



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

**“Análisis de la fosforilación de p53 en S15, S20 y S46 inducidas por el
Resveratrol y su asociación con la sensibilización a Cisplatino en
células MCF-7_R resistentes”**

T E S I S

Que presenta

M. en C. Jorge Arturo Hernández Valencia

Para obtener el grado de

Doctor en Ciencias

En la especialidad de

Genética y Biología Molecular

Directores de la Tesis:

Dr. Jaime García Mena

Dr. Patricio Gariglio Vidal

Ciudad de México

OCTUBRE, 2018

La presente Tesis fue desarrollada y realizada gracias al apoyo del

Programa Nacional de Becas de Posgrado

Del

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)

No. De registro: 485386

Dedicada a
Mi madre, Rosa Valencia Rojas

AGRADECIMIENTOS

In memoriam: Gracias Jean Castillo, eres una gran estrella en el cielo.

Dr. Jaime García Mena y Dr. Patricio Gariglio por la oportunidad de formar parte de su equipo de trabajo durante el Doctorado, además de su asesoría académica y apoyo en los laboratorios para el buen desarrollo del proyecto.

Dr. José Díaz Chávez por su invaluable apoyo en la publicación del artículo, asesoría académica y por el tiempo dedicado en la revisión de la presente tesis.

Dra. Rosa María Bermúdez Cruz, Dr. Luis Kameyama Kawabe y Dr. José Tapia Ramírez por su asesoría académica y en la revisión de la presente tesis.

Enrique García Villa por el soporte y asesoría técnica en el área experimental además por la revisión y corrección del artículo académico.

Dra. Luisa Bazán por la asesoría en la estandarización de ATM; Dr. Rodolfo Ocadiz, Lauro Macías y Elizabeth Álvarez por todo el apoyo técnico en el laboratorio.

Mi madre Rosa Valencia por su infinito amor, su apoyo y creer y confiar en mí.

A mi compañero de vida Esneider Arias por su cariño y comprensión; el pequeño Thiago y sus sonrisas que levantan mi ánimo y la Sra. Adela Manjarres por su confianza.

El cariño de mis hermanos Uriel y Berenice Valencia y de mi familia: Mario Sixtos, mi cuñado Luis Jiménez, mi abuelita Ma. de la Luz Rojas, mis tíos: Yolanda Valencia, Soledad Santiago, Rodolfo Valencia, mis primas: Nancy Valencia, Gabriela Valencia, Lucero Valencia, Angélica Valencia y primos políticos Humberto Gómez y Luis Cruz.

A mis valiosos y más cercanos amigos: Josué Cerón, Aquetzalli Arenas, Alejandro Lagunas, Rosa Becerril, Elizabeth Schaeffer, Eduardo Moreno, Nayeli Rivera, Andrea Dent y Sandy Paul.

CONTENIDO

ÍNDICE DE FIGURAS.....	i
NOTACIÓN.....	ii
RESUMEN.....	iv
ABSTRACT.....	v
1. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES.....	1
1.1. Cáncer de mama: Estadísticas y Generalidades.....	1
1.2. Cisplatino.....	2
1.2.1. Aspectos Generales	2
1.2.2. Ventajas del uso de cisplatino y efectos Secundarios	3
1.2.3. Mecanismos de acción del CDDP	4
1.2.4. Mecanismos de resistencia a CDDP	6
1.3. Resveratrol.....	8
1.3.1. Información General	8
1.3.2. Resveratrol y su uso en el tratamiento contra el cáncer	8
1.4 Modificaciones postraduccionales de la proteína supresora de tumores p53.....	11
1.4.1 Fosforilación de p53 y respuesta celular	12
1.4.2 Efectos del Resveratrol y de la resistencia a CDDP en la fosforilación de p53	13
1.5 Antecedentes Directos.....	15
2. JUSTIFICACIÓN.....	17
3. HIPÓTESIS.....	18
4. OBJETIVOS.....	19
4.1. Objetivo General	19
4.2. Objetivos Particulares	19
5. METODOLOGIA EXPERIMENTAL.....	20
6. RESULTADOS.....	25
6.1. Resveratrol induce la fosforilación de p53 en Ser20 y disminuye la fosforilación de Ser15 y Ser46 por CDDP en células MCF-7_R	25
6.2. La fosforilación temprana de p53 en Ser20 inducida por el Resveratrol es suficiente para activar la transcripción dependiente de p53 en las células MCF-7_R	27

6.3. El Resveratrol sensibiliza las células MCF-7_R a CDDP e induce apoptosis.	30
6.4. La fosforilación temprana de p53 en Ser20 por Resveratrol es necesaria para la estabilidad de p53 en células MCF-7_R.	32
6.5. Resveratrol inhibe la fosforilación de ATM, la disminución de BCL-2 y aumenta la expresión de BAX.	34
7. DISCUSIÓN.....	38
8. CONCLUSIONES	45
9. PERSPECTIVAS.....	46
10. REFERENCIAS.....	47

ÍNDICE DE FIGURAS

No. Figura	Título de la Figura	Página
1	Mecanismos de acción de CDDP.	6
2	Mecanismos de quimiosensibilización de tumores por Resveratrol.	10
3	Modelos para la fosforilación de Ser46 mediada por HIPK2 y DRYK-2 en respuesta al daño al ADN.	13
4	Estructura y unión del Resveratrol y su derivado a la integrina $\alpha\beta3$	15
5	Resveratrol induce la fosforilación de p53 en Ser20 y disminuye la fosforilación de Ser 15 y Ser 46 por CDDP en células MCF-7 _R .	26
6	La fosforilación temprana de p53 en Ser20 inducida por el Resveratrol es suficiente para activar la transcripción dependiente de p53 en las células MCF-7 _R .	29
7	El Resveratrol sensibiliza las células MCF-7 _R a CDDP e induce apoptosis.	31
8	La fosforilación temprana de p53 en Ser20 por Resveratrol es necesaria para la estabilidad de p53 en células MCF-7 _R .	33
9	Resveratrol induce apoptosis en células MCF-7 _R independientemente de p53.	35
10	Resveratrol inhibe la fosforilación de ATM, la disminución de BCL-2 y aumenta la expresión de BAX.	36
11	Modelo propuesto de la sensibilización de las células MCF-7 _R por el Resveratrol.	44

NOTACIÓN

ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ARNm	Ácido Ribonucleico Mensajero
ATM	del inglés “Ataxia Telangiectasia Mutated”
BAX	del inglés “BCL-2 Associated X protein”
BCL-2	del inglés “B-Cell Lymphoma 2”
Bcl-xL	del inglés “B-cell lymphoma-extra Large”
BRCA1	del inglés “Breast Cancer Early Onset 1”
BRCA2	del inglés “Breast Cancer Early Onset 2”
cAMP	del inglés “Cyclic Adenosine Monophosphate”
CDDP	Cisplatino
CDKs	del inglés “Cyclin-Dependent Kinase”
c-FLIP	del inglés “Cellular FLICE-like Inhibitory Protein”
cGMP	del inglés “Guanosine Monophosphate”
DMEM	del inglés “Dulbecco's Modified Eagle”
DMSO	Dimetilsulfóxido
DR4	del inglés “Dead Receptor 4”
DR5	del inglés “Dead Receptor 5”
IC ₅₀	Concentración Media Inhibitoria
INEGI	Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática
MAPK	del inglés Mitogen-Activated Protein Kinases
miRNA	del inglés “micro Ribonucleic Acid”

Análisis de la fosforilación de p53 en S15, S20 y S46 inducidas por el Resveratrol y su asociación con la sensibilización a Cisplatino en células MCF-7_R resistentes

MRN	Complejo de proteínas: Mre11, Rad50 y Nbs1
MRP1	del inglés “Multidrug Resistant Protein 1”
NOXA	nombre del inglés “Phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1”
NFKB	del inglés “Nuclear Factor Kappa B)
OMS	Organización Mundial de la Salud
PIG3	del inglés “p53-Induced Gene 3 protein”
PUMA	del inglés “p53 Upregulated Modulator of Apoptosis”
ROS	del inglés “Reactive Oxygen Species”
RPM	Revoluciones por Minuto
RT-PCR	del inglés “Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction
SD	del inglés “Standard Desviation” (Desviación Estándar)
TNF	del inglés “Tumor Necrosis Factor”
TRAIL	del inglés “TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand”
VP-16	Etopósido
XIAP	del inglés “X-linked Inhibitor of Apoptosis”

RESUMEN

La resistencia a cisplatino (CDDP) es la principal causa del fracaso en el tratamiento para el cáncer, incluyendo el cáncer de mama. La proteína supresora de tumores p53 es clave en la inducción del arresto del ciclo celular, reparación del ADN o apoptosis, en respuesta a los estímulos celulares externos. Esta proteína es fosforilada en Ser15 y Ser20 en respuesta al daño al ADN o en Ser46 para inducir apoptosis. Resveratrol (Resv) es un compuesto natural quimiosensibilizador que es prometedor para el tratamiento del cáncer y se ha demostrado que sensibiliza a las células tumorales a través de la sobrerregulación y fosforilación de p53. En este trabajo desarrollamos una línea celular MCF-7 resistente a CDDP (MCF-7_R) para investigar el efecto *in vitro* del Resveratrol en combinación con CDDP sobre el papel de p53 para revertir la resistencia a CDDP en las células MCF-7_R. Demostramos que el Resv induce la fosforilación de Ser20 en las células resistentes para activar los genes blanco de p53, tales como *PUMA* y *BAX*, restaurando apoptosis. Resv también induce un cambio en la proporción BCL-2/BAX, donde disminuyó la expresión de la proteína BCL-2 y aumentó la de la proteína BAX. Interesantemente, el Resv atenúa la fosforilación de p53 inducida por CDDP en Ser15 y Ser46 probablemente a través de la inhibición de la fosforilación de ATM. Finalmente, el Resv activa diferentes cinasas, tales como CK1, CHK2 y AMPK para inducir la fosforilación de p53 en Ser20, sugiriendo un nuevo mecanismo de activación de p53 y quimiosensibilización a CDDP.

ABSTRACT

Resistance to Cisplatin (CDDP) is a major cause for cancer treatment failure, including human breast cancer. The tumor suppressor protein p53 is a key factor in the induction of cell-cycle arrest, DNA repair, or apoptosis in response to cellular stress. The p53 protein is phosphorylated in Serine15 and Serine20 in response to DNA damage or in Serine46 to induce apoptosis. Resveratrol (Resv) is a natural compound with potential properties to act as a chemosensitizer for cancer treatment, that has been shown to sensitize tumor cells through upregulation and phosphorylation of p53. We developed a CDDP-resistant MCF-7 cell line (MCF-7_R) to investigate the effect *in vitro* of Resveratrol in combination with cisplatin over the role of p53 to overcome CDDP resistance in MCF-7_R cells. We have shown that Resv induces Serine20 (S20) phosphorylation in chemoresistant cells and activates p53 target genes such as *PUMA* and *BAX*, restoring apoptosis consequently. Resveratrol also induce a change in the BCL-2/BAX ratio, where BCL-2 protein expression was decreased, and BAX protein was increased. Interestingly, Resv attenuates CDDP-induced p53 phosphorylation in Serine15 (S15) and Serine46 (S46) probably through of the inhibition of ATM phosphorylation. It also activates different kinases, such as CK1, CHK2 and AMPK to induce S20 phosphorylation of p53, suggesting a novel mechanism of p53 activation and chemosensitization to CDDP.

1. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

1.1. Cáncer de mama: Estadísticas y Generalidades.

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), el cáncer de mama es la segunda neoplasia más frecuente en la población en general y la más frecuente entre las mujeres con un estimado de 1.67 millones de nuevos casos diagnosticados anualmente, representando el 25% de los casos de cáncer en mujeres. La incidencia es más alta en países desarrollados (excepto Japón); varía desde 27 por cada 100,000 mujeres en África Central, hasta 96 en Europa occidental. El cáncer de mama también es la principal causa de muerte por un tumor maligno en la mujer en países en vías de desarrollo y la segunda en países desarrollados (después del cáncer de pulmón) con una defunción cada minuto en todo el mundo (552,000) y tasas de mortalidad que van de 6 en Asia oriental a 20 por cada 100,000 mujeres en África Occidental (OMS, s. f.).

En América Latina, el cáncer de mama es el cáncer más frecuente con 152,059 casos diagnosticados anualmente, una cuarta parte (24.9%) de los casos de cáncer en mujeres. Es también la principal causa de muerte por un tumor maligno en la mujer latinoamericana, con 43,208 defunciones y tasas de mortalidad promedio de 13. En México también a partir del año 2006, el cáncer de mama desplazó al cáncer cérvico uterino para ubicarse como la primera causa de muerte por cáncer en la mujer. Anualmente se estima una ocurrencia de 20,444 casos en mujeres, con una incidencia de 35.4 casos por cada 100,000 mujeres. En el año 2016, se registraron 5,405 defunciones en mujeres con una tasa de 16.3 defunciones por cada 100,000 mujeres (Secretaría de Salud, 2016).

Al igual que otros tipos de cáncer, empieza con el crecimiento anormal o descontrolado de células, principalmente en los conductos que llevan la leche hacia el pezón (cáncer de mama ductal), o en las glándulas que producen la leche (cáncer de mama lobulillar), motivo por el cual es más frecuente su

presencia en las mujeres, aunque existen tumores malignos de mama menos comunes también en hombres. Si bien no hay causas directas, existen factores de riesgo que incrementan la probabilidad de aparición de este tipo de cáncer; entre ellos destacan: la edad (a mayor edad, mayor riesgo), la predisposición genética (mutación de los genes BRCA1 y BRCA2), la obesidad, fumar, la ingesta de alcohol, usar terapia de reemplazo hormonal (para el tratamiento de la menopausia), no tener hijos o tener el primero después de los 35 años de edad, no dar leche materna y llevar una vida sedentaria (American Cancer Society, 2017).

El tratamiento integral del cáncer de mama es multidisciplinario, los manejos son cirugía y radioterapia en cualquiera de sus tres modalidades (neoadyuvante, adyuvante y paliativa) y el tratamiento sistémico incluye la quimioterapia, la terapia endócrina y la terapia dirigida a blancos moleculares (American Cancer Society, 2017).

En México, la incidencia de cáncer de mama ha mantenido una tendencia al alza en el periodo de 2011 a 2016 (de 13.92 a 16.12, respectivamente, INEGI, 2018) y cada vez es más común encontrar casos de cáncer de mama resistentes a la quimioterapia, por lo tanto, es indispensable buscar otras alternativas terapéuticas para su tratamiento y de esta manera disminuir la tasa de incidencia y aumentar la sobrevida.

1.2. Cisplatino

1.2.1. Aspectos Generales

Algunos metales son esenciales para los procesos celulares y dependiendo de su disponibilidad, fueron seleccionados durante la evolución para mejorar los procesos bioquímicos involucrados en tales procesos celulares. Los metales tienen diferentes características que incluyen actividad redox y modos de coordinación y reactividad variable, por lo tanto, su concentración intracelular es altamente regulada. Se ha encontrado que las concentraciones anormales de iones metálicos están asociadas con varios desórdenes

patológicos, incluyendo cáncer. Sin embargo, algunos compuestos metálicos son candidatos potenciales como agentes anticancerígenos. [1]

El descubrimiento del cisplatino en 1960 (CDDP; cis-diaminodicloroplatino; cis-[PtCl₂(NH₃)₂]) despertó un potencial interés como medicamento quimioterapéutico contra el cáncer. El uso clínico del CDDP ha sido utilizado en pacientes con diferentes tipos de cáncer como el cáncer de ovario, pulmón, testículo, cervicouterino, estómago y próstata, observándose una mejora en los pacientes tratados. Sin embargo, su uso está limitado debido a la toxicidad en tejidos normales [2, 3].

Adicionalmente, las terapias combinadas para el tratamiento de cáncer son comunes, en donde el CDDP es frecuentemente usado en combinación con uno, dos, tres o incluso cuatro agentes distintos (por ejemplo: paclitaxel e inhibidores de proteínas) con resultados positivos. Este trabajo conjunto conlleva a tener un mayor efecto en la antiproliferación del cáncer, mientras se producen efectos secundarios mínimos [3-10].

1.2.2. Ventajas del uso de cisplatino y efectos Secundarios

Clínicamente, el CDDP es usado como adyuvante en las terapias contra cáncer. Su efecto anticancerígeno consiste en inducir muerte de las células tumorales [4, 5]. Sin embargo, la dosis administrada es limitada debido a los efectos secundarios, los cuales consisten en efectos que dañan a las células sanas, tales como: disminución de la producción de células de la médula ósea y su posterior disminución en sangre (mielosupresión) y disminución en la respuesta a infecciones (inmunosupresión). Algunos efectos secundarios más específicos incluyen el daño renal (nefrotoxicidad), daño neural (neurotoxicidad), alteraciones en el corazón (cardiotoxicidad), hepatotoxicidad y pérdida de la audición [3, 5-10].

También se ha observado que los tumores generan resistencia al tratamiento con CDDP de dos maneras. La “resistencia adquirida” donde el CDDP es inicialmente eficiente pero después se vuelve inefectivo con el

tiempo y la “resistencia intrínseca” que ocurre cuando es inefectivo desde el inicio del tratamiento [11].

Los mecanismos celulares involucrados en la resistencia a CDDP incluyen: disminución en la acumulación intracelular de CDDP y/o incremento de expulsión del CDDP al medio extracelular, inactivación por incremento en los niveles de análogos sulfurados de alcoholes (tioles celulares), incremento de actividad de la vía de reparación del ADN por escisión de nucleótidos (NER, por sus siglas en inglés) y disminución en la reparación de sustitución de bases del ADN (MMR, por sus siglas en inglés) además de evasión de apoptosis (ver apartado 1.2.5.) [11-13]. Con base en estos antecedentes, queda claro que es necesario buscar alternativas quimioterapéuticas o un tratamiento combinado de CDDP con otros agentes para minimizar los efectos secundarios negativos antes mencionados con la finalidad de mejorar la calidad de vida del paciente.

1.2.3. Mecanismos de acción del CDDP

El CDDP básicamente induce apoptosis mediada por la activación de varias vías de transducción de señales. Este efecto se ve reflejado por la inhibición de la síntesis de ADN y la reparación del daño que resulta en el arresto del ciclo celular en la fase G1, S o G2-M y finalmente la inducción de apoptosis [3]. El CDDP induce apoptosis a través de diversos mecanismos: (**Figura 1**):

- Inducción de la producción de Especies Reactivas del Oxígeno (ROS). El daño generado en el ADN esta mediado por radicales libres inducidos por la adición de metales que inhiben la reparación del ADN. Ya sea directamente por el radical libre, mediante la sustitución de zinc de los dominios de dedos de zinc o indirectamente, por la disminución del glutatión celular (provoca un consecuente aumento intracelular de zinc) [14].
- Interacción con el ADN: Daño y mecanismos de reparación del ADN. El CDDP (a bajas concentraciones) genera aductos en el ADN al interaccionar el átomo de platino con las guaninas del ADN generando un daño, el cual es reconocido por las proteínas de la reparación de

cambio de nucleótido que se unen en el aducto (reparación por escisión de nucleótidos), sin embargo, no se lleva a cabo la reparación debido a la presencia del platino y se activa la apoptosis [15].

- Apoptosis extrínseca: El CDDP activa el receptor TRAIL (que actúa a través del factor de necrosis tumoral (TNF)) e interactúa con los receptores de muerte (DR4 y DR5) y activa vías apoptóticas intracelulares [16, 17].
- Apoptosis intrínseca: el CDDP está implicado en la despolarización de la membrana mitocondrial, permitiendo la acumulación de citocromo C en el citosol, la translocación de BAX, la disminución de BCL-2 y la activación de caspasas 7 y 9 activando así la apoptosis [18].
- Interacción con p53: Se ha reportado que la expresión de p53 normal es esencial para el efecto citotóxico del CDDP y la activación de la apoptosis, ya que p53 tiene la capacidad de reconocer y unirse al ADN modificado por el CDDP y de esta manera activar la muerte celular al no poder repararse el daño generado en el ADN [19].
- Intervenciones Epigénéticas: Los efectos del tratamiento de CDDP en las modificaciones postraduccionales de las histonas se ve reflejado en la fosforilación de la histona H3 en Ser10, mediada por la vía MAPK; y la hiperacetilación de la histona H4 [20]. Una terapia combinada de inhibidores de deacetilasas de histonas y CDDP puede ser un buen candidato para el uso clínico durante la quimioterapia del paciente [21].
- MicroARNs: Al analizar la expresión de microARNs (miRNAs) y los genes que regulan, se encontró que el CDDP aumenta los niveles de miR-16, miR-34a-c, miR-17-5p y miR-125, mientras sus oncogenes blanco (BCL2, E2E1 y E2F3, respectivamente) fueron reducidos después del tratamiento. A su vez, disminuye los niveles de miR-106 y miR-105 mientras que sus genes blanco (RB1 y p53, respectivamente)

Análisis de la fosforilación de p53 en S15, S20 y S46 inducidas por el Resveratrol y su asociación con la sensibilización a Cisplatino en células MCF-7_R resistentes

aumentan su expresión después del tratamiento, activando de este modo la apoptosis [22].

- Señalización de calcio: El CDDP provoca un aumento del $[Ca^{2+}]_i$ *in vitro* activando la apoptosis [23].

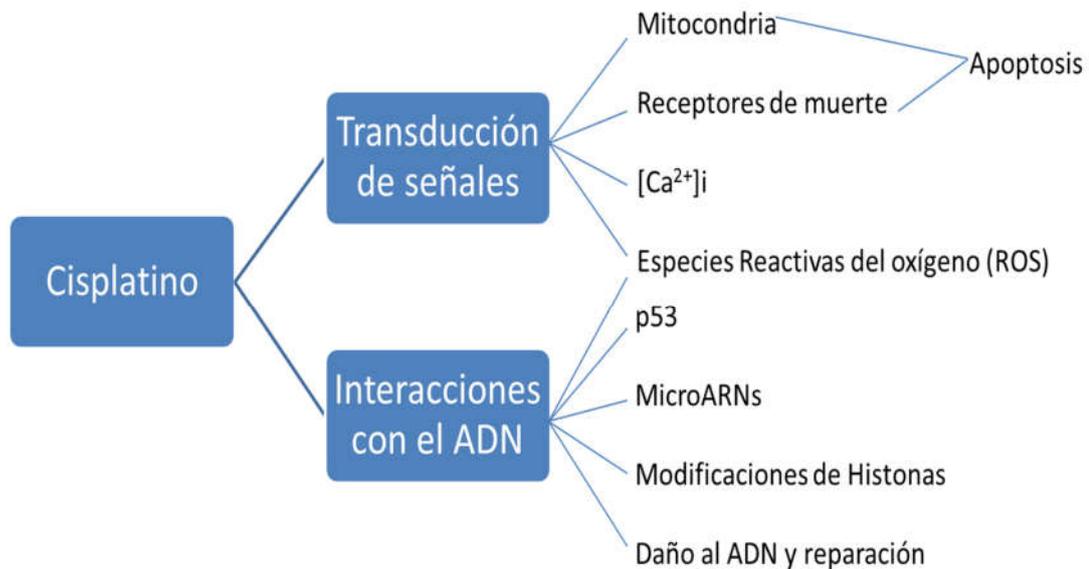


Figura 1. Mecanismos de acción de CDDP.

1.2.4. Mecanismos de resistencia a CDDP

La resistencia a diferentes fármacos representa la principal causa del fracaso en los tratamientos para curar a los pacientes con cáncer. Cuando las células se vuelven resistentes a CDDP, las dosis pueden incrementarse y con ello una toxicidad mayor en diferentes órganos [11].

Los mecanismos celulares de resistencia a CDDP son multifactoriales. En general, las proteínas de los mecanismos de defensa celular están sobreexpresadas en las células resistentes a CDDP, además, presentan alteración en la respuesta celular por daño genotóxico inducido por fármacos [24].

Los mecanismos celulares de resistencia a CDDP son. A) desintoxicación por tioles de glutatión y metalotioneína; B) aumento en la

reparación, tolerancia a lesiones nucleares y reducción de apoptosis y C) baja acumulación de CDDP [25].

El CDDP entra a la célula (transporte activo) y sus ligandos cloruro se sustituyen por agua, formando especies que reaccionan con sitios nucleofílicos de las macromoléculas celulares [13]. Una vez dentro, interacciona con otras moléculas, además del ADN, incluyendo aquellas que contienen grupo sulfuro, como la metalotioneína y glutatión, que secuestran el CDDP y lo remueven de la célula. La metalotioneína participa en la remoción de iones de metales pesados. El glutatión, en presencia de CDDP, forma un complejo que es eliminado de las células. Los niveles de metalotioneína y glutatión están incrementados en algunos, mas no en todos, los casos de resistencia celular a CDDP [13].

Algunos factores de transcripción están involucrados en la resistencia a CDDP tales como YB-1 (proteína-1 de unión a Y-box), CTF2 (factor de transcripción 2 de unión a CCAAT), ATF4 (Factor activador de transcripción 4), ZNF143 (Factor de los dedos de zinc 143) y mtTFA (Factor de transcripción mitocondrial A). YB-1 y ZNF143 pueden unirse al ADN modificado por CDDP junto a las proteínas de reparación al ADN, indicando que pueden estar participando en tal proceso [26]. También se ha observado una sobreexpresión de oncogenes como *c-fos*, *c-myc*, *H-ras*, *c-jun* y *c-abl* [13].

Recientes estudios demuestran que alteraciones inducidas por fármacos en la metilación del ADN tiene un papel importante en la resistencia. La reversión de resistencia a CDDP en neuroblastoma murino fue inducida a través de la inhibición de la actividad de las ADN metiltransferasas [27]. El miR-345 y miR-7 cuyo blanco es el ARNm la proteína MRP1 se han encontrado disminuidos en células MCF-7, sugiriendo que están asociados a un fenotipo resistente a CDDP [28]. En otros tipos de cáncer, se ha observado un aumento de la glicoproteína P (Pgp) y MRP1 que funcionan como bombas de salida dependientes de ATP. Ciclosporina A y PAK-104P, agentes revertantes de

resistencia, son capaces de disminuir la resistencia a CDDP en algunos modelos *in vitro* [29].

1.3. Resveratrol

1.3.1. Información General

El Resveratrol (3,5,4'-trihidroxiestilbeno) (C₁₄H₁₂O₃) es una fitoalexina natural producida por una amplia variedad de plantas, por ejemplo, las uvas rojas, cacahuates y bayas. El uso del Resveratrol en los extractos de uva data del 2500 A.C. [30]. El Resveratrol fue identificado por primera vez en 1940 como un constituyente de las raíces de hellebore blanco (*Veratrum grandiflorum*), también en bebidas japonesas y chinas usadas en medicina tradicional [31-33].

Actualmente el Resveratrol es conocido como un polifenol natural producido por algunas plantas en respuesta a estrés, lesiones, radiación ultravioleta (UV) e infecciones fúngicas como parte de un mecanismo de defensa. La piel fresca de las uvas contiene una concentración en un intervalo de 50 a 100 µg de Resveratrol por gramo, y la concentración en el vino va desde 0.2 a 7.7 mg por litro. Los estudios epidemiológicos han encontrado una relación inversa entre el consumo de vino de uva roja y la incidencia de enfermedades cardiovasculares [34, 35]

La inflamación juega un papel importante en la patogénesis de una amplia variedad de enfermedades incluyendo enfermedades cardiovasculares, cáncer, diabetes, Alzheimer y enfermedades autoinmunes. Existen agentes naturales que pueden suprimir esta inflamación y tienen un efecto importante en la mitigación de los síntomas de estas enfermedades. El Resveratrol exhibe actividades antioxidantes y antiinflamatorias lo cual lo hace un compuesto potencial para el tratamiento de estas enfermedades [30].

1.3.2. Resveratrol y su uso en el tratamiento contra el cáncer

Se ha demostrado que el Resveratrol suprime la proliferación de gran variedad de tumores, incluyendo linfomas y mielomas; cáncer de mama, colon,

páncreas, estómago, próstata, cabeza-cuello, ovario, hígado, pulmón y cervical; melanoma y de músculo [30]. Además de inhibir proliferación, el Resveratrol induce apoptosis a través de la vía dependiente de caspasa 8 (Vía I, mediada por receptores) y/o de la vía dependiente de la caspasa 9 (Vía II, mitocondrial). Los mecanismos de supresión de la proliferación e inducción de apoptosis se describen a continuación (**Figura 2**).

Vía Fas: El Resveratrol activa a los receptores de muerte, que en turno activan la apoptosis dependiente de la vía Ligando de Fas (FasL, vía tipo I) en células tumorales. Fas es uno de los receptores de muerte del Factor de Necrosis Tumoral (TNF) [36]. La combinación de Resveratrol con perifosina o bortezomib aumenta esta respuesta apoptótica [37].

Vía mitocondrial: El Resveratrol ha demostrado activar la apoptosis de la vía tipo II mitocondrial, a través de la despolarización de la membrana mitocondrial, activando de esta manera la caspasa 9 en las células cancerosas [38]. También se ha observado que el Resveratrol induce apoptosis a través de la disminución de BCL-2 [39].

Vía Rb-E2F/DP: Rb y E2F son miembros de la familia de factores de transcripción, los cuales son proteínas importantes que regulan la progresión del ciclo celular en la transición de la fase G1/S. Hay evidencia que el Resveratrol baja la hiperfosforilación de Rb favoreciendo su activación. Esta respuesta está acompañada por una baja en la expresión de la familia de factores de transcripción E2F y sus compañeros heterodiméricos DP1 y DP2, facilitando de esta manera el arresto del ciclo celular y la apoptosis en células cancerosas [40]. Además, el efecto antiproliferativo del Resveratrol fue asociado con un marcador de la inhibición de la fosforilación de Rb en concomitancia de la inhibición de proteínas CDKs, tal marcador es p21^{Cip/WAF1}, una proteína que está regulada transcripcionalmente por p53 [41, 42].

Vía de la activación de p53: *P53* es un gen supresor de tumores. Existen numerosos reportes acerca del papel de p53 en la apoptosis inducida por Resveratrol [43-48]. En un estudio se reportó que el Resveratrol induce

Análisis de la fosforilación de p53 en S15, S20 y S46 inducidas por el Resveratrol y su asociación con la sensibilización a Cisplatino en células MCF-7_R resistentes

apoptosis únicamente en células que expresan p53 silvestre pero no en células deficientes de p53 [46]. También se ha observado que Resveratrol aumenta p53, P21, la proteína proapoptótica BAX e induce una disminución de BCL-2 y ciclina D1 [43, 47, 49].

Activación de la vía de las ceramidas: Se ha demostrado que Resveratrol puede inhibir el crecimiento celular e inducir apoptosis por un incremento y acumulación de ceramida en cáncer de mama [50].

Vía de polimerización de la tubulina: Diversos estudios han encontrado que el Resveratrol interfiere con la polimerización de la tubulina (componente central del centrosoma) de una manera dosis dependiente, mediante un arresto celular en la fase G2/M seguido de la activación de la apoptosis [51].



Figura 2. Mecanismos de quimiosensibilización de tumores por Resveratrol. El Resveratrol sensibiliza a las células tumorales a agentes quimioterapéuticos mediante proteínas blanco involucradas en supervivencia, proliferación y transporte celular.

Vía de la Adenil-Ciclase: el GMP y AMP cíclico (cAMP) son conocidos como reguladores de la proliferación celular. El Resveratrol es capaz de incrementar los niveles de cAMP pero no de cGMP, a través de un efecto

estimulador de la enzima adenilato ciclasa; inhibiendo el crecimiento celular a través del sistema de la proteína cinasa A dependiente de cAMP [52].

Vía de Survivina: Survivina pertenece a la familia de proteínas inhibidoras de apoptosis (IAP) y actúa como reguladora de la división celular. Durante la mitosis esta proteína se localiza en los centrosomas, el cinetocoro y en el eje mitótico. Se ha reportado en diversos tipos de cáncer que survivina está sobreexpresada y que interactúa con la proteína HSP90 para bloquear la función de p53 [53, 54]. El Resveratrol disminuye la expresión de survivina y de esta manera activa la vía de las caspasas, en especial la 9, llevando a apoptosis a las células cancerosas [30, 55-57].

Otros mecanismos de acción del Resveratrol son: a través de la inhibición de c-FLIP activando la caspasa 8 [58]; la disminución de la Glicoproteína-P, que aumenta el transporte de compuestos naturales y lipofílicos fuera de células cancerígenas resistentes [59]; la disminución de MRP1 que transporta agentes quimioterapéuticos fuera de la célula en asociación con el glutatión celular [60]; la disminución de Bcl-xL, una proteína mitocondrial antiapoptótica [57]; la inhibición de la vía NFκB y STAT-3 [61, 62]; y la inhibición de XIAP, una proteína anti-apoptótica, permitiendo la actividad de las caspasas [63]

1.4 Modificaciones postraduccionales de la proteína supresora de tumores p53

p53 es una proteína supresora de tumores, se le refiere como el “guardián del genoma” que regula el ciclo celular, la reparación del ADN e inducción de apoptosis en respuesta al daño irreparable del ADN. p53 está dividida en 3 dominios funcionales: el dominio N-terminal de transactivación, un dominio de unión al DNA y un dominio regulatorio C-terminal [64, 65].

El dominio N-terminal de transactivación es requerido para regular la estabilidad y actividad transcripcional de p53. Para ser más específicos, las fosforilaciones de este dominio modulan la afinidad de p53 con su regulador

negativo MDM2 y la activación selectiva de los genes blanco de p53. El dominio de unión al ADN es necesario para el reconocimiento de los promotores de los genes blanco de p53. El dominio regulatorio C-terminal posee señales de localización nuclear (NLS), señales de exporte nuclear (NES) así como un dominio de tetramerización y es regulada por modificaciones postraduccionales tales como ubiquitinación, acetilación y metilación [66].

En condiciones normales, los niveles de expresión de p53 son bajos debido a su regulador negativo MDM2 y la degradación vía proteosoma. En respuesta a estrés genotóxico, p53 es estabilizada, se acumula en el núcleo y promueve la inhibición del ciclo celular para facilitar la reparación del ADN. Sin embargo, cuando el daño en el ADN es irreparable, p53 induce la expresión de genes pro-apoptóticos [67].

1.4.1 Fosforilación de p53 y respuesta celular.

La fosforilación de p53 en los residuos de Serina (Ser), Treonina (Thr) y Tirosina (Tyr) son indispensables para la activación de señales en respuesta de daño al ADN. Las fosforilaciones del dominio N-terminal de transactivación son un prerrequisito para la estabilización de p53 y la activación de sus genes blanco. Cuando las células son expuestas a agentes genotóxicos, p53 es fosforilada en Ser15 por ATM en una fase inductiva temprana (<24 horas), seguida por ATR en una fase tardía (>24 horas) [68, 69] y en Ser20 por CHK1/2. Ambas fosforilaciones permiten a p53 escapar de la ubiquitinación y degradación mediada por MDM2. p53 estabilizada activa sus genes blanco promoviendo el arresto del ciclo celular (por ejemplo, *P21*) seguido de reparación al ADN [70-72]. Bajo condiciones de daño irreparable (>24 horas), Ser46 es fosforilada por ATM [69], y otras cinasas como HIPK2 [73] en respuesta a radiación UV y DYRK2 en respuesta a adriamicina y radiación UV [74] (**Figura 3**). La fosforilación de Ser46 es necesaria para inducir genes relacionados con la apoptosis mediada por p53 tales como *p53AIP1*, *PUMA*, *NOXA*, *BAX* y *PIG3* [75-79] y la represión transcripcional de genes como *BCL-2* [80]. La identificación de las cinasas responsables para la fosforilación de

Análisis de la fosforilación de p53 en S15, S20 y S46 inducidas por el Resveratrol y su asociación con la sensibilización a Cisplatino en células MCF-7_R resistentes

p53 expresadas a partir del estímulo generado en la célula, es importante para conocer los mecanismos de cambio en la función de p53, principalmente la fosforilación de la Ser46, la cual aumenta la eficiencia de inducción de la apoptosis en células tumorales por p53 [73].

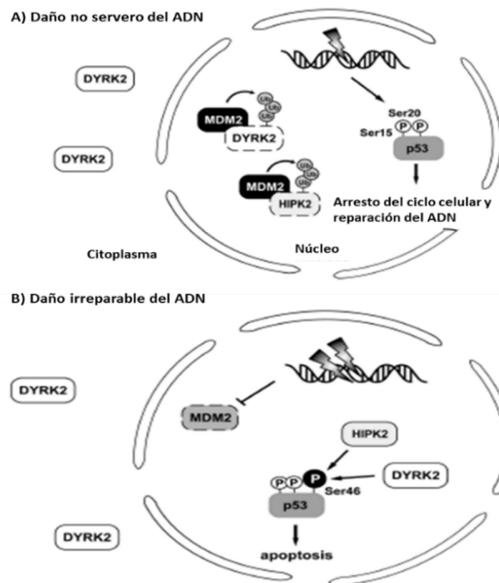


Figura 3. Modelos para la fosforilación de Ser46 mediada por HIPK2 y DRYK-2 en respuesta al daño al ADN. A) Bajo condiciones normales o daño no severo del ADN, DYRK2 e HIPK2 nucleares son ubiquitinadas por MDM2, resultando en una disminución en su expresión. B) Bajo estrés genotóxico, la disminución en la expresión y función de MDM2 causa la estabilización y expresión de HIPK2 y DYRK2, fosforilando de esta manera a p53 en Ser46 para inducir apoptosis en las células.

Algunos reportes demuestran la importancia de la modificación de Ser46 usando una p53 mutante. Feng y colaboradores reportaron que una mutación de p53 en Ser46A disminuye la apoptosis dependiente de p53 [81]. Asimismo, la introducción de una p53 mutada en p53-Ser46D, que imita la fosforilación de Ser46, puede revertir la resistencia a la apoptosis inducida por p53 en células HSC-3 de cáncer oral [82].

1.4.2 Efectos del Resveratrol y de la resistencia a CDDP en la fosforilación de p53.

Múltiples estudios han encontrado que el Resveratrol induce un aumento en la fosforilación de p53 en Ser15 además de promover apoptosis celular en

diversos tipos de cáncer [48, 83, 84]. Lin *et al.*, describen esta pSer15 en células de cáncer de próstata por medio de la inhibición de MAPK [85]; Shi *et al.*, observan el mismo efecto, sin embargo, con la activación de la vía MAPK además de un aumento de C-Fos, C-Jun y p21 [45]; Rusin *et al.*, además encontraron pSer20, pSer37 de p53 y p-H2AX en osteosarcoma [86].

Existen reportes de que Akt promueve la resistencia a CDDP en cáncer de ovario humano por medio de la inhibición de la fosforilación de p53 (Ser15, Ser20 y Ser46) y su función nuclear. En estas células PI3K activa a Akt (por medio de señales de proliferación y supervivencia celular) y ésta modula el contenido de p53 por la fosforilación de MDM2 que activa la proteólisis de p53, inhibiendo la expresión de PUMA y la apoptosis [87]; Johnson-Holiday *et al.* describen que la interacción de CCR9-CCL25 (citosinas inflamatorias) promueven dicha resistencia, activando Akt dependiente de PI3K [88]; Huang *et al.*, descubrieron que la desfosforilación de p53 y p63 están involucradas en la generación de resistencia a CDDP [89]; finalmente Kim *et al.*, observaron que al inhibir Akt se activa p53 y se revierte la resistencia a CDDP [90].

En el caso particular de células MCF-7, Lin y colaboradores describieron que la integrina $\alpha\text{V}\beta\text{3}$ tiene un receptor para Resveratrol en su dominio heterodimérico extracelular (monómero β3 , péptido Arg-Gly-Asp (RGD); una vez que el Resveratrol interactúa con este receptor, se activan las cinasas ERK1/2 (vía MAPK) las cuales inducen la fosforilación de p53 en Ser15 [91]. Hsieh reportó mediante un análisis *in silico* la interacción del Resveratrol y un derivado, triacetil Resveratrol, con la subunidad β3 de la integrina $\alpha\text{V}\beta\text{3}$ (**Figura 4**), también demostró que ambos compuestos promueven la fosforilación de en Ser15 de p53 y la activación de p21 [92].

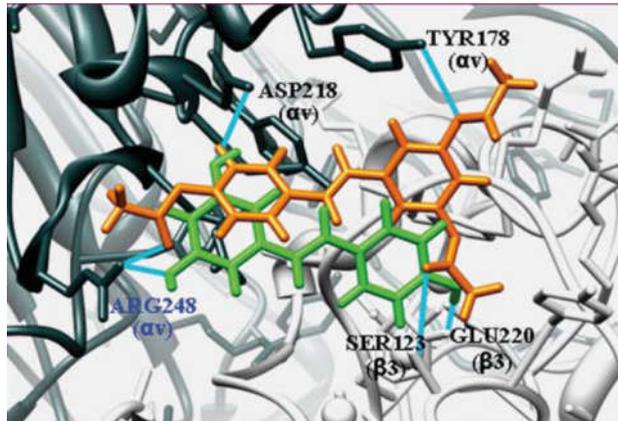


Figura 4. Estructura y unión del Resveratrol y su derivado triacetil a la integrina $\alpha V\beta 3$. El Resveratrol y su derivado triacetil Resveratrol forman puentes de hidrógeno (líneas azules) con el mismo residuo Arg248 de la subunidad αV de la integrina (azul oscuro). El Resveratrol (verde) se une a Asp218 de la subunidad αV (azul oscuro) y a Glu220 de la subunidad $\beta 3$ (blanco). El triacetil Resveratrol (naranja) se une a Tyr178 de la subunidad αV (azul oscuro) y Ser123 de la subunidad $\beta 3$ (blanco) [92].

Otros grupos de investigación también han reportado que el Resveratrol induce la fosforilación de p53 en Ser15 y Ser20 en células MCF-7 e induce apoptosis [93, 94]. Finalmente, se ha reportado que Resveratrol inhibe la proliferación de células MCF-7 resistentes a tamoxifen, a través de la fosforilación de p38 que activa a p53 y ésta se une al promotor proximal del Receptor de estrógenos α (ER α) llevando a la inhibición de la expresión de este receptor [95].

1.5 Antecedentes Directos

En nuestro laboratorio se encontró que células MCF-7 tratadas con Resveratrol presentan una disminución en la expresión de genes de reparación y de la replicación del ADN, la recombinación homóloga y del ciclo celular, además de una disminución de los niveles de las proteínas del complejo MRN (MRE-11-NBS1-RAD50) importante en la vía de reparación del ADN por recombinación homóloga [96].

Además, se observó que la combinación del tratamiento con CDDP y Resveratrol genera una considerable inhibición de la proliferación celular.

Análisis de la fosforilación de p53 en S15, S20 y S46 inducidas por el Resveratrol y su asociación con la sensibilización a Cisplatino en células MCF-7_R resistentes

Notablemente, la cantidad de CDDP utilizada en el tratamiento combinado es 30 veces menor a la de solo CDDP (IC_{50} , de 0.13 contra 4.95 μ M, respectivamente). Esto sugiere que el Resveratrol puede ayudar a reducir la dosis requerida de CDDP para que un paciente pueda obtener los mismos beneficios de este agente anticancerígeno, pero ahora con solo una trigésima parte de la dosis y una posible disminución de efectos secundarios.

Adicionalmente, se desarrolló un fenotipo celular MCF-7 resistente a CDDP (MCF-7_R). Estas células MCF-7_R (IC_{50} , 9.57 μ M) son dos veces más resistentes al CDDP que las células MCF-7 sensibles (IC_{50} , 4.95 μ M). Cuando las células MCF-7_R son sometidas a un tratamiento con Resveratrol, hay una reversión en la resistencia celular al CDDP; es decir, en presencia de Resveratrol las células MCF-7_R aparentemente regresan a un fenotipo sensible al CDDP y además presentan una inhibición de la proliferación celular similar a la de las células MCF-7 sensibles (IC_{50} , 0.18 μ M vs. IC_{50} , 0.13 μ M, respectivamente).

Para conocer si la proteína p53 tiene algún papel en la generación de resistencia a CDDP, en las células MCF-7_R y en las MCF-7 se inhibió la expresión de p53 por medio de un shARN y su actividad transcripcional por medio de pifitrina α , y se encontró un aumento de hasta 3 y 5 veces de la IC_{50} bajo tratamiento con CDDP, respectivamente, sugiriendo que la pérdida de p53 está directamente involucrada en la generación de dicha resistencia. Además, observamos que el Resveratrol en combinación con CDDP aún es capaz de disminuir la dosis IC_{50} necesaria de CDDP en estas condiciones de carencia de p53, sugiriendo que el Resveratrol induce una disminución en la viabilidad y proliferación celular por la activación de p53 en este modelo de estudio, pero que la inhibición de p53 es un factor que conlleva a la pérdida de sensibilidad al CDDP y al Resveratrol.

2. JUSTIFICACIÓN

El CDDP es un agente anticancerígeno usado en la quimioterapia de varios tipos de cáncer, incluyendo el cáncer de mama. Sin embargo, los efectos adversos y la resistencia a la quimioterapia basada en CDDP es una causa importante en el fracaso de su tratamiento, en particular en pacientes que recaen y que necesitan una segunda quimioterapia. Por lo anterior, es necesario la búsqueda de nuevas alternativas, como el uso del Resveratrol, que ayuden a restablecer la sensibilidad de los tumores a la quimioterapia basada en CDDP. Sobre este argumento, es indispensable investigar los mecanismos moleculares mediante los cuales el Resveratrol puede reactivar la muerte celular de tumores resistentes a CDDP.

3. HIPÓTESIS

El CDDP inhibe la fosforilación de p53 en los residuos Ser15, Ser20 y Ser46 como parte de un mecanismo de generación de resistencia a CDDP en las células MCF-7_R resistentes; mientras que el Resveratrol favorecerá la fosforilación de dichos residuos para activar y estabilizar a p53, y de esta manera superar la resistencia a CDDP activando mecanismos de muerte celular.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo General

Analizar la fosforilación inducida por el Resveratrol en residuos indispensables para la activación de p53 y su asociación con la sensibilización a CDDP en células MCF-7_R.

4.2. Objetivos Particulares

1. Comparar los niveles de fosforilación de p53 en Ser15, Ser20 y Ser46 a 6, 12 y 24 h inducidos bajo tratamiento con CDDP y/o Resveratrol en células MCF-7 y MCF-7_R.
2. Analizar la actividad transcripcional dependiente de p53 a través de sus genes blanco tales como *P21*, *PIG3*, *PUMA*, *BAX* y *NOXA* en las células MCF-7_R tratadas con CDDP y/o Resveratrol.
3. Determinar los niveles de apoptosis total en las células MCF-7 y MCF-7_R tratadas con CDDP y/o Resveratrol.
4. Identificar la cinasa activada por el Resveratrol que fosforila a p53 en Ser20, mediante el uso de inhibidores específicos de cinasas en células MCF-7_R.
5. Dilucidar la cinasa de Ser20 indispensable para la activación de apoptosis mediante el uso de inhibidores específicos de cinasas de Ser20 en células MCF-7_R tratadas con CDDP y/o Resveratrol.
6. Comparar los niveles de expresión de las proteínas BCL-2 y BAX y su correlación, así como los de ATM total y fosforilada bajo tratamientos con CDDP y/o Resveratrol en células MCF-7_R.

5. METODOLOGIA EXPERIMENTAL

Cultivo celular

Células MCF-7 y MCF-7_R fueron cultivadas a 37°C y 5% de CO₂ en medio DMEM (Life Technologies, Inc.) complementado con 10% de suero fetal bovino y 0.1 unidades/ml de antibiótico (penicilina y estreptomina) y antimicótico (Anfotericina B). Las células MCF-7_R estuvieron sometidas a una concentración constante de 6 µM/ml de Cisplatino (CDDP) (Sigma – Aldrich Co.).

Tratamientos celulares

Las células MCF-7 y MCF-7_R fueron colocadas en placas de 60 mm con una cantidad de 2x10⁵ células durante 24 horas antes de su tratamiento. Posteriormente se trataron con 6 µM/ml de CDDP con y sin Resveratrol (Sigma-Aldrich) a una concentración de 100 µM/ml en medio DMEM complementado durante 6 o 48 horas.

Para los ensayos con inhibidores específicos de cinasas, células MCF-7 y MCF-7_R fueron tratadas con Compuesto C (40 µM/ml), inhibidor de CHK2 (25 µM) o D4476 (60 µM) simultáneamente con CDDP y/o Resveratrol, durante 6 o 48 horas. Los inhibidores fueron adquiridos de Santa Cruz Biotechnology.

Western Blot

Las células MCF-7 y MCF-7_R fueron cosechadas por tripsinización y colectadas mediante centrifugación. Se realizó una extracción de proteínas totales con buffer RIPA (Tris-HCl pH 7.5, 50 mM; EDTA pH 8.0, 1 mM; NaCl 150 mM; NP-40 1%). Las muestras fueron separadas en un gel de poliacrilamida con SDS al 10% a 20 mA (para ATM al 7%; para BCL2 y BAX al 16%) y transferidas a membranas de nitrocelulosa (GE Healthcare, USA) durante 16 horas a 0.04 mA (para ATM, 2h a 120 V.; para BCL2 y BAX 1:15 h y 0.09 mA.); seguido de una hora de bloqueo con TBS-Tween (10 mM

Análisis de la fosforilación de p53 en S15, S20 y S46 inducidas por el Resveratrol y su asociación con la sensibilización a Cisplatino en células MCF-7_R resistentes

Tris-HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl, Tween-20 0.1% v/v) con 5% p/v de leche libre de grasas y un lavado con TBS-Tween-20 a 0.1% de 5 minutos. Las membranas fueron incubadas con anticuerpos primarios contra p53 (acoplado a Horse Radish Peroxidase-HRP), ATM, BCL2 (Santa Cruz Biotechnology) o BAX-HRP (Abcam), durante toda la noche a 4°C.; posteriormente se incubó con un anticuerpo secundario anti-ratón (ATM y BCL-2) durante 1 hora a 4°C. Finalmente se detectó la proteína mediante el kit de Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Fisher Scientific, USA) en placas de autoradiografía. Fue usado un anticuerpo anti-actina-HRP (Santa Cruz Biotechnology) incubado durante 45 minutos a 4°C para la normalización de carga de proteína.

Western Blot (Proteínas fosforiladas)

Después del tratamiento correspondiente, las células MCF-7 y MCF-7_R fueron cosechadas por tripsinización y colectadas mediante centrifugación. Se realizó una extracción de proteínas totales con buffer RIPA (Tris-HCl pH 7.5, 50 mM; EDTA pH 8.0, 1 mM; NaCl 150 mM; NP-40 1%) y un coctel de inhibidores de fosfatasa (Santa Cruz Biotechnology). Las muestras fueron separadas en un gel de poliacrilamida con SDS al 10% a 20 mAmp. (ATM 7%) y transferidas a membranas de nitrocelulosa durante 16 horas a 0.04 Amp. (p-ATM, 2h a 120 V.); seguido de una hora de bloqueo con TBS-Tween (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl, Tween-20 0.1% v/v) conteniendo 5% de Albúmina Sérica Bovina (BSA) y un lavado con TBS-Tween durante 5 minutos. Las membranas fueron incubadas con anticuerpos primarios Fosfo-p53 Ser15 (p53-pSer15), Fosfo-p53 Ser20 (p53-pSer20, Fosfo-p53 Ser46 (p53-pSer46) (Cell Signaling Technology) o Fosfo-ATM Ser 1981 (ATM-pS1981) (Santa Cruz Biotechnology) durante toda la noche a 4°C, posteriormente se incubó con un anticuerpo secundario anti-conejo o anti-ratón para ATM, durante 1 hora a 4°C. Finalmente se detectó la proteína mediante el kit de Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Fisher Scientific, USA) en placas de autoradiografía. Fue usado un anticuerpo anti-actina-HRP (Santa Cruz

Análisis de la fosforilación de p53 en S15, S20 y S46 inducidas por el Resveratrol y su asociación con la sensibilización a Cisplatino en células MCF-7_R resistentes

Biotechnology) incubado durante 45 minutos a 4°C para la normalización de carga de proteína.

Extracción de ARN total

Después del tratamiento correspondiente, se cosecharon las células usando 500 µL del reactivo TRIzol (Invitrogen Life Technologies). Posteriormente, se adicionaron 200 µL de cloroformo agitando vigorosamente y se centrifugó a 12,000 RPM por 15 minutos a 4°C. Se añadió a la capa acuosa (en otro tubo), 250 µL de isopropanol se homogenizó y centrifugó a 12,000 RPM por 15 minutos a 4°C. Se decantó el sobrenadante y se adicionaron 500 µL de etanol al 75% para lavar y resuspender la pastilla. Se centrifugó a 7,500 RPM por 10 minutos a 4°C, se decantó el sobrenadante y se dejó secar la pastilla de ARN. Se resuspendió la pastilla en 30 µL de H₂O-DEPC. Se alicuotó y almacenó a -70°C. La integridad del ARN fue determinada por un análisis en gel de agarosa (1.7% a 75 V.) y cuantificado usando un NanoDrop (Thermo Scientific NanoDrop One/One) usando 1 µL de ARN y 99 µL de H₂O-DEPC.

Síntesis de ADN complementario (cADN)

La transcripción reversa del ARN total fue realizada por el kit First Strand cDNA Synthesis (Thermo Fisher Scientific) usando 3 µg de ARN total, 1 µL de primer oligo (dT), 10 µL de agua libre de nucleasas, 4 µL de Buffer de Reacción a 5X, 1 µL de RiboLock RNase inhibitor (20 u/µL); 2 µL de Mix dNTP 10 nM y 2 µL de Transcriptasa Reversa M-MuLV (20 u/µL). El volumen total de 20 µL fue incubado por 60 minutos a 37°C. Para terminar la reacción se incubó a 70°C durante 5 minutos. Se almacenó a -70°C.

RT-PCR en Tiempo Real.

Fue realizada usando el reactivo SYBR Green Master Mix (Thermo Fisher Scientific) usando 10 µL, 1 µL de oligo Sentido (50 ng/µL), 1 µL de oligo Antisentido (50 ng/µL), 1 µL de cADN (3 µg/µL) y 7 µL de agua libre de nucleasas. Las reacciones fueron realizadas en el 7300 Real Time PCR System (Applied Biosystems) bajo las siguientes condiciones: Paso 1, 1 Ciclo,

Análisis de la fosforilación de p53 en S15, S20 y S46 inducidas por el Resveratrol y su asociación con la sensibilización a Cisplatino en células MCF-7_R resistentes

95°C, 10 minutos; Paso 2, 40 ciclos (95°C 0:30 minutos, 60°C 0:30 minutos, 72°C 0:30 minutos); Paso 3, añadir la curva de disociación estándar. La lectura de fluorescencia fue durante la etapa de hibridación (60°C, 0:30 minutos). La Especificidad de cada PCR fue examinada por el perfil de temperatura de disociación de los productos finales. Los datos de la expresión relativa de los genes fueron analizados por el método comparativo de CT ($2^{-\Delta\Delta CT}$). La cantidad relativa de la expresión de los genes se normalizaron a Beta-2 microglobulina (*B2M*). Los genes *P21*, *PUMA*, *NOXA*, *BAX*, *PIG3* y *B2M* fueron adquiridos de Integrated DNA Technologies (IDT) y las secuencias Sentido y Antisentido están representadas en la siguiente tabla:

Blanco	Primer Sentido (5' to 3')	Primer Antisentido (5' to 3')
<i>P21</i>	GGAAGACCATGTGGACCTGT	GGCGTTTGGAGTGGTAGAAA
<i>PUMA</i>	CACCTAATTGGGCTCCATCT	ACGACCTCAACGCACAGTA
<i>BAX</i>	AAAGATGGTCACGGTCCAAC	CAAACCTGGTGCTCAAGGC
<i>PIG3</i>	GGTCACTGGGTAGATTCTGTC	AGTCTGATCACCAGTTTGCTG
<i>NOXA</i>	GTGCCCTTGGAAACGGAAGA	CCAGCCGCCAGTCTAATCA
<i>B2M</i>	ACCTCCATGATGCTGCTTAC	GGACTGGTCTTTCTATCTCTTGT

Ensayos de Anexina V (Apoptosis)

Fue realizado usando el Kit Alexa Fluor 488 AnnexinV/Dead Cell apoptosis (Invitrogen V13245). Después del tratamiento correspondiente, células MCF-7 y MCF-7_R fueron cosechadas por tripsinización y se recuperaron las células suspendidas en el medio DMEM y se centrifugaron a 5,000 RPM durante 3 minutos. Se realizó un lavado con PBS (KH₂PO₄ 1.5 mM, NaCl 155 mM, Na₂HPO₄-7H₂O 2.7 mM, pH 7.2) y se centrifugó a 5,000 RPM por 3 minutos. Se retiró el sobrenadante y se añadieron 200 µL de Buffer ABB 1X (Annexin Binding Buffer), 1 µL de Yoduro de propidio (PI, 1 mg/mL) y 1 µL de Alexa Fluor 488 Annexin V, se resuspendió e incubó a temperatura ambiente en oscuridad durante 15 minutos. Se centrifugó a 5,000 RPM durante 5 minutos y fue finalmente resuspendido en 400 µL de ABB. Las células fueron analizadas por citometría de flujo a 530 y 575 nm en el FACSCalibur. Los datos analizados fueron realizados sobre 20,000 eventos con el Summit Software V. 4.3.

Análisis Estadístico

Los resultados están expresados como el promedio \pm SD de 3 experimentos independientes. Los análisis estadísticos fueron realizados por Anova de una cola seguido por la prueba de Comparación Múltiple de Dunnett (compara el promedio de cada columna con el promedio de una columna control) o la prueba de Comparación Múltiple de Tukey (compara el promedio de cada columna con el promedio de otra). Todos los análisis estadísticos fueron analizados en el PRISM Software V. 6.0. Los valores de $P < 0.05$, 0.01 and 0.001 fueron considerados significativos. Los análisis densimétricos se realizaron mediante el Image Lab Software V. 5.1 (Bio-Rad Laboratories).

6. RESULTADOS

6.1. Resveratrol induce la fosforilación de p53 en Ser20 y disminuye la fosforilación de Ser15 y Ser46 por CDDP en células MCF-7_R

Evaluamos la hipótesis de que la fosforilación de p53, que es requerida para la apoptosis mediada por p53, esta reducida en la respuesta a CDDP [87] en las células resistentes; y que el Resveratrol activa este tipo de apoptosis a través de la restauración de la fosforilación de p53 en Ser15, Ser20 y Ser46 para sensibilizar a las células MCF-7_R. Para probar esta hipótesis, tratamos células MCF-7 y MCF-7_R con 6 µM de CDDP con o sin 100 µM de Resveratrol o 100 µM de Resveratrol durante 6, 12 y 24 h y analizar los niveles de fosforilación de Ser15, Ser20 y Ser46 en respuesta a los tratamientos.

Como se muestra en la **Figura 5A y 5B**, observamos que en las células MCF-7, la fosforilación de p53-pSer15 después del tratamiento con CDDP, tiene un máximo a las 6 h y va disminuyendo (aunque no completamente) a las 12 y 24 h; sin embargo, para Resveratrol y CDDP+Resveratrol, esta fosforilación se mantuvo constante a las 6 y 12 h, con el incremento más alto a las 24 h. Por otro lado, la fosforilación de p53-pSer20 con el tratamiento con CDDP comienza a las 6 h con el incremento más alto a las 12 h. El tratamiento con Resveratrol induce esta fosforilación a las 6 h, disminuye a las 12 h para finalmente mostrar un ligero incremento a las 24 h. El tratamiento con CDDP+Resveratrol induce la fosforilación de este residuo de manera similar al Resveratrol con un moderado incremento a las 24 h. La fosforilación de p53-pSer46 fue muy similar en los tres tratamientos, comenzando la fosforilación a las 6 h y con el incremento más alto a las 24 h. Cabe resaltar que observamos que el Resveratrol por si solo promueve la fosforilación de Ser46 y no había sido reportado previamente.

Sin embargo, en las células MCF-7_R, contrario a lo hipotetizado, el tratamiento con CDDP muestra la activación de fosforilación de Ser15 y Ser46, pero con un retardo hasta las 12 y 24 h, respectivamente. Por otra parte, la

Análisis de la fosforilación de p53 en S15, S20 y S46 inducidas por el Resveratrol y su asociación con la sensibilización a Cisplatino en células MCF-7_R resistentes

fosforilación de p53-pSer20 no presenta ningún incremento con este tratamiento al compararlo con el grupo control (sin tratamiento).

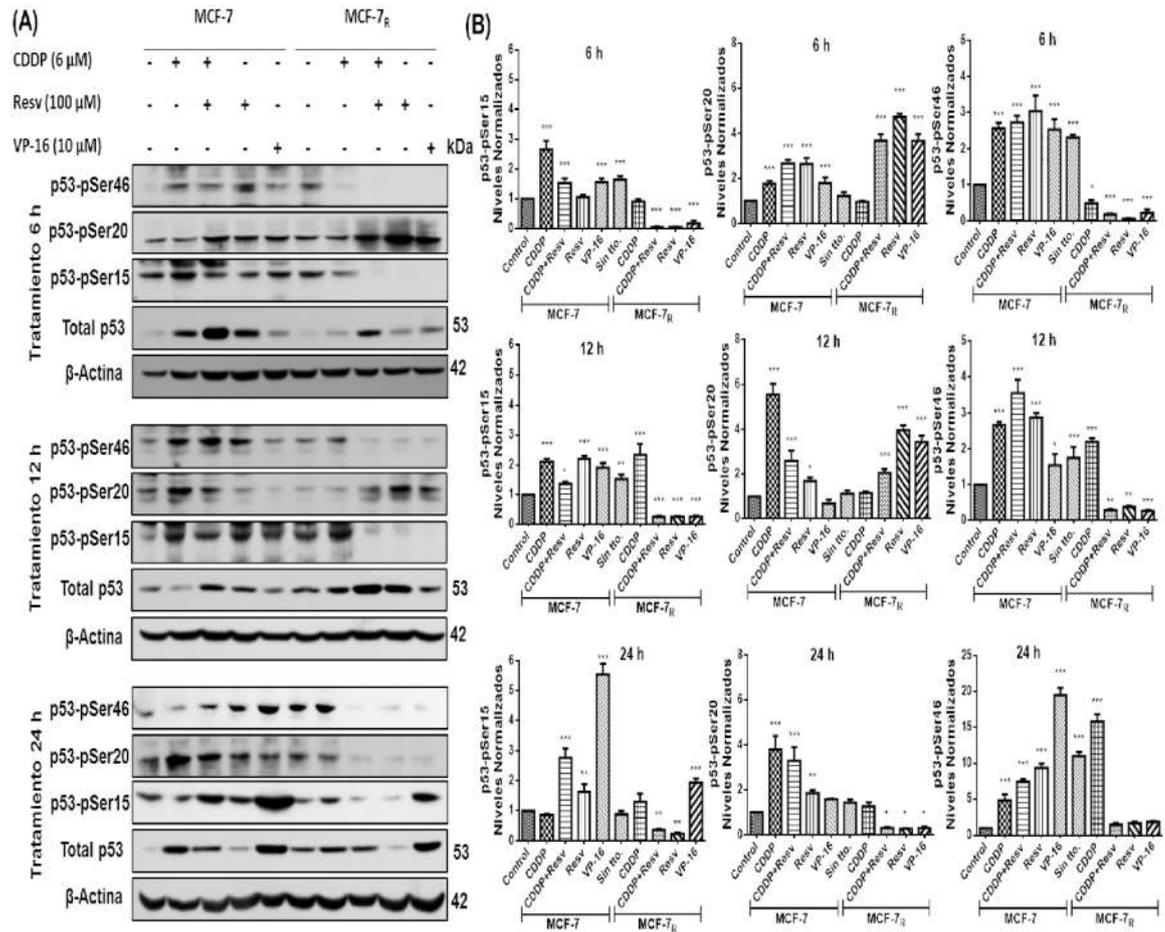


Figura 5. Resveratrol induce la fosforilación de p53 en Ser20 y disminuye la fosforilación de Ser 15 y Ser 46 por CDDP en células MCF-7_R. **(A)** Células MCF-7 y MCF-7_R fueron tratadas con vehículo DMSO-Etanol (Control o sin tratamiento (Sin tto.)) o 6 μM de CDDP con o sin 100 μM de Resveratrol (Resv) o 100 μM de Resveratrol durante 6, 12 y 24 h, sin tratamiento (Sin tto.). Los contenidos de p53 fosforilada y total fueron evaluados por Western Blot usando anticuerpos para residuos fosforilados de p53 o p53 total (DO-1), como se indica. Las células tratadas con VP-16 (10 μM) fueron utilizadas como control positivo de fosforilación de p53. **(B)** Análisis densitométrico de las fosforilaciones de p53 después de la normalización con β-actina. Se analizó mediante Anova de un camino seguido de la prueba de Comparación Múltiple de Dunnett para comparar células MCF-7 sin tratamiento (grupo control) con el resto de los grupos de datos en cada punto de tiempo. Los resultados están representados como el promedio de tres experimentos independientes ±SD. *P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001.

Interesantemente, los tratamientos de CDDP+Resveratrol y Resveratrol muestran un patrón inverso de la fosforilación de p53 por CDDP, fosforilando únicamente a p53-pSer20 con el mayor incremento a las 6 y 12 h y una drástica disminución a las 24 h; e inhibiendo la fosforilación de p53-pSer15 y p53-pSer46 en todos los tiempos analizados, sugiriendo que la fosforilación de Ser20 es un evento importante para la resistencia a CDDP y la restauración de la sensibilidad inducida por el Resveratrol.

El tratamiento con etopósido (VP-16) fue utilizado como control positivo de fosforilación de p53 en las células MCF-7 sensibles a CDDP. Interesantemente, cuando tratamos células MCF-7_R con VP-16 observamos un efecto similar al tratamiento con Resveratrol, sugiriendo la posibilidad de que ambos tienen una vía de señalización común para inducir la fosforilación de p53 en Ser20.

6.2. La fosforilación temprana de p53 en Ser20 inducida por el Resveratrol es suficiente para activar la transcripción dependiente de p53 en las células MCF-7_R

Una proteína p53 estable activa sus genes blanco produciendo de esta manera el arresto del ciclo celular (por ejemplo, *P21*), reparación del ADN [70-72, 74] o apoptosis en condiciones de daño irreparable al ADN (por ejemplo, *PUMA*, *NOXA*, *BAX* y *PIG3*) [77-79]. Con base en la observación de que la única fosforilación de p53 en las células MCF-7_R inducida por el Resveratrol fue en la Ser20, tratamos células MCF-7 y MCF-7_R con 6 μ M de CDDP con o sin 100 μ M de Resveratrol, o solamente 100 μ M de Resveratrol por 6 y 12 h para evaluar si únicamente con esta fosforilación fue suficiente para activar la transcripción dependiente de p53 en las células MCF-7_R y se utilizó RT-PCR en Tiempo Real para determinar los niveles de ARNm de los genes anteriormente mencionados.

Como se muestra en la **Figura 6**, en células MCF-7_R el gen *P21* bajo tratamientos con CDDP con o sin Resveratrol mostró altos niveles de expresión que se mantuvieron constantes en los tiempos de análisis (6 h ~11, ~17 de aumento, respectivamente; 12 h ~13, ~17 de aumento,

Análisis de la fosforilación de p53 en S15, S20 y S46 inducidas por el Resveratrol y su asociación con la sensibilización a Cisplatino en células MCF-7_R resistentes

respectivamente), en cambio con Resveratrol solo hay un aumento significativo a las 12 h (~4 de aumento), sugiriendo que el principal activador es CDDP. En el caso de células MCF-7 tratadas con CDDP, *P21* tiene un aumento significativo de expresión a las 12 h (~7 de aumento), y con el tratamiento de CDDP+Resveratrol desde las 6 h tiene altos niveles de expresión (~27 de aumento) para bajar a las 12 h (~5 de aumento), y con el tratamiento con Resveratrol solo hay un aumento significativo a las 6 h (~10 de aumento), sugiriendo que a las 6 h hay una cooperación de CDDP+Resveratrol.

El gen *PUMA* se sobre-expresó a las 6 h bajo todas las condiciones de tratamiento en ambas líneas celulares para disminuir drásticamente a las 12 h. Sin embargo, de acuerdo con el análisis estadístico, el aumento más significativo fue bajo los tratamientos con CDDP y CDDP+Resveratrol en las células MCF-7 y con CDDP en las células MCF-7_R, que están en el orden de $>2 \times 10^4$ veces de aumento, en cambio con el Resveratrol $<2 \times 10^3$ veces de aumento para ambas líneas celulares. A las 12 h, la expresión de *PUMA* disminuyó por debajo del nivel basal del control, excepto en las células MCF-7 tratadas con Resveratrol donde se observó un aumento significativo de ~3 veces.

El gen *NOXA* en las células MCF-7_R fue elevado por CDDP a las 6 h y CDDP+Resveratrol a las 12 h, aunque la activación por la combinación fue menor (~11 vs ~9 de aumento, respectivamente). En las células MCF-7 se observa un patrón similar al visto en las células MCF-7_R, con la diferencia de que los máximos niveles de expresión son a las 12 h, siendo la mayor bajo el tratamiento con CDDP con ~11 de aumento seguido de la combinación con ~9 de aumento. Tal vez en la combinación el Resveratrol dificulta la activación de *NOXA* por el CDDP ya que el tratamiento únicamente con Resveratrol no induce una expresión significativa de *NOXA* en ambas líneas celulares.

Por otra parte, el gen *PIG3* se incrementó ligeramente únicamente con Resveratrol (~2 de aumento) en células MCF-7. En las células MCF-7_R sin

Análisis de la fosforilación de p53 en S15, S20 y S46 inducidas por el Resveratrol y su asociación con la sensibilización a Cisplatino en células MCF-7_R resistentes

tratamiento, hay una expresión significativa que se mantiene a las 6 y 12 h (~2 de aumento) con respecto al control de células MCF-7, sin embargo, el Resveratrol incrementa de ~2 a las 6 h, hasta un máximo de ~4 veces a las 12 h, la expresión de *PIG3* lo cual sugiere una nula participación de este gen.

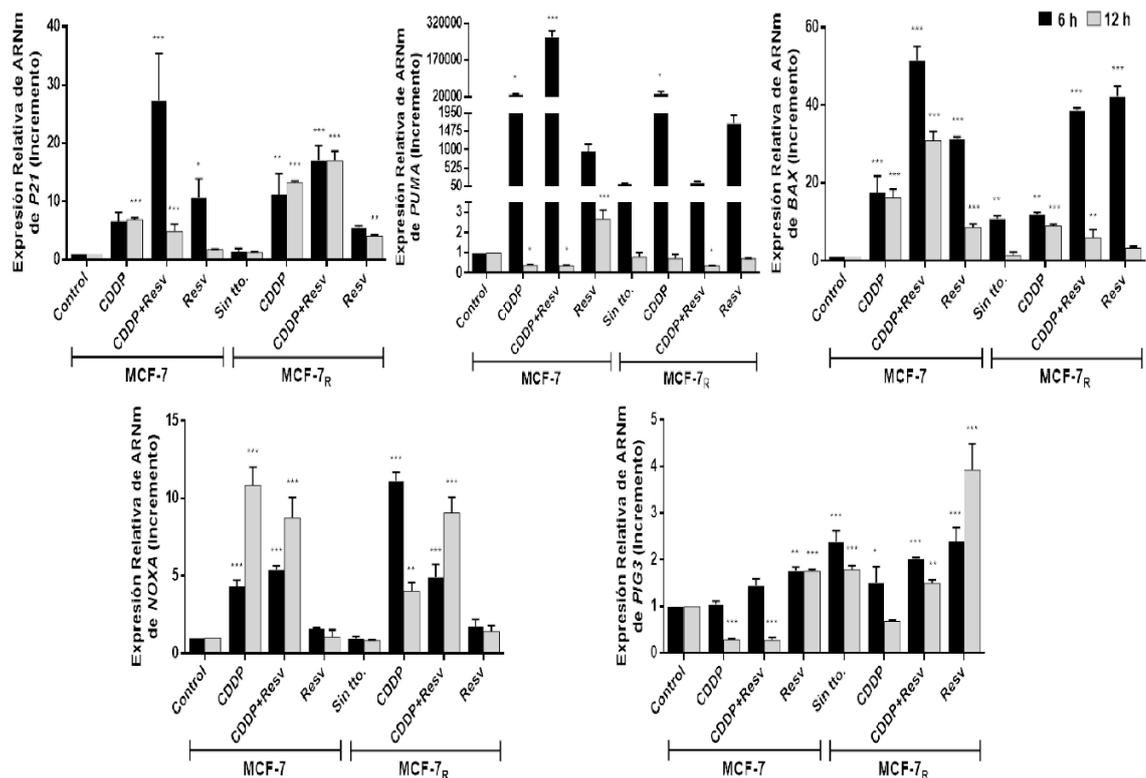


Figura 6. La fosforilación temprana de p53 en Ser20 inducida por el Resveratrol es suficiente para activar la transcripción dependiente de p53 en las células MCF-7_R. El ARN total extraído de células tratadas con vehículo DMSO-Etanol (Control o sin tratamiento (Sin tto.)) o 6 μM de CDDP con o sin 100 μM de Resveratrol (Resv) o 100 μM de Resveratrol durante 6 y 12 h se evaluó para cuantificar los niveles de expresión de los genes *P21*, *BAX*, *NOXA*, *PUMA* y *PIG3* a través de RT-PCR en Tiempo Real. Los niveles de ARNm de los genes fueron normalizados con el gen constitutivo *B2M*. Se analizó mediante Anova de un camino seguido de la prueba de Comparación Múltiple de Dunnett para comparar células MCF-7 sin tratamiento (grupo control) con el resto de los grupos de datos en cada punto de tiempo. Los resultados están representados como el promedio de tres experimentos independientes ±SD. **P*<0.05; ***P*<0.01; ****P*<0.001.

Finalmente, el gen *BAX* en las células MCF-7_R es principalmente activado por el Resveratrol a las 6 h (~42 de aumento), y en la combinación de

Análisis de la fosforilación de p53 en S15, S20 y S46 inducidas por el Resveratrol y su asociación con la sensibilización a Cisplatino en células MCF-7_R resistentes

CDDP+Resveratrol (~38 de aumento) para luego disminuir drásticamente a las 12 h. En el grupo MCF-7_R sin tratamiento hay una activación significativa de este gen a las 6 h (~11 de aumento) que se mantiene bajo el tratamiento con CDDP a las 6 y 12 h. En cambio, en las células MCF-7, la expresión máxima es a las 6 h bajo el tratamiento combinado (~51 de aumento), seguido por el Resveratrol (~31 de aumento) y CDDP (~18 de aumento).

Sin embargo, en el caso de las células MCF-7_R, no fue posible observar una cooperación sinérgica entre los tratamientos, ya que la activación de todos los genes proapoptóticos en el tratamiento combinado siempre fue menor que en el tratamiento con CDDP o Resveratrol solos, lo que sugiere que solo uno de ellos es responsable de la activación de un gen en particular. Interesantemente, el gen *BAX*, uno de los principales efectores apoptóticos, es únicamente reactivado por el Resveratrol, indicando que esto podría ser un evento clave para la inducción de apoptosis en las células MCF-7_R.

Estos resultados sugieren que la fosforilación temprana de p53 en Ser20 inducida por el Resveratrol en las células MCF-7_R es suficiente para activar la transcripción dependiente de p53 de los genes seleccionados y no se requiere la fosforilación de los residuos Ser15 y Ser46.

6.3. El Resveratrol sensibiliza las células MCF-7_R a CDDP e induce apoptosis.

Evaluamos si el Resveratrol puede inducir apoptosis en las células resistentes mediante citometría de flujo usando Anexina V/PI, para lo cual tratamos células MCF-7 y MCF-7_R con 6 μM de CDDP con o sin 100 μM de Resveratrol o 100 μM de Resveratrol durante 48 h. La **Figura 7A**, muestra los porcentajes de apoptosis total (apoptosis temprana y tardía), para las células MCF-7 (panel izquierdo), para el tratamiento con CDDP fue de 82.02% ±1.79%, para CDDP+Resveratrol fue de 76.55% ±11.16% y Resveratrol fue de 60.52% ±5.57% (**Figura 7B**, $p < 0.001$, gráfica izquierda).

Análisis de la fosforilación de p53 en S15, S20 y S46 inducidas por el Resveratrol y su asociación con la sensibilización a Cisplatino en células MCF-7_R resistentes

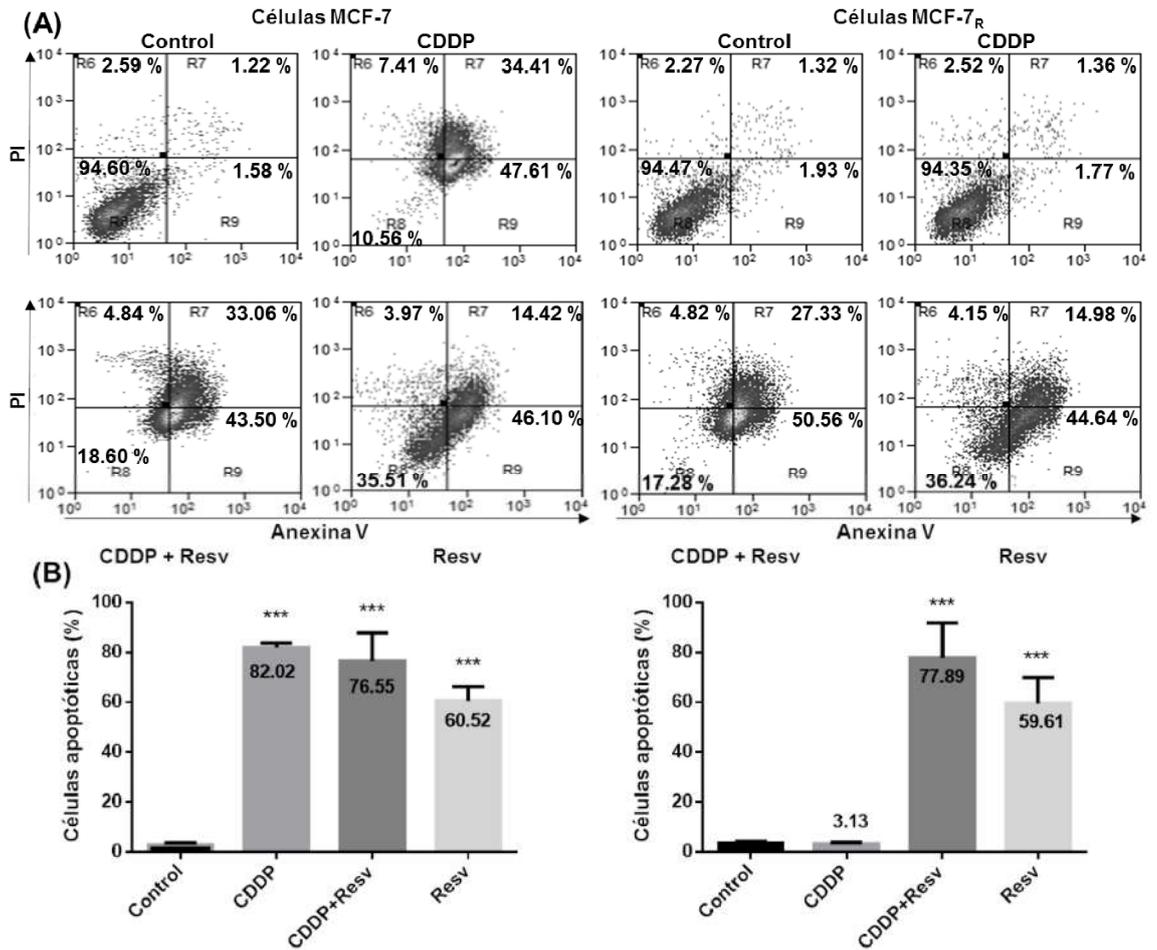


Figura 7. El Resveratrol sensibiliza las células MCF-7_R a CDDP e induce apoptosis. **(A)** Células MCF-7 y MCF-7_R fueron tratadas con vehículo DMSO-etanol como Control, o 6 μ M de CDDP con o sin 100 μ M de Resveratrol (Resv) o 100 μ M de Resveratrol durante 48 h y fueron doblemente marcadas con Anexina V y Yoduro de propidio (PI) seguido de un análisis por Citometría de flujo para determinar las células apoptóticas. Las células viables están localizadas en el cuadrante inferior derecho (doble negativo de Anexina V-/PI-). Las células apoptóticas (Anexina V+/PI-) están localizadas en el cuadrante inferior izquierdo (apoptosis temprana) y superior izquierdo (apoptosis tardía). Los datos están presentados como porcentaje de la población celular. **(B)** Se muestran los resultados combinados de tres análisis de citometría independientes que representan los niveles promedio de células apoptóticas totales. Los resultados están representados como el promedio de tres experimentos independientes \pm SD. *** P <0.001 por Anova de una cola seguido de la prueba de Comparación Múltiple de Dunnett.

Análisis de la fosforilación de p53 en S15, S20 y S46 inducidas por el Resveratrol y su asociación con la sensibilización a Cisplatino en células MCF-7_R resistentes

Como esperábamos, las células MCF-7_R (panel derecho) tratadas con CDDP no muestran apoptosis, sin embargo, con el tratamiento con CDDP+Resveratrol la apoptosis se restablece y aumenta hasta 77.89% ±13.80% y con Resveratrol hasta 59.61% ±10.16% (**Figura 7B**, $p < 0.001$, gráfica derecha), efecto similar a su contraparte sensible. Estos datos sugieren que el Resveratrol con o sin CDDP puede inducir apoptosis en las células MCF-7_R, superando la resistencia a CDDP.

6.4. La fosforilación temprana de p53 en Ser20 por Resveratrol es necesaria para la estabilidad de p53 en células MCF-7_R

Reportes previos indican que las cinasas CK1, CHK2 y AMPK pueden inducir la fosforilación de p53 en Ser20 como respuesta a varios tipos de estrés tal como CK1 en una infección viral (virus HHV-6B de ADN) [97], radiación ionizante para CHK2 [98] y estrés metabólico para AMPK [99]. Para elucidar cual señal de activación es inducida por el Resveratrol para fosforilar p53 en Ser20, tratamos células MCF-7_R con 6 μM de CDDP con o sin 100 μM de Resveratrol con y sin la presencia de inhibidores específicos de cinasas p53-pSer20: el inhibidor D4476 para CK1 (60 μM), el inhibidor de CHK2 (25 μM) y el inhibidor Compuesto C para AMPK (40 μM) durante 6 h.

Como se muestra en la **Figura 8A**, la inhibición de la fosforilación por los inhibidores de CK1 y CHK2 solo tiene lugar con el tratamiento con Resveratrol, mientras que la inhibición de AMPK impide la fosforilación de Ser20 en ambos tratamientos con CDDP y Resveratrol. Encontramos que en las células tratadas con CDDP únicamente el inhibidor de AMPK bloquea la fosforilación de Ser20, pero inesperadamente los 3 inhibidores bloquean la fosforilación de Ser20 en las células tratadas con Resveratrol. Sin embargo, en el tratamiento con CDDP con el inhibidor de AMPK, la estabilidad de p53 no fue afectada dado que en las células MCF-7_R tratadas con CDDP, p53 esta fosforilada en Ser15 y Ser46 (ver **Figura 5A y 8A**). Sin embargo, el tratamiento con Resveratrol inhibe p53-pSer15 y p53-pSer46 en las células MCF-7_R (ver **Figura 5A**), consecuentemente la pérdida de la fosforilación de Ser20 por los inhibidores de AMPK y CK1 resulta en un deterioro completo de la estabilidad

Análisis de la fosforilación de p53 en S15, S20 y S46 inducidas por el Resveratrol y su asociación con la sensibilización a Cisplatino en células MCF-7_R resistentes

de p53 (**Figura 8A**). Por otro lado, con el inhibidor de CHK2, la estabilidad de p53 no fue afectada, sugiriendo que con el tratamiento con Resveratrol otra modificación postraduccional sobre p53 podría estar involucrada en una atenuación del efecto de la pérdida de p53-pS20.

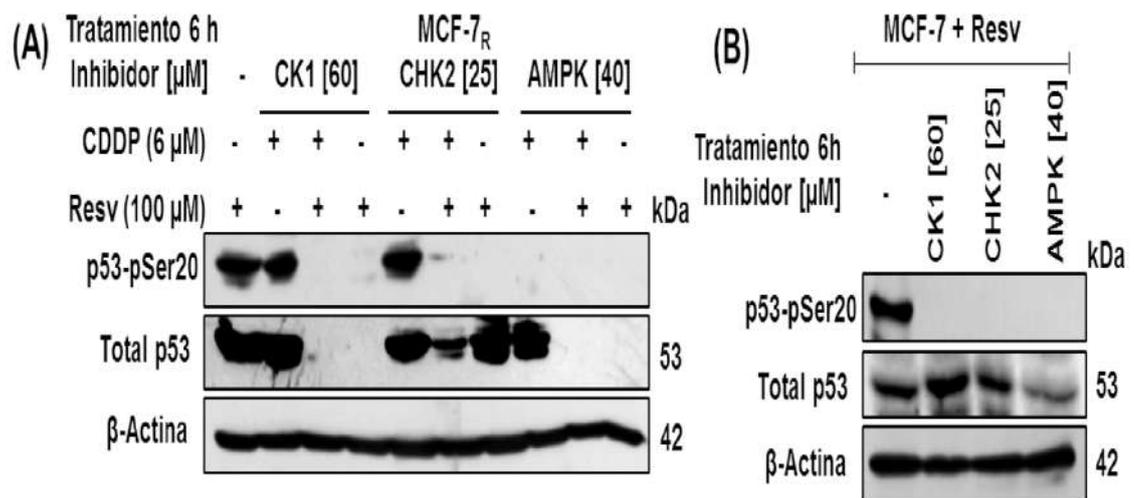


Figura 8. La fosforilación temprana de p53 en Ser20 por Resveratrol es necesaria para la estabilidad de p53 en células MCF-7_R. **(A)** Células MCF-7_R fueron tratadas con 6 μM de CDDP con o sin 100 μM de Resveratrol (Resv) o 100 μM de Resveratrol y **(B)** Células MCF-7 fueron tratadas con 100 μM de Resveratrol; ambas líneas celulares fueron tratadas durante 6 h con inhibidores específicos de cinasas de Ser20: CK1 (60 μM), CHK2 (25 μM) o AMPK (40 μM). Los contenidos de p53 total y fosforilada se evaluaron mediante Western Blot, utilizando anticuerpos dirigidos contra p53 total (DO-1) o contra el residuo específico fosforilado Ser20, como se indica.

Para comparar el efecto de los inhibidores con la contraparte sensible, tratamos células MCF-7 con 100 μM de Resveratrol y con los inhibidores de cinasas de Ser20 durante 6 h. Como se observa en la **Figura 8B**, los inhibidores de CK1, CHK2 y AMPK, impiden la fosforilación de p53-pSer20 sin la degradación de p53 dado que la fosforilación de p53 en Ser15 y Ser46 esta inducida por el Resveratrol (ver **Figura 5A y 8A**). Estos resultados sugieren en las células MCF-7_R la fosforilación temprana de p53 en Ser20 inducida por el Resveratrol es suficiente para la estabilización de p53 y su función de transactivación y que esta inhibición induce la degradación de p53 comparado con su contraparte sensible, donde p53 es estable después de la inhibición de

Análisis de la fosforilación de p53 en S15, S20 y S46 inducidas por el Resveratrol y su asociación con la sensibilización a Cisplatino en células MCF-7_R resistentes

la fosforilación de Ser20 probablemente debido a que contiene fosforilación en Ser15 y Ser46 inducidos por el Resveratrol.

Para investigar si una de las cinasas es clave para la activación de la apoptosis, tratamos células MCF-7_R con 6 μ M de CDDP y 100 μ M de Resveratrol con los inhibidores específicos de cinasas de p53-pSer20 durante 48 horas y evaluamos la inducción de apoptosis con Anexina V/PI y citometría de flujo. Como se aprecia en la **Figura 9A**, las células MCF-7_R tratadas con los inhibidores de CK1 y AMPK (p53 degradada) tienen 59.25% \pm 4.27 y 70.91% \pm 3.43% respectivamente, del total de células apoptóticas, sugiriendo una apoptosis independiente de p53. Por otro lado, las células con la presencia del inhibidor de CHK2 (bajo nivel de p53), presenta una significativa reducción de células apoptóticas con el 20.95% \pm 1.43% vs 68.44% \pm 8.94% de células apoptóticas sin inhibidor (**Figura 9B**, *** $p < 0.001$), sugiriendo que la presencia de una posible forma de p53 no funcional en las células MCF-7_R (sin fosforilación de Ser15, Ser20 y Ser46), puede impedir la inducción de apoptosis.

6.5. Resveratrol inhibe la fosforilación de ATM, la disminución de BCL-2 y aumenta la expresión de BAX

Anteriormente se ha reportado que la Ser15 de p53 es fosforilada mediante la activación de ATM, a través de su autofosforilación en la Ser1981, en una fase inductiva temprana después del daño al ADN [68, 69]. La Ser46 de p53 es secuencialmente fosforilada por ATM [69]; y con base en esta observación, encontramos que el tratamiento con Resveratrol con o sin CDDP en células MCF-7_R, inhibe la fosforilación en la Ser1981 de ATM a pesar de los altos niveles de proteína total de ATM (**Figura 10A**), lo cual sugiere que posiblemente la disminución en la fosforilación de p53 en la Ser15 y Ser46 (**Figura 5A**) puede ser debido a la inhibición de la fosforilación de ATM por el Resveratrol.

Análisis de la fosforilación de p53 en S15, S20 y S46 inducidas por el Resveratrol y su asociación con la sensibilización a Cisplatino en células MCF-7_R resistentes

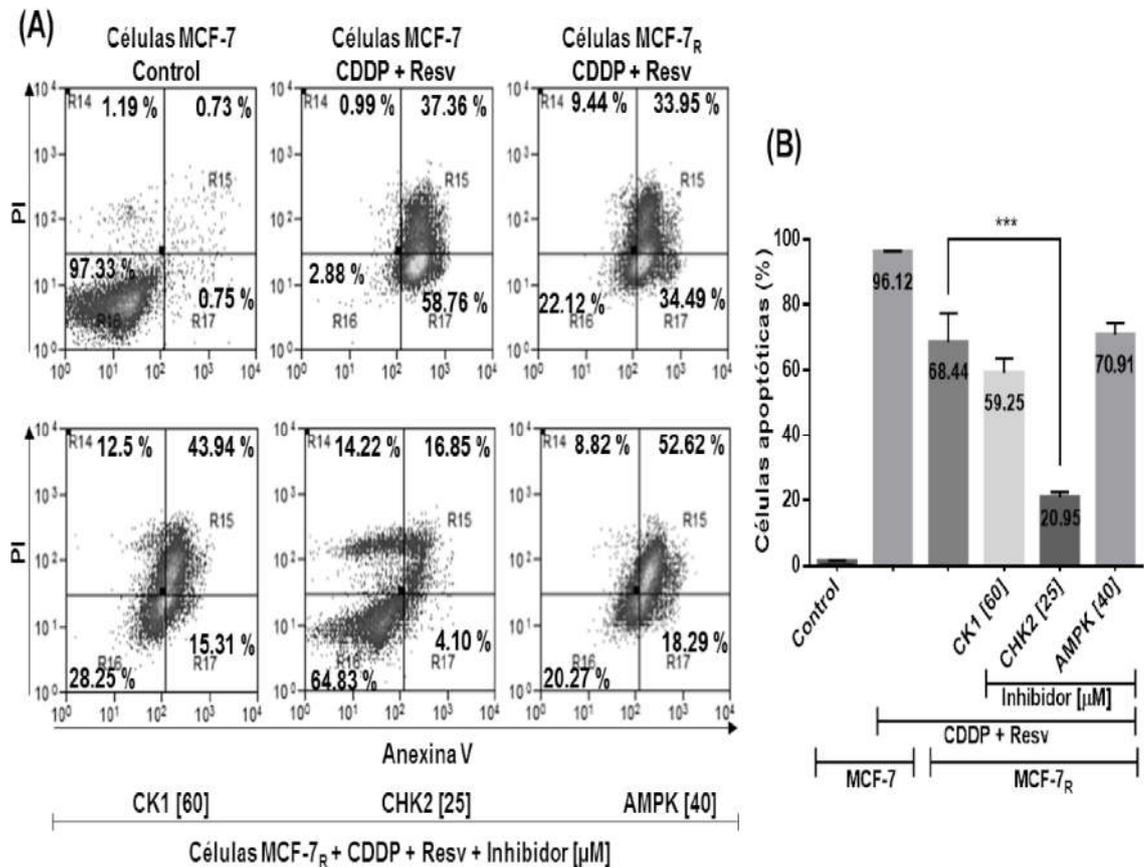


Figura 9. Resveratrol induce apoptosis en células MCF-7_R independientemente de p53. **(A)** Células MCF-7 y MCF-7_R fueron tratadas con vehículo DMSO-etanol como Control o con 6 μ M de CDDP con 100 μ M de Resveratrol (Resv) y cultivadas en combinación con los inhibidores de CK1 (60 μ M), CHK2 (25 μ M) o AMPK (40 μ M) durante 48 h y fueron doblemente marcadas con Anexina V y Yoduro de propidio (PI) seguido de un análisis por Citometría de flujo para determinar las células apoptóticas. Las células viables están localizadas en el cuadrante inferior derecho (doble negativo de Anexina V-/PI-). Las células apoptóticas (Anexina V+/PI-) están localizadas en el cuadrante inferior derecho (apoptosis temprana) y superior izquierdo (apoptosis tardía). Los datos están presentados como porcentaje de la población celular. **(B)** Se muestran los resultados combinados de tres análisis de citometría independientes que representan los niveles promedio de células apoptóticas totales. Los resultados están representados como el promedio de tres experimentos independientes \pm SD. *** P <0.001 por Anova de una cola seguido de la prueba de Comparación Múltiple de Tukey.

Análisis de la fosforilación de p53 en S15, S20 y S46 inducidas por el Resveratrol y su asociación con la sensibilización a Cisplatino en células MCF-7_R resistentes

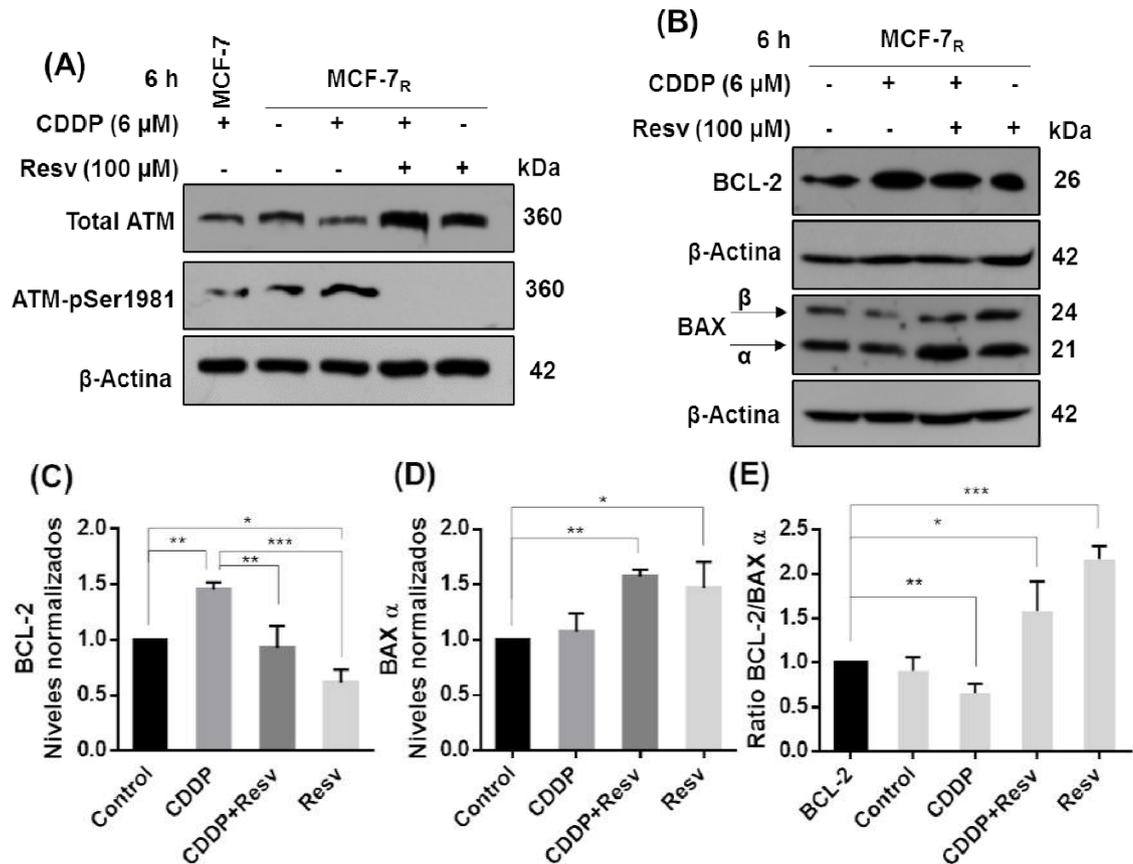


Figura 10. Resveratrol inhibe la fosforilación de ATM, la disminución de BCL-2 y aumenta la expresión de BAX. Las células MCF-7_R fueron tratadas con 6 μM de CDDP con o sin 100 μM de Resveratrol (Resv) durante 6 h. **(A)** ATM total y fosforilada y **(B)** BCL-2 y BAX, los contenidos de proteína se evaluaron mediante Western Blot, utilizando anticuerpos dirigidos contra ATM total, ATM p-Ser1981, BCL-2 y BAX, como se indica. Las células MCF-7 tratadas con CDDP fueron utilizadas como un Control positivo de la fosforilación de ATM. **(C, D)** Análisis densitométricos de BCL-2 y BAX después de la normalización con β-actina por Anova de una cola seguido de la prueba de Comparación Múltiple de Dunnett o Tukey. **(E)** Cuantificación de la proporción de expresión de proteína de BCL-2/BAX por t test. Los resultados están representados como el promedio de tres experimentos independientes ±SD. **P*<0.05; ***P*<0.01; ****P*<0.001.

Por otro lado, para investigar el bloqueo de la apoptosis en las células MCF-7_R tratadas con CDDP y la reactivación por Resveratrol, analizamos las proteínas antiapoptótica BCL-2 y proapoptótica BAX y encontramos que los niveles de BCL-2 se incrementan y los de BAX disminuyen después de 6 h de tratamiento con CDDP (**Figura 10 B, C, E**). Sin embargo, en las células

Análisis de la fosforilación de p53 en S15, S20 y S46 inducidas por el Resveratrol y su asociación con la sensibilización a Cisplatino en células MCF-7_R resistentes

tratadas con CDDP+Resveratrol o Resveratrol, la expresión de BCL-2 disminuye y la de BAX aumenta, siendo el tratamiento con solo Resveratrol el que induce la mayor inhibición de BCL-2 y la mayor expresión de BAX (**Figura 10 B - E**). Interesantemente, detectamos dos bandas al analizar la expresión de la proteína BAX, las cuales podrían corresponder a dos isoformas, la β de 24 kDa y la α de 21 kDa (**Figura 10 B**), y ambas aumentan su expresión al tratar con Resveratrol con o sin CDDP, pero únicamente tomamos como referencia la expresión de BAX correspondiente a la banda predictiva de 21 kDa por el anticuerpo, la cual denominamos BAX α . Finalmente, estos resultados sugieren que una elevada expresión de BCL-2 y la disminución de BAX en el tratamiento con CDDP bloquea la apoptosis y que el Resveratrol induce apoptosis a través de la inhibición de BCL-2 y el aumento de la expresión de BAX.

7. DISCUSIÓN

El CDDP es uno de los quimioterapéuticos más utilizados en el tratamiento de varios tipos de cáncer, incluyendo el cáncer de mama [2, 4, 5] pero comúnmente resulta en efectos adversos y toxicidad, afectando de esta manera a los tejidos sanos, siendo la resistencia la causa principal de fracaso en el tratamiento [2, 3, 8, 10, 11, 100]. Debido a lo anterior, es de nuestro interés continuar investigando para encontrar quimiosensibilizadores efectivos que reviertan la resistencia en los tumores. En este contexto, el Resveratrol es conocido como un agente preventivo, protector y anticancerígeno, que tiene el potencial de disminuir la toxicidad por el CDDP y puede sensibilizar las células quimioresistentes a través de diversos mecanismos que conllevan a la superación de la resistencia, incluyendo la sobreexpresión de p53 [43, 47, 49, 101]. Considerando la capacidad quimiosensibilizadora del Resveratrol, desarrollamos una línea celular MCF-7_R resistente a CDDP a una concentración máxima de 6 μ M, y nuestros resultados previos indican que el Resveratrol induce sensibilidad al CDDP, disminuyendo la IC₅₀ de CDDP en las células MCF-7_R.

La contribución de p53 a la quimiosensibilidad y quimioresistencia sigue siendo poco clara. Previamente ha sido reportado que la adquisición de la resistencia a agentes quimioterapéuticos, incluyendo el CDDP, ocurre en células cancerosas que expresan p53 silvestre. Un mecanismo propuesto para explicar este fenómeno es que esta proteína p53 se vuelve inactiva. p53 puede ser activada mediante modificaciones postraduccionales como la fosforilación, en respuesta a varias señales de estrés celular, protegiendo a p53 de la ubiquitinación mediada por MDM2 y su consecuente degradación proteosomal. La fosforilación de p53 en Ser15 y Ser20 es requerida para la activación de vías de reparación del ADN [68-72], y bajo condiciones de daño irreparable al ADN, la Ser46 de p53 es fosforilada para activar la apoptosis inducida por p53 [73, 74, 102, 103]. Creemos que la resistencia de las células MCF-7_R a CDDP puede estar relacionada con la pérdida de fosforilación de estos residuos

Análisis de la fosforilación de p53 en S15, S20 y S46 inducidas por el Resveratrol y su asociación con la sensibilización a Cisplatino en células MCF-7_R resistentes

específicos de p53, como fue previamente descrito en células de cáncer de ovario resistentes a CDDP [87, 89, 90]. Para corroborar esta hipótesis, tratamos células MCF-7 y MCF-7_R con 6 μ M de CDDP (máxima concentración de sobrevivencia de las células resistentes), con la finalidad de comparar el efecto generado en ambas líneas celulares.

Nuestros resultados muestran que el tratamiento con CDDP induce la fosforilación de p53 en Ser15, Ser20 y Ser 46 en las células MCF-7, mientras que en las células MCF-7_R la Ser15 y Ser46 parecen estar constitutivamente fosforiladas incluso sin tratamiento, sin embargo, estas células sobreviven al tratamiento. Interesantemente, la fosforilación de Ser20 esta inhibida en las células MCF-7_R tratadas con CDDP, mientras que, al mismo tiempo, los tratamientos con CDDP+Resveratrol y Resveratrol aumentaron considerablemente los niveles de esta fosforilación, sugiriendo que la fosforilación de Ser20 puede ser clave para que p53 active sus genes blanco, específicamente *BAX*, para superar la resistencia a CDDP en las células MCF-7_R. Además, la importancia de este sitio es resaltada por el hecho de que el tratamiento con CDDP en combinación con Resveratrol o el Resveratrol solo, disminuyen considerablemente la fosforilación de p53 en Ser15 y Ser46, pero a pesar de esto se activa la apoptosis. Aunque nosotros no descartamos la posible fosforilación de p53 en otros sitios que colaboren con la fosforilación en Ser20 para inducir apoptosis. Interesantemente, también observamos el mismo efecto generado por el Resveratrol en las células resistentes tratadas con VP-16, sugiriendo que ambos compuestos podrían tener una vía de señalización similar para inducir la fosforilación de p53 en Ser20. Por otro lado, algunos reportes han descrito que la Ser15 de p53 es fosforilada por ATM activada, mediante su fosforilación en el residuo Ser1981, en una fase temprana después del daño al ADN [68, 69] y posteriormente, la Ser46 es secuencialmente fosforilada también por ATM [69], nuestros resultados sugieren que la inhibición de la fosforilación de Ser15 y Ser46 en las células MCF-7_R esté relacionada con la desactivación de ATM al inhibirse la fosforilación en la Ser1981 con los tratamientos con CDDP+Resveratrol y

Análisis de la fosforilación de p53 en S15, S20 y S46 inducidas por el Resveratrol y su asociación con la sensibilización a Cisplatino en células MCF-7_R resistentes

Resveratrol. Además, dado que ATM es una proteína clave de la respuesta al daño del ADN que está relacionado con la resistencia genotóxica, la inhibición de la actividad de ATM [104, 105] también podría contribuir a la quimiosensibilidad de las células MCF-7_R. Previamente, ha sido reportado que el Resveratrol induce la fosforilación de p53 en Ser15 y Ser20 en las células MCF-7 [91-94, 106], pero a nuestro entender, esta es la primera vez que se demuestra que el Resveratrol induce la fosforilación de Ser46. Nuestros resultados son consistentes con otros reportes en células MCF-7 y en otros tipos de cáncer sensibles o resistentes, que indican que el Resveratrol incrementa la actividad transcripcional dependiente de p53, incluyendo el incremento de los niveles de ARNm de *BAX*, *BAK* y *PUMA*, sin embargo, no analizaron ninguna modificación postraducciona de p53 [57, 107-111].

Con el fin de dilucidar cual cinasa es responsable para la activación de la fosforilación de p53-Ser20 en las células MCF-7_R, usamos tres inhibidores específicos de cinasas que se conoce que fosforilan a p53 en Ser20, dependiendo del tipo de estímulo externo y que incluye la vía de daño al ADN (inhibidor de CHK2), activación oncogénica (inhibidor de CK1) y estrés metabólico (inhibidor de AMPK). Observamos que la baja fosforilación continua de Ser20 en células MCF-7_R tratadas con CDDP es inducida por AMPK ya que fue sensible al inhibidor de AMPK. La activación de AMPK por CDDP se ha reportado anteriormente y se ha relacionado con la inhibición de la apoptosis y la resistencia adquirida [112, 113], por lo tanto, es muy interesante que la cinasa responsable para la fosforilación de Ser20 por CDDP sea la misma que podría ser responsable de la inhibición de la apoptosis. Sorpresivamente, cuando usamos los tres inhibidores en las células MCF-7_R tratadas con CDDP+Resveratrol y Resveratrol, todos bloquean la fosforilación de Ser20, sugiriendo que el Resveratrol activa las tres cinasas para fosforilar a p53. En este punto no podemos explicar la codependencia de las tres cinasas para fosforilar Ser20. Es posible que el Resveratrol active las tres cinasas para asegurar o mantener la fosforilación por periodos largos de tiempo. Bajo este escenario, pensamos que podría haber una dinámica fluida

entre las tres cinasas para la interacción en el sitio de unión específico para Ser20 y la obstaculización de cualquiera de las cinasas podría bloquear dicho sitio para las otras dos. También existe la posibilidad de una probable intercomunicación que cause una dependencia desconocida entre las tres cinasas o de que la interacción de las tres cinasas en los sitios de acoplamiento del dominio Box-V de p53 es importante para permitir la fosforilación de Ser20. Sin embargo, este interesante resultado debería analizarse más a fondo en trabajos futuros.

Adicionalmente, la inhibición de la fosforilación de Ser20 por los inhibidores de CK1 y AMPK en las células MCF-7_R en presencia del Resveratrol, resulta en la pérdida de la estabilidad de p53 mientras que la inhibición de CHK2 conserva parte de la expresión de proteína total de p53, sugiriendo que al inhibir CHK2 hay otros posibles residuos fosforilados a lo largo de p53, realizado por otra cinasa, que podrían ser esenciales para mantener la estabilidad de p53. Mientras que el inhibidor de AMPK en presencia de CDDP conserva la proteína total de p53, lo que sugiere que a pesar de la inhibición de Ser20, la fosforilación en Ser15 y Ser46 que se mantienen bajo este tratamiento en las células MCF-7_R, le dan estabilidad a p53, evitando su degradación. Adicionalmente, cuando inhibimos las tres cinasas en las células MCF-7 tratadas con Resveratrol, corroboramos que efectivamente el Resveratrol activa las tres cinasas, sin embargo, se mantiene la estabilidad de la proteína total de p53 porque mantiene su fosforilación de Ser15 y Ser46.

Aunque las tres cinasas fueron necesarias en la fosforilación de p53-Ser20, se realizaron ensayos de apoptosis en presencia de cada uno de los tres inhibidores para dilucidar si una de las cinasas es clave o más importante para la activación de la apoptosis en las células MCF-7_R. Desafortunadamente, la pérdida completa de estabilidad de p53 con los inhibidores de CK1 y AMPK produjo una inducción elevada de apoptosis. Existen algunos reportes que describen el mismo fenómeno en células MCF-7, los cuales nos sugieren una

apoptosis independiente de p53. Por ejemplo, en un estudio en células MCF-7, la disrupción de p53 con un plásmido que expresa la oncoproteína E6 sensibiliza a las células al CDDP [114]. De la misma manera, Menendez JA y Lupu R silenciaron p53 para dilucidar si la apoptosis inducida en las células MCF-7 por la inhibición de FASN era a través de la ruta de p53; inesperadamente, encontraron una elevación del 300% en la apoptosis [115]. Además, la regulación negativa específica de p53 mostró un aumento en la apoptosis a través de SMAD4 [116]. Finalmente, el uso de un ARNi para p53 también sensibilizó las células MCF-7 a la apoptosis inducida por la ceramida [117]. Estos trabajos podrían explicar parcialmente nuestros resultados ya que se sabe que Resveratrol induce apoptosis también por inducción de ceramida [50]. Sin embargo, otra observación interesante fue que con el inhibidor de CHK2 se conservaba parte de la proteína p53 total pero probablemente inactiva debido a que la inducción de la apoptosis se redujo fuertemente, lo que sugiere que la proteína p53 inactiva, al no tener fosforilados sus residuos clave (Ser15, Ser20 y Ser46), no solo disminuyó la inducción de la apoptosis, sino que también la bloqueó, sugiriendo que podría estar contribuyendo a la generación de resistencia probablemente al no poder activar sus genes blanco.

Finalmente, también observamos otra importante diferencia en el balance BCL-2-BAX entre las células MCF-7_R tratadas con CDDP y CDDP+Resveratrol. En primera instancia, los resultados de RT-PCR en Tiempo Real y Western blot, muestran que la expresión del gen proapoptótico BAX y su correspondiente proteína BAX se sobre-expresaron en los tratamientos de CDDP+Resveratrol y Resveratrol, mientras que en el tratamiento con CDDP fueron disminuidas significativamente. Por otro lado, la proteína antiapoptótica BCL-2 aumentó con el tratamiento con CDDP, lo que sugiere que BCL-2 podría estar participando de manera importante en la generación de resistencia al impedir la apoptosis, mientras que con los tratamientos con CDDP+Resveratrol y Resveratrol la expresión de esta proteína fue disminuida significativamente. Como se reportó anteriormente, el equilibrio entre BCL-2 y BAX es un elemento regulador clave [118] y puede ser

Análisis de la fosforilación de p53 en S15, S20 y S46 inducidas por el Resveratrol y su asociación con la sensibilización a Cisplatino en células MCF-7_R resistentes

un mecanismo adicional que explicaría la inducción de la apoptosis en células MCF-7_R en presencia de Resveratrol y CDDP+Resveratrol al aumentar BAX y disminuir BCL-2.

En resumen, nuestros resultados sugieren un nuevo modelo de quimiosensibilización por Resveratrol en células MCF-7_R. Este estudio provee evidencia del papel de p53 y sus niveles de fosforilación en la resistencia a CDDP y los mecanismos moleculares del Resveratrol para quimiosensibilizar al CDDP a las células cancerosas resistentes de mama. Demostramos que en las células MCF-7_R el Resveratrol induce la fosforilación temprana de p53 en Ser20 y disminuye la fosforilación de p53 inducida por CDDP en los residuos Ser15 y Ser46, probablemente a través de la inactivación de ATM. Esta fosforilación en p53-Ser20 es suficiente para activar la transcripción de *BAX* y *PUMA* dependiente de p53 y de esta manera induce apoptosis en las células MCF-7_R. El Resveratrol activa diferentes cinasas, tales como CHK1, CHK2 y AMPK para inducir la fosforilación de p53 en Ser20, sugiriendo un nuevo mecanismo de activación de p53 y quimiosensibilización a CDDP. Al mismo tiempo, el Resveratrol disminuye la expresión de la proteína BCL-2 y aumenta los niveles de la proteína BAX, proteínas claves en la inhibición y activación de la apoptosis, respectivamente. Por otro lado, el CDDP induce la fosforilación de p53 en Ser15 y Ser46 en las células resistentes, pero la apoptosis probablemente esté bloqueada río abajo, al menos en parte, por la regulación positiva de la proteína BCL-2 y a pesar del aumento en la expresión de *PUMA* y *NOXA* (ver modelo en **Figura 11**). Una comprensión más profunda del mecanismo molecular que subyace a la quimiorresistencia y la quimiosensibilización por el Resveratrol en el cáncer de mama humano puede, en última instancia, mejorar los resultados del tratamiento para esta enfermedad.

Análisis de la fosforilación de p53 en S15, S20 y S46 inducidas por el Resveratrol y su asociación con la sensibilización a Cisplatino en células MCF-7_R resistentes

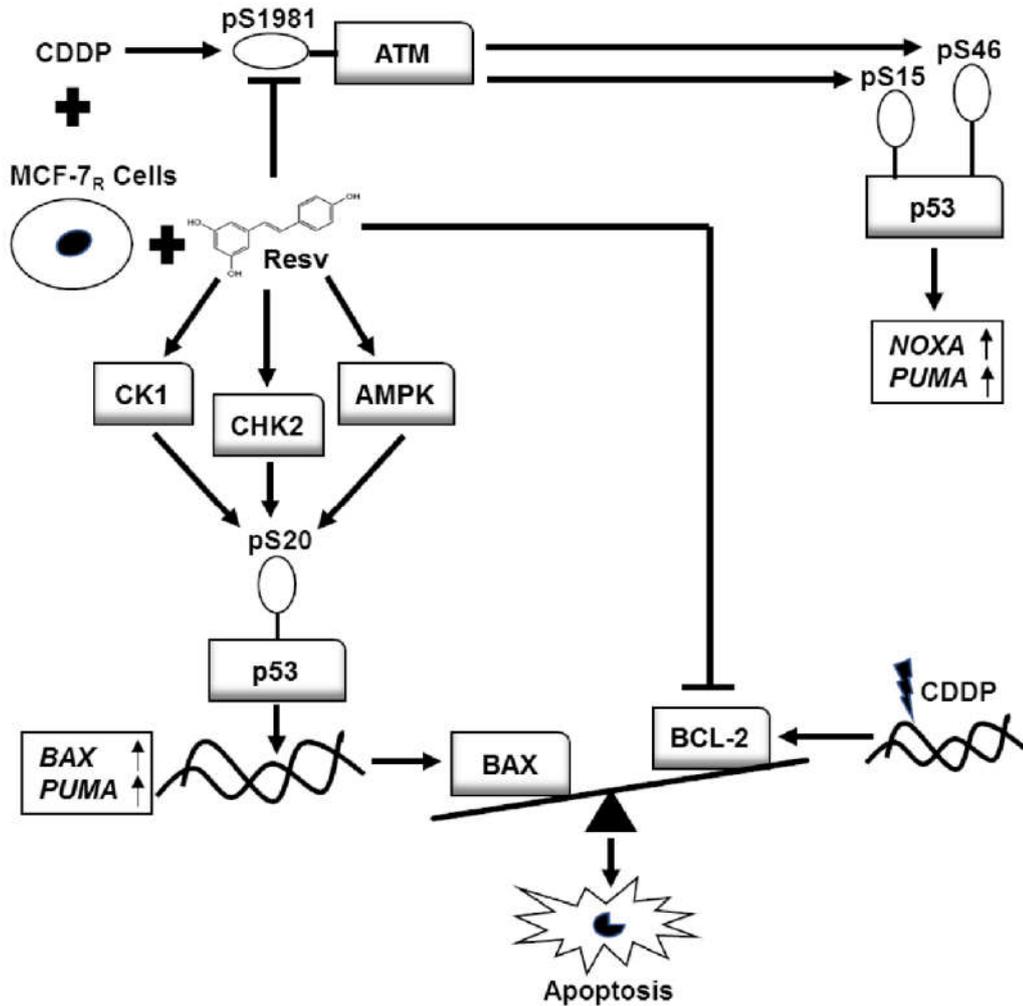


Figura 11. Modelo propuesto de la sensibilización de las células MCF-7_R por el Resveratrol. En células MCF-7_R, el Resveratrol disminuye la fosforilación en Ser15 y Ser46 de p53 mediante la inhibición de la fosforilación de ATM. Sin embargo, activa las cinasas CK1, CHK2 y AMPK para inducir la fosforilación de p53 en Ser20, que es suficiente para la activación transcripcional dependiente de p53 que aumenta los niveles de expresión de los genes *BAX* y *PUMA*, y modifica la proporción entre la expresión de *BCL-2/BAX*, la proteína *BAX* aumenta mientras la expresión de *BCL-2* disminuye, restaurando de esta manera la apoptosis y revirtiendo la resistencia a CDDP. Por otro lado, la sobreexpresión de *BCL-2* en las células MCF-7_R tratadas con CDDP mantiene la quimiorresistencia y bloquea la apoptosis a pesar de la alta expresión de *NOXA* y *PUMA*.

8. CONCLUSIONES

El Resveratrol indujo la fosforilación temprana de p53 en Ser20 y disminuyó la fosforilación de p53 inducida por CDDP en los residuos Ser15 y Ser46 en las células MCF-7_R.

El Resveratrol inhibe la fosforilación de ATM en las células MCF-7_R.

La fosforilación de p53-Ser20 es suficiente para activar la transcripción de los genes proapoptóticos *BAX* y *PUMA* dependiente de p53.

El Resveratrol disminuyó la expresión de la proteína BCL-2 y aumentó los niveles de la proteína BAX y de esta manera induce apoptosis en las células MCF-7_R en ausencia de fosforilación de p53 en Ser46.

El Resveratrol activa diferentes cinasas, tales como CHK1, CHK2 y AMPK para inducir la fosforilación de p53 en Ser20, sugiriendo un nuevo mecanismo de activación de p53 y quimiosensibilización a CDDP.

9. PERSPECTIVAS

Derivado de la presente investigación habría diversos estudios que realizar, los cuales se mencionan a continuación:

- a) Analizar todas las fosforilaciones de la proteína p53 en células MCF-7_R tratadas con CDDP y/o Resveratrol mediante inmunoprecipitación de p53 total y análisis por espectrometría de masas, además de comparar si hay diferencias en los residuos fosforilados entre los diferentes tipos de tratamiento.
- b) Identificar cuáles proteínas o mecanismos de reparación al ADN, además de p53 y BCL-2, están involucradas en la generación de resistencia al CDDP, así como el efecto del Resveratrol sobre estas proteínas o mecanismo.
- c) Demostrar la posible codependencia de las cinasas AMPK, CK1 y CHK2 que activa el Resveratrol, mediante la inhibición de alguna de ellas a través de un ARN de interferencia y también analizar otra proteína blanco de alguna de estas cinasas que sea activada por Resveratrol.
- d) Hacer estudios *in vivo* en ratones desnudos, generando tumores con células MCF-7_R y tratarlos con CDDP y/o Resveratrol y verificar que se inhiba y reduzca el tamaño de dichos tumores.

10. REFERENCIAS

- [1] M. Frezza, S. Hindo, D. Chen, A. Davenport, S. Schmitt, D. Tomco, Q.P. Dou, Novel metals and metal complexes as platforms for cancer therapy, *Curr. Pharm. Des.* 16 (2010) 1813-1825.
- [2] C.M. Che, F.M. Siu, Metal complexes in medicine with a focus on enzyme inhibition, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 14 (2010) 255-261.
- [3] B. Desoize, C. Madoulet, Particular aspects of platinum compounds used at present in cancer treatment, *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 42 (2002) 317-325.
- [4] J. Zhang, L. Wang, Z. Xing, D. Liu, J. Sun, X. Li, Y. Zhang, Status of bi- and multi-nuclear platinum anticancer drug development, *Anticancer Agents Med Chem* 10 (2010) 272-282.
- [5] N. Shah, D.S. Dizon, New-generation platinum agents for solid tumors, *Future Oncol* 5 (2009) 33-42.
- [6] D.A. Gunes, A.M. Florea, F. Splettstoesser, D. Busselberg, Co-application of arsenic trioxide (As₂O₃) and cisplatin (CDDP) on human SY-5Y neuroblastoma cells has differential effects on the intracellular calcium concentration ([Ca²⁺]_i) and cytotoxicity, *Neurotoxicology* 30 (2009) 194-202.
- [7] A.M. Florea, D. Busselberg, Occurrence, use and potential toxic effects of metals and metal compounds, *Biometals* 19 (2006) 419-427.
- [8] R.Y. Tsang, T. Al-Fayea, H.J. Au, Cisplatin overdose: toxicities and management, *Drug Saf.* 32 (2009) 1109-1122.
- [9] M. Liu, C.C. Chien, M. Burne-Taney, R.R. Molls, L.C. Racusen, R.B. Colvin, H. Rabb, A pathophysiologic role for T lymphocytes in murine acute cisplatin nephrotoxicity, *J. Am. Soc. Nephrol.* 17 (2006) 765-774.
- [10] R. Pratibha, R. Sameer, P.V. Rataboli, D.A. Bhiwgade, C.Y. Dhume, Enzymatic studies of cisplatin induced oxidative stress in hepatic tissue of rats, *Eur. J. Pharmacol.* 532 (2006) 290-293.

- [11] V. Brabec, J. Kasparikova, Modifications of DNA by platinum complexes. Relation to resistance of tumors to platinum antitumor drugs, *Drug Resist Updat* 8 (2005) 131-146.
- [12] Y. Sedletska, M.J. Giraud-Panis, J.M. Malinge, Cisplatin is a DNA-damaging antitumour compound triggering multifactorial biochemical responses in cancer cells: importance of apoptotic pathways, *Curr Med Chem Anticancer Agents* 5 (2005) 251-265.
- [13] M. Kartalou, J.M. Essigmann, Mechanisms of resistance to cisplatin, *Mutat. Res.* 478 (2001) 23-43.
- [14] B. Desoize, Cancer and metals and metal compounds: part I--carcinogenesis, *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 42 (2002) 1-3.
- [15] S.G. Chaney, S.L. Campbell, E. Bassett, Y. Wu, Recognition and processing of cisplatin- and oxaliplatin-DNA adducts, *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 53 (2005) 3-11.
- [16] S. Shamimi-Noori, W.S. Yeow, M.F. Ziauddin, H. Xin, T.L. Tran, J. Xie, A. Loehfelm, P. Patel, J. Yang, D.S. Schrupp, B.L. Fang, D.M. Nguyen, Cisplatin enhances the antitumor effect of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand gene therapy via recruitment of the mitochondria-dependent death signaling pathway, *Cancer Gene Ther.* 15 (2008) 356-370.
- [17] T. Wenger, J. Mattern, R. Penzel, N. Gassler, T.L. Haas, M.R. Sprick, H. Walczak, P.H. Krammer, K.M. Debatin, I. Herr, Specific resistance upon lentiviral TRAIL transfer by intracellular retention of TRAIL receptors, *Cell Death Differ.* 13 (2006) 1740-1751.
- [18] A. Muscella, N. Calabriso, F.P. Fanizzi, S.A. De Pascali, L. Urso, A. Ciccarese, D. Migoni, S. Marsigliante, [Pt(O,O'-acac)(gamma-acac)(DMS)], a new Pt compound exerting fast cytotoxicity in MCF-7 breast cancer cells via the mitochondrial apoptotic pathway, *Br. J. Pharmacol.* 153 (2008) 34-49.
- [19] C.M. Park, M.J. Park, H.J. Kwak, S.I. Moon, D.H. Yoo, H.C. Lee, I.C. Park, C.H. Rhee, S.I. Hong, Induction of p53-mediated apoptosis and

- recovery of chemosensitivity through p53 transduction in human glioblastoma cells by cisplatin, *Int. J. Oncol.* 28 (2006) 119-125.
- [20] D. Wang, S.J. Lippard, Cisplatin-induced post-translational modification of histones H3 and H4, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 20622-20625.
- [21] M. Drottar, M.C. Liberman, R.R. Ratan, D.W. Roberson, The histone deacetylase inhibitor sodium butyrate protects against cisplatin-induced hearing loss in guinea pigs, *Laryngoscope* 116 (2006) 292-296.
- [22] S.Y. Xie, Y.J. Li, P.Y. Wang, F. Jiao, S. Zhang, W.J. Zhang, miRNA-regulated expression of oncogenes and tumor suppressor genes in the cisplatin-inhibited growth of K562 cells, *Oncol. Rep.* 23 (2010) 1693-1700.
- [23] A. Tomaszewski, D. Busselberg, Cisplatin modulates voltage gated channel currents of dorsal root ganglion neurons of rats, *Neurotoxicology* 28 (2007) 49-58.
- [24] S.C. Righetti, P. Perego, N. Carenini, E. Corna, L. Dal Bo, S. Cedrola, C.A. La Porta, F. Zunino, Molecular alterations of cells resistant to platinum drugs: role of PKC α , *Biochim. Biophys. Acta* 1763 (2006) 93-100.
- [25] M.D. Hall, M. Okabe, D.W. Shen, X.J. Liang, M.M. Gottesman, The role of cellular accumulation in determining sensitivity to platinum-based chemotherapy, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 48 (2008) 495-535.
- [26] T. Torigoe, H. Izumi, H. Ishiguchi, Y. Yoshida, M. Tanabe, T. Yoshida, T. Igarashi, I. Niina, T. Wakasugi, T. Imaizumi, Y. Momii, M. Kuwano, K. Kohno, Cisplatin resistance and transcription factors, *Curr Med Chem Anticancer Agents* 5 (2005) 15-27.
- [27] Y.Y. Qiu, B.L. Mirkin, R.S. Dwivedi, Inhibition of DNA methyltransferase reverses cisplatin induced drug resistance in murine neuroblastoma cells, *Cancer Detect. Prev.* 29 (2005) 456-463.
- [28] I.P. Pogribny, J.N. Filkowski, V.P. Tryndyak, A. Golubov, S.I. Shpileva, O. Kovalchuk, Alterations of microRNAs and their targets are associated

- with acquired resistance of MCF-7 breast cancer cells to cisplatin, *Int. J. Cancer* 127 (2010) 1785-1794.
- [29] S. Akiyama, Z.S. Chen, M. Kitazono, T. Sumizawa, T. Furukawa, T. Aikou, [Mechanisms for resistance to anticancer agents and the reversal of the resistance], *Hum. Cell* 12 (1999) 95-102.
- [30] B.B. Aggarwal, A. Bhardwaj, R.S. Aggarwal, N.P. Seeram, S. Shishodia, Y. Takada, Role of resveratrol in prevention and therapy of cancer: preclinical and clinical studies, *Anticancer Res.* 24 (2004) 2783-2840.
- [31] B.C. Vastano, Y. Chen, N. Zhu, C.T. Ho, Z. Zhou, R.T. Rosen, Isolation and identification of stilbenes in two varieties of *Polygonum cuspidatum*, *J. Agric. Food Chem.* 48 (2000) 253-256.
- [32] S.K. Lee, Z.H. Mbwambo, H. Chung, L. Luyengi, E.J. Gamez, R.G. Mehta, A.D. Kinghorn, J.M. Pezzuto, Evaluation of the antioxidant potential of natural products, *Comb Chem High Throughput Screen* 1 (1998) 35-46.
- [33] D. Mikulski, M. Molski, Quantitative structure-antioxidant activity relationship of trans-resveratrol oligomers, trans-4,4'-dihydroxystilbene dimer, trans-resveratrol-3-O-glucuronide, glucosides: trans-piceid, cis-piceid, trans-astringin and trans-resveratrol-4'-O-beta-D-glucopyranoside, *Eur J Med Chem* 45 (2010) 2366-2380.
- [34] P. Kopp, Resveratrol, a phytoestrogen found in red wine. A possible explanation for the conundrum of the 'French paradox'?, *Eur. J. Endocrinol.* 138 (1998) 619-620.
- [35] A.Y. Sun, A. Simonyi, G.Y. Sun, The "French Paradox" and beyond: neuroprotective effects of polyphenols, *Free Radic. Biol. Med.* 32 (2002) 314-318.
- [36] M.V. Clement, J.L. Hirpara, S.H. Chawdhury, S. Pervaiz, Chemopreventive agent resveratrol, a natural product derived from grapes, triggers CD95 signaling-dependent apoptosis in human tumor cells, *Blood* 92 (1998) 996-1002.

- [37] M. Reis-Sobreiro, C. Gajate, F. Mollinedo, Involvement of mitochondria and recruitment of Fas/CD95 signaling in lipid rafts in resveratrol-mediated antimyeloma and antileukemia actions, *Oncogene* 28 (2009) 3221-3234.
- [38] J. Dorrie, H. Gerauer, Y. Wachter, S.J. Zunino, Resveratrol induces extensive apoptosis by depolarizing mitochondrial membranes and activating caspase-9 in acute lymphoblastic leukemia cells, *Cancer Res.* 61 (2001) 4731-4739.
- [39] I. Tinhofer, D. Bernhard, M. Senfter, G. Anether, M. Loeffler, G. Kroemer, R. Kofler, A. Csordas, R. Greil, Resveratrol, a tumor-suppressive compound from grapes, induces apoptosis via a novel mitochondrial pathway controlled by Bcl-2, *FASEB J.* 15 (2001) 1613-1615.
- [40] V.M. Adhami, F. Afaq, N. Ahmad, Involvement of the retinoblastoma (pRb)-E2F/DP pathway during antiproliferative effects of resveratrol in human epidermoid carcinoma (A431) cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 288 (2001) 579-585.
- [41] Y.A. Kim, W.H. Lee, T.H. Choi, S.H. Rhee, K.Y. Park, Y.H. Choi, Involvement of p21WAF1/CIP1, pRB, Bax and NF-kappaB in induction of growth arrest and apoptosis by resveratrol in human lung carcinoma A549 cells, *Int. J. Oncol.* 23 (2003) 1143-1149.
- [42] T. Kubota, Y. Uemura, M. Kobayashi, H. Taguchi, Combined effects of resveratrol and paclitaxel on lung cancer cells, *Anticancer Res.* 23 (2003) 4039-4046.
- [43] J. Lu, C.H. Ho, G. Ghai, K.Y. Chen, Resveratrol analog, 3,4,5,4'-tetrahydroxystilbene, differentially induces pro-apoptotic p53/Bax gene expression and inhibits the growth of transformed cells but not their normal counterparts, *Carcinogenesis* 22 (2001) 321-328.
- [44] B.A. Narayanan, N.K. Narayanan, G.G. Re, D.W. Nixon, Differential expression of genes induced by resveratrol in LNCaP cells: P53-mediated molecular targets, *Int. J. Cancer* 104 (2003) 204-212.

- [45] A. Shih, F.B. Davis, H.Y. Lin, P.J. Davis, Resveratrol induces apoptosis in thyroid cancer cell lines via a MAPK- and p53-dependent mechanism, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 87 (2002) 1223-1232.
- [46] C. Huang, W.Y. Ma, A. Goranson, Z. Dong, Resveratrol suppresses cell transformation and induces apoptosis through a p53-dependent pathway, *Carcinogenesis* 20 (1999) 237-242.
- [47] T.C. Hsieh, G. Juan, Z. Darzynkiewicz, J.M. Wu, Resveratrol increases nitric oxide synthase, induces accumulation of p53 and p21(WAF1/CIP1), and suppresses cultured bovine pulmonary artery endothelial cell proliferation by perturbing progression through S and G2, *Cancer Res.* 59 (1999) 2596-2601.
- [48] U.G. Haider, D. Sorescu, K.K. Griendling, A.M. Vollmar, V.M. Dirsch, Resveratrol increases serine15-phosphorylated but transcriptionally impaired p53 and induces a reversible DNA replication block in serum-activated vascular smooth muscle cells, *Mol. Pharmacol.* 63 (2003) 925-932.
- [49] G. Gatouillat, E. Balasse, D. Joseph-Pietras, H. Morjani, C. Madoulet, Resveratrol induces cell-cycle disruption and apoptosis in chemoresistant B16 melanoma, *J. Cell. Biochem.* 110 (2010) 893-902.
- [50] F. Scarlatti, G. Sala, G. Somenzi, P. Signorelli, N. Sacchi, R. Ghidoni, Resveratrol induces growth inhibition and apoptosis in metastatic breast cancer cells via de novo ceramide signaling, *FASEB J.* 17 (2003) 2339-2341.
- [51] Y. Schneider, P. Chabert, J. Stutzmann, D. Coelho, A. Fougèrouse, F. Gosse, J.F. Launay, R. Brouillard, F. Raul, Resveratrol analog (Z)-3,5,4'-trimethoxystilbene is a potent anti-mitotic drug inhibiting tubulin polymerization, *Int. J. Cancer* 107 (2003) 189-196.
- [52] A.M. El-Mowafy, M. Alkhalaf, Resveratrol activates adenylyl-cyclase in human breast cancer cells: a novel, estrogen receptor-independent cytostatic mechanism, *Carcinogenesis* 24 (2003) 869-873.

- [53] J.R. Fangusaro, H. Caldas, Y. Jiang, R.A. Altura, Survivin: an inhibitor of apoptosis in pediatric cancer, *Pediatr Blood Cancer* 47 (2006) 4-13.
- [54] J.R. Kanwar, S.K. Kamalapuram, R.K. Kanwar, Targeting survivin in cancer: the cell-signalling perspective, *Drug Discov Today* 16 (2011) 485-494.
- [55] S. Fulda, K.M. Debatin, Sensitization for anticancer drug-induced apoptosis by the chemopreventive agent resveratrol, *Oncogene* 23 (2004) 6702-6711.
- [56] W. Zhao, P. Bao, H. Qi, H. You, Resveratrol down-regulates survivin and induces apoptosis in human multidrug-resistant SPC-A-1/CDDP cells, *Oncol. Rep.* 23 (2010) 279-286.
- [57] A.R. Jazirehi, B. Bonavida, Resveratrol modifies the expression of apoptotic regulatory proteins and sensitizes non-Hodgkin's lymphoma and multiple myeloma cell lines to paclitaxel-induced apoptosis, *Molecular cancer therapeutics* 3 (2004) 71-84.
- [58] D.B. Longley, T.R. Wilson, M. McEwan, W.L. Allen, U. McDermott, L. Galligan, P.G. Johnston, c-FLIP inhibits chemotherapy-induced colorectal cancer cell death, *Oncogene* 25 (2006) 838-848.
- [59] F. Quan, C. Pan, Q. Ma, S. Zhang, L. Yan, Reversal effect of resveratrol on multidrug resistance in KBv200 cell line, *Biomed. Pharmacother.* 62 (2008) 622-629.
- [60] S.H. Kweon, J.H. Song, T.S. Kim, Resveratrol-mediated reversal of doxorubicin resistance in acute myeloid leukemia cells via downregulation of MRP1 expression, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 395 (2010) 104-110.
- [61] A. Bhardwaj, G. Sethi, S. Vadhan-Raj, C. Bueso-Ramos, Y. Takada, U. Gaur, A.S. Nair, S. Shishodia, B.B. Aggarwal, Resveratrol inhibits proliferation, induces apoptosis, and overcomes chemoresistance through down-regulation of STAT3 and nuclear factor-kappaB-regulated antiapoptotic and cell survival gene products in human multiple myeloma cells, *Blood* 109 (2007) 2293-2302.

- [62] K.B. Harikumar, B.B. Aggarwal, Resveratrol: a multitargeted agent for age-associated chronic diseases, *Cell Cycle* 7 (2008) 1020-1035.
- [63] H. Sasaki, Y. Sheng, F. Kotsuji, B.K. Tsang, Down-regulation of X-linked inhibitor of apoptosis protein induces apoptosis in chemoresistant human ovarian cancer cells, *Cancer Res.* 60 (2000) 5659-5666.
- [64] A.M. Bode, Z. Dong, Post-translational modification of p53 in tumorigenesis, *Nature reviews. Cancer* 4 (2004) 793-805.
- [65] J.P. Kruse, W. Gu, Modes of p53 regulation, *Cell* 137 (2009) 609-622.
- [66] K. Yoshida, Y. Miki, The cell death machinery governed by the p53 tumor suppressor in response to DNA damage, *Cancer Sci* 101 (2010) 831-835.
- [67] T. Enoch, C. Norbury, Cellular responses to DNA damage: cell-cycle checkpoints, apoptosis and the roles of p53 and ATM, *Trends Biochem. Sci.* 20 (1995) 426-430.
- [68] S.Y. Shieh, M. Ikeda, Y. Taya, C. Prives, DNA damage-induced phosphorylation of p53 alleviates inhibition by MDM2, *Cell* 91 (1997) 325-334.
- [69] M. Kodama, C. Otsubo, T. Hirota, J. Yokota, M. Enari, Y. Taya, Requirement of ATM for rapid p53 phosphorylation at Ser46 without Ser/Thr-Gln sequences, *Mol. Cell. Biol.* 30 (2010) 1620-1633.
- [70] W.S. el-Deiry, T. Tokino, V.E. Velculescu, D.B. Levy, R. Parsons, J.M. Trent, D. Lin, W.E. Mercer, K.W. Kinzler, B. Vogelstein, WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression, *Cell* 75 (1993) 817-825.
- [71] H. Hermeking, C. Lengauer, K. Polyak, T.C. He, L. Zhang, S. Thiagalingam, K.W. Kinzler, B. Vogelstein, 14-3-3 sigma is a p53-regulated inhibitor of G2/M progression, *Mol. Cell* 1 (1997) 3-11.
- [72] H. Tanaka, H. Arakawa, T. Yamaguchi, K. Shiraishi, S. Fukuda, K. Matsui, Y. Takei, Y. Nakamura, A ribonucleotide reductase gene involved in a p53-dependent cell-cycle checkpoint for DNA damage, *Nature* 404 (2000) 42-49.

- [73] G. D'Orazi, B. Cecchinelli, T. Bruno, I. Manni, Y. Higashimoto, S. Saito, M. Gostissa, S. Coen, A. Marchetti, G. Del Sal, G. Piaggio, M. Fanciulli, E. Appella, S. Soddu, Homeodomain-interacting protein kinase-2 phosphorylates p53 at Ser 46 and mediates apoptosis, *Nat Cell Biol* 4 (2002) 11-19.
- [74] N. Taira, K. Nihira, T. Yamaguchi, Y. Miki, K. Yoshida, DYRK2 is targeted to the nucleus and controls p53 via Ser46 phosphorylation in the apoptotic response to DNA damage, *Mol. Cell* 25 (2007) 725-738.
- [75] K. Oda, H. Arakawa, T. Tanaka, K. Matsuda, C. Tanikawa, T. Mori, H. Nishimori, K. Tamai, T. Tokino, Y. Nakamura, Y. Taya, p53AIP1, a potential mediator of p53-dependent apoptosis, and its regulation by Ser-46-phosphorylated p53, *Cell* 102 (2000) 849-862.
- [76] K. Yoshida, H. Liu, Y. Miki, Protein kinase C delta regulates Ser46 phosphorylation of p53 tumor suppressor in the apoptotic response to DNA damage, *J. Biol. Chem.* 281 (2006) 5734-5740.
- [77] A. Villunger, E.M. Michalak, L. Coultas, F. Mullauer, G. Bock, M.J. Ausserlechner, J.M. Adams, A. Strasser, p53- and drug-induced apoptotic responses mediated by BH3-only proteins puma and noxa, *Science* 302 (2003) 1036-1038.
- [78] W. Kong, X. Jiang, W.E. Mercer, Downregulation of Wip-1 phosphatase expression in MCF-7 breast cancer cells enhances doxorubicin-induced apoptosis through p53-mediated transcriptional activation of Bax, *Cancer Biol Ther* 8 (2009) 555-563.
- [79] W. Zhang, J. Luo, F. Chen, F. Yang, W. Song, A. Zhu, X. Guan, BRCA1 regulates PIG3-mediated apoptosis in a p53-dependent manner, *Oncotarget* 6 (2015) 7608-7618.
- [80] T. Miyashita, S. Krajewski, M. Krajewska, H.G. Wang, H.K. Lin, D.A. Liebermann, B. Hoffman, J.C. Reed, Tumor suppressor p53 is a regulator of bcl-2 and bax gene expression in vitro and in vivo, *Oncogene* 9 (1994) 1799-1805.

- [81] L. Feng, M. Hollstein, Y. Xu, Ser46 phosphorylation regulates p53-dependent apoptosis and replicative senescence, *Cell Cycle* 5 (2006) 2812-2819.
- [82] S.J. Ichwan, S. Yamada, P. Sumrejkanchanakij, E. Ibrahim-Auerkari, K. Eto, M.A. Ikeda, Defect in serine 46 phosphorylation of p53 contributes to acquisition of p53 resistance in oral squamous cell carcinoma cells, *Oncogene* 25 (2006) 1216-1224.
- [83] Q.B. She, A.M. Bode, W.Y. Ma, N.Y. Chen, Z. Dong, Resveratrol-induced activation of p53 and apoptosis is mediated by extracellular-signal-regulated protein kinases and p38 kinase, *Cancer Res.* 61 (2001) 1604-1610.
- [84] H.Y. Lin, H.Y. Tang, F.B. Davis, P.J. Davis, Resveratrol and apoptosis, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1215 (2011) 79-88.
- [85] H.Y. Lin, A. Shih, F.B. Davis, H.Y. Tang, L.J. Martino, J.A. Bennett, P.J. Davis, Resveratrol induced serine phosphorylation of p53 causes apoptosis in a mutant p53 prostate cancer cell line, *J. Urol.* 168 (2002) 748-755.
- [86] M. Rusin, A. Zajkowicz, D. Butkiewicz, Resveratrol induces senescence-like growth inhibition of U-2 OS cells associated with the instability of telomeric DNA and upregulation of BRCA1, *Mech. Ageing Dev.* 130 (2009) 528-537.
- [87] M. Fraser, T. Bai, B.K. Tsang, Akt promotes cisplatin resistance in human ovarian cancer cells through inhibition of p53 phosphorylation and nuclear function, *Int. J. Cancer* 122 (2008) 534-546.
- [88] C. Johnson-Holiday, R. Singh, E.L. Johnson, W.E. Grizzle, J.W. Lillard, Jr., S. Singh, CCR9-CCL25 interactions promote cisplatin resistance in breast cancer cell through Akt activation in a PI3K-dependent and FAK-independent fashion, *World J Surg Oncol* 9 (2011) 46.
- [89] Y. Huang, J.S. Jeong, J. Okamura, M. Sook-Kim, H. Zhu, R. Guerrero-Preston, E.A. Ratovitski, Global tumor protein p53/p63 interactome:

- making a case for cisplatin chemoresistance, *Cell Cycle* 11 (2012) 2367-2379.
- [90] C.W. Kim, J.N. Lu, S.I. Go, J.H. Jung, S.M. Yi, J.H. Jeong, Y.S. Hah, M.S. Han, J.W. Park, W.S. Lee, Y.J. Min, p53 restoration can overcome cisplatin resistance through inhibition of Akt as well as induction of Bax, *Int. J. Oncol.* 43 (2013) 1495-1502.
- [91] H.Y. Lin, L. Lansing, J.M. Merillon, F.B. Davis, H.Y. Tang, A. Shih, X. Vitrac, S. Krisa, T. Keating, H.J. Cao, J. Bergh, S. Quackenbush, P.J. Davis, Integrin alphaVbeta3 contains a receptor site for resveratrol, *FASEB J.* 20 (2006) 1742-1744.
- [92] T.C. Hsieh, C. Wong, D. John Bennett, J.M. Wu, Regulation of p53 and cell proliferation by resveratrol and its derivatives in breast cancer cells: an in silico and biochemical approach targeting integrin alphavbeta3, *Int. J. Cancer* 129 (2011) 2732-2743.
- [93] H.Y. Tang, A. Shih, H.J. Cao, F.B. Davis, P.J. Davis, H.Y. Lin, Resveratrol-induced cyclooxygenase-2 facilitates p53-dependent apoptosis in human breast cancer cells, *Molecular cancer therapeutics* 5 (2006) 2034-2042.
- [94] S. Zhang, H.J. Cao, F.B. Davis, H.Y. Tang, P.J. Davis, H.Y. Lin, Oestrogen inhibits resveratrol-induced post-translational modification of p53 and apoptosis in breast cancer cells, *Br. J. Cancer* 91 (2004) 178-185.
- [95] F. De Amicis, F. Giordano, A. Vivacqua, M. Pellegrino, M.L. Panno, D. Tramontano, S.A. Fuqua, S. Ando, Resveratrol, through NF-Y/p53/Sin3/HDAC1 complex phosphorylation, inhibits estrogen receptor alpha gene expression via p38MAPK/CK2 signaling in human breast cancer cells, *FASEB J.* 25 (2011) 3695-3707.
- [96] I. Leon-Galicia, J. Diaz-Chavez, E. Garcia-Villa, L. Uribe-Figueroa, A. Hidalgo-Miranda, L.A. Herrera, E. Alvarez-Rios, J. Garcia-Mena, P. Gariglio, Resveratrol induces downregulation of DNA repair genes in

- MCF-7 human breast cancer cells, *Eur. J. Cancer Prev.* 22 (2013) 11-20.
- [97] N.J. MacLaine, B. Oster, B. Bundgaard, J.A. Fraser, C. Buckner, P.A. Lazo, D.W. Meek, P. Hollsberg, T.R. Hupp, A central role for CK1 in catalyzing phosphorylation of the p53 transactivation domain at serine 20 after HHV-6B viral infection, *J. Biol. Chem.* 283 (2008) 28563-28573.
- [98] A. Craig, M. Scott, L. Burch, G. Smith, K. Ball, T. Hupp, Allosteric effects mediate CHK2 phosphorylation of the p53 transactivation domain, *EMBO Rep* 4 (2003) 787-792.
- [99] S.A. Hawley, J. Boudeau, J.L. Reid, K.J. Mustard, L. Udd, T.P. Makela, D.R. Alessi, D.G. Hardie, Complexes between the LKB1 tumor suppressor, STRAD alpha/beta and MO25 alpha/beta are upstream kinases in the AMP-activated protein kinase cascade, *J Biol* 2 (2003) 28.
- [100] D. Chen, V. Milacic, M. Frezza, Q.P. Dou, Metal complexes, their cellular targets and potential for cancer therapy, *Curr. Pharm. Des.* 15 (2009) 777-791.
- [101] S.C. Gupta, R. Kannappan, S. Reuter, J.H. Kim, B.B. Aggarwal, Chemosensitization of tumors by resveratrol, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1215 (2011) 150-160.
- [102] T.G. Hofmann, A. Moller, H. Sirma, H. Zentgraf, Y. Taya, W. Droge, H. Will, M.L. Schmitz, Regulation of p53 activity by its interaction with homeodomain-interacting protein kinase-2, *Nat Cell Biol* 4 (2002) 1-10.
- [103] K. Yoshida, Nuclear trafficking of pro-apoptotic kinases in response to DNA damage, *Trends Mol Med* 14 (2008) 305-313.
- [104] K.V. Luong, L. Wang, B.J. Roberts, J.K. Wahl, 3rd, A. Peng, Cell fate determination in cisplatin resistance and chemosensitization, *Oncotarget* 7 (2016) 23383-23394.
- [105] A.M. Weber, A.J. Ryan, ATM and ATR as therapeutic targets in cancer, *Pharmