocó cambios significativos en ninguno de los procesos medidos. Sin embargo, tanto el RSV como la TSA disminuyeron la viabilidad celular en forma dosis-dependiente comparada con la viabilidad de las células no tratadas (Figura 8A). Para indagar sobre la razón por la cual la viabilidad celular es menor en las células tratadas con TSA y RSV, procedimos a realizar un ensayo de apoptosis y encontramos que ambos fármacos inducen activación de caspasas, también en una manera dosis dependiente (Figura 8B). Estos resultados sugieren que la inhibición de HDAC para la disminución de la viabilidad celular mediada por inducción de apoptosis, mientras que la inhibición de DNMT juega un papel menor.

La Tapsigargina (Tg) es un inhibidor irreversible de las bombas SERCA que induce apoptosis a concentraciones altas, en este experimento se utilizó 1 μg de Tg como control positivo para la disminución de viabilidad celular y activación de caspasas. El dimetilsulfóxido (DMSO) y el etanol absoluto (EtOH) son los vehículos que se utilizaron para disolver la 5-aza y el RSV, respectivamente. En este experimento se utilizaron como control para demostrar que los vehículos no afectaban, por sí mismos, la viabilidad de las células no tratadas.

A)



B)

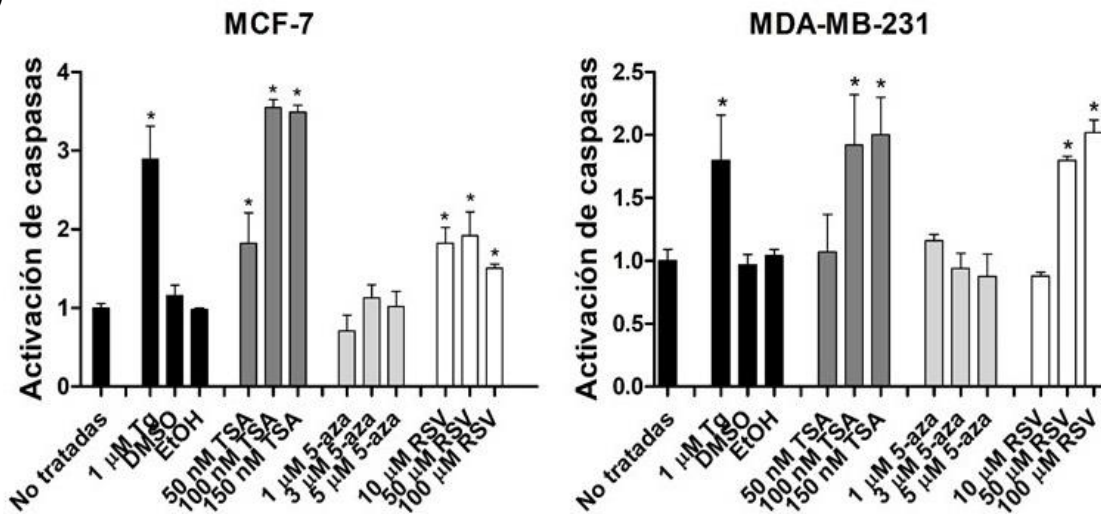


Figura 8. Comparación de los efectos de TSA, 5-aza y RSV viabilidad celular y apoptosis en células MCF-7 y MDA-MB-231. Las células MCF-7 y MDA-MB-231 fueron tratadas con concentraciones crecientes de TSA (0-150 nM), 5-aza (1-5 μ M) y RSV (0-100 μ M) durante 72 h. La viabilidad celular (A) fue determinada mediante ensayos colorimétricos que monitoreaban la reducción de una solución a base de resazurina; la actividad de caspasas (B) fue determinada mediante ensayos colorimétricos utilizando el sustrato Ac-DEVD-pNA, que es escindido por varias caspasas. Los valores representan el % de viabilidad celular y el índice de activación de caspasas, ambos normalizados contra el control de células no tratadas. N=3, *p <0.05.

8.2 Cambios en la expresión de los genes *ATP2A2* y *ATP2A3* por TSA, 5-aza o RSV y su efecto en la homeostasis de calcio en células de cáncer de mama

Ya que la expresión de los genes SERCA puede ser modulada epigenéticamente por HDACi y DNMTi en varios tipos de cáncer, se evaluaron los efectos de los fármacos TSA, 5-aza y RSV en la expresión del mRNA de los genes *ATP2A2* y *ATP2A3* mediante PCR en tiempo real. Se puede observar en la Figura 9A que la expresión de *ATP2A2* no cambia de manera significativa en ninguna de las dos líneas celulares utilizadas con ninguno de los 3 fármacos. Por otro lado, la expresión de *ATP2A3* aumenta en las dos líneas celulares con TSA y RSV. Sin embargo, la inducción por RSV es mayor comparada con la inducción por TSA. Con 5-aza no se observaron cambios (Figura 9A).

También evaluamos el efecto de estos fármacos en el Ca^{2+} intracelular, obteniendo resultados heterogéneos. Ni TSA, ni 5-aza mostraron efecto ni en la concentración citosólica de Ca^{2+} , ni en la liberación de Ca^{2+} inducida por Tg. Con TSA solamente aumentó la capacidad de liberación de Ca^{2+} del RE en la línea MDA-MB-231, sin variaciones significativas en las demás condiciones (Figura 9B).

El Ca^{2+} citosólico $[\text{Ca}_{2+}]_i$ en las células MCF-7 tratadas con RSV fue menor (111.8 nM \pm 5.75) que en las células no tratadas (157.5 \pm 26.5); en contraste, en células MDA-MB-231 el RSV aumentó el $[\text{Ca}_{2+}]_i$ (117.6 \pm 4.2) comparado con las células no tratadas (49.8 \pm 5.2). En cuanto a la liberación de Ca^{2+} inducida por Tg, los resultados también fueron opuestos, en células MCF-7 tratadas con RSV la liberación fue menor (86.2 \pm 9.5) comparado con células no tratadas (144.1 \pm 18.2); mientras que en

células MDA-MB-231 tratadas con RSV la liberación fue mayor (544.1 ± 21.7) comparada con las células no tratadas (442.8 ± 14.5).

Mientras que en la línea MCF-7 el RSV disminuyó el Ca^{2+} basal y aumentó la liberación de Ca^{2+} del RE con respecto al control no tratado, en la línea MDA-MB-231 sucedió lo contrario. Con TSA solamente aumentó la capacidad de liberación de Ca^{2+} del RE en la línea MDA-MB-231, sin variaciones significativas en las demás condiciones (Figura 9B).

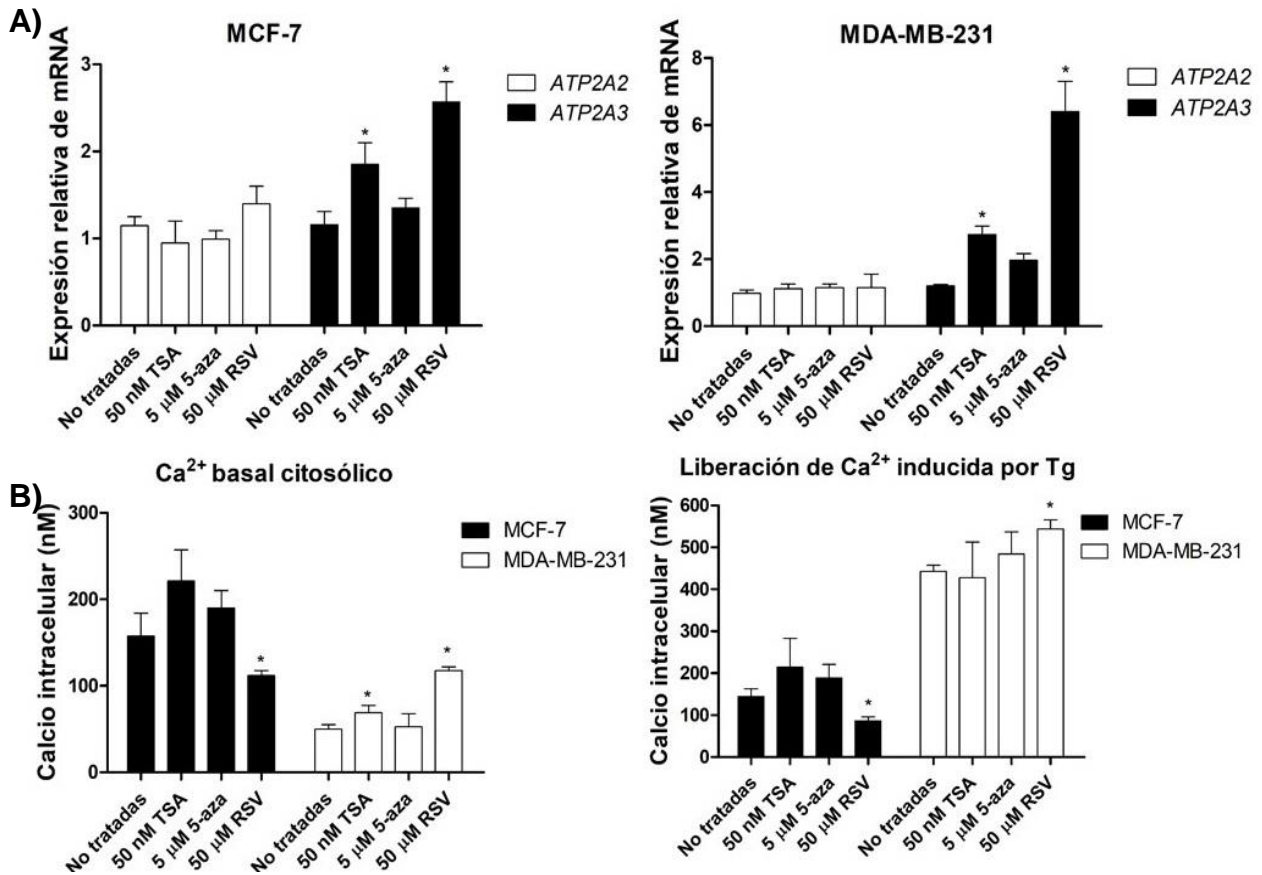


Figura 9. Cambios inducidos por TSA, 5-aza o RSV en la expresión de mRNA de SERCA2 y SERCA3 y en la homeostasis de Ca^{2+} células MCF-7 y MDA-MB-231. Las células fueron tratadas con 50 nM TSA, 5 μM 5-aza o 50 μM RSV de RSV durante 72 h. Posteriormente se procedió a cuantificar el mRNA de los genes *ATP2A2* y *ATP2A3* por qPCR (A); la homeostasis de Ca^{2+} (B) se realizó mediante la utilización de FURA2-AM. N=3, *p < 0.05.

8.3 Efecto de la TSA y RSV en de la actividad de HDAC en células de cáncer de mama

En la figura 10A se muestra la actividad de HDAC en extractos nucleares derivados de células MCF-7 y MDA-MB-231 tratadas con RSV y TSA durante 72 h, observándose que ambos tratamientos farmacológicos disminuyen la actividad de HDAC (Figura 10A). En la literatura existen algunas referencias que proponen al RSV como inhibidor de la actividad de HDAC a través de su unión al sitio activo. Para probar esto, utilizamos extractos nucleares derivados de células sin tratar y se les agregó directamente RSV en dosis crecientes o 50 nM de TSA, se incubó durante 1 hora a 37°C y se determinó la actividad mediante absorbancia. En la Figura 10B se observa que el RSV inhibió la actividad de HDAC en una forma dosis-dependiente.

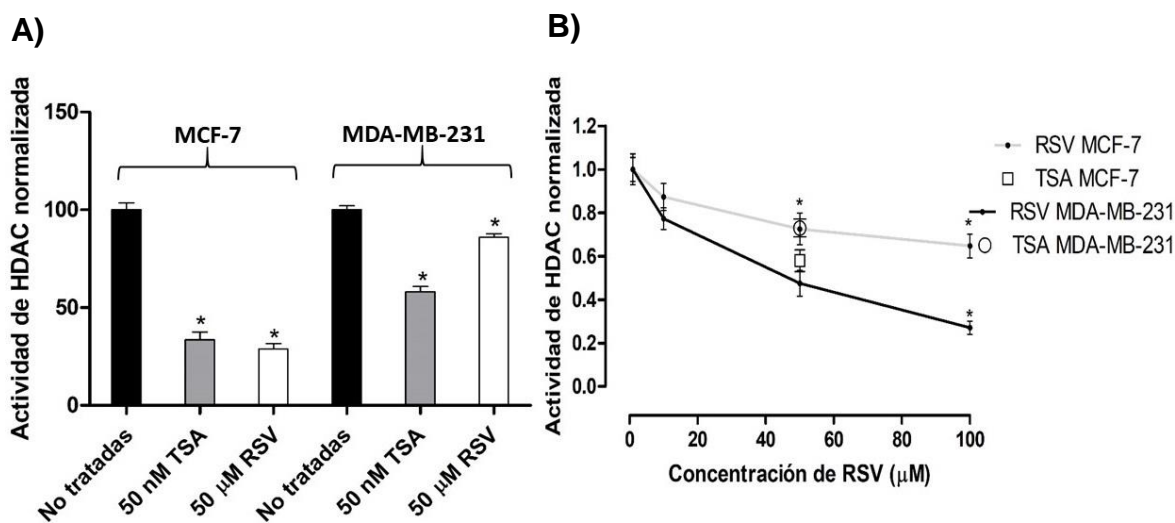


Figura 10. Actividad de HDAC en células tratadas con TSA o RSV. A) Inhibición de la actividad de HDAC en extractos nucleares de células MCF-7 y MDA-MB-231 tratadas con TSA o RSV. B) Inhibición de la actividad de HDAC por adición de RSV o TSA a extractos nucleares de células MCF-7 y MDA-MB-231. La medición se realizó monitoreando los cambios en la absorbancia de una cadena rica en residuos de lisina. N=3, *p <0.05.

8.4 Expresión de HDAC2 y patrón de acetilación global de la histona H3 inducidos por TSA o RSV en células de cáncer de mama

Otra de las posibilidades para explicar la actividad reducida de HDAC por RSV en líneas celulares de cáncer de mama es la disminución en los niveles de HDAC, por lo que se procedió a realizar Western Blots para visualizar si había o no cambios en los niveles de HDAC2 en los extractos nucleares de células MCF-7 y MDA-MB-231 tratadas con RSV. Se utilizaron extractos nucleares debido a que HDAC2 es una HDAC que se encuentra predominantemente en el núcleo. Los niveles del factor de transcripción TFIIB fueron utilizados como control de carga para normalizar los cambios en la expresión de HDAC2 y los niveles de H3ac. En la Figura 11 se puede observar que el tratamiento con TSA no provoca disminución en los niveles de HDAC2 en ninguna de las dos líneas celulares.

Sin embargo, cuando se aplica 50 μ M de RSV encontramos menor cantidad de HDAC2 en ambas líneas celulares, como puede observarse tanto por la intensidad de la banda y el análisis densitométrico. Por otro lado, también mediante Western Blot observamos cómo el estado de acetilación global en la histona H3 se encuentra incrementado en respuesta a RSV y TSA con respecto a las células control, sugiriendo que el mecanismo por el cual actúan estos dos fármacos es por el remodelaje de la estructura de la cromatina y comprobando que los cambios en los niveles de HDAC2 tienen consecuencias funcionales a nivel de la cromatina.

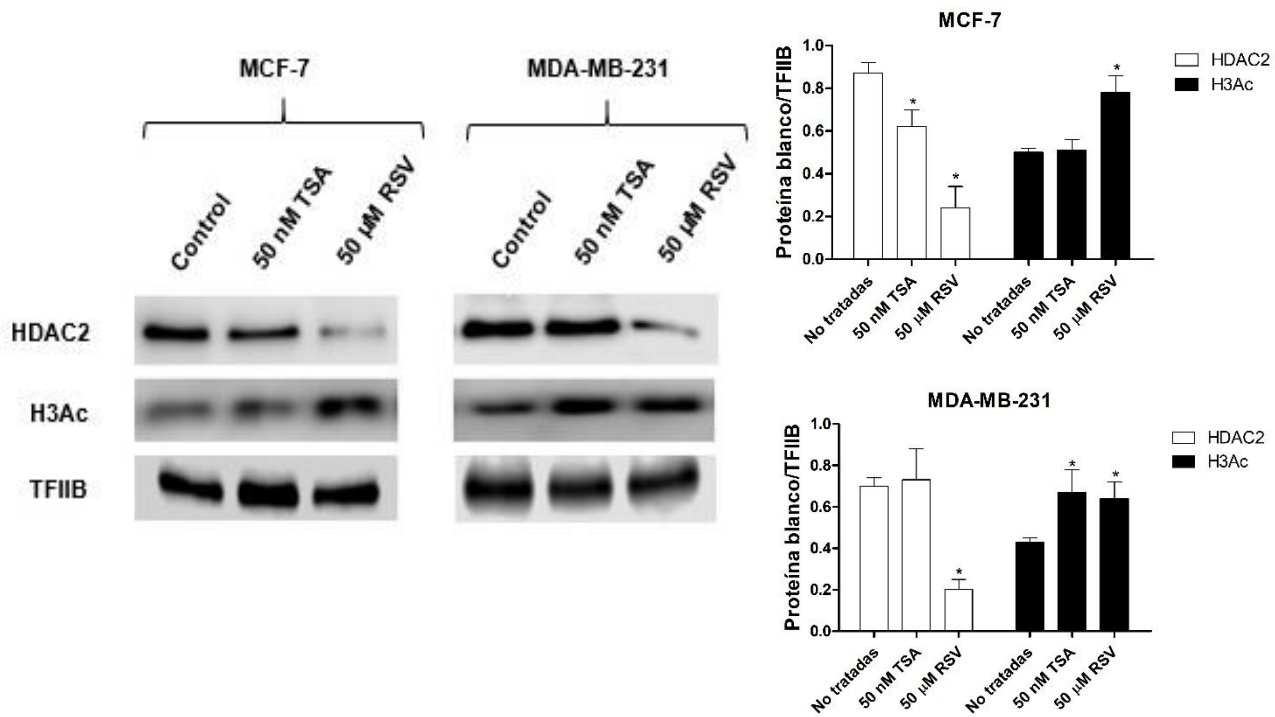


Figura 11. Cambios en los niveles de HDAC2 y en el patrón de acetilación global de H3 en respuesta a TSA y RSV en células MCF-7 y MDA-MB-231. Los extractos nucleares derivados de células no tratadas, y tratadas con TSA o RSV fueron utilizados para evaluar los niveles de HDAC2 y H3ac por WB. Se muestra un WB representativo y el análisis densitométrico de 3 experimentos independientes. TFIIB fue utilizado como control de carga para normalizar los resultados. N=3, *p < 0.05.

8.5 Localización de HDAC2 en células de cáncer de mama tratadas con TSA o RSV

Debido al resultado obtenido en la sección anterior que muestra menor cantidad de proteína HDAC2 en núcleo, decidimos realizar experimentos de inmunofluorescencias y microscopía confocal para determinar la localización celular de HDAC2, dada que otra posibilidad para explicar la actividad de HDAC disminuida era el cambio de localización de estas enzimas. En la Figura 12A se observa que el tratamiento con TSA o RSV provoca acumulación de HDAC2 en el citosol con respecto al control en células MCF-7, mientras que en células MDA-MB-231 (Figura 12B) se observa una localización completamente nuclear tanto en las células control como en las células tratadas con TSA o RSV.

Para corroborar estos resultados, se realizaron WB para medir los niveles de HDAC2 en extracto total de células no tratadas y tratadas con TSA o RSV y observamos que no hay variaciones en los niveles de HDAC2 en las células tratadas con respecto al control en ninguna de las dos líneas celulares (Figura 12C), confirmando que la disminución de HDAC2 ocurre exclusivamente en el compartimento nuclear.

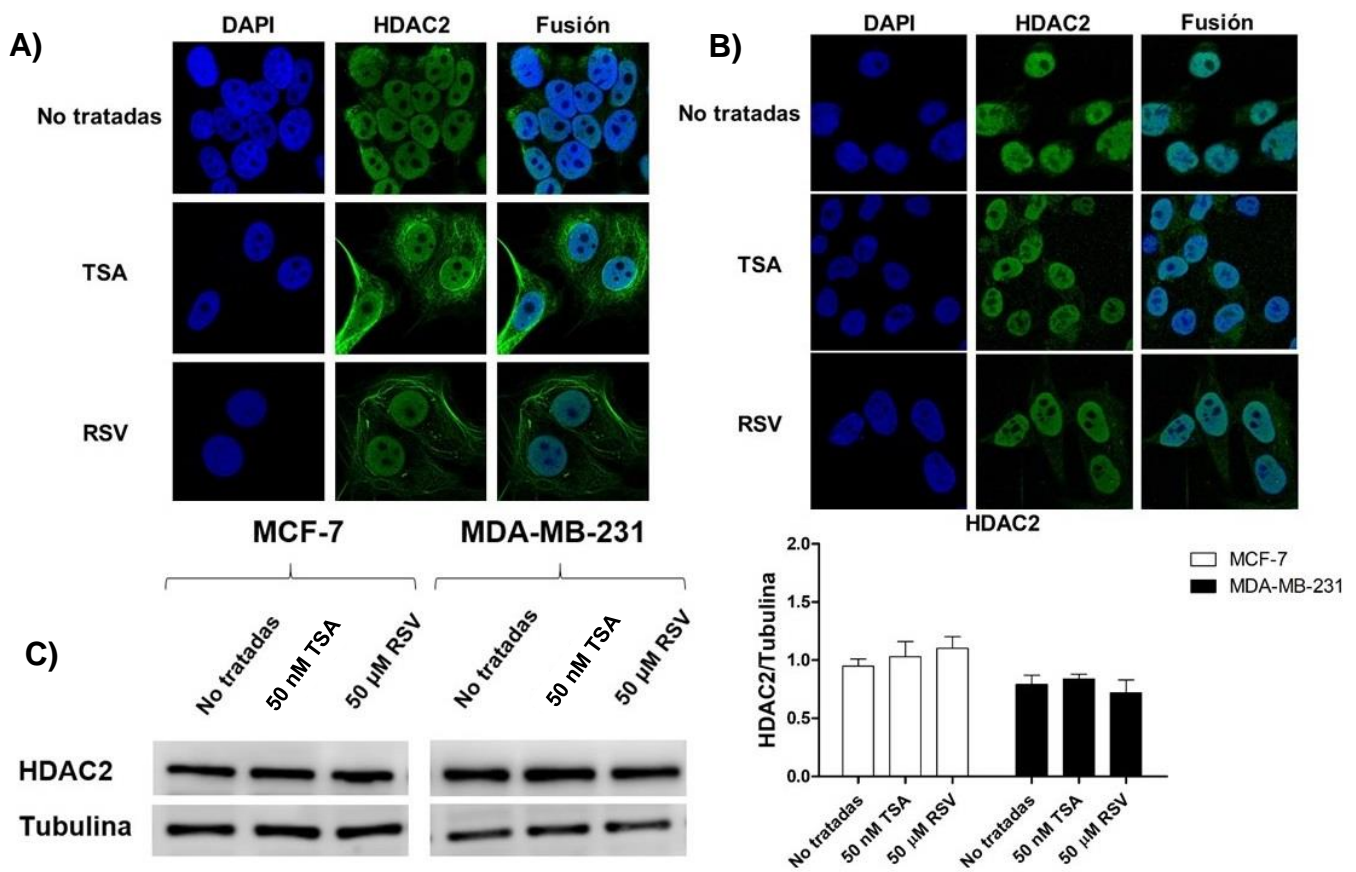


Figura 12. Localización celular de HDAC2 en células MCF-7 y MDA-MB-231 tratadas con TSA o RSV. Las células MCF-7 (A) y MDA-MB-231 (B) fueron tratadas con TSA o RSV durante 72 h, para después examinar la localización de HDAC2 mediante inmunofluorescencia y microscopía confocal. Los niveles totales de HDAC2 (C) fueron cuantificados mediante WB, los niveles de α -tubulina fueron utilizados como control de carga para normalizar los resultados. Se muestra un WB representativo y el análisis densitométrico de 3 experimentos independientes. N=3, *p <0.05.

8.6 Evaluación de la actividad de HAT en respuesta al tratamiento con TSA o RSV en células de cáncer de mama

Las enzimas que llevan a cabo la actividad opuesta a las HDAC son las HAT, ambas participan activamente en el remodelaje de la estructura de la cromatina con consecuencias importantes en la transcripción, por lo que se procedió a cuantificar su actividad en células tratadas con TSA y RSV.

En la Figura 13 se muestra la actividad de HAT en extractos nucleares de células de cáncer de mama tratadas por 72 h con TSA o RSV, observándose que en las células MCF-7 hay aumento significativo de la actividad de HAT tanto por TSA como por RSV, mientras que en las células MDA-MB-231 no se encontraron cambios significativos con ninguno de los 2 tratamientos con respecto al control.

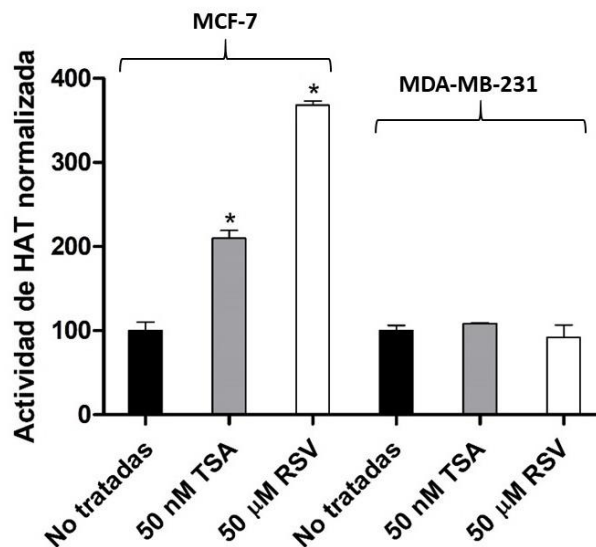


Figura 13. Actividad de HAT en extractos nucleares de células MCF-7 y MDA-MB-231 tratadas con TSA o RSV. Los extractos nucleares de células no tratadas y tratadas con TSA y RSV fueron utilizados para cuantificar la actividad de HAT a través de la detección espectrofotométrica del NADH producido por la liberación de CoA debido a la acetilación de un sustrato peptídico por las HAT. N=3, *p <0.05.

8.7 Efecto de un inhibidor de p300 en la expresión de *ATP2A3* en células de cáncer de mama tratadas con TSA o RSV

p300 es una HAT que está involucrada en la activación transcripcional de muchos genes, incluido *ATP2A3* en cáncer de hígado [96]. Debido a lo anterior, se utilizó el compuesto C646, el cual es un inhibidor reversible de la actividad de p300, que compite con el acetil-CoA por el sitio de unión a CoA [101] y se evaluó la expresión del gen *ATP2A3* mediante qPCR. Se encontró que el tratamiento con 1 μ M de C646 durante 72 h no tiene efecto sobre la expresión de *ATP2A3*, y que cuando se combina con TSA o RSV, no previene el aumento de la expresión de *ATP2A3* por estos dos fármacos en las células MCF-7, aunque en las células MDA-MB-231, previene ligeramente el aumento de *ATP2A3* mediado por RSV (Figura 14).

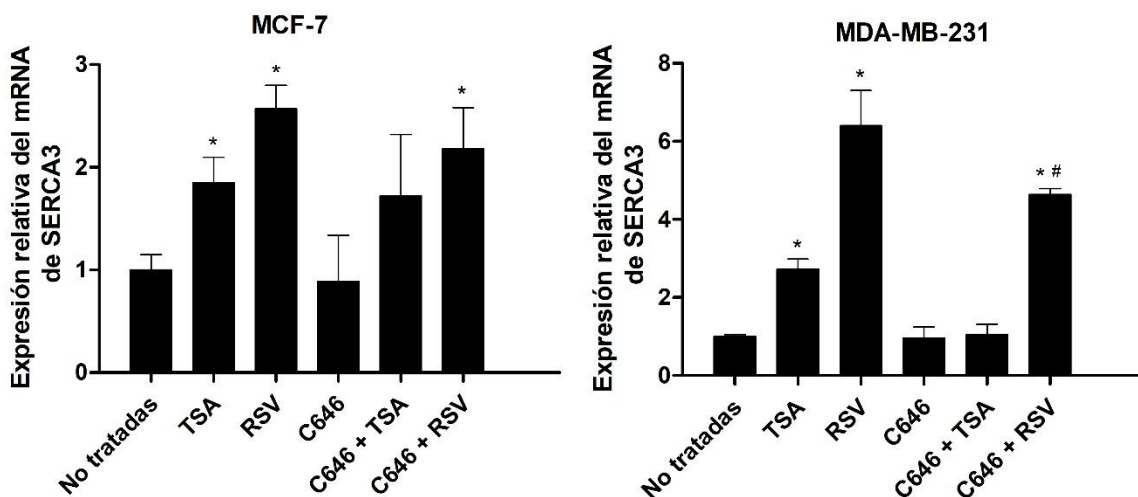


Figura 14. Expresión del mRNA de SERCA3 en presencia de un inhibidor de p300 en células MCF-7 y MDA-MB-231 tratadas con TSA o RSV. Las células MCF-7 y MDA-MB-231 fueron tratadas con TSA, RSV y/o C646 solos o en combinación, para evaluar el efecto de estos fármacos en la expresión de *ATP2A3* mediante qPCR. N=3, *p < 0.05.

8.8 Ocupancia relativa de las marcas H3K9Ac y H3K27Ac en una región del promotor de *ATP2A3* en células tratadas con TSA o RSV

El hecho de observar menor actividad de HDAC por RSV (y menores niveles de proteína HDAC2), hace pensar que podría ocurrir un desbalance entre el estado de acetilación y desacetilación en residuos específicos de lisina, inclinando la balanza hacia la ganancia de acetilación, favoreciendo la transcripción. Para corroborar si la expresión del gen *ATP2A3* inducida por RSV se correlaciona con incremento en el enriquecimiento de las marcas de activación transcripcional mediadas por acetilación, se realizaron experimentos de ChIP contra las modificaciones de histonas H3K9ac y H3K27ac, las cuales han sido estudiadas ampliamente y se ha demostrado que se encuentran asociadas a regiones transcripcionalmente activas.

Los resultados mostraron que el incremento en la expresión del gen *ATP2A3* mediado por RSV está correlacionado con ganancia de acetilación en H3K27, pero sólo en la línea celular MDA-MB-231, y permaneció sin cambios significativos en la línea celular MCF-7. La marca H3K9ac no mostró cambios en ninguna de las dos líneas celulares (Figuras 15A-B). Adicionalmente, en la Figura 13C se muestra una disminución de la ocupancia de HDAC2 en esa misma región en células MDA-MB-231 cuando son tratadas con RSV.

Para validar los resultados de este experimento, se utilizó como control positivo a la región proximal del promotor de β -actina, el cual es un gen de expresión ubicua, y se puede observar que ambas marcas de eucromatina H3K9ac y H3K27ac se encuentran enriquecidas en este promotor, así como la ocupancia relativa de HDAC2 en esta región es muy baja. Por otro lado, se utilizó como control negativo

a la región proximal del gen GAP43, el cual codifica para una proteína importante en el crecimiento y plasticidad neuronal [102], por lo que no esperamos que se exprese en células cancerosas de origen epitelial. Se observa que las marcas H3K9ac y H3K27ac se encuentran en niveles prácticamente indetectables en este promotor, pero la ocupancia relativa de HDAC2 es abundante, validando así nuestros resultados y los anticuerpos utilizados.

Se evaluaron principalmente los cambios de estas marcas en la región -262 a -135 del promotor de *ATP2A3* debido a que, a pesar de que el porcentaje de CpG está distribuido uniformemente en los primeros 1,000 nucleótidos del promotor, es en esta región donde se ha observado disminución de la metilación cuando se induce la transcripción de *ATP2A3* utilizando agentes hipometilantes [95].

En la Figura 15D se muestran datos de ChIP-seq obtenidos del consorcio ENCODE, en el cual se observa que en las células MCF-7, tanto las marcas de eucromatina H3K9ac como H3K27ac se encuentran asociadas al promotor de *ATP2A3*. Esto se realizó con la finalidad de vislumbrar el panorama epigenético y de la cromatina en esta región, ya que la imagen también muestra el enriquecimiento de las marcas de heterocromatina H3K9me3 y H3K27me3, y se observa que su abundancia es baja en el promotor de *ATP2A3* en células MCF-7 en condiciones normales de cultivo, lo cual sugiere que este gen se encuentra transcripcionalmente activo en este tipo celular.

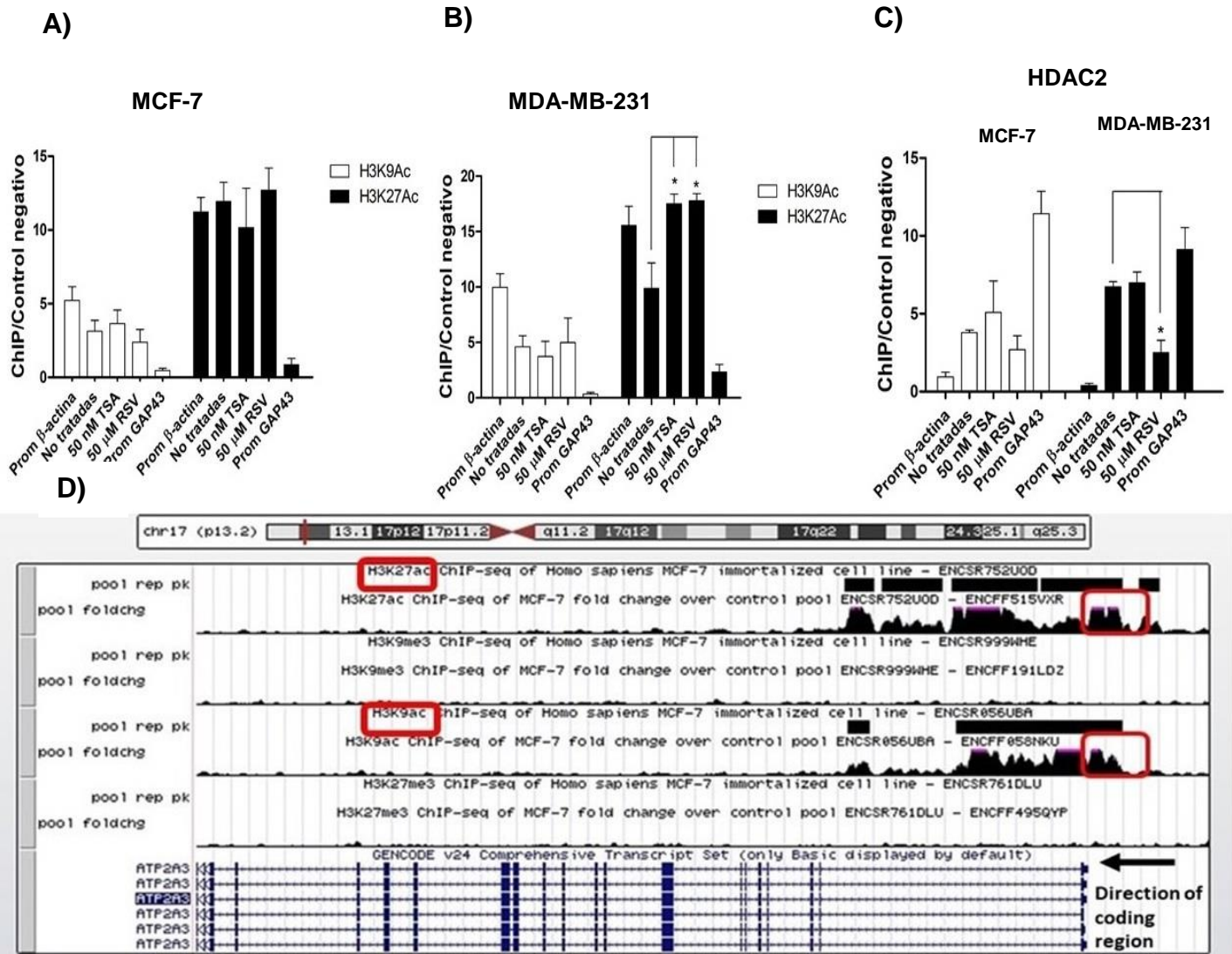


Figura 15. Experimentos de ChIP contra marcas de histonas asociadas con activación transcripcional y HDAC2. Enriquecimiento relativo de las marcas de histonas H3K9ac y H3K27ac en la región -262 a -135 del promotor de *ATP2A3* en las líneas celulares MCF-7 (A) y MDA-MB-231 (B) tratadas con TSA o RSV mediante ChIP. Se muestra también la ocupancia relativa de HDAC2 (C) en la misma región del promotor de *ATP2A3* en las líneas MCF-7 y MDA-MB-231 tratadas con TSA o RSV. N=3, *p < 0.05. Adicionalmente, se muestra la presencia de las marcas de histonas H3K27ac, H3K9me3, H3K9ac y H3K27me3 en el promotor de *ATP2A3* en células MCF-7 con datos públicos de ChIP-seq obtenidos de la base de datos del proyecto ENCODE. En los cuadros rojos se encuentran resaltada las señales para H3K27ac y H3K9ac. La fecha a la izquierda indica la dirección de la región codificante, puesto que el gen *ATP2A3* es codificado en la cadena (-).

8.9 Evaluación de la actividad de DNMT en respuesta al tratamiento con 5-aza o RSV en células de cáncer de mama

Como ya se mencionó, las DNMT transfieren grupos metilos al carbono número 5 de las citosinas. Cuando estas citosinas se encuentran en la región promotora de un gen, suelen tener efectos negativos en la transcripción de ese gen. Por esta razón, decidimos evaluar la actividad de DNMT en células de cáncer de mama tratadas con RSV, y comparamos su efecto con un agente hipometilante como la 5-aza, la cual además de incorporarse al DNA como análogo de la citosina y evitar la acción de las DNMT, también puede unirse covalentemente a las DNMT e inducir su degradación [103]. Observamos, como se muestra en la Figura 16, que en las células MCF-7 no hubo cambios en la actividad de DNMT ni con 5-aza ni con RSV, pero en las células MDA-MB-231 hubo una reducción de la actividad con ambos fármacos de alrededor del 40%.

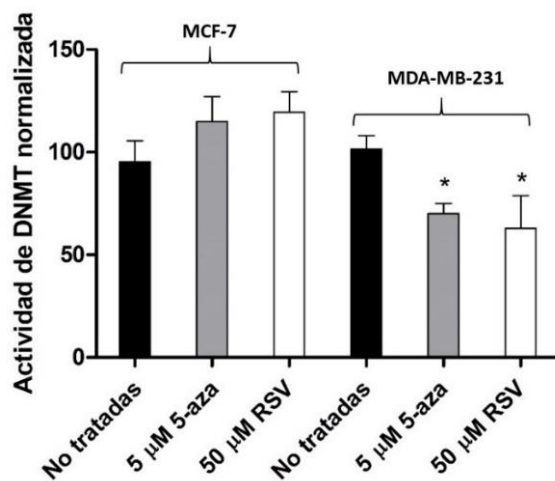


Figura 16. Actividad de DNMT en extractos nucleares de células MCF-7 y MDA-MB-231 tratadas con 5-aza o RSV. Los extractos nucleares de células tratadas con RSV o 5-aza fueron utilizados para medir la actividad de DNMT mediante el uso de un anticuerpo que detecta la 5mC. N=3, *p <0.05.

8.10 Expresión de las proteínas MBD2 y MeCP2 en células tratadas con 5-aza o RSV

MBD2 y MeCP2 son proteínas de la familia de MBD (Methyl-CpG-binding proteins, por sus siglas en inglés) que tienen la capacidad de unirse a CpG metiladas y se han caracterizado por tener la función de represores transcripcionales [104], por lo que decidimos evaluar si el tratamiento con TSA o RSV alteraba sus niveles. En la Figura 17 se muestra que tanto MeCP2 como MBD2 disminuyen sus niveles nucleares en ambas líneas celulares cuando son tratadas con RSV, mientras que el tratamiento con 5-aza no provoca cambios con respecto a las células no tratadas.

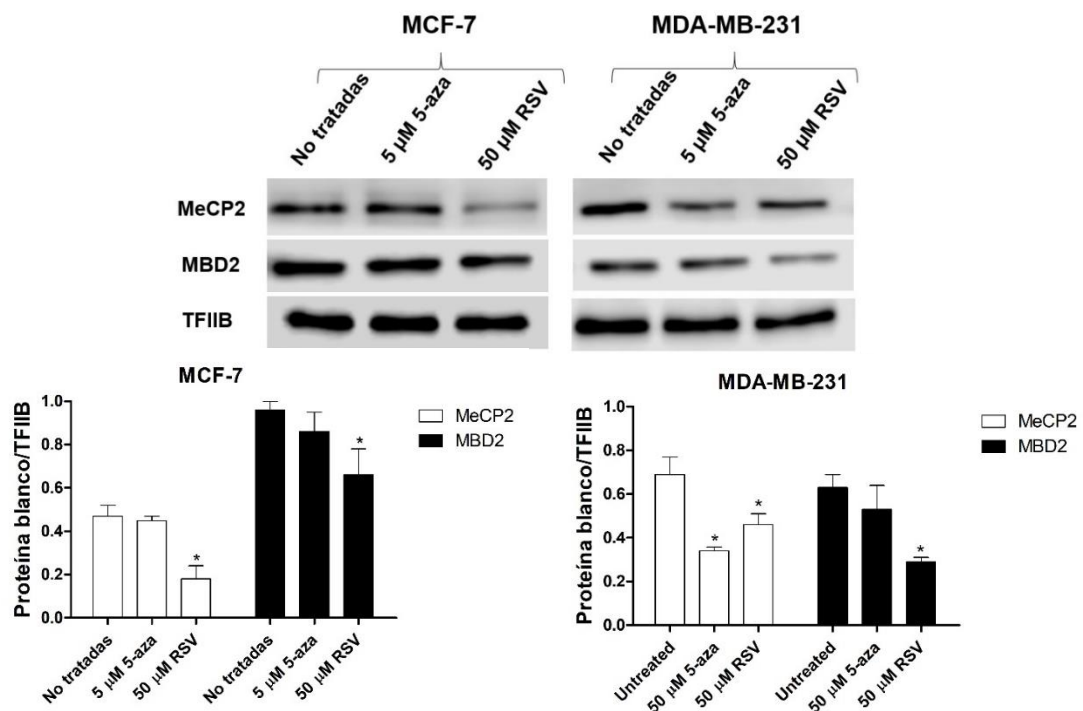


Figura 17. Western Blot mostrando los niveles de las proteínas MeCP2 y MBD2 en células de cáncer de mama tratadas con 5-aza o RSV. Los extractos nucleares de células MCF-7 y MDA-MB-231 tratadas y no tratadas con RSV o 5-aza fueron utilizados para cuantificar mediante WB los niveles de las proteínas MeCP2 y MBD2. Se muestra un WB representativo y el análisis densitométrico de 3 experimentos independientes. N=3, *p < 0.05.

8.11 Patrón de metilación del promotor de *ATP2A3* en líneas celulares de cáncer de mama

El análisis del patrón de metilación de genes, así de sus promotores, puede llegar a ser de utilidad clínica, ya que existen casos en los que la hipermetilación de un gen (por ejemplo, los supresores tumorales RASSF1 o GSTP1), es asociada con un mal pronóstico o probabilidad de recurrencia para las pacientes diagnosticadas con cáncer de mama [105].

Debido a que existen antecedentes de que la expresión de *ATP2A3* es regulada, al menos parcialmente, por metilación en células de cáncer gástrico y de colon [95], evaluamos el patrón de metilación de CpG en la región proximal del promotor de *ATP2A3* desde la región -300 hasta +180 mediante secuenciación de DNA modificado con bisulfito de sodio.

La Figura 18 muestra que la región proximal del promotor, río arriba del sitio de inicio de la transcripción (TSS), se encuentra hipometilada en ambas líneas celulares en condiciones normales de cultivo. Las células MCF-7 incluso muestran sus sitios CpG hipometilados en el cuerpo del gen (río abajo del TSS), mientras que las células MDA-MB-231 muestran un patrón de metilación muy alto en la región cercana al codón de inicio de la traducción.

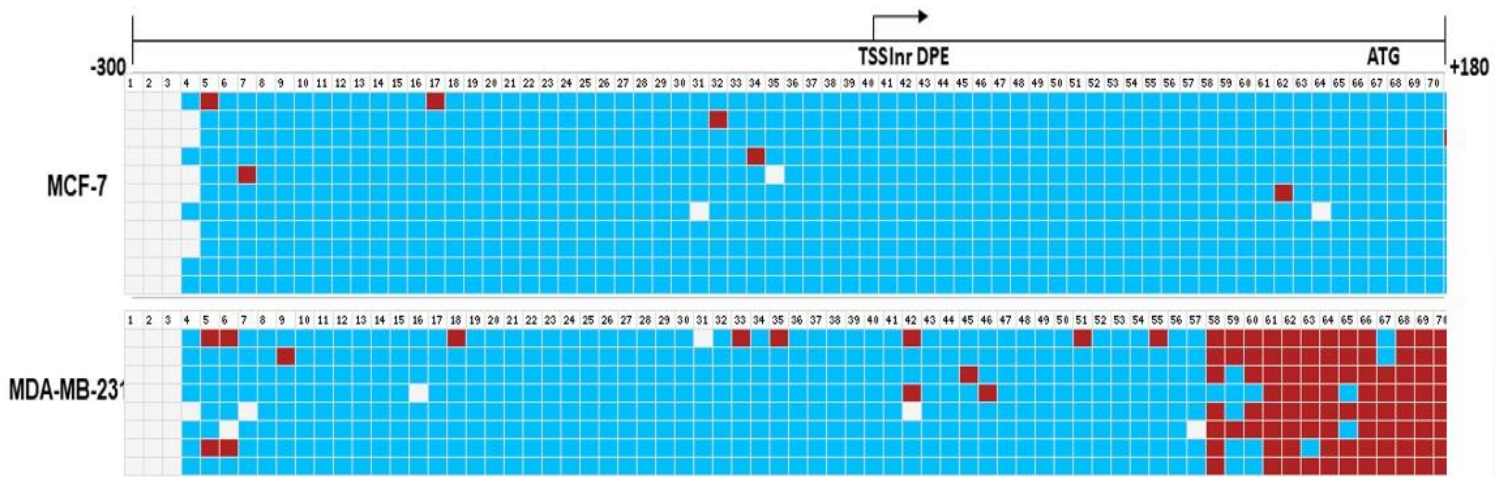


Figura 18. Patrón de metilación de CpG en la región -300 - +180 del promotor del gen *ATP2A3* en líneas celulares de cáncer de mama. Las células MCF-7 y MDA-MB-231 fueron cosechadas en condiciones normales de cultivo, se extrajo el DNA genómico y este fue modificado con bisulfito de sodio y secuenciado para determinar el patrón de metilación del promotor de *ATP2A3*. Cada línea representa la secuenciación de una clona diferente (11 para MCF-7 y 8 para MDA-MB-231); cada cuadro representa un dinucleótido CpG dentro de la región -300 a +180 del promotor de *ATP2A3*, los cuadros azules representan a las CpG no metiladas, mientras que los cuadros rojos a las metiladas. Los cuadros blancos representan CpG cuyo estado de metilación no se pudo determinar.

9. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La expresión génica aberrante es uno de los eventos más tempranos durante la carcinogénesis, además de que se encuentra involucrada en todas las características del cáncer [39]. Por ésta razón, no es sorprendente que proteínas involucradas en procesos epigenéticos y remodelaje de la cromatina presenten mutaciones o alteraciones en su función y/o expresión en células cancerosas [106].

El hecho de que los procesos epigenéticos sean reversibles, representa una característica importante que ha atraído el interés hacia ellos para el desarrollo de medicamentos contra diversas patologías, de hecho algunos fármacos epigenéticos (conocidos como epi-fármacos o epi-drogas) han sido probados en ensayos clínicos con buenos resultados [107-109].

El consumo de fitoestrógenos se ha asociado con menor riesgo de desarrollar varios tipos de cáncer, entre ellos cáncer de mama, próstata y ovario [78, 81]. Además, han mostrado ser agentes con un valor terapéutico contra cáncer de mama, tanto subtipos dependientes del RE- α como contra aquellos que no expresan receptores de hormonas (triples negativos) [110, 111]. Existen datos en la literatura que muestran a los fitoestrógenos como moduladores epigenéticos de la expresión de genes clave en cáncer, los cuales podrían explicar el mecanismo por el cual estas moléculas han mostrado beneficios a la salud en diversos estudios epidemiológicos [14, 112-114].

Basados en la evidencia que el RSV puede ser un regulador epigenético [89, 91, 92, 115], aunado a que en una investigación previa demostramos que el RSV induce

la expresión del gen *ATP2A3* con consecuencias fisiológicas importantes en células de cáncer de mama, sin alterar la expresión de *ATP2A3* [15], decidimos investigar si la inducción de la expresión del gen *ATP2A3* mediada por RSV ocurre por mecanismos epigenéticos, específicamente acetilación y desacetilación de histonas, así como metilación del su promotor.

El promotor de *ATP2A3* carece de caja TATA y su transcripción basal es controlada por elementos del tipo Inr y DPE, así como por los factores de transcripción Sp1, Sp3 y Klf4 [116]. Otra característica de este promotor es que los primeros 1,000 nucleótidos río arriba del TSS, presentan un 78% de GC, lo cual lo hace susceptible a ser regulado por metilación [15]. Incluso se ha demostrado que la expresión de *SERCA3* puede ser modulada utilizando DNMTi, así como HDACi, en células de cáncer de hígado, gástrico y de colon [95, 96, 116], lo cual sugiere que este promotor puede ser regulado epigenéticamente en diversos tipos de cáncer.

La proteína *SERCA3* ha sido propuesta como un marcador de diferenciación, y particularmente en tejido epitelial mamario se ha observado que su expresión empieza a disminuir incluso en lesiones pre-cancerosas [9], por lo que el estudio de su regulación podría tener implicaciones clínicas ya sea para el tratamiento o como un marcador de diagnóstico/pronóstico.

El RSV y la TSA disminuyen la viabilidad celular e inducen apoptosis en células de cáncer de mama

Comparamos el efecto del RSV con dos fármacos, los cuales están dirigidos a dos procesos epigenéticos (TSA, un HDACi y 5-aza, un DNMTi). Tanto el RSV como la TSA disminuyen la viabilidad de las células de cáncer de mama MCF-7 y MDA-MB-231 en una manera dependiente de la dosis (Figuras 8A y 8B). La viabilidad celular reducida puede ser atribuida a un proceso apoptótico, ya que se detectó activación de caspasas en respuesta al tratamiento con RSV y TSA. La resistencia a la muerte celular es una característica del cáncer y ésta varía dependiendo del subtipo. Por ejemplo, el subtipo luminal A de cáncer de mama, representado en este trabajo por las células MCF-7, presenta un mejor pronóstico comparado con el subtipo triple negativo (células MDA-MB-231), el cual es más agresivo y propenso a realizar metástasis; además, éste último muestra actividad proliferativa mucho mayor que el luminal A [117], la cual podría mitigar los efectos del RSV y otros fármacos y explicaría por qué las células MDA-MB-231 son más resistentes a la disminución de viabilidad e inducción de apoptosis.

Con 5-aza no se observaron cambios significativos ni en viabilidad celular ni en inducción de apoptosis. Esto puede ser por 2 razones: la primera es que sus efectos sean solamente a nivel de inhibición del crecimiento [118]; y la segunda explicación es que se ha observado en distintos tipos de líneas celulares de cáncer, la 5-aza por sí misma no induce muerte celular, pero es capaz de sensibilizarlas a ciertos fármacos [119]. Por ejemplo, las células MCF-7 resistentes a doxorrubicina cuando son expuestas a doxorrubicina (0-500 nM) o 5-aza (0-10 μ M) durante 24-48 h, no muestran cambios significativos en la supervivencia, sin embargo, cuando se

administran en combinación, las células disminuyen su supervivencia hasta en un 70% después de 48 h [120].

El RSV induce expresión del gen *ATP2A3* y remodelaje del manejo de Ca^{2+} en células de cáncer de mama

Es importante estudiar los genes que alteran su expresión en respuesta a HDACi y DNMTi debido a que, a pesar de que éstos fármacos pueden provocar cambios generales en la estructura de la cromatina, solo una pequeña fracción de genes alteran su expresión, por lo que la expresión génica global no se ve afectada de manera tan significativa [121]. La identificación de estos genes podría llevarnos a entender mejor su función en la fisiología celular, puesto que los epi-fármacos regulan varios procesos celulares involucrados en la carcinogénesis [63].

Tanto el RSV como la TSA inducen la expresión del gen *ATP2A3* sin afectar la expresión del gen constitutivo *ATP2A2*. Para los experimentos posteriores se seleccionó la concentración de 50 μ M de RSV, ya que fue la concentración en la cual se observó la mayor inducción de la expresión de *ATP2A3*, esta concentración está dentro del rango utilizado en la literatura para estudiar los efectos del RSV en diferentes tipos de células, e incluso es una concentración que se puede alcanzar en plasma sanguíneo de ratas después de la administración oral o intravenosa del mismo [122-126].

El RSV potenció la expresión del gen *ATP2A3* incluso más que TSA. Los datos indican que los cambios en la expresión de los genes SERCA tienen una

consecuencia fisiológica, no sólo en la inducción de apoptosis, sino también en alteraciones del manejo de Ca^{2+} citosólico (Figura 9). El Ca^{2+} citosólico basal fue menor en las células MCF-7 tratadas con RSV comparado con el de las células no tratadas, mientras que las células MDA-MB-231 mostraron lo opuesto. La respuesta a la inhibición de la actividad de SERCA con Tg también fue diferente en ambas líneas celulares, mientras que la liberación de Ca^{2+} del RE en células MCF-7 tratadas con RSV fue menor que en células no tratadas, en células MDA-MB-231 se observó el efecto contrario (Figura 9B). Sugerimos que las características bioquímicas juegan un papel importante en este fenómeno. SERCA2b tiene una afinidad por Ca^{2+} ($K_{\text{Ca}^{2+}}=0.2 \mu\text{M}$) que es seis veces mayor que la afinidad de las isoformas de SERCA3 ($K_{\text{Ca}^{2+}}=1.2 \mu\text{M}$) [18, 127]. Además, las diferencias en la velocidad de transporte de Ca^{2+} , la abundancia relativa de las isoformas de SERCA y las variaciones en los niveles de otras proteínas involucradas en el manejo de Ca^{2+} , igualmente juegan un papel importante en la homeostasis de Ca^{2+} en un contexto celular dado. Por lo tanto, es difícil la predicción de las variaciones de Ca^{2+} a través del análisis de solamente la expresión de SERCA3. Adicionalmente, una de las principales diferencias entre las células MCF-7 y MDA-MB-231 es la expresión del RE- α , el cual es importante para modular el comportamiento de células de cáncer de mama. El Ca^{2+} y la respuesta a proteínas mal plegadas (UPR, por sus siglas en inglés) son mediadores clave en la activación del RE- α [128, 129]. Esto podría, al menos en parte, explicar las diferencias en el manejo de Ca^{2+} citosólico en respuesta a RSV en estas líneas celulares, y sería un campo interesante para futuras investigaciones.

El RSV y la TSA disminuyen la actividad de HDAC, pero solo el RSV disminuye la abundancia de HDAC2 nuclear

La alteración en la expresión y/o actividad de varias HDAC ha sido identificada en diversos tumores [130]. Por ejemplo en cáncer de mama se ha observado que la sobre-expresión de HDAC1, HDAC2 y HDAC3 es común en tumores poco diferenciados y agresivos, mientras que expresión abundante de HDAC6 es de buen pronóstico en IDC [58].

Aunque el RSV es considerado un activador de SIRT1, las sirtuinas pertenecen a la clase III de HDAC, las cuales difieren de las HDAC clásicas en diversos aspectos como estructura, especificidad de sustrato y dependencia de cofactores [131, 132], por lo que es posible que la regulación negativa de la actividad de HDAC por RSV se dé a través de mecanismos diferentes. Además, el RSV y otros activadores de SIRT1 son capaces de acelerar la reparación de la piel en ratones, y este mismo efecto puede ser logrado a través de la aplicación de HDACi como la TSA [133]. Nuestros resultados sugieren que el RSV es un HDACi y puede llegar a ser tan eficiente como la TSA, no sólo a través de la reducción de la actividad de HDAC (como un inhibidor potencial a través de la unión a la enzima), sino también disminuyendo los niveles nucleares de HDAC2, de acuerdo con los experimentos de Western Blot e inmunofluorescencias (Figuras 11 y 12). Es importante la identificación de nuevas moléculas con actividad de HDACi, ya que en los ensayos clínicos, si bien se han llegado a observar resultados prometedores en algunos casos, estos fármacos también están asociados con toxicidad, llegando a ocasionar en los pacientes efectos secundarios como trombocitopenia, neutropenia, anemia,

fatiga, diarrea, vómito y/o deshidratación [72], por lo que el RSV pudiera sustituir a los HDACi en ensayos clínicos, ya que ha mostrado ser mejor tolerado por los pacientes [113, 134].

El RSV y la TSA incrementan la actividad de HAT

La inhibición de HDAC mediada por RSV podría ser suficiente para favorecer la ganancia de acetilación de histonas. Sin embargo, también se detectó el aumento de la actividad de HAT por RSV y TSA, lo cual provoca la acumulación de acetilación global de la histona H3 (Figura 11). Estos resultados concuerdan con investigaciones previas en las que se ha observado que el RSV y otros fitoestrógenos como el pterostilbeno, epigallocatequina galato (EGCG) y sulforafano pueden reactivar la expresión del RE- α en células de cáncer de mama triple negativas a través de la reversión de las aberraciones epigenéticas que lo mantienen silenciado, como actividad de HAT reducida y actividad de HDAC aumentada, neutralizando el contexto de heterocromatina y provocando que estas células vuelvan a ser sensibles a terapia hormonal con tamoxifeno [89, 90]. El tratamiento con RSV y pterostilbeno en las células de cáncer de mama triples negativas MDA-MB-157 y HCC1806 reactiva la expresión del RE- α a través de la acumulación de la marca de activación transcripcional H3K9ac sobre el promotor del ER- α [89]. También en modelos pre-clínicos de cáncer de mama resistente a terapia endocrina, se ha observado que la inhibición de HDAC puede restaurar la sensibilidad hacia la terapia anti-estrogénica [135]. Esto es de suma importancia, ya que alrededor del 30-40% de las pacientes que inicialmente son diagnosticadas con

tumores ER+, desarrollan resistencia a la terapia anti-estrogénica, y esto es causado principalmente por el silenciamiento epigenético del RE- α [136].

Incluso en un ensayo clínico de fase 3, se encontró que las pacientes tratadas con una combinación de tucidinostat (un HDACi) con exemestano (un inhibidor de aromatasas), mostraron un mayor tiempo de supervivencia libre de progresión de la enfermedad comparado con las pacientes que recibieron solamente un placebo + exemestano (7.4 vs 5.5 meses, respectivamente) [137], mostrando que la inhibición de HDAC puede tener utilidad en la práctica clínica.

Además, cuando utilizamos el compuesto C646, el cual es un inhibidor específico de la actividad de p300, la inducción de la expresión de *ATP2A3* por RSV apenas mostró cambios (Figura 14). Aunque utilizamos una concentración mayor (1 μ M) que la constante de inhibición del compuesto (400 nM) [138], en otros estudios se han utilizado concentraciones entre 10 y 20 veces mayores [101, 139]. Por lo tanto, es posible que la concentración que utilizamos no fuera suficiente para prevenir la inducción de *ATP2A3* mediada por RSV y que p300 esté involucrado en la activación de la expresión de *ATP2A3*, no solo por RSV sino en condiciones normales.

El RSV incrementa H2K27ac y disminuye la ocupancia relativa de HDAC2 sobre el promotor de SERCA3 en células MDA-MB-231, pero no en células MCF-7

La actividad tanto de HDAC como de HAT mediada por RSV inclina la balanza hacia la creación de un ambiente favorable para la ganancia de acetilación de histonas, la cual se ha asociado con activación transcripcional [51]. En la figura 11 observamos que ocurría una ganancia global en la acetilación de H3; sin embargo, si bien el grado de acetilación global es un parámetro importante, es la localización de esta modificación la que pudiera tener un impacto más importante en la biología celular [140]. Además, se ha observado que, en distintas líneas celulares, e incluso entre distintas muestras de pacientes derivadas de un mismo tipo de cáncer, la actividad de HAT/HDAC es distinta, así como la tendencia de MPT en residuos aminoácidos específicos en las histonas en respuesta a HDACi [141]. De acuerdo con lo anterior, decidimos evaluar la acetilación en dos residuos específicos de lisina que han mostrado una gran importancia en la estructura de la cromatina y la regulación de la transcripción, y observamos un enriquecimiento de H3K27ac, pero no de H3K9ac sobre el promotor de *ATP2A3* en células MDA-MB-231 tratadas con RSV o TSA (Figura 15B). Sorprendentemente, no hubo cambios en los niveles ni de H3K9ac ni H3K27ac en células MCF-7 (Figura 15A). Una posible explicación es que *SERCA3* ha sido propuesto como un marcador de diferenciación [116] y las líneas celulares que utilizamos representan diferentes grados de diferenciación. Las células MCF-7 pertenecen a un subtipo de cáncer de tipo luminal, que se caracteriza por conservar algunas características epiteliales, como la expresión de E-caderina y algunas citoqueratinas [36]; en contraste, las células MDA-MB-231 son del subtipo triple negativo el cual es una forma más agresiva y menos diferenciada de cáncer de mama [142], por lo que el hecho de que la sobre-expresión de *ATP2A3*, así como la acumulación de marcas de eucromatina se hayan dado solamente en las células

triples negativas y menos diferenciadas, que intrínsecamente expresan bajos niveles de éste, concuerda bien con esta propuesta. Adicionalmente, cuando se utilizan los HDACi butirato de sodio (NaB) y SAHA, las células MCF-7 acumulan la marca H3K4ac (asociada a promotores de genes activos), sobre el promotor de BRCA1 y de otros genes, mientras que las células MDA-MB-231 no mostraron cambios [143], por lo que el estatus de expresión del RE- α podría jugar un papel importante en la respuesta que las células de cáncer de mama presentan a epifármacos, agregando una capa más de complejidad al estudio del efecto de éstas moléculas en cáncer.

De acuerdo con nuestros resultados, la inducción de *ATP2A3* es más potente en células MDA-MB-231 que en células MCF-7 (Figura 9A). La cuantificación de la expresión de *ATP2A3* mediante PCR en tiempo real, indica que sus niveles en células MDA-MB-231 son mucho menos abundantes comparado con las células MCF-7, en condiciones normales de cultivo, apoyando la idea de que SERCA3 puede funcionar como un marcador de diferenciación. Además, se ha visto que la expresión de las bombas de Ca^{2+} SERCA y PMCA se regula de manera diferencial en una forma específica de subtipo cuando células de cáncer de mama son tratadas con HDACi [144].

En adición a nuestros resultados, datos de ChIP-seq publicados por el consorcio ENCODE muestran que tanto los residuos H3K9 como H3K27 se encuentran hiperacetilados en condiciones normales sobre el promotor de *ATP2A3* en células MCF-7 (Figura 15D), la cual es la única línea celular derivada de glándula mamaria para la cual existen datos en ENCODE.

En este punto del trabajo, decidimos concentrarnos solamente en el análisis del promotor de SERCA3 por dos razones: la primera es debido a los resultados obtenidos mediante qPCR, en la cual no se observaron cambios en la expresión de *ATP2A2* bajo ninguna de nuestras condiciones experimentales, lo cual la propuesta de diversos autores de que éste es un gen de expresión constitutiva [145]. Y la segunda razón fue por razones metodológicas. En hecho de no observar cambios en este gen, podría habernos ayudado a utilizarlo como “control negativo” en diversos experimentos. Sin embargo, debido a las características intrínsecas de este promotor, resulta muy difícil amplificarlo por PCR, así como clonarlo en vectores de expresión para su posterior análisis.

En un trabajo reciente, donde se evaluaron 15 muestras de pacientes con cáncer de mama, mediante ChIP-seq acoplado a con ensayos de microarreglos de DNA (ChIP-chip) se encontró que en tumores HER2 positivos y triples negativos, los promotores de genes importantes se encontraban marcados con la modificación H3K9ac, mientras que en tumores luminales, la marca predominante era H3K27ac [117]. A pesar de que solamente se evaluaron esas dos marcas, estos resultados sugieren que las células de cierto subtipo de cáncer de mama acumulan preferentemente modificaciones sobre residuos específicos en las histonas, lo cual concuerda con lo observado en este estudio, donde las células MDA-MB-231 acumularon acetilación solamente sobre la K27 y no sobre la K9. Incluso, se ha demostrado que la pérdida o ausencia de ciertas marcas de cromatina son no solamente características de ciertos tipos de cáncer, sino que pueden tener un valor

clínico ya que pueden asociarse con parámetros como la recurrencia y/o supervivencia [146, 147].

El RSV también podría ejercer su función a través de la interrupción, desestabilización y/o inhibición de complejos remodeladores de la cromatina. Por ejemplo, el RSV ha mostrado la capacidad de promover la expresión de PTEN a través de la inhibición del complejo MTA1/DAC en células de cáncer de próstata DU145 y PC3M [94]. Nuestros resultados demuestran que el RSV disminuye la ocupancia relativa de HDAC2 sobre el promotor de *ATP2A3* en células MDA-MB-231 (Figura 13C), probablemente inhibiendo la formación de un complejo silenciador del gen *ATP2A3*.

El RSV disminuye la actividad de DNMT y la expresión de proteínas de unión a DNA metilado

La evaluación de la metilación del DNA es importante debido a que se ha encontrado que ésta puede ser un buen marcador de pronóstico, así como de probabilidad de recurrencia en varios tipos de cáncer. Ejemplo de estos son los análisis de metilación en los genes *RASSF1*, *GSTP1*, *BRCA1* y *CDH1*, los cuales cuando se encuentran metilados indican que hay una menor probabilidad de respuesta a ciertos tratamientos y mayor probabilidad de presentar recurrencia después de 5 años [105, 148]. Incluso, un perfil de metilación de genoma completo de los subtipos de cáncer de mama ya mencionados anteriormente, ha revelado que los subtipos HER2 positivo y triple negativo tienen patrones de metilación

específicos, mientras que los subtipos luminales son más heterogéneos en cuanto a esta característica [149]. De manera general se ha observado que los subtipos triples negativos presentan menor grado de metilación en promotores comparado con los otros subtipos [149, 150], lo cual sugiere que este subtipo contiene una mayor cantidad de genes transcripcionalmente activos.

Como previamente se había observado en células MDA-MB-157 y MDA-MB-231 [89, 90], confirmamos la inhibición de la actividad de DNMT mediada por el tratamiento con RSV, aunque observamos disminución solamente en células MDA-MB-231, mientras que en células MCF-7 no se observaron cambios (Figura 16).

MeCP2 y MBD2 son proteínas que normalmente se unen al DNA metilado [151]. Evaluamos los niveles de MeCP2 y MBD2 en extracto total de células MCF-7 y MDA-MB-231, encontrando que ambas proteínas se encuentran disminuidas cuando se aplica tratamiento con RSV o 5-aza (Figura 17). Sin embargo, cuando analizamos el patrón de metilación del promotor proximal de *ATP2A3*, encontramos que se encuentra hipometilado en ambas líneas celulares (Figura 18). Por lo tanto, concluimos que la metilación del promotor de *ATP2A3* no juega un papel importante en la activación *ATP2A3* mediada por RSV. A pesar de que en estudios previos se ha demostrado que los altos niveles de metilación en los promotores de muchos genes correlacionan con los tumores mamarios positivos para el RE [152], éste no parece ser el caso del gen *ATP2A3*, que no estuvo metilado en las células ER+ ni tampoco en las triples negativas.

En un estudio previo, se analizó el efecto del RSV en los niveles globales de metilación del genoma en células MDA-MB-231, identificando el conjunto de genes

que muestran tanto hipermetilación como hipometilación en respuesta al tratamiento con RSV [153]. Dado que el gen *ATP2A3* no fue identificado dentro del panel de genes mencionado previamente, sugerimos que el RSV puede regular la expresión de genes, en este caso particular del gen *ATP2A3*, por mecanismos adicionales, y no solamente por cambios en el patrón de metilación del DNA.

De manera notable, a pesar de la falta de metilación en el promotor próxima, las células MDA-MB-231 muestran un patrón de metilación muy denso en el cuerpo del gen, en la región cercana al codón de inicio de traducción. Esta metilación concuerda con datos públicos de la base de datos Cancer Cell Line Encyclopedia, y sería interesante analizar qué papel tiene esa metilación en la regulación de la transcripción de *ATP2A3*, así como funciones adicionales que pudiera tener.

A pesar de que desde hace varios años se han investigado intensamente los efectos benéficos del consumo de RSV en la salud humana (Figura 19), sus mecanismos aún no se entienden completamente.

El RSV y sus análogos han sido probados en diversos estudios *in vitro* e *in vivo*, así como en ensayos clínicos con buenos resultados. Sin embargo, se necesitan más estudios mecanísticos, así como más ensayos clínicos para entender los mecanismos del RSV y otros fitoestrógenos. El entendimiento de cómo estos y otros agentes quimiopreventivos ejercen su función a nivel celular y molecular nos dará un panorama más amplio que nos permitirá más opciones terapéuticas y de prevención, consolidando el área de la nutriepigénica como un aliado importante contra el cáncer y otros problemas de salud pública. Los resultados de este trabajo proveen bases moleculares para la justificación del uso del RSV como un adyuvante

en el área de la oncología, por lo que debería ser tomado en cuenta para la realización de ensayos clínicos para evaluar su efectividad.

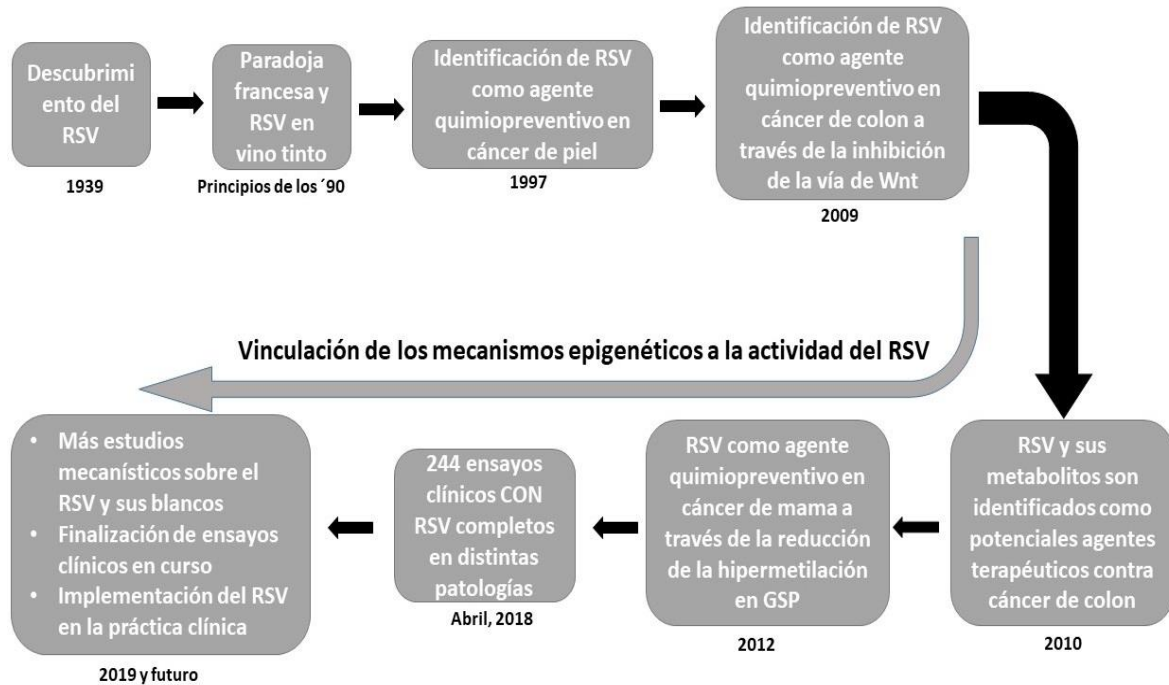


Figura 19. Eventos principales en el campo del RSV y la investigación en cáncer. El RSV fue identificado por primera vez en 1939 en elébore blanco. En la década de 1990, se identificó en vino tinto y se sugirió como una posible explicación a la paradoja francesa, la cual consiste en que la baja incidencia de obesidad y enfermedades cardiovasculares en la población francesa, a pesar de su dieta alta en grasas, se podía explicar a través del alto consumo de vino tinto en aquel país [113]. En 1997, se encontró que la aplicación tópica de RSV inhibe la carcinogénesis en un modelo murino de cáncer de piel [154]. Pacientes de cáncer de colon fueron tratados con dosis bajas de RSV (<1mg/día) y se observó que la vía de señalización de Wnt se encontraba inhibida en la mucosa normal de colon pero no en las células neoplásicas, sugiriendo que bajas dosis de RSV podrían tener un efecto quimiopreventivo para el cáncer de colon [155]. En 2010 se reportó que pacientes con cáncer de colon que consumieron dosis de 0.5-1g de RSV/día alcanzaron concentraciones suficientes de éste en el torrente sanguíneo

para observar efectos farmacológicos, de hecho, encontraron que las células neoplásicas presentaban una proliferación disminuida a través de la inhibición de Ki-67. En 2012, se reportó que mujeres adultas con alta predisposición a desarrollar cáncer de mama y que consumieron dosis de 10-100 mg de RSV/día por 12 semanas, mostraron altos niveles de RSV y sus metabolitos en suero; además, análisis de metilación revelaron que el promotor del supresor tumoral *RASSF-1 α* estaba hipometilado comparado con las mujeres que solamente recibieron un placebo. Para abril de 2018, se habían completado 244 ensayos clínicos que utilizaron al RSV en distintas patologías[113], la mayoría de ellos mostrando efectos benéficos.

10. CONCLUSIONES

- El tratamiento con RSV disminuye la viabilidad de las células de cáncer de mama MCF-7 y MDA-MB-231, a través de la inducción de apoptosis.
- El RSV induce la expresión del gen *ATP2A3*, mientras que la expresión del gen *ATP2A2* no cambia. La activación del gen *ATP2A3* es más potente en las células MDA-MB-231 que en las MCF-7.
- El RSV provoca cambios en el manejo intracelular de Ca^{2+} en ambas líneas celulares, aunque de manera diferencial.
- El RSV disminuye la actividad de HDAC en ambas líneas celulares y altera la localización nuclear de HDAC2 las células MCF-7, provocando incremento en la acetilación de la histona H3.
- El RSV incrementa la actividad de HAT en células MCF-7, pero no en MDA-MB-231, sin alteraciones en la expresión de p300.
- El RSV favorece el enriquecimiento de la acetilación de H3K27 solamente en las células MDA-MB-231, con disminución de la ocupancia de HDAC2 en la región proximal del promotor de *ATP2A3*.
- El tratamiento con RSV disminuye la actividad de DNMT en células MDA-MB-231, así como la expresión de las proteínas de unión al DNA metilado MeCP2 y MBD2 en ambas líneas celulares.
- El promotor proximal de *ATP2A3* en ambas líneas celulares se encuentra hipometilado, aunque la región río abajo inmediata al sitio del inicio de la transcripción está densamente metilada en células MDA-MB-231.

11. PERSPECTIVAS

A pesar de que ya son décadas que se conoce al RSV, así como los beneficios que su ingesta brinda a los consumidores, se sabe realmente poco de cuáles son los mecanismos moleculares por los que actúa, no sólo en cáncer sino también en otras patologías. En este trabajo caracterizamos los cambios epigenéticos en el promotor del gen *ATP2A3* inducidos por RSV. Sin embargo, experimentos más puntuales que incluyan el silenciamiento de HDAC2 y/o de otras proteínas que pudieran estar involucradas en este proceso, ya sea mediante RNAi o la tecnología CRISPR-Cas, nos permitirían responder mecánicamente la pregunta “¿Cómo es que esto sucede?”.

Si bien en este estudio estudiamos al RSV como un modulador epigenético de algunos genes, seguimos sin saber cuáles son sus efectos a nivel de genoma completo, por lo que sería interesante investigar cuáles son las nuevas características que adquiere el genoma, en cuanto a su estructura, dinámica y patrones globales de expresión génica, cuando un tipo celular dado es expuesto a RSV.

Adicionalmente, la evaluación del efecto del RSV, ya sea sólo o en combinación con otros fármacos comúnmente utilizados en quimio o inmunoterapia, en modelos animales, así como en pacientes, podría ser útil para poder ofrecer más alternativas de tratamiento a los pacientes.

12. ARTÍCULO PUBLICADO DERIVADO DE ESTA TESIS

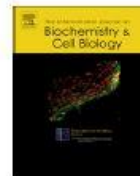
International Journal of Biochemistry and Cell Biology 113 (2019) 37–47



Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Biochemistry
and Cell Biology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/biocel



Resveratrol up-regulates *ATP2A3* gene expression in breast cancer cell lines through epigenetic mechanisms



Eduardo Izquierdo-Torres^a, Andrés Hernández-Oliveras^{b,c}, Iván Meneses-Morales^a,
Gabriela Rodríguez^a, Gabriela Fuentes-García^a, Ángel Zarain-Herzberg^{a,*}

^a Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, Mexico

^b Programa de Doctorado en Ciencias de la Salud, Universidad Veracruzana, Veracruz, Mexico

^c Instituto de Investigaciones Biológicas, Universidad Veracruzana, Xalapa, Veracruz, Mexico

ARTICLE INFO

Keywords:

SERCA
Breast cancer
Resveratrol
Epigenetics
Deacetylation
DNA methylation

ABSTRACT

Resveratrol (RSV) is a phytoestrogen which has been related to chemoprevention of several types of cancer. In this work, we show up to a 6-fold increased expression of *ATP2A3* gene induced by RSV that triggers apoptosis and changes of intracellular Ca^{2+} management in MCF-7 and MDA-MB-231 breast cancer cell lines. We explored epigenetic mechanisms for that RSV-induced *ATP2A3* up-regulation. The results indicate that RSV-induced *ATP2A3* up-regulation correlates with about 50% of reduced HDAC activity and reduced nuclear HDAC2 expression and occupancy on *ATP2A3* promoter, increasing the global acetylation of histone H3 and the enrichment of histone mark H3K27Ac on the proximal promoter of the *ATP2A3* gene in MDA-MB-231 cells. We also quantified HAT activity, finding that it can be boosted with RSV treatment; however, pharmacological inhibition of p300, one of the main HATs, did not have significant effects in RSV-mediated *ATP2A3* gene expression.

Additionally, DNMT activity was also reduced in cells treated with RSV, as well as the expression of Methyl-DNA binding proteins MeCP2 and MBD2. However, analysis of the methylation pattern of *ATP2A3* gene promoter showed un-methylated promoter in both cell lines. Taken together, the results of this work help to explain, at the molecular level, how *ATP2A3* gene is regulated in breast cancer cells, and the benefits of RSV intake observed in epidemiological data, studies with animals, and *in vitro* models.

1. Introduction

The calcium ion concentration ($[\text{Ca}^{2+}]$) functions as a second messenger which controls a wide variety of cellular processes such as differentiation, growth, and cell death, among others (Berridge et al., 2003). One of the main components of the Ca^{2+} signaling system is the Sarco/Endoplasmic Reticulum Calcium ATPase (SERCA), an enzyme which transport Ca^{2+} from the cytosol to the lumen of Endoplasmic Reticulum (ER) through ATP hydrolysis to restore the steady state (Brini and Carafoli, 2009). The SERCA pumps are encoded by three different genes (*ATP2A1-3*), whose expression is tightly regulated in tissue and development stage-specific manner (Periasamy and Kalyanasundaram, 2007). Deregulated expression of Ca^{2+} channels and pumps (including SERCA3) are characteristic features of some diseases, including breast, colon, and gastric cancer (Gelebart et al., 2002; Papp

and Brouland, 2011).

Phytoestrogens are chemical compounds that are produced in plants in response to different contexts, especially stress exposure (Duffy et al., 2007). According to epidemiological studies, they have been correlated with a lower risk to develop breast cancer (Khan et al., 2012); even they have been tested in clinical studies with good outcomes, functioning as both a treatment and adjuvant therapy to minimize the side effects and resistance to chemotherapy (Cottart et al., 2014; Al Fatease et al., 2019; Jin et al., 2019; Li et al., 2017). Phytoestrogens account for multiple targets, including the epigenome (Carlos-Reyes et al., 2019). It was shown that 20–40 μM of genistein can stimulate the expression of p21 and p16, which have tumor suppression functions, such increase was correlated with inhibition of HDAC activity (Li et al., 2013); likewise, genistein and resveratrol (RSV) can reactivate the expression of Estrogen Receptor alpha (ER- α) in ER- α -negative breast cancer cells

Abbreviations: ER, Endoplasmic Reticulum; SERCA, Sarco/Endoplasmic Reticulum Ca^{2+} -ATPase Pump; RSV, Resveratrol; ER- α , Estrogen Receptor Alpha; HDAC, Histone Deacetylases; HAT, Histone Acetyltransferases

* Corresponding author at: Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Avenida Universidad 3000, Mexico City, 04510, Mexico.

E-mail address: zarain@unam.mx (Á. Zarain-Herzberg).

<https://doi.org/10.1016/j.biocel.2019.05.020>

Received 17 March 2019; Received in revised form 29 May 2019; Accepted 31 May 2019

Available online 04 June 2019

1357-2725/ © 2019 Elsevier Ltd. All rights reserved.

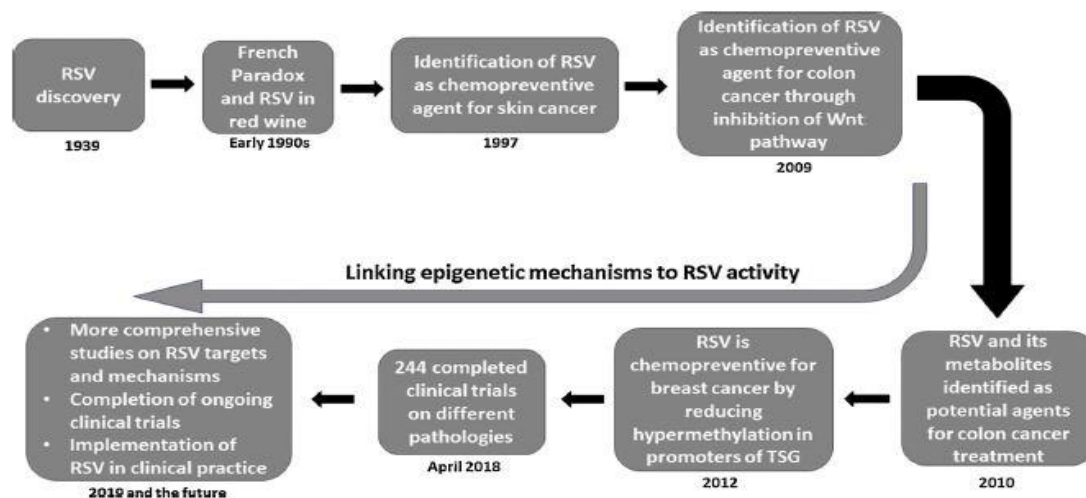


Fig. 1. Major events in the field of RSV and cancer research. RSV has been isolated from different sources, however, it was first identified in 1939 in white hellebore. In the 1990s, it was identified in red wine and suggested as a putative explanation of French Paradox, which consists in that the decreased incidence of heart disease and obesity in the French population, despite their high-fat diet, could be explained by the red wine intake in that country (Singh et al., 2019). In 1997, it was found that topical application of RSV inhibited carcinogenesis in a mouse skin cancer model (Jang et al., 1997). Colon cancer patients were treated with very small doses of RSV (< 1 mg), and Wnt signaling was inhibited in normal colonic mucosa but not in neoplastic tissue, suggesting that low doses of RSV may have a chemopreventive role for colon cancer (Nguyen et al., 2009). In 2010, patients with colorectal cancer consumed 0.5–1 g of RSV daily. RSV reached sufficient concentrations to observe pharmacologic effects, actually, it reduced cell proliferation through Ki-67 inhibition (Patel et al., 2010). In 2012, adult women with high risk to develop breast cancer consumed 10–100 mg of RSV daily for 12 weeks. High levels of RSV and metabolites were detected in serum, and methylation analysis revealed that *RASSF1a* promoter, a Tumor Suppressor Gene (TSG) was hypomethylated compared to the women who only received placebo (Zhu et al., 2012). To April 2018, 244 clinical trials had used RSV in a broad set of pathologies (Singh et al., 2019), most of them showed beneficial effects of this molecule. As a result, more clinical and comprehensive research is needed to understand RSV mechanisms, but the data to date are promising to introduce RSV to routine clinical practice.

through the enrichment of histone marks associated with transcriptional activation on the ER- α gene promoter, due to HDAC inhibition and promotion of HAT activities (Kala and Tollefsbol, 2016). RSV also suppress the lysine methyltransferase EZH2 (Hu et al., 2019) and it is very effective to inhibit the proliferation of ER- α positive and triple negative breast cancer cells (Hu et al., 2019; Horgan et al., 2019). A time-line schematic representation of some important events in the field of RSV and cancer research are highlighted in Fig. 1.

Additionally, we previously demonstrated that RSV induces the expression of the human *ATP2A3* gene, but not of the housekeeping *ATP2A2* gene, in MCF-7 and MDA-MB-231 cells. Moreover, up-regulation of *ATP2A3* is essential for RSV-induced apoptosis in these cancer cell lines since *ATP2A3* silencing assays using siRNA partially decreases the apoptotic process induced by RSV (Izquierdo-Torres et al., 2017). Despite all the evidence, the molecular mechanisms associated with the RSV effects remain elusive. Therefore, in this work, we focus on the mechanisms for RSV-induced *ATP2A3* expression in human breast cancer cell lines, with emphasis on histone acetylation/deacetylation and CpG DNA methylation processes to shed light about how RSV works in reactivating silenced genes in the context of cancer.

2. Materials and methods

2.1. Cell cultures and treatments

MCF-7 and MDA-MB-231 breast cancer cell lines were purchased from ATCC and cultured in DMEM with high glucose + 10% FBS, 0.5% penicillin-streptomycin, and 70 mg/l kanamycin (Sigma Aldrich). Cells were grown at 37 °C in a humidified 5% CO₂/95% air atmosphere. Exponentially growing cells were trypsinized and then seeded. When cells reached 60% confluence by microscopic examination, RSV, 5-azacytidine (5-aza) or Trichostatin A (TSA) were added. Cells were treated for 72 h, replacing the culture medium every 24 h.

2.2. Cell viability assay

1 × 10⁴ cells per well were seeded in 96-well plates. After 24 h, cells were treated with RSV (10–100 μ M), TSA (50–150 nM) or 5-aza (1–5 μ M). Subsequently, Prestoblu Cell Viability Reagent (1:10 in culture medium) was added, and the plate was incubated at 37 °C for 30 min. Viable cells were counted by absorbance measurements at 405 nm.

2.3. Caspases activity assay

Caspases activities were measured using the colorimetric Caspase 3 Assay Kit (Sigma-Aldrich). Briefly, 50 μ g of control cells lysates and treated with RSV (10–100 μ M), TSA (50–150 nM) or 5-aza (1–5 μ M) were incubated for four h with the peptide substrate Ac-DEVD-pNA. The absorbance was determined at 405 nm.

2.4. RNA isolation, reverse transcription, and real-time PCR (qRT-PCR) reactions

MCF-7 and MDA-MB-231 cells were treated as described above, washed with PBS, and 1 ml of Trisure reagent (Bioline) was added to each well to isolate total RNA, according to the manufacturer's instructions. Total RNA (1 μ g) was reverse-transcribed using M-MLV reverse transcriptase according to the manufacturer's instructions (Invitrogen). qRT-PCR was performed in triplicate using 50 ng of cDNA with SYBR GreenER qPCR Supermix reagent in a Rotor Gene-Q thermal cycler (Qiagen). β -actin expression was determined to normalize the results. Primer sequences are shown in Table 1.

2.5. Spectrofluorometric determination of Ca²⁺

Control cells and treated with RSV (50 μ M), 5-aza (5 μ M) or TSA

Table 1
Sequence of primers employed for Real-Time PCR and PCR of Bisulfite-modified DNA.

Primer name	Sequence 5'-3'	PCR Product Size (bp)
hSERCA2b	F: CGAACCCCTGCGACTCATCTTC R: TGCCGAGAACGAGCAGGATTTG	189
h-panSERCA3	F: CAGGGGACATTGTAGAAGTGGC R: TGGTCACGGACACAGATTTCAC	126
hSERCA3 promoter	F: CAGATCCACCCCTAGCAG R: TGCAGAGGGGAAAACCTGAGAC	116
h β -actin	F: TGAAGGTGACAGCAGTCGGTTG R: GGCTTTTAGGATGGCAAGGGAC	146
hATP2A3 BSP	F: GGTTTAGGAGATTTAGAGGAG R: CCAAATACCCGAAAAA CATCC	709

F, Forward; R, Reverse.

(50 nM) were charged with 5 μ M of FURA2-AM dye (Invitrogen) in Krebs buffer for 45 min at 37 °C in a humidified 5% CO₂/95% air atmosphere. Cells were then trypsinized and resuspended in Krebs Buffer pH 7.4 for monitoring fluorescence in real time at 340 nm excitation, and 510 nm of emission. Ca²⁺ release from the ER was measured by adding thapsigargin (50 μ M), a specific and irreversible pan-SERCA pump inhibitor.

2.6. HDAC, HAT, and DNMT activities assays

Total HDAC and HAT activities were determined using HDAC Activity Colorimetric Assay Kit, HAT Activity Colorimetric Assay Kit (Biovision), and EpiQuik DNA Methyltransferase Activity/Inhibition Assay Kit (Epigentek). 50 μ g of nuclear extract from MCF-7 and MDA-MB-231 cells treated with RSV or TSA were incubated with the substrates, according to the manufacturer's instructions. Changes in absorbance were monitored during multiple time points at 405 nm (for HDAC substrate), 440 nm (for HAT substrate) or 450 nm (for 5mC).

2.7. Western blot

Fifty μ g of total protein or nuclear extract from MCF-7 and MDA-MB-231 cells were separated by SDS-PAGE and transferred to a PVDF membrane (GE Healthcare Bio-Sciences). The membranes were blocked with 5% nonfat milk for two h. Primary antibodies were incubated overnight at 4 °C, and secondary antibodies were incubated 2 h at RT. Immunodetection was performed using antibodies against HDAC2, MeCP2, and MBD2/3 (Abcam), H3Ac (Millipore) and TFIIB (Santa Cruz Biotechnology) as a loading control. Detection was achieved using the chemiluminescent reactive Super Signal West Dura Extended Duration Substrate (Thermo Fisher). The luminescence of the membranes was captured in a C-Digit Blot Scanner and analyzed using the Image-Studio Lite 5.2.5 software (LI – COR).

2.8. Immunofluorescence and confocal microscopy

MCF-7 and MDA-MB-231 cells were seeded into 8-chamber culture slides (LabTek) at 5 \times 10⁴ cells/ml per chamber overnight and were treated with 50 nM TSA or 50 μ M RSV. Then, cells were fixed with 1% of paraformaldehyde and permeabilized with 1% Triton X-100 followed by blockage of unspecific interaction sites with 3% BSA/PBS. After washing, the slides were incubated with the HDAC2 antibody (Abcam) overnight at 4 °C. Then, cells were incubated with Alexa Flour 488 conjugated anti-rabbit (Molecular Probes) for 2 h at RT. Later, chambers were incubated with DAPI (Sigma Aldrich) for 5 min at RT. After washing with PBS, the slides were mounted using Vectorshield* (Vector Labs). Cells were examined under a Nikon A1R + STORM confocal microscopy. Pictures were analyzed with ImageJ software.

2.9. Chromatin immunoprecipitation (ChIP) assays

MCF-7 and MDA-MB-231 cells were treated with RSV or TSA, and then they were crosslinked using 1% formaldehyde. The reaction was stopped with glycine 0.125 M. The cells were lysed and subjected to sonication in a Biorruptor Pico (Diagenode) sonication device. Immunoprecipitation was done with One-Day ChIP Kit (Diagenode) following the manufacturer instructions with some modifications. Five hundred μ g of the sonicated chromatin was incubated with two μ g of antibody against H3K9Ac, H3K27Ac, and HDAC2 (Abcam).

qRT-PCR quantification was performed using specific primers for the -258 to -143 bp region of the human ATP2A3 promoter (Table 1). The data are shown as relative occupancy of the immunoprecipitated factor with respect to the negative control (anti-IgG antibody), and 10% of input DNA served as a positive control for PCR amplification.

2.10. Bisulfite-modified DNA sequencing

DNA from MCF-7 and MDA-MB-231 cells were treated with sodium bisulfite using EZ DNA Methylation-Direct Kit (Zymo Research). ATP2A3 specific primers (Table 1) were designed using Methyl Primer Express software (Thermo Fisher Scientific) and used to carry out Bisulfite Sequencing PCR (BSP). BSP reactions were carried out with Kapa DNA polymerase (Merck) using 1 μ l of bisulfite-converted genomic DNA in the Eppendorf Gradient Master Cycler, programmed with an initial incubation of 94 °C for 4 min, followed by 45 cycles of 40 s at 94 °C, 30 s at 63 °C, and 60 s at 66 °C, and a final extension step at 72 °C for 5 min. The PCR product was gel-purified and cloned using the CloneJET PCR cloning (Thermo Fisher Scientific). *Escherichia coli* DH5 α cells were transformed with the ligation product, and specific primers for the plasmid were used to screen positive clones. Automated DNA sequencing analyzed the clones harboring the ATP2A3 proximal promoter at the Molecular Biology Unit of the Instituto de Fisiología Celular, UNAM, Mexico. Sequencing data were revised with Chromas software, and methylation analysis and graphic representation were performed with BISMA software (Bisulfite Sequencing DNA Methylation Analysis).

2.11. Statistical analysis

Data were analyzed in GraphPad Prism software and are expressed as the mean of three independent experiments \pm Standard Deviation (SD). Comparisons among experimental groups were made by one-way ANOVA Dunnett's multiple comparison tests. Differences in mean values were considered significant at $p < 0.05$.

3. Results

3.1. Characterization of the effect of RSV, TSA, and 5-aza on cell viability

We compared the effect of RSV with two drugs targeting two different epigenetic mechanisms (TSA, HDACi; and 5-aza, DNMTi) on cell viability in MCF-7 and MDA-MB-231 cells. Cell viability was determined after 72 h of treatment with increasing concentrations of these drugs. We found that RSV and TSA treatments decrease cell viability in a dose-dependent manner in both cell lines. Statistically significant reduction in cell viability by RSV can be observed even at low concentrations (10 μ M), using 50 μ M both cell lines displayed 25% of reduction and with 100 μ M it was reduced around 40–50%. Interestingly, 5-aza treatment did not have an effect on cell viability in both cell lines (Fig. 2A-B). To understand if the reduction of cell viability might be attributed to apoptosis, we measured caspases activities, finding enhanced activity in MCF-7 and MDA-MB-231 cells treated with RSV and TSA. Using 50 and 100 μ M of RSV caspases activation was 2-fold compared to activation in untreated cells (Fig. 2C-D).

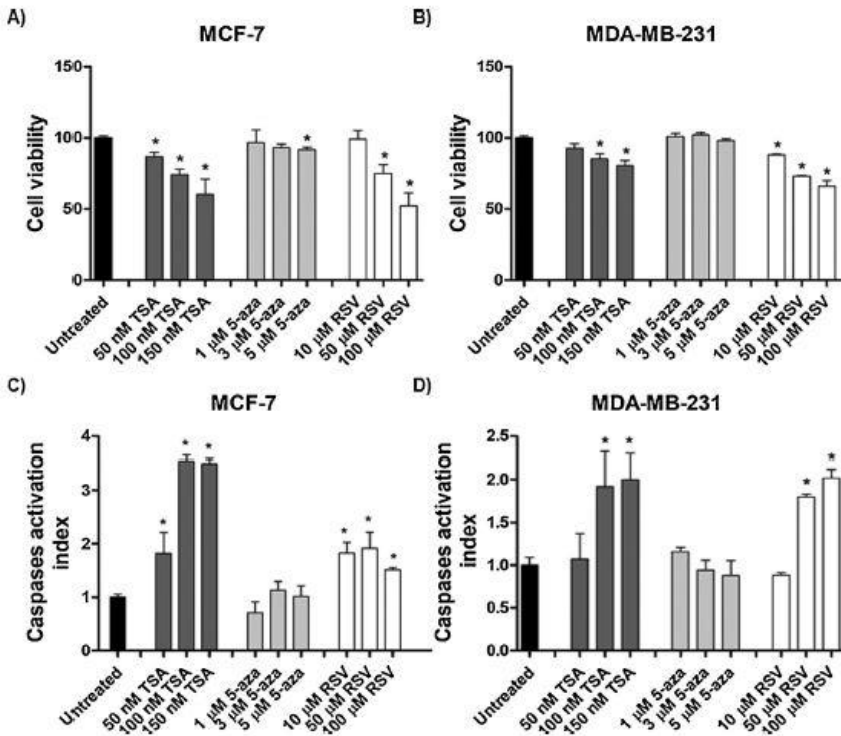


Fig. 2. RSV and TSA decrease cell viability and induce apoptosis in breast cancer cells. (A) MCF-7 and (B) MDA-MB-231 cells were treated with increasing concentrations of TSA (0–150 nM), 5-aza (1–5 μM) and RSV (0–100 μM) during 72 h, then cell viability was determined by colorimetric assays by measuring the metabolic reduction of a resazurin-based solution. (C) MCF-7 and (D) MDA-MB-231 cells were treated with increasing concentrations of TSA (0–150 nM), 5-aza (1–5 μM) or RSV (0–100 μM) during 72 h; then caspases activity was determined by colorimetric assays using the peptide substrate Ac-DEVD-pNA, which is cleaved by several caspases. Values in the figures are means \pm SD of three independent experiments (N = 3). One-way ANOVA Dunnett's multiple comparison tests, * $p < 0.05$.

3.2. The effect of RSV, TSA, and 5-aza on the expression of SERCA genes and Ca^{2+} management in breast cancer cells

When we compared the effects of RSV, TSA, and 5-aza treatments on SERCA2 and SERCA3 mRNA levels, we found that RSV elicits an increase in the relative SERCA3 mRNA level even more than TSA. RSV increased *ATP2A3* expression 2.5-fold in MCF-7 and 6-fold in MDA-MB-231 cells, whereas TSA increased 2-fold and 2.5-fold, respectively (Fig. 3A). 5-aza did not increase the SERCA3 mRNA level. The SERCA2 mRNA level was not modified by RSV, TSA, or 5-aza treatments.

We examined the effect of RSV, TSA, and 5-aza on Ca^{2+} management and found that in response to pharmacological treatments, the basal cytosolic $[Ca^{2+}]_i$ and Ca^{2+} content inside the ER was different between the two cell lines. Whereas TSA and 5-aza did not trigger changes either in cytosolic $[Ca^{2+}]_i$ nor in Tg-induced Ca^{2+} release in both cell lines (Fig. 3B), RSV elicited opposite effects. The basal cytosolic $[Ca^{2+}]_i$ in MCF-7 cells treated with RSV was lower ($111.8 \text{ nM} \pm 5.75$) than in untreated cells ($157.5 \text{ nM} \pm 26.5$); in contrast, basal cytosolic $[Ca^{2+}]_i$ in MDA-MB-231 cells treated with RSV was higher ($117.6 \text{ nM} \pm 4.2$) compared to untreated cells ($49.8 \text{ nM} \pm 5.2$) (Fig. 3B). Furthermore, Ca^{2+} release capacity from the ER was also specific for each cell line. In MCF-7 cells, RSV decreased the Tg-induced Ca^{2+} release ($86.2 \text{ nM} \pm 9.5$) compared to untreated cells ($144.1 \text{ nM} \pm 18.2$). In MDA-MB-231 cells, an opposite effect was observed, RSV increased the Tg-induced Ca^{2+} release ($544.1 \text{ nM} \pm 21.7$) compared to untreated cells ($442.98 \text{ nM} \pm 14.5$) (Fig. 3B).

3.3. HDAC activity, expression, and localization after RSV and TSA treatments

We compared the function of RSV and TSA as HDAC inhibitors. Therefore, we investigated the effect of TSA and RSV on HDAC class I and II activities. Both TSA and RSV inhibit HDAC class I and II activities at different extent in nuclear extracts derived from MCF-7 and MDA-

MB-231 cells, albeit HDAC from MCF-7 cells are more prone to the inhibition by RSV than MDA-MB-231 cells with 71.2% vs. 14.1% of inhibition, respectively (Fig. 4A).

RSV has been previously proposed as a potential pan-HDAC inhibitor (Venturelli et al., 2013), although it has not been demonstrated that RSV can bind to the catalytic site of HDACs class I and II. Then, we used nuclear extract derived from untreated MCF-7 and MDA-MB-231 cells, and we added increasing concentrations of RSV (0–100 μM), finding that RSV inhibits HDAC activity in a dose-dependent manner in both cell lines (Fig. 4B). Fifty nM of TSA was used as a positive control since it is known that TSA inhibits HDACs activities by chelating a zinc ion, which is essential for their enzymatic activity (Vanhaecke et al., 2004).

Both cell lines showed an increased pattern of acetylation on histone H3 with TSA or RSV; the RSV-induced increase with RSV was 50% (Fig. 4C-E). Nevertheless, when we assessed HDAC2, we noticed that nuclear HDAC2 protein levels were reduced in nuclear extracts from MCF-7 and MDA-MB-231 cells treated with RSV (Fig. 4C-E). We also examined the subcellular localization of HDAC2 protein through immunofluorescence and confocal microscopy, finding that the nuclear localization of HDAC2 was not affected in MCF-7 and MDA-MB-231 cells when treated with RSV or TSA, although MCF-7 cells also showed cytosolic HDAC2 presence when treated with TSA and RSV (Fig. 4F-G). Analysis of HDAC2 expression in the total extract from MCF-7 and MDA-MB-231 cells showed no changes in HDAC2 expression (Fig. 4H-I).

3.4. RSV and TSA-mediated HAT activity in breast cancer cells

Histone acetyltransferases (HATs) perform the opposite activity compared to HDACs enzymes. When we measured HAT enzymatic activity in nuclear extracts, we noted that both treatments strongly increase HAT activity in MCF-7 cells (RSV by 368% and TSA by 210%), whereas the activity in MDA-MB-231 did not change significantly

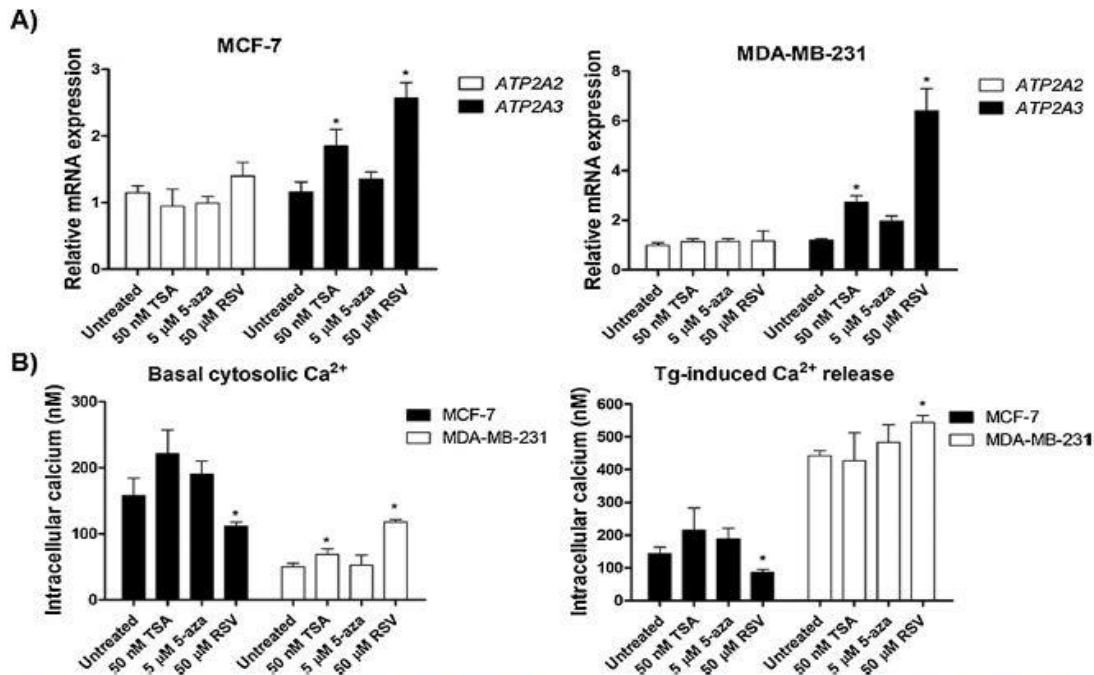


Fig. 3. RSV and TSA induce *ATP2A3* gene expression and remodeling of Ca^{2+} management in breast cancer cells. (A) MCF-7 and MDA-MB-231 cells were treated with 50 nM of TSA, 5 μM of 5-aza or 50 μM of RSV during 72 h. Then total RNA was isolated and 1 μg was retro-transcribed to determine *SERCA2b* and *SERCA3* mRNA expression by qRT-PCR using 50 ng of cDNA. Control cells treated only with the vehicle were considered as one. (B) MCF-7 and MDA-MB-231 cells were treated with TSA (50 nM), 5-aza (5 μM) or RSV (50 μM) during 72 h; then cells were charged with FURA2-AM (5 μM) to determine Ca^{2+} concentration in basal conditions and in response to stimuli. Changes in the fluorescence were monitored in a spectrofluorometer in real time at 340 nm excitation and 510 nm emission wavelength. Ca^{2+} release from the ER was measured by adding thapsigargin (50 μM). Data are expressed as means \pm SD of three independent experiments, each performed in triplicates (N = 3). One-way ANOVA Dunnett's multiple comparison tests, *indicates values with $p < 0.05$ for experimental conditions compared to the control.

(Fig. 5A). We determined the *SERCA3* mRNA expression under pharmacologically inhibited p300 activity, one of the main HATs that regulates gene transcription through chromatin remodeling. C646 is a specific p300-inhibitor (Bowers et al., 2010), and treatment of both cell lines with this compound did not alter the RSV-induced *SERCA3* mRNA levels (Fig. 5B). However, when we combined C646 with RSV, *SERCA3* mRNA upregulation by RSV was partially prevented in MDA-MB-231 cells (Fig. 5B).

3.5. Relative occupancy of H3K9Ac, H3K27Ac, and HDAC2 on human *ATP2A3* gene promoter in breast cancer cells

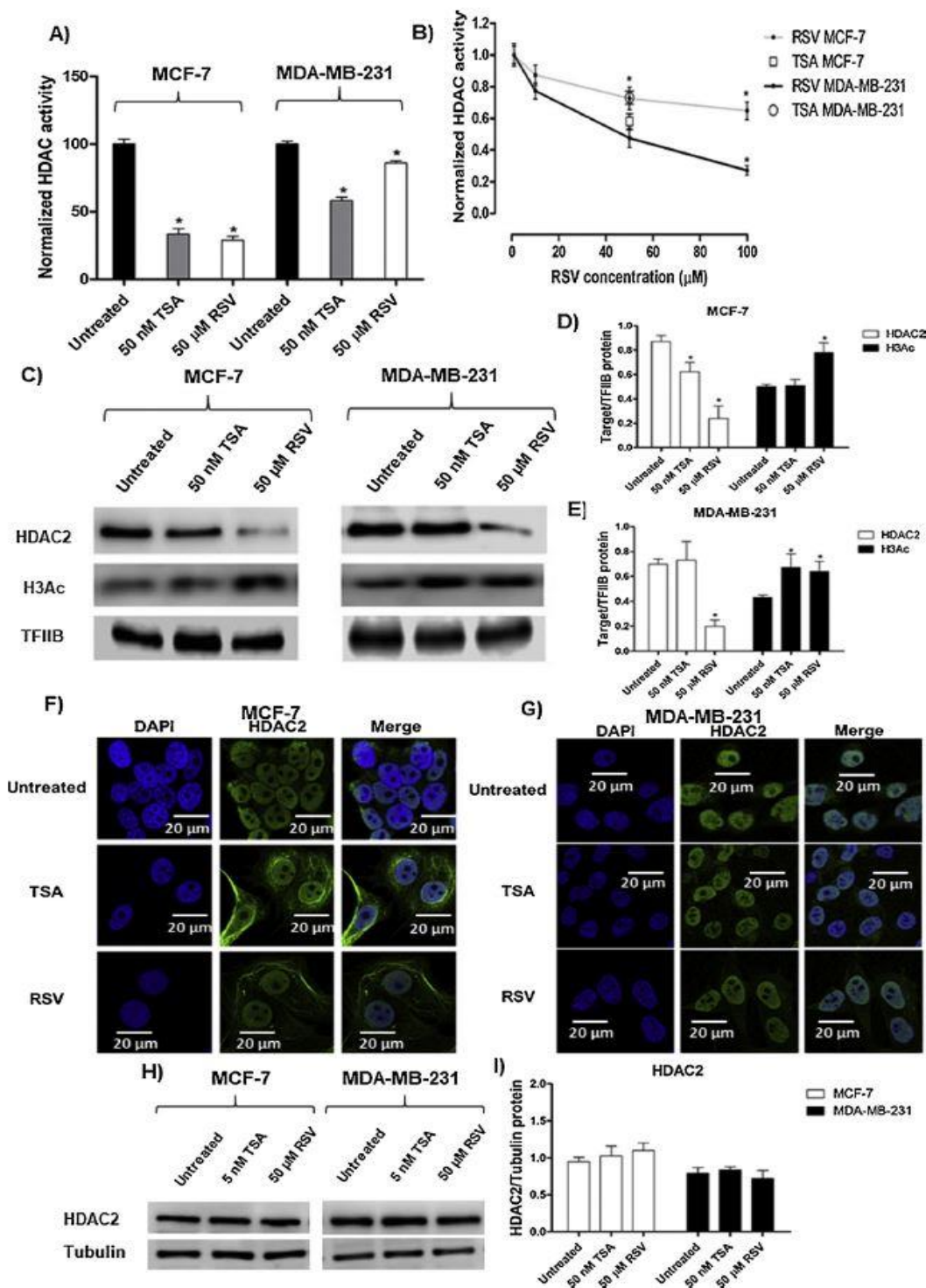
We performed ChIP assays to determine the presence of acetylation-related histone marks for transcriptional activation H3K9Ac and H3K27Ac on human *ATP2A3* promoter in cells treated with RSV or TSA. The results indicate that H3K9Ac and H3K27Ac remained unchanged in MCF-7 cells treated with TSA or RSV (Fig. 6A). On the other hand, H3K9Ac also remained unchanged in MDA-MB-231 cells treated with TSA or RSV, but there is an enrichment of 78% in H3K27Ac in cells treated with TSA or RSV compared to untreated cells (Fig. 6B). Additionally, HDAC2 relative occupancy on *ATP2A3* proximal promoter decreases 63% in MDA-MB-231 cells with RSV treatment (Fig. 6C). Fig. 6D shows the acetylation and trimethylation pattern of H3K9 and H3K27 on the human *ATP2A3* gene in MCF-7 cells, according to ChIP-seq data published by the ENCODE project. It can be seen that there are ChIP-seq peaks only for H3K9Ac and H3K27Ac histone marks in the region corresponding to the *ATP2A3* promoter, while no peaks for H3K9me3 and H3K27me3 are observed.

3.6. DNMT activity and Methyl-CpG binding proteins expressed in response to RSV in breast cancer cells

Next, we analyzed the effect of RSV as a potential CpG DNA methylation inhibitor. DNMT activity in nuclear extracts obtained from MDA-MB-231 was decreased with RSV to comparable levels observed with 5-aza, 70% vs. 62%, respectively (Fig. 7A). On the other hand, DNMT activity in MCF-7 cells was not affected either with 5-aza nor RSV. We also analyzed the levels of the Methyl-CpG binding proteins MeCP2 and MBD2; finding that both proteins were significantly decreased in cells treated with RSV, and in smaller proportion with 5-aza (Fig. 7B-D). However, analysis of CpG methylation in *ATP2A3* gene promoter revealed that it is essentially un-methylated in MCF-7 and MDA-MB-231 cells (Fig. 7E). Interestingly, a portion of the 5'-NT region near to the translation initiation codon of the *ATP2A3* gene exon 1 was mostly methylated in MDA-MB-231 cells but un-methylated in MCF-7 cells.

4. Discussion

Aberrant gene expression is one of the earliest events in carcinogenesis, and it is involved in all hallmarks of cancer (Jones and Baylin, 2007). For this reason, it is not surprising that proteins involved in epigenetic processes and chromatin remodeling undergo mutations or alterations in their expression and function in cancer cells (Morgan and Shilatifard, 2015). The reversibility of epigenetic events makes them an attractive target for drug development, in fact some epigenetic drugs have been tested in clinical practices with good outcomes (Crump et al., 2008; Duvic et al., 2007; Richardson et al., 2008).



(caption on next page)

Phytoestrogens intake have been associated with a lower risk of developing several types of cancer, mainly breast cancer (Persson, 2000; Zhang et al., 2017) and has been observed as an efficient

therapeutically agent against ER-α positive and triple negative breast cancer (Horgan et al., 2019; Poschner et al., 2019). It has been reviewed in the literature the role of phytoestrogens as epigenetic modulators to

Fig. 4. RSV decreases HDAC activity and nuclear HDAC2 expression, increasing total acetylation on histone H3 in breast cancer cells. (A) MCF-7 and MDA-MB-231 cells were treated with 50 nM of TSA or 50 μ M of RSV during 72 h, and then nuclear extracts were isolated to determine HDAC activity using the HDAC colorimetric substrate, which comprises an acetylated lysine side chain. (B) Nuclear extracts of untreated MCF-7 and MDA-MB-231 cells were used to determine the percentage of inhibition in HDAC activity produced by increasing concentrations of RSV (0–100 μ M). Values in the figures are means \pm SD of three independent experiments (N = 3). HDAC2 and total H3Ac protein levels were determined by Western blot, showing (C) a representative WB image and the normalized values obtained by densitometric analysis for two independent experiments (N = 2) in (D) MCF-7 and (E) MDA-MB-231 cells. (F) MCF-7 and (G) MDA-MB-231 cells were treated with 50 nM of TSA or 50 μ M of RSV during 72 h, and they were fixed with 1% of paraformaldehyde, incubated with anti-HDAC2 antibody, washed and observed by confocal microscopy. Pictures were analyzed with ImageJ software. The image is representative of two independent experiments (N = 2). Expression of total HDAC2 protein in MCF-7 and MDA-MB-231 cells, showing a representative WB image (H), and the normalized values obtained by densitometric analysis (I) for two independent experiments (N = 2). One-way ANOVA Dunnett's multiple comparison tests, * p < 0.05.

explain the health benefits observed in several investigations (Khan et al., 2012; Carlos-Reyes et al., 2019; Singh et al., 2019). Based on the evidence that RSV had shown activity as epigenetic regulator (Kala and Tollefsbol, 2016; Venturelli et al., 2013; Mirza et al., 2013; Gao and Tollefsbol, 2018), and since we previously demonstrated that it promotes the expression of the human *ATP2A3* gene in breast cancer cells (Izquierdo-Torres et al., 2017), we decided to investigate whether *ATP2A3* up-regulation by RSV was mediated by epigenetic events, specifically histone acetylation and CpG DNA methylation.

4.1. RSV and TSA decrease cell viability and induce apoptosis in breast cancer cells

We compared the effect of RSV with two drugs targeting different epigenetic mechanisms (TSA targeting HDAC, and 5-aza targeting DNMTs). RSV and TSA decrease cell viability in a dose-dependent manner (Fig. 2A). This reduced cell viability can be attributed to apoptosis since caspases activation was detected in response to RSV and TSA in MCF-7 and MDA-MB-231 cells (Fig. 2B) as previously reported (Izquierdo-Torres et al., 2017; Kim and Bae, 2011).

4.2. RSV induces *ATP2A3* gene expression in breast cancer cells and remodeling of Ca^{2+} management in breast cancer cells

We noted that RSV only up-regulates the expression of *ATP2A3* gene, whereas the housekeeping *ATP2A2* gene did never change. Based on the induction of *ATP2A3* gene (Izquierdo-Torres et al., 2017) we selected 50 μ M of RSV for the remaining experiments, this concentration is within the range used in literature to study the effect of RSV on different cell targets and even is a reachable RSV blood plasma concentration after oral or intravenous administration in rats (Colom et al., 2011; Juan et al., 2010; Alayev et al., 2015; Khan et al., 2014; Qin et al., 2014).

Resveratrol enhanced SERCA3 mRNA expression in MCF-7 and MDA-MB-232 cells even more than TSA. Our data indicate that changes in the expression of SERCA genes by RSV have functional implications due to induction of apoptosis and alterations in cytosolic $[Ca^{2+}]$ management (Figs. 2C-D and 3B). Basal cytosolic $[Ca^{2+}]$ was lower in RSV-treated MCF-7 cells compared to untreated cells; MDA-MB-231 cells showed the opposite effect. The response to SERCA inhibition activity with thapsigargin was also different among both cell lines.

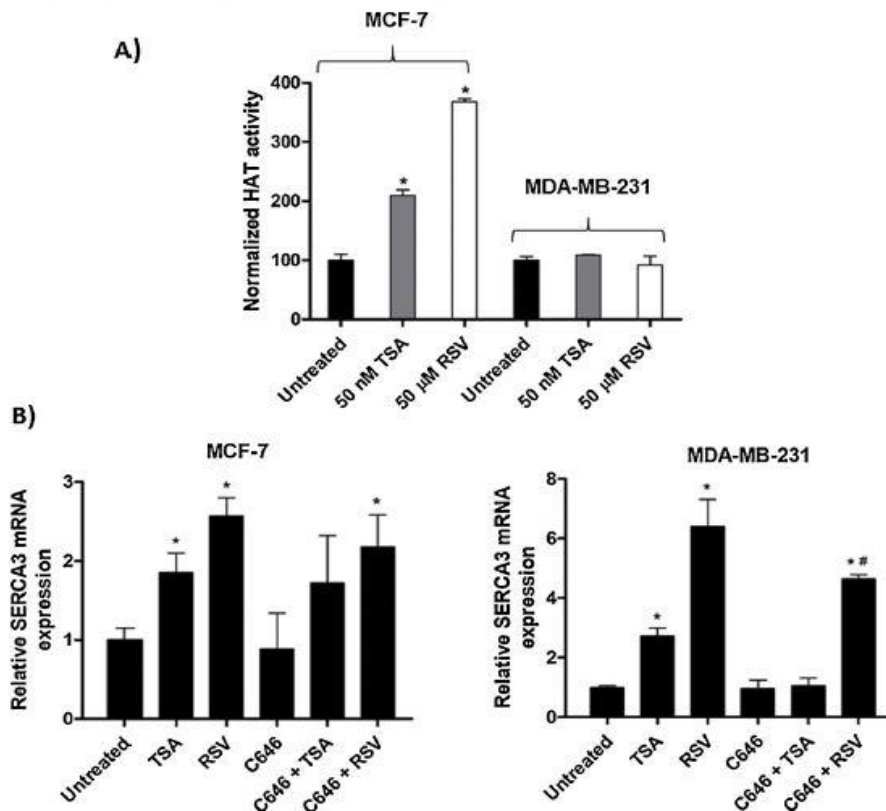


Fig. 5. RSV and TSA increased HAT activity, but combined treatment with a p300 inhibitor does not alter SERCA3 mRNA expression. (A) MCF-7 and MDA-MB-231 cells were treated with 50 nM of TSA or 50 μ M of RSV during 72 h, and then nuclear extracts were isolated to determine HAT activity through spectrophotometric detection of NADH produced by CoA release due to acetylation of a peptide substrate by HATs. (B) MCF-7 and MDA-MB-231 cells were treated with 50 nM of TSA, 50 μ M of RSV, 1 μ M of p300-inhibitor C646, TSA + C646 or RSV-C646 during 72 h. Then total RNA was isolated and 1 μ g was retro-transcribed to determine SERCA3 mRNA expression by qRT-PCR using 50 ng of cDNA. Values in the figures are means \pm SD of three independent experiments (N = 3); One-way ANOVA Dunnett's multiple comparison tests, * p < 0.05.

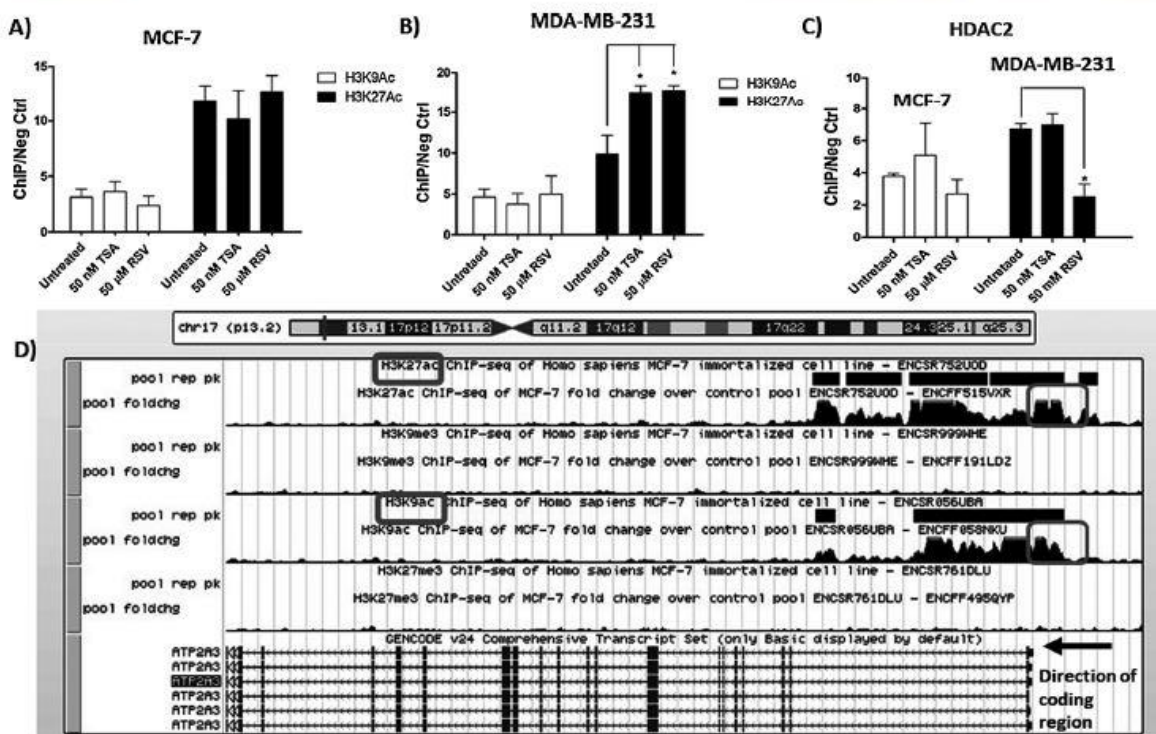


Fig. 6. RSV increases H3K27Ac and decrease HDAC2 relative occupancy on human *ATP2A3* promoter in MDA-MB-231 breast cancer cells, but not in MCF-7 cells. (A) MCF-7 and (B) MDA-MB-231 cells were treated with 50 nM of TSA or 50 μM of RSV during 72 h. Cells were crosslinked with a buffer containing 1% formaldehyde and then they were lysed, and chromatin was sheared. Chromatin Immunoprecipitation (ChIP) assays were performed using H3K9Ac, H3K27Ac and (C) HDAC2 antibodies to determine the relative occupancy of these proteins with respect to the negative control (anti-IgG antibody) on the human *ATP2A3* promoter, through qRT-PCR. A 10% input DNA served as a positive control for PCR amplification. (D) Acetylation and trimethylation pattern of H3K9 and H3K27 on the human *ATP2A3* gene in MCF-7 cells, according to ChIP-seq data published by ENCODE Project. Values in the figures are means \pm SD of three independent experiments (N = 3); One-way ANOVA Dunnett's multiple comparison tests, *p < 0.05.

Ca²⁺ release from ER in RSV-treated MCF-7 cells was lesser than untreated cells, whereas MDA-MB-231 cells showed the opposite effect (Fig. 3B). We suggest that the biochemical characteristics of SERCA isoforms play a key role in this phenomenon. SERCA2b has 6-times greater Ca²⁺ affinity ($K_{Ca^{2+}} = 0.2 \mu\text{M}$) than SERCA3 ($K_{Ca^{2+}} = 1.2$) (Chandrasekera et al., 2009; Dode et al., 2002). Differences in Ca²⁺ transport speed, the relative abundance of SERCA isoforms and variation in levels of other Ca²⁺ handling proteins likewise play a crucial role in Ca²⁺ homeostasis in a specific cellular context. Consequently, the prediction of Ca²⁺ variations only by analyzing the SERCA expression is challenging. Similar results were found by Gelebart et al. (2002) when compared normal KATO-III gastric cancer cells with cells treated with the HDACi butyrate. This treatment induces SERCA3 over-expression, and basal cytosolic Ca²⁺ was higher, and ER Ca²⁺ release was lower in butyrate-treated cells (Gelebart et al. (2002)).

Additionally, one of the main differences among MCF-7 and MDA-MB-231 cells is their status in ER- α expression, which is important to modulate cell behavior in breast cancer cells. Ca²⁺ and the Unfolded Protein Response (UPR) are key mediators in ER- α activation (Divekar et al., 2011; Livezey et al., 2018); this could, at least in part, explain the differences in Ca²⁺ management in these two cell lines in response to RSV and is an interesting field for upcoming research.

4.3. RSV and TSA decrease HDAC activity in breast cancer cells, but only RSV treatment decreases the abundance of nuclear HDAC2

Although RSV is considered an activator of SIRT1, sirtuins belong to the HDACs class III and differ from classical HDACs class I, II and IV in

several aspects, such as structure, substrate specificity and dependence on cofactors (Haigis and Sinclair, 2010; Kupis et al., 2016), thus, it is possible that HDAC negative regulation by RSV may be through different mechanism(s). Moreover, RSV and other SIRT1 activators accelerated skin repair in a mouse model, and the same effect can be achieved by HDAC inhibitors such as TSA (Spallotta et al., 2013). Our results suggest that RSV is an HDAC inhibitor not only due to the reduction of HDAC activity (as a potentially catalytic site-mediated inhibitor) (Fig. 4A-B) but also by decreasing nuclear HDAC2 protein levels, according to our Western blot and immunofluorescence experiments (Fig. 4C-I).

4.4. RSV and TSA increase HAT activity in breast cancer cells

The RSV-mediated HDAC inhibition is enough to favor the gain of histone acetylation; nevertheless, the gain of total acetylation (Fig. 4C-E) could be stronger since RSV and TSA increased HAT activity in MCF-7 cells (Fig. 5A). These results agree with previous reports which show that RSV, pterostilbene, epigallocatechin-3-gallate (EGCG) and sulforaphane (SFN), reactivate the expression of ER- α in triple negative breast cancer cells through reversing the epigenetic aberrations that keep it silent, such as reduced HAT activity and increased HDAC and DNMT activities, neutralizing the heterochromatin context and re-sensitizing these cell lines to tamoxifen treatment (Li et al., 2017; Kala and Tollefsbol, 2016). This phenomenon was also previously observed by Kala and Tollefsbol when treated MDA-MB-157 and HCC1806 triple-negative breast cancer cells with RSV and pterostilbene to reactivate the expression of ER- α and observed decreased HDAC activity and

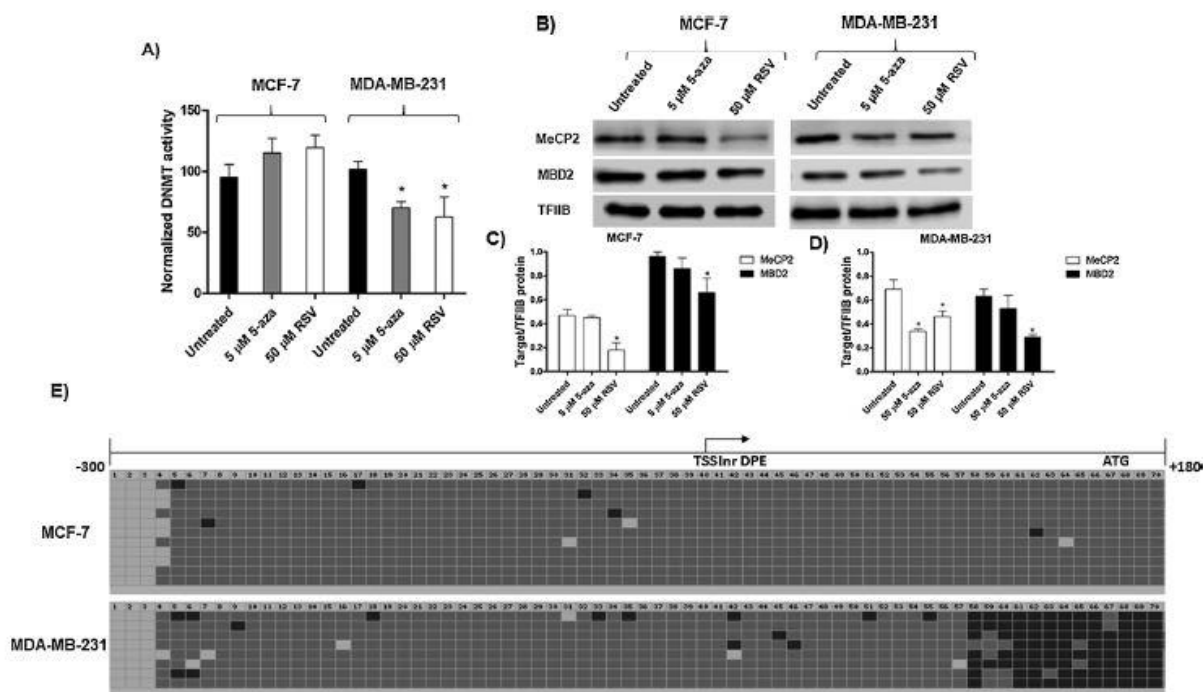


Fig. 7. RSV decreases DNMT activity and MBDs expression in breast cancer cells. (A) MCF-7 and MDA-MB-231 cells were treated with 5 μM of 5-aza or 50 μM of RSV during 72 h, and then nuclear extracts were isolated to determine DNMT activity through the methylation of a CG-rich substrate and colorimetric detection of 5mC using specific antibodies. Values in the figures are means ± SD of three independent experiments (N = 3). MeCP2 and MBD2 levels were determined by Western blot, showing (B) a representative WB image and the normalized values obtained by densitometric analysis for two independent experiments (N = 2) in (C) MCF-7, and (D) MDA-MB-231 cells. (E) MCF-7 and MDA-MB-231 cells were cultured. Genomic DNA was treated with sodium bisulfite, and *ATP2A3* promoter was amplified by PCR using methyl-specific primers. PCR product was cloned into a plasmid to transform DH5α *E. coli* cells. Plasmids containing the PCR product with *ATP2A3* promoter from both cell lines were purified and sequenced to determine the CpG methylation pattern. One-way ANOVA Dunnett's multiple comparison tests, *p < 0.05.

increased HAT activity, as well as H3K9Ac enrichment on ER-α promoter (Kala and Tollefsbol, 2016).

However, when we used the p300-specific inhibitor C646, *ATP2A3* induction by RSV barely showed changes (Fig. 5B). Although we used a higher concentration (1 μM) of C646 compared to its Ki (400 nM) (Bowers et al., 2010), other studies have used 10 or 15-fold higher concentrations (Dou et al., 2018; Wang et al., 2017). Thus, it is possible that the concentration we used was not enough to prevent the RSV-mediated *ATP2A3* induction.

4.5. RSV increases H3K27Ac and decrease HDAC2 relative occupancy on *ATP2A3* promoter in MDA-MB-231 breast cancer cells, but not in MCF-7 cells

The RSV-mediated activity of HDAC and HAT enzymes might create a favorable environment for transcription due to the gain of acetylation associated with transcriptional activation (Rothbart and Strahl, 2014). Accordingly, we observed an enrichment of H3K27Ac, but not H3K9Ac, on *ATP2A3* promoter in MDA-MB-231 cells treated with RSV or TSA (Fig. 6B). Surprisingly, there were no changes in levels neither on H3K9Ac nor H3K27Ac in MCF-7 cells under our experimental conditions (Fig. 6A). A possible explanation is that *SERCA3* has been proposed as a differentiation marker (Flores-Peredo et al., 2017), and the cell lines used in our experiments represent different grades of differentiation. MCF-7 cells represent a luminal breast cancer subtype; in contrast, MDA-MB-231 represents a triple negative breast cancer subtype (Subik et al., 2010), which is a less differentiated and the most aggressive form of breast cancer (Hon et al., 2016). According to our results, the induction of *ATP2A3* gene by RSV is higher in MDA-MB-231 cells than in MCF-7 cells (Fig. 3A). Analysis of the threshold cycle value

in real-time RT-PCR indicates that *SERCA3* expression in MDA-MB-231 is much less abundant compared to MCF-7 cells under normal growing conditions, supporting the previously proposed idea that *SERCA3* expression is a useful differentiation marker (Papp and Brouland, 2011). Additionally, Varga et al. 2018 demonstrated that PMCA and *SERCA* Ca²⁺ pumps expression is differentially regulated in a subtype specific manner when breast cancer cell lines are treated with HDACi (Varga et al., 2018).

In addition to our results, ChIP-seq data consulted from ENCODE Project show that H3K9 and H3K27 are hyperacetylated in normal conditions on *ATP2A3* promoter in MCF-7 cells (Fig. 6D), there is no data available for MDA-MB-231 cells.

RSV might also act disrupting, destabilizing or by inhibiting chromatin remodeling complexes; for instance, RSV showed the capacity to promote PTEN expression through inhibition of MTA1/HDAC complex in DU145 and PC3M prostate cancer cells (Dhar et al., 2015). Our results demonstrate that RSV treatment decrease HDAC2 occupancy on the *ATP2A3* promoter (Fig. 6C), probably inhibiting an *ATP2A3* silencing complex.

4.6. RSV decreased DNMT activity and Methyl-CpG binding proteins expression in breast cancer cells

As previously reported in MDA-MB-157 and MDA-MB-231 cells (Li et al., 2017; Kala and Tollefsbol, 2016), we confirmed a DNMT inhibition activity in response to phytoestrogens treatment (RSV), although we observed the DNMT inhibition only in MDA-MB-231 cells, whereas MCF-7 cells did not show reduced or increased DNMT activity (Fig. 7A). MeCP2 and MBD2 are proteins that usually bind methylated DNA (Bogdanovic and Veenstra, 2009). We assessed MeCP2 and MBD2

levels in the total extract from MCF-7 and MDA-MB-231 cells, finding that both proteins are reduced when cells were treated with RSV or 5-aza (Fig. 7B-D); however, the *ATP2A3* promoter in both cell lines is unmethylated (Fig. 7E). Therefore, we conclude that methylation of *ATP2A3* promoter does not play a crucial role in its RSV-induced up-regulation in breast cancer cells. Medina-Aguilar et al. analyzed the effect of RSV on the genome-wide methylation, identifying the set of genes that were hypermethylated or hypomethylated in response to RSV treatment (Medina-Aguilar et al., 2017) and *ATP2A3* was not detected, suggesting that RSV exerts its function by additional mechanisms, not only through changes in DNA methylation patterns.

4.7. Conclusions and future perspectives

In conclusion, RSV induces *ATP2A3* gene expression in MCF-7 and MDA-MB-231 breast cancer cells, triggering apoptosis, and remodeling in Ca^{2+} homeostasis. The transactivation of *ATP2A3* is correlated with reduced HDAC2 nuclear expression, reduced global HDAC activity, and enhanced global HAT activity, eliciting the enrichment of transcriptional activation histone mark H3K27Ac on *ATP2A3* promoter. DNA methylation does not play an important role in RSV-mediated *ATP2A3* up-regulation due to, although the DNMT activity was reduced, *ATP2A3* promoter is un-methylated in these cell lines. Taken together, these results contribute to the understanding of RSV-associated anticancer effect.

Although there has been intense research for years on the benefits of RSV intake on human health and disease (Fig. 1), its mechanism(s) are not fully understood. RSV and its analogs have been tested in several *in vitro* and *in vivo* studies as well as clinical trials with good outcomes (Singh et al., 2019). The complete understanding about how this and other chemopreventive agents work would give us the chance to develop more therapeutic and adjuvant options for cancer patients, consolidating the nutriepigenomics field as an important ally against cancer and other public health problems.

Funding

This work was supported by grants Dirección General de Asuntos del Personal Académico-PAPIIT-UNAMIN217216, IV200218 and IN219219 to A.Z.-H. E. I-T was supported by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología434893 Ph.D. scholarship.

Acknowledgment

We thank Dr. Cristina Castañeda Patlán from Facultad de Medicina, UNAM and Dr. Miguel Tapia Rodríguez from Unidad de Microscopía of Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, for their technical assistance in Western blots and Confocal microscopy experiments, respectively.

References

Berridge, M.J., Bootman, M.D., Roderick, H.L., 2003. Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4, 517–529.

Brini, M., Carafoli, E., 2009. Calcium pumps in health and disease. *Physiol. Rev.* 89, 1341–1378.

Periasamy, M., Kalyanasundaram, A., 2007. SERCA pump isoforms: their role in calcium transport and disease. *Muscle Nerve* 35, 430–442.

Gelebart, P., Kovacs, T., Brouland, J.P., van Gorp, R., Grossmann, J., Rivard, N., Panis, Y., Martin, V., Bredoux, R., Enouf, J., Papp, B., 2002. Expression of endomembrane calcium pumps in colon and gastric cancer cells. Induction of SERCA3 expression during differentiation. *J. Biol. Chem.* 277, 26310–26320.

Papp, B., Brouland, J.P., 2011. Altered endoplasmic reticulum calcium pump expression during breast tumorigenesis. *Breast Cancer (Auckl)* 5, 163–174.

Duffy, C., Perez, K., Partridge, A., 2007. Implications of phytoestrogen intake for breast cancer. *CA Cancer J. Clin.* 57, 260–277.

Khan, S.I., Aumusuwan, P., Khan, L.A., Walker, L.A., Dasmahapatra, A.K., 2012. Epigenetic events associated with breast cancer and their prevention by dietary components targeting the epigenome. *Chem. Res. Toxicol.* 25, 61–73.

Cottart, C.H., Nivet-Antoine, V., Beaudeau, J.L., 2014. Review of recent data on the

metabolism, biological effects, and toxicity of resveratrol in humans. *Mol. Nutr. Food Res.* 58, 7–21.

Al Fatease, A., Shah, V., Nguyen, D.X., Cote, B., LeBlanc, N., Rao, D.A., Alani, A.W., 2019. Chemosensitization and mitigation of Adriamycin-induced cardiotoxicity using combinational polymeric micelles for co-delivery of quercetin/resveratrol and resveratrol/curcumin in ovarian cancer. *Nanomedicine*.

Jin, X., Wei, Y., Liu, Y., Lu, X., Ding, F., Wang, J., Yang, S., 2019. Resveratrol promotes sensitization to Doxorubicin by inhibiting epithelial-mesenchymal transition and modulating SIRT1/beta-catenin signaling pathway in breast cancer. *Cancer Med.* 8, 1246–1257.

Li, Y., Meeran, S.M., Tollefsbol, T.O., 2017. Combinatorial bioactive botanicals re-sensitize tamoxifen treatment in ER-negative breast cancer via epigenetic reactivation of ERalpha expression. *Sci. Rep.* 7, 9345.

Carlos-Reyes, A., Lopez-Gonzalez, J.S., Meneses-Flores, M., Gallardo-Rincon, D., Ruiz-Garcia, E., Marchat, L.A., Astudillo-de la Vega, H., Hernandez de la Cruz, O.N., Lopez-Camarillo, C., 2019. Dietary compounds as epigenetic modulating agents in cancer. *Front. Genet.* 10, 79.

Li, Y., Chen, H., Hardy, T.M., Tollefsbol, T.O., 2013. Epigenetic regulation of multiple tumor-related genes leads to suppression of breast tumorigenesis by dietary genistein. *PLoS One* 8, e54369.

Kala, R., Tollefsbol, T.O., 2016. A novel combinational epigenetic therapy using resveratrol and pterostilbene for restoring estrogen receptor-alpha (ERalpha) expression in ERalpha-negative breast cancer cells. *PLoS One* 11, e0155057.

Hu, C., Liu, Y., Teng, M., Jiao, K., Zhen, J., Wu, M., Li, Z., 2019. Resveratrol inhibits the proliferation of estrogen receptor-positive breast cancer cells by suppressing EZH2 through the modulation of ERK1/2 signaling. *Cell Biol. Toxicol.*

Horgan, X.J., Tatum, H., Brannan, E., Paul, D.H., Rhodes, L.V., 2019. Resveratrol analogues surprisingly effective against triple-negative breast cancer, independent of ERalpha. *Oncol. Rep.* 41, 3517–3526.

Izquierdo-Torres, E., Rodriguez, G., Meneses-Morales, I., Zarain-Heinzberg, A., 2017. *ATP2A3* gene as an important player for resveratrol anticancer activity in breast cancer cells. *Mol. Carcinog.* 56, 1703–1711.

Venturelli, S., Berger, A., Bocker, A., Busch, C., Weiland, T., Noor, S., Leischner, C., Schleicher, S., Mayer, M., Weiss, T.S., Bischoff, S.C., Lauer, U.M., Bitzer, M., 2013. Resveratrol as a pan-HDAC inhibitor alters the acetylation status of histone [corrected] proteins in human-derived hepatoblastoma cells. *PLoS One* 8, e73097.

Vanhaecke, T., Papeleu, P., Elaut, G., Rogiers, V., 2004. Trichostatin A-like hydroxamate histone deacetylase inhibitors as therapeutic agents: toxicological point of view. *Curr. Med. Chem.* 11, 1629–1643.

Bowers, E.M., Yan, G., Mukherjee, C., Orry, A., Wang, L., Holbert, M.A., Crump, N.T., Hazzalin, C.A., Liszczak, G., Yuan, H., Larocca, C., Saldanha, S.A., Abagyan, R., Sun, Y., Meyers, D.J., Marmorstein, R., Mahadevan, L.C., Alani, R.M., Cole, P.A., 2010. Virtual ligand screening of the p300/CBP histone acetyltransferase: identification of a selective small molecule inhibitor. *Chem. Biol.* 17, 471–482.

Jones, P.A., Baylin, S.B., 2007. The epigenomics of cancer. *Cell* 128, 683–692.

Morgan, M.A., Shilatifard, A., 2015. Chromatin signatures of cancer. *Genes Dev.* 29, 238–249.

Crump, M., Coiffier, B., Jacobsen, E.D., Sun, L., Ricker, J.L., Xie, H., Frankel, S.R., Randolph, S.S., Cheson, B.D., 2008. Phase II trial of oral vorinostat (suberoylanilide hydroxamic acid) in relapsed diffuse large-B-cell lymphoma. *Ann. Oncol.* 19, 964–969.

Duvic, M., Talpur, R., Ni, X., Zhang, C., Hazarika, P., Kelly, C., Chiao, J.H., Reilly, J.F., Ricker, J.L., Richon, V.M., Frankel, S.R., 2007. Phase 2 trial of oral vorinostat (suberoylanilide hydroxamic acid, SAHA) for refractory cutaneous T-cell lymphoma (CTCL). *Blood* 109, 31–39.

Richardson, P., Mitsiades, C., Colson, K., Reilly, E., McBride, L., Chiao, J., Sun, L., Ricker, J., Rizvi, S., Oerth, C., Atkins, B., Fearon, I., Anderson, K., Siegel, D., 2008. Phase I trial of oral vorinostat (suberoylanilide hydroxamic acid, SAHA) in patients with advanced multiple myeloma. *Leuk. Lymphoma* 49, 502–507.

Person, I., 2000. Estrogens in the causation of breast, endometrial and ovarian cancers - evidence and hypotheses from epidemiological findings. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 74, 357–364.

Zhang, Q., Peng, H., Qluwakemi, B., Wang, J., Yao, S., Cheng, G., Xu, H., Qiu, H., Zhu, L., Yuan, M., 2017. Phytoestrogens and risk of prostate cancer: an updated meta-analysis of epidemiologic studies. *Int. J. Food Sci. Nutr.* 68, 28–42.

Poschner, S., Maier-Salamon, A., Thalhammer, T., Jager, W., 2019. Resveratrol and other dietary polyphenols are inhibitors of estrogen metabolism in human breast cancer cells. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 190, 11–18.

Singh, A.P., Singh, R., Verma, S.S., Rai, V., Kaschula, C.H., Maiti, P., Gupta, S.C., 2019. Health benefits of resveratrol: evidence from clinical studies. *Med. Res. Rev.*

Mirza, S., Sharma, G., Paushad, R., Gupta, S.D., Pandya, P., Ralhan, R., 2013. Expression of DNA methyltransferases in breast cancer patients and to analyze the effect of natural compounds on DNA methyltransferases and associated proteins. *J. Breast Cancer* 16, 23–31.

Gao, Y., Tollefsbol, T.O., 2018. Combinational Proanthocyanidins and Resveratrol Synergistically Inhibit Human Breast Cancer Cells and Impact Epigenetic (-)Mediating Machinery. *Int. J. Mol. Sci.* 19.

Kim, H.J., Bae, S.C., 2011. Histone deacetylase inhibitors: molecular mechanisms of action and clinical trials as anti-cancer drugs. *Am. J. Transl. Res.* 3, 166–179.

Colom, H., Alfarras, I., Maijo, M., Juan, M.E., Planas, J.M., 2011. Population pharmacokinetic modeling of trans-resveratrol and its glucuronide and sulfate conjugates after oral and intravenous administration in rats. *Pharm. Res.* 28, 1606–1621.

Juan, M.E., Maijo, M., Planas, J.M., 2010. Quantification of trans-resveratrol and its metabolites in rat plasma and tissues by HPLC. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 51, 391–398.

Alayev, A., Berger, S.M., Kramer, M.Y., Schwartz, N.S., Holz, M.K., 2015. The combination of rapamycin and resveratrol blocks autophagy and induces apoptosis in breast

- cancer cells. *J. Cell. Biochem.* 116, 450–457.
- Khan, A., Aljarbou, A.N., Aldehbi, Y.H., Faisal, S.M., Khan, M.A., 2014. Resveratrol suppresses the proliferation of breast cancer cells by inhibiting fatty acid synthase signaling pathway. *Cancer Epidemiol.* 38, 765–772.
- Qin, Y., Ma, Z., Dang, X., Li, W., Ma, Q., 2014. Effect of resveratrol on proliferation and apoptosis of human pancreatic cancer MIA PaCa-2 cells may involve inhibition of the Hedgehog signaling pathway. *Mol. Med. Rep.* 10, 2563–2567.
- Chandrasekera, P.C., Kargacin, M.E., Deans, J.P., Lytton, J., 2009. Determination of apparent calcium affinity for endogenously expressed human sarco(endo)plasmic reticulum calcium-ATPase isoform SERCA3. *Am. J. Physiol., Cell Physiol.* 296, C1105–1114.
- Dode, L., Vilsen, B., Van Baelen, K., Wuytack, F., Clausen, J.D., Andersen, J.P., 2002. Dissection of the functional differences between sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺-ATPase (SERCA) 1 and 3 isoforms by steady-state and transient kinetic analyses. *J. Biol. Chem.* 277, 45579–45591.
- Divekar, S.D., Storch, G.B., Sperle, K., Veselik, D.J., Johnson, E., Dakshanamurthy, S., Lajimihubip, Y.N., Nakles, R.E., Huang, L., Martin, M.B., 2011. The role of calcium in the activation of estrogen receptor- α . *Cancer Res.* 71, 1658–1668.
- Livezey, M., Kim, J.E., Shapiro, D.J., 2018. A new role for estrogen receptor α in cell proliferation and Cancer: activating the anticipatory unfolded protein response. *Front. Endocrinol. (Lausanne)* 9, 325.
- Haigis, M.C., Sinclair, D.A., 2010. Mammalian sirtuins: biological insights and disease relevance. *Annu. Rev. Pathol.* 5, 253–295.
- Kupis, W., Palyga, J., Tomal, E., Niewiadomska, E., 2016. The role of sirtuins in cellular homeostasis. *J. Physiol. Biochem.* 72, 371–380.
- Spallotta, F., Cencioni, C., Straino, S., Nanni, S., Rosati, J., Artuso, S., Manni, I., Colusi, C., Piaggio, G., Martelli, F., Valente, S., Mai, A., Capogrossi, M.C., Farsetti, A., Gaetano, C., 2013. A nitric oxide-dependent cross-talk between class I and III histone deacetylases accelerates skin repair. *J. Biol. Chem.* 288, 11004–11012.
- Dou, C., Liu, Z., Tu, K., Zhang, H., Chen, C., Yaqoob, U., Wang, Y., Wen, J., van Deursen, J., Sicard, D., Tschumperlin, D., Zou, H., Huang, W.C., Urrutia, R., Shah, V.H., Kang, N., 2018. P300 Acetyltransferase Mediates Stiffness-Induced Activation of Hepatic Stellate Cells Into Tumor-Promoting Myfibroblasts. *Gastroenterology* 154, 2209–2221 e2214.
- Wang, Y.M., Gu, M.L., Meng, F.S., Jiao, W.R., Zhou, X.X., Yao, H.P., Ji, F., 2017. Histone acetyltransferase p300/CBP inhibitor C646 blocks the survival and invasion pathways of gastric cancer cell lines. *Int. J. Oncol.* 51, 1860–1868.
- Rothbart, S.B., Strahl, B.D., 2014. Interpreting the language of histone and DNA modifications. *Biochim. Biophys. Acta* 1839, 627–643.
- Flores-Peredo, L., Rodriguez, G., Zarain-Herzberg, A., 2017. Induction of cell differentiation activates transcription of the Sarco/Endoplasmic Reticulum calcium-ATPase 3 gene (ATP2A3) in gastric and colon cancer cells. *Mol. Carcinog.* 56, 735–750.
- Subik, K., Lee, J.F., Baxter, L., Strzepek, T., Costello, D., Crowley, P., Xing, L., Hung, M.C., Bonfiglio, T., Hicks, D.G., Tang, P., 2010. The expression patterns of ER, PR, HER2, CK5/6, EGFR, Ki-67 and AR by immunohistochemical analysis in breast Cancer cell lines. *Breast Cancer (Auckl)* 4, 35–41.
- Hon, J.D., Singh, B., Sahin, A., Du, G., Wang, J., Wang, V.Y., Deng, F.M., Zhang, D.Y., Monaco, M.E., Lee, P., 2016. Breast cancer molecular subtypes: from TNBC to QNBC. *Am. J. Cancer Res.* 6, 1864–1872.
- Varga, K., Hollosi, A., Paszty, K., Hegedus, L., Szakacs, G., Timar, J., Papp, B., Enyedi, A., Padanyi, R., 2018. Expression of calcium pumps is differentially regulated by histone deacetylase inhibitors and estrogen receptor α in breast cancer cells. *BMC Cancer* 18, 1029.
- Dhar, S., Kumar, A., Li, K., Tzivion, G., Levenson, A.S., 2015. Resveratrol regulates PTEN/Akt pathway through inhibition of MTA1/HDAC unit of the NuRD complex in prostate cancer. *Biochim. Biophys. Acta* 1853, 265–275.
- Bogdanovic, O., Veenstra, G.J., 2009. DNA methylation and methyl-CpG binding proteins: developmental requirements and function. *Chromosoma* 118, 549–565.
- Medina-Aguilar, R., Perez-Plasencia, C., Gariglio, P., Marchat, L.A., Flores-Perez, A., Lopez-Camarillo, C., Garcia Mena, J., 2017. DNA methylation data for identification of epigenetic targets of resveratrol in triple negative breast cancer cells. *Data Brief* 11, 169–182.
- Jang, M., Cai, L., Udeani, G.O., Slowing, K.V., Thomas, C.F., Beecher, C.W., Fong, H.H., Farnsworth, N.R., Kinghorn, A.D., Mehta, R.G., Moon, R.C., Pezzuto, J.M., 1997. Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science* 275, 218–220.
- Nguyen, A.V., Martinez, M., Stamos, M.J., Moyer, M.P., Planutis, K., Hope, C., Holcombe, R.F., 2009. Results of a phase I pilot clinical trial examining the effect of plant-derived resveratrol and grape powder on Wnt pathway target gene expression in colonic mucosa and colon cancer. *Cancer Manag. Res.* 1, 25–37.
- Patel, K.R., Brown, V.A., Jones, D.J., Britton, R.G., Hemingway, D., Miller, A.S., West, K.P., Booth, T.D., Perloff, M., Crowell, J.A., Bremner, D.E., Steward, W.P., Gescher, A.J., Brown, K., 2010. Clinical pharmacology of resveratrol and its metabolites in colorectal cancer patients. *Cancer Res.* 70, 7392–7399.
- Zhu, W., Qin, W., Zhang, K., Rottinghaus, G.E., Chen, Y.C., Kliethemes, B., Sauter, E.R., 2012. Trans-resveratrol alters mammary promoter hypermethylation in women at increased risk for breast cancer. *Nutr. Cancer* 64, 393–400.

13. ARTÍCULOS ADICIONALES PUBLICADOS DURANTE LOS ESTUDIOS DE DOCTORADO

- Izquierdo-Torres E., Rodríguez G., Meneses-Morales I. & Zarain-Herzberg A. (2017). *ATP2A3* gene as an important player for resveratrol anticancer activity in breast cancer cells. *Mol Carcinog*, 56(7), 1703-1711. doi: 10.1002/mc.22625.
- Izquierdo-Torres E & Zarain-Herzberg A. (2017). Mecanismos moleculares de los fitoestrógenos y su relación con el cáncer. *REB* 36(4), 101-110.
- Meneses-Morales I, Izquierdo-Torres E, Flores-Peredo L, Rodríguez G, Hernández-Oliveras A & Zarain-Herzberg A.(2019). Epigenetic regulation of the human *ATP2A3* gene promoter in gastric and colon cancer cell lines. *Mol Carcinog*, 8(6):887-897. doi: 10.1002/mc.22978.
- Hernández-Oliveras A., Izquierdo-Torres E., Meneses-Morales I., Rodríguez G., Zarain-Herzberg A. & Santiago-García J. (2019). Histone deacetylase inhibitors promote *ATP2A3* gene expression in hepatocellular carcinoma cells: p300 as a transcriptional regulator. *Int J Biochem Cell Biol*, (113), 8-16. doi: 10.1016/j.biocel.2019.05.014.
- Izquierdo-Torres, E., Lozano-Arriaga, D., Hernández-Oliveras, A. & Zarain-Herzberg, A. (2020). Las bombas SERCA: su papel en la patogénesis tumoral e implicaciones clínicas. *REB*. (En proceso de revisión).
- Zarain-Herzberg, A., Izquierdo-Torres, E., Hernández-Oliveras, A., Rodríguez, G. & Lozano Arriaga, D. (2020). Expresión diferencial de los genes SERCA en células de cáncer de mama. *Gac Med Mex*. (En proceso de revisión).

14. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Berridge, M.J., M.D. Bootman, and H.L. Roderick, *Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2003. **4**(7): p. 517-29.
2. Brini, M. and E. Carafoli, *Calcium pumps in health and disease*. Physiol Rev, 2009. **89**(4): p. 1341-78.
3. Periasamy, M. and A. Kalyanasundaram, *SERCA pump isoforms: their role in calcium transport and disease*. Muscle Nerve, 2007. **35**(4): p. 430-42.
4. Korczak, B., et al., *Structure of the rabbit fast-twitch skeletal muscle Ca²⁺-ATPase gene*. J Biol Chem, 1988. **263**(10): p. 4813-9.
5. Zarain-Herzberg, A., D.H. MacLennan, and M. Periasamy, *Characterization of rabbit cardiac sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺(+)-ATPase gene*. J Biol Chem, 1990. **265**(8): p. 4670-7.
6. Stammers, A.N., et al., *The regulation of sarco(endo)plasmic reticulum calcium-ATPases (SERCA)*. Can J Physiol Pharmacol, 2015. **93**(10): p. 843-54.
7. Kovacs, T., et al., *All three splice variants of the human sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase 3 gene are translated to proteins: a study of their co-expression in platelets and lymphoid cells*. Biochem J, 2001. **358**(Pt 3): p. 559-68.
8. Martin, V., et al., *Three novel sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase (SERCA) 3 isoforms. Expression, regulation, and function of the membranes of the SERCA3 family*. J Biol Chem, 2002. **277**(27): p. 24442-52.
9. Papp, B. and J.P. Brouland, *Altered Endoplasmic Reticulum Calcium Pump Expression during Breast Tumorigenesis*. Breast Cancer (Auckl), 2011. **5**: p. 163-74.
10. Brouland, J.P., et al., *The loss of sarco/endoplasmic reticulum calcium transport ATPase 3 expression is an early event during the multistep process of colon carcinogenesis*. Am J Pathol, 2005. **167**(1): p. 233-42.
11. Liu, L.H., et al., *Squamous cell tumors in mice heterozygous for a null allele of Atp2a2, encoding the sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺-ATPase isoform 2 Ca²⁺ pump*. J Biol Chem, 2001. **276**(29): p. 26737-40.
12. Roderick, H.L. and S.J. Cook, *Ca²⁺ signalling checkpoints in cancer: remodelling Ca²⁺ for cancer cell proliferation and survival*. Nat Rev Cancer, 2008. **8**(5): p. 361-75.
13. Duffy, C., K. Perez, and A. Partridge, *Implications of phytoestrogen intake for breast cancer*. CA Cancer J Clin, 2007. **57**(5): p. 260-77.
14. Khan, S.I., et al., *Epigenetic events associated with breast cancer and their prevention by dietary components targeting the epigenome*. Chem Res Toxicol, 2012. **25**(1): p. 61-73.
15. Izquierdo-Torres, E., et al., *ATP2A3 gene as an important player for resveratrol anticancer activity in breast cancer cells*. Mol Carcinog, 2017. **56**(7): p. 1703-1711.
16. Berridge, M.J., P. Lipp, and M.D. Bootman, *The versatility and universality of calcium signalling*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2000. **1**(1): p. 11-21.

17. Monteith, G.R., N. Prevarskaya, and S.J. Roberts-Thomson, *The calcium-cancer signalling nexus*. Nat Rev Cancer, 2017. **17**(6): p. 367-380.
18. Dode, L., et al., *Dissection of the functional differences between sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺-ATPase (SERCA) 1 and 3 isoforms by steady-state and transient kinetic analyses*. J Biol Chem, 2002. **277**(47): p. 45579-91.
19. Arbabian, A., et al., *Modulation of endoplasmic reticulum calcium pump expression during lung cancer cell differentiation*. FEBS J, 2013. **280**(21): p. 5408-18.
20. Endo, Y., et al., *Sarcoendoplasmic reticulum Ca(2+) ATPase type 2 downregulated in human oral squamous cell carcinoma*. Int J Cancer, 2004. **110**(2): p. 225-31.
21. Gelebart, P., et al., *Expression of endomembrane calcium pumps in colon and gastric cancer cells. Induction of SERCA3 expression during differentiation*. J Biol Chem, 2002. **277**(29): p. 26310-20.
22. Pacifico, F., et al., *The expression of the sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPases in thyroid and its down-regulation following neoplastic transformation*. J Mol Endocrinol, 2003. **30**(3): p. 399-409.
23. Korosec, B., et al., *ATP2A3 gene is involved in cancer susceptibility*. Cancer Genet Cytogenet, 2009. **188**(2): p. 88-94.
24. Singh, C., G. Chhabra, and N. Ahmad, *Resveratrol and Cancer Cell Biology: Actionable Targets and Mechanisms of Resveratrol*. 2018. p. 183-207.
25. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation*. Cell, 2011. **144**(5): p. 646-74.
26. Bray, F., et al., *Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries*. CA Cancer J Clin, 2018. **68**(6): p. 394-424.
27. Siegel, R.L., K.D. Miller, and A. Jemal, *Cancer statistics, 2019*. CA Cancer J Clin, 2019. **69**(1): p. 7-34.
28. Harbeck, N., et al., *Breast cancer*. Nat Rev Dis Primers, 2019. **5**(1): p. 66.
29. Makki, J., *Diversity of Breast Carcinoma: Histological Subtypes and Clinical Relevance*. Clin Med Insights Pathol, 2015. **8**: p. 23-31.
30. Badve, S., et al., *Basal-like and triple-negative breast cancers: a critical review with an emphasis on the implications for pathologists and oncologists*. Mod Pathol, 2011. **24**(2): p. 157-67.
31. Dai, X., et al., *Breast Cancer Cell Line Classification and Its Relevance with Breast Tumor Subtyping*. J Cancer, 2017. **8**(16): p. 3131-3141.
32. Holliday, D.L. and V. Speirs, *Choosing the right cell line for breast cancer research*. Breast Cancer Res, 2011. **13**(4): p. 215.
33. Kulkarni, A., et al., *Breast Cancer Incidence and Mortality by Molecular Subtype: Statewide Age and Racial/Ethnic Disparities in New Jersey*. Cancer Health Disparities, 2019. **3**: p. e1-e17.
34. Messier, T.L., et al., *Histone H3 lysine 4 acetylation and methylation dynamics define breast cancer subtypes*. Oncotarget, 2016. **7**(5): p. 5094-109.
35. Qu, Y., et al., *Evaluation of MCF10A as a Reliable Model for Normal Human Mammary Epithelial Cells*. PLoS One, 2015. **10**(7): p. e0131285.

36. Subik, K., et al., *The Expression Patterns of ER, PR, HER2, CK5/6, EGFR, Ki-67 and AR by Immunohistochemical Analysis in Breast Cancer Cell Lines*. Breast Cancer (Auckl), 2010. **4**: p. 35-41.
37. Vineis, P., A. Schatzkin, and J.D. Potter, *Models of carcinogenesis: an overview*. Carcinogenesis, 2010. **31**(10): p. 1703-9.
38. Baylin, S.B. and J.E. Ohm, *Epigenetic gene silencing in cancer - a mechanism for early oncogenic pathway addiction?* Nat Rev Cancer, 2006. **6**(2): p. 107-16.
39. Jones, P.A. and S.B. Baylin, *The epigenomics of cancer*. Cell, 2007. **128**(4): p. 683-92.
40. Gronbaek, K., C. Hother, and P.A. Jones, *Epigenetic changes in cancer*. APMIS, 2007. **115**(10): p. 1039-59.
41. Valencia, A.M. and C. Kadoch, *Chromatin regulatory mechanisms and therapeutic opportunities in cancer*. Nat Cell Biol, 2019. **21**(2): p. 152-161.
42. Robertson, K.D., *DNA methylation, methyltransferases, and cancer*. Oncogene, 2001. **20**(24): p. 3139-55.
43. Aapola, U., et al., *Isolation and initial characterization of a novel zinc finger gene, DNMT3L, on 21q22.3, related to the cytosine-5-methyltransferase 3 gene family*. Genomics, 2000. **65**(3): p. 293-8.
44. Aapola, U., I. Liiv, and P. Peterson, *Imprinting regulator DNMT3L is a transcriptional repressor associated with histone deacetylase activity*. Nucleic Acids Res, 2002. **30**(16): p. 3602-8.
45. Bourc'his, D., et al., *Dnmt3L and the establishment of maternal genomic imprints*. Science, 2001. **294**(5551): p. 2536-9.
46. Shukla, S., et al., *Epigenetics of Breast Cancer: Clinical Status of Epi-drugs and Phytochemicals*. Adv Exp Med Biol, 2019. **1152**: p. 293-310.
47. Fuks, F., *DNA methylation and histone modifications: teaming up to silence genes*. Curr Opin Genet Dev, 2005. **15**(5): p. 490-5.
48. Kohli, R.M. and Y. Zhang, *TET enzymes, TDG and the dynamics of DNA demethylation*. Nature, 2013. **502**(7472): p. 472-9.
49. Kulis, M. and M. Esteller, *DNA methylation and cancer*. Adv Genet, 2010. **70**: p. 27-56.
50. Bannister, A.J. and T. Kouzarides, *Regulation of chromatin by histone modifications*. Cell Res, 2011. **21**(3): p. 381-95.
51. Rothbart, S.B. and B.D. Strahl, *Interpreting the language of histone and DNA modifications*. Biochim Biophys Acta, 2014. **1839**(8): p. 627-43.
52. Fucito, A., et al., *Genetic and epigenetic alterations in breast cancer: what are the perspectives for clinical practice?* Int J Biochem Cell Biol, 2008. **40**(4): p. 565-75.
53. Luger, K., *Dynamic nucleosomes*. Chromosome Res, 2006. **14**(1): p. 5-16.
54. Walker, I.O., *Differential dissociation of histone tails from core chromatin*. Biochemistry, 1984. **23**(23): p. 5622-8.
55. Skiniotis, G., D. Moazed, and T. Walz, *Acetylated histone tail peptides induce structural rearrangements in the RSC chromatin remodeling complex*. J Biol Chem, 2007. **282**(29): p. 20804-8.

56. Rice, J.C. and C.D. Allis, *Histone methylation versus histone acetylation: new insights into epigenetic regulation*. *Curr Opin Cell Biol*, 2001. **13**(3): p. 263-73.
57. Benton, C.B., W. Fiskus, and K.N. Bhalla, *Targeting Histone Acetylation: Readers and Writers in Leukemia and Cancer*. *Cancer J*, 2017. **23**(5): p. 286-291.
58. Li, Y. and E. Seto, *HDACs and HDAC Inhibitors in Cancer Development and Therapy*. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2016. **6**(10).
59. Elsheikh, S.E., et al., *Global histone modifications in breast cancer correlate with tumor phenotypes, prognostic factors, and patient outcome*. *Cancer Res*, 2009. **69**(9): p. 3802-9.
60. Yoo, C.B. and P.A. Jones, *Epigenetic therapy of cancer: past, present and future*. *Nat Rev Drug Discov*, 2006. **5**(1): p. 37-50.
61. Sigalotti, L., et al., *Epigenetic drugs as pleiotropic agents in cancer treatment: biomolecular aspects and clinical applications*. *J Cell Physiol*, 2007. **212**(2): p. 330-44.
62. Ho, A.S., S. Turcan, and T.A. Chan, *Epigenetic therapy: use of agents targeting deacetylation and methylation in cancer management*. *Onco Targets Ther*, 2013. **6**: p. 223-32.
63. Treppendahl, M.B., L.S. Kristensen, and K. Gronbaek, *Predicting response to epigenetic therapy*. *J Clin Invest*, 2014. **124**(1): p. 47-55.
64. Jones, P.A., et al., *Epigenetic therapy in immune-oncology*. *Nat Rev Cancer*, 2019. **19**(3): p. 151-161.
65. Lustberg, M.B. and B. Ramaswamy, *Epigenetic targeting in breast cancer: therapeutic impact and future direction*. *Drug News Perspect*, 2009. **22**(7): p. 369-81.
66. Cai, F.F., et al., *Epigenetic therapy for breast cancer*. *Int J Mol Sci*, 2011. **12**(7): p. 4465-87.
67. Walkinshaw, D.R. and X.J. Yang, *Histone deacetylase inhibitors as novel anticancer therapeutics*. *Curr Oncol*, 2008. **15**(5): p. 237-43.
68. Minucci, S. and P.G. Pelicci, *Histone deacetylase inhibitors and the promise of epigenetic (and more) treatments for cancer*. *Nat Rev Cancer*, 2006. **6**(1): p. 38-51.
69. Huang, Y., et al., *Epigenetics in breast cancer: what's new?* *Breast Cancer Res*, 2011. **13**(6): p. 225.
70. Prince, H.M., M.J. Bishton, and S.J. Harrison, *Clinical studies of histone deacetylase inhibitors*. *Clin Cancer Res*, 2009. **15**(12): p. 3958-69.
71. Song, S.H., S.W. Han, and Y.J. Bang, *Epigenetic-based therapies in cancer: progress to date*. *Drugs*, 2011. **71**(18): p. 2391-403.
72. Mottamal, M., et al., *Histone deacetylase inhibitors in clinical studies as templates for new anticancer agents*. *Molecules*, 2015. **20**(3): p. 3898-941.
73. Seto, E. and M. Yoshida, *Erasers of histone acetylation: the histone deacetylase enzymes*. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2014. **6**(4): p. a018713.
74. Shimazu, T., et al., *Plasma isoflavones and the risk of lung cancer in women: a nested case-control study in Japan*. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2011. **20**(3): p. 419-27.

75. Yang, W.S., et al., *Soy intake is associated with lower lung cancer risk: results from a meta-analysis of epidemiologic studies*. Am J Clin Nutr, 2011. **94**(6): p. 1575-83.
76. Ko, K.P., et al., *Isoflavones from phytoestrogens and gastric cancer risk: a nested case-control study within the Korean Multicenter Cancer Cohort*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2010. **19**(5): p. 1292-300.
77. He, J., et al., *Phytoestrogens and risk of prostate cancer: a meta-analysis of observational studies*. World J Surg Oncol, 2015. **13**: p. 231.
78. Zhang, Q., et al., *Phytoestrogens and risk of prostate cancer: an updated meta-analysis of epidemiologic studies*. Int J Food Sci Nutr, 2017. **68**(1): p. 28-42.
79. Maffini, M.V., et al., *Endocrine disruptors and reproductive health: the case of bisphenol-A*. Mol Cell Endocrinol, 2006. **254-255**: p. 179-86.
80. Haselkorn, T., S.L. Stewart, and P.L. Horn-Ross, *Why are thyroid cancer rates so high in southeast asian women living in the United States? The bay area thyroid cancer study*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2003. **12**(2): p. 144-50.
81. Persson, I., *Estrogens in the causation of breast, endometrial and ovarian cancers - evidence and hypotheses from epidemiological findings*. J Steroid Biochem Mol Biol, 2000. **74**(5): p. 357-64.
82. Eden, J.A., *Phytoestrogens for menopausal symptoms: a review*. Maturitas, 2012. **72**(2): p. 157-9.
83. Qu, X.L., et al., *Phytoestrogen intake and risk of ovarian cancer: a meta-analysis of 10 observational studies*. Asian Pac J Cancer Prev, 2014. **15**(21): p. 9085-91.
84. Keinan-Boker, L., et al., *Dietary phytoestrogens and breast cancer risk*. Am J Clin Nutr, 2004. **79**(2): p. 282-8.
85. Messina, M., W. McCaskill-Stevens, and J.W. Lampe, *Addressing the soy and breast cancer relationship: review, commentary, and workshop proceedings*. J Natl Cancer Inst, 2006. **98**(18): p. 1275-84.
86. Ziegler, R.G., *Phytoestrogens and breast cancer*. Am J Clin Nutr, 2004. **79**(2): p. 183-4.
87. Li, Y., et al., *Epigenetic regulation of multiple tumor-related genes leads to suppression of breast tumorigenesis by dietary genistein*. PLoS One, 2013. **8**(1): p. e54369.
88. Li, Y., et al., *Epigenetic reactivation of estrogen receptor-alpha (ERalpha) by genistein enhances hormonal therapy sensitivity in ERalpha-negative breast cancer*. Mol Cancer, 2013. **12**: p. 9.
89. Kala, R. and T.O. Tollefsbol, *A Novel Combinatorial Epigenetic Therapy Using Resveratrol and Pterostilbene for Restoring Estrogen Receptor-alpha (ERalpha) Expression in ERalpha-Negative Breast Cancer Cells*. PLoS One, 2016. **11**(5): p. e0155057.
90. Li, Y., S.M. Meeran, and T.O. Tollefsbol, *Combinatorial bioactive botanicals re-sensitize tamoxifen treatment in ER-negative breast cancer via epigenetic reactivation of ERalpha expression*. Sci Rep, 2017. **7**(1): p. 9345.
91. Mirza, S., et al., *Expression of DNA methyltransferases in breast cancer patients and to analyze the effect of natural compounds on DNA*

- methyltransferases and associated proteins*. J Breast Cancer, 2013. **16**(1): p. 23-31.
92. Venturelli, S., et al., *Resveratrol as a pan-HDAC inhibitor alters the acetylation status of histone [corrected] proteins in human-derived hepatoblastoma cells*. PLoS One, 2013. **8**(8): p. e73097.
 93. Singh, B., et al., *Resveratrol inhibits estrogen-induced breast carcinogenesis through induction of NRF2-mediated protective pathways*. Carcinogenesis, 2014. **35**(8): p. 1872-80.
 94. Dhar, S., et al., *Resveratrol regulates PTEN/Akt pathway through inhibition of MTA1/HDAC unit of the NuRD complex in prostate cancer*. Biochim Biophys Acta, 2015. **1853**(2): p. 265-75.
 95. Meneses-Morales, I., et al., *Epigenetic regulation of the human ATP2A3 gene promoter in gastric and colon cancer cell lines*. Mol Carcinog, 2019. **58**(6): p. 887-897.
 96. Hernandez-Oliveras, A., et al., *Histone deacetylase inhibitors promote ATP2A3 gene expression in hepatocellular carcinoma cells: p300 as a transcriptional regulator*. Int J Biochem Cell Biol, 2019. **113**: p. 8-16.
 97. Nicholson, D.W., et al., *Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis*. Nature, 1995. **376**(6535): p. 37-43.
 98. Chomczynski, P. and N. Sacchi, *Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction*. Anal Biochem, 1987. **162**(1): p. 156-9.
 99. Pfaffl, M.W., *A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR*. Nucleic Acids Res, 2001. **29**(9): p. e45.
 100. Paredes, R.M., et al., *Chemical calcium indicators*. Methods, 2008. **46**(3): p. 143-51.
 101. Wang, Y.M., et al., *Histone acetyltransferase p300/CBP inhibitor C646 blocks the survival and invasion pathways of gastric cancer cell lines*. Int J Oncol, 2017. **51**(6): p. 1860-1868.
 102. Chambers, J.S., et al., *Growth-associated protein 43 (GAP-43) and synaptophysin alterations in the dentate gyrus of patients with schizophrenia*. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 2005. **29**(2): p. 283-90.
 103. Ghoshal, K., et al., *5-Aza-deoxycytidine induces selective degradation of DNA methyltransferase 1 by a proteasomal pathway that requires the KEN box, bromo-adjacent homology domain, and nuclear localization signal*. Mol Cell Biol, 2005. **25**(11): p. 4727-41.
 104. Fournier, A., et al., *The role of methyl-binding proteins in chromatin organization and epigenome maintenance*. Brief Funct Genomics, 2012. **11**(3): p. 251-64.
 105. de Ruijter, T.C., et al., *Prognostic DNA methylation markers for hormone receptor breast cancer: a systematic review*. Breast Cancer Res, 2020. **22**(1): p. 13.
 106. Morgan, M.A. and A. Shilatifard, *Chromatin signatures of cancer*. Genes Dev, 2015. **29**(3): p. 238-49.
 107. Crump, M., et al., *Phase II trial of oral vorinostat (suberoylanilide hydroxamic acid) in relapsed diffuse large-B-cell lymphoma*. Ann Oncol, 2008. **19**(5): p. 964-9.

108. Duvic, M., et al., *Phase 2 trial of oral vorinostat (suberoylanilide hydroxamic acid, SAHA) for refractory cutaneous T-cell lymphoma (CTCL)*. *Blood*, 2007. **109**(1): p. 31-9.
109. Richardson, P., et al., *Phase I trial of oral vorinostat (suberoylanilide hydroxamic acid, SAHA) in patients with advanced multiple myeloma*. *Leuk Lymphoma*, 2008. **49**(3): p. 502-7.
110. Horgan, X.J., et al., *Resveratrol analogues surprisingly effective against triplenegative breast cancer, independent of ERalpha*. *Oncol Rep*, 2019. **41**(6): p. 3517-3526.
111. Poschner, S., et al., *Resveratrol and other dietary polyphenols are inhibitors of estrogen metabolism in human breast cancer cells*. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2019. **190**: p. 11-18.
112. Carlos-Reyes, A., et al., *Dietary Compounds as Epigenetic Modulating Agents in Cancer*. *Front Genet*, 2019. **10**: p. 79.
113. Singh, A.P., et al., *Health benefits of resveratrol: Evidence from clinical studies*. *Med Res Rev*, 2019.
114. Chatterjee, B., K. Ghosh, and S.R. Kanade, *Resveratrol modulates epigenetic regulators of promoter histone methylation and acetylation that restores BRCA1, p53, p21(CIP1) in human breast cancer cell lines*. *Biofactors*, 2019.
115. Gao, Y. and T.O. Tollefsbol, *Combinational Proanthocyanidins and Resveratrol Synergistically Inhibit Human Breast Cancer Cells and Impact Epigenetic(-)Mediating Machinery*. *Int J Mol Sci*, 2018. **19**(8).
116. Flores-Peredo, L., G. Rodriguez, and A. Zarain-Herzberg, *Induction of cell differentiation activates transcription of the Sarco/Endoplasmic Reticulum calcium-ATPase 3 gene (ATP2A3) in gastric and colon cancer cells*. *Mol Carcinog*, 2017. **56**(2): p. 735-750.
117. Karsli-Ceppioglu, S., et al., *The Epigenetic Landscape of Promoter Genome-wide Analysis in Breast Cancer*. *Sci Rep*, 2017. **7**(1): p. 6597.
118. Xiong, J. and R.J. Epstein, *Growth inhibition of human cancer cells by 5-aza-2'-deoxycytidine does not correlate with its effects on INK4a/ARF expression or initial promoter methylation status*. *Mol Cancer Ther*, 2009. **8**(4): p. 779-85.
119. Tyagi, T., et al., *Potentiation of growth inhibition and epigenetic modulation by combination of green tea polyphenol and 5-aza-2'-deoxycytidine in human breast cancer cells*. *Breast Cancer Res Treat*, 2015. **149**(3): p. 655-68.
120. Khan, G.N., et al., *Azacytidine-induced Chemosensitivity to Doxorubicin in Human Breast Cancer MCF7 Cells*. *Anticancer Res*, 2017. **37**(5): p. 2355-2364.
121. Li, W. and Z. Sun, *Mechanism of Action for HDAC Inhibitors-Insights from Omics Approaches*. *Int J Mol Sci*, 2019. **20**(7).
122. Alayev, A., et al., *The combination of rapamycin and resveratrol blocks autophagy and induces apoptosis in breast cancer cells*. *J Cell Biochem*, 2015. **116**(3): p. 450-7.
123. Colom, H., et al., *Population pharmacokinetic modeling of trans-resveratrol and its glucuronide and sulfate conjugates after oral and intravenous administration in rats*. *Pharm Res*, 2011. **28**(7): p. 1606-21.

124. Juan, M.E., M. Maijo, and J.M. Planas, *Quantification of trans-resveratrol and its metabolites in rat plasma and tissues by HPLC*. J Pharm Biomed Anal, 2010. **51**(2): p. 391-8.
125. Khan, A., et al., *Resveratrol suppresses the proliferation of breast cancer cells by inhibiting fatty acid synthase signaling pathway*. Cancer Epidemiol, 2014. **38**(6): p. 765-72.
126. Qin, Y., et al., *Effect of resveratrol on proliferation and apoptosis of human pancreatic cancer MIA PaCa-2 cells may involve inhibition of the Hedgehog signaling pathway*. Mol Med Rep, 2014. **10**(5): p. 2563-7.
127. Chandrasekera, P.C., et al., *Determination of apparent calcium affinity for endogenously expressed human sarco(endo)plasmic reticulum calcium-ATPase isoform SERCA3*. Am J Physiol Cell Physiol, 2009. **296**(5): p. C1105-14.
128. Divekar, S.D., et al., *The role of calcium in the activation of estrogen receptor-alpha*. Cancer Res, 2011. **71**(5): p. 1658-68.
129. Livezey, M., J.E. Kim, and D.J. Shapiro, *A New Role for Estrogen Receptor alpha in Cell Proliferation and Cancer: Activating the Anticipatory Unfolded Protein Response*. Front Endocrinol (Lausanne), 2018. **9**: p. 325.
130. Barneda-Zahonero, B. and M. Parra, *Histone deacetylases and cancer*. Mol Oncol, 2012. **6**(6): p. 579-89.
131. Haigis, M.C. and D.A. Sinclair, *Mammalian sirtuins: biological insights and disease relevance*. Annu Rev Pathol, 2010. **5**: p. 253-95.
132. Kupis, W., et al., *The role of sirtuins in cellular homeostasis*. J Physiol Biochem, 2016. **72**(3): p. 371-80.
133. Spallotta, F., et al., *A nitric oxide-dependent cross-talk between class I and III histone deacetylases accelerates skin repair*. J Biol Chem, 2013. **288**(16): p. 11004-12.
134. Sinha, D., et al., *Resveratrol for breast cancer prevention and therapy: Preclinical evidence and molecular mechanisms*. Semin Cancer Biol, 2016. **40-41**: p. 209-232.
135. Wander, S.A., L.M. Spring, and A. Bardia, *Genetics to epigenetics: targeting histone deacetylases in hormone receptor-positive metastatic breast cancer*. Lancet Oncol, 2019. **20**(6): p. 746-748.
136. Bhat, S.A., et al., *Diagnostic utility of epigenetics in breast cancer - A review*. Cancer Treat Res Commun, 2019. **19**: p. 100125.
137. Jiang, Z., et al., *Tucidinostat plus exemestane for postmenopausal patients with advanced, hormone receptor-positive breast cancer (ACE): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial*. Lancet Oncol, 2019. **20**(6): p. 806-815.
138. Bowers, E.M., et al., *Virtual ligand screening of the p300/CBP histone acetyltransferase: identification of a selective small molecule inhibitor*. Chem Biol, 2010. **17**(5): p. 471-82.
139. Dou, C., et al., *P300 Acetyltransferase Mediates Stiffness-Induced Activation of Hepatic Stellate Cells Into Tumor-Promoting Myofibroblasts*. Gastroenterology, 2018. **154**(8): p. 2209-2221 e14.
140. Ruh, M.F., et al., *The effects of histone acetylation on estrogen responsiveness in MCF-7 cells*. Endocrine, 1999. **11**(2): p. 157-64.

141. Sharda, A., et al., *Elevated HDAC activity and altered histone phosphoacetylation confer acquired radio-resistant phenotype to breast cancer cells*. Clin Epigenetics, 2020. **12**(1): p. 4.
142. Hon, J.D., et al., *Breast cancer molecular subtypes: from TNBC to QNBC*. Am J Cancer Res, 2016. **6**(9): p. 1864-1872.
143. Dagdemir, A., et al., *Epigenetic Modifications with DZNep, NaBu and SAHA in Luminal and Mesenchymal-like Breast Cancer Subtype Cells*. Cancer Genomics Proteomics, 2016. **13**(4): p. 291-303.
144. Varga, K., et al., *Expression of calcium pumps is differentially regulated by histone deacetylase inhibitors and estrogen receptor alpha in breast cancer cells*. BMC Cancer, 2018. **18**(1): p. 1029.
145. Vandecaetsbeek, I., et al., *The Ca²⁺ pumps of the endoplasmic reticulum and Golgi apparatus*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2011. **3**(5).
146. Fraga, M.F., et al., *Loss of acetylation at Lys16 and trimethylation at Lys20 of histone H4 is a common hallmark of human cancer*. Nat Genet, 2005. **37**(4): p. 391-400.
147. Lopez-Camarillo, C., et al., *Pharmaco-epigenomics: On the Road of Translation Medicine*. Adv Exp Med Biol, 2019. **1168**: p. 31-42.
148. Hao, X., et al., *DNA methylation markers for diagnosis and prognosis of common cancers*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2017. **114**(28): p. 7414-7419.
149. Chen, X., J. Zhang, and X. Dai, *DNA methylation profiles capturing breast cancer heterogeneity*. BMC Genomics, 2019. **20**(1): p. 823.
150. Williams, K.E., et al., *DNA methylation in breast cancers: Differences based on estrogen receptor status and recurrence*. J Cell Biochem, 2019. **120**(1): p. 738-755.
151. Bogdanovic, O. and G.J. Veenstra, *DNA methylation and methyl-CpG binding proteins: developmental requirements and function*. Chromosoma, 2009. **118**(5): p. 549-65.
152. Benevolenskaya, E.V., et al., *DNA methylation and hormone receptor status in breast cancer*. Clin Epigenetics, 2016. **8**: p. 17.
153. Medina-Aguilar, R., et al., *DNA methylation data for identification of epigenetic targets of resveratrol in triple negative breast cancer cells*. Data Brief, 2017. **11**: p. 169-182.
154. Jang, M., et al., *Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes*. Science, 1997. **275**(5297): p. 218-20.
155. Nguyen, A.V., et al., *Results of a phase I pilot clinical trial examining the effect of plant-derived resveratrol and grape powder on Wnt pathway target gene expression in colonic mucosa and colon cancer*. Cancer Manag Res, 2009. **1**: p. 25-37.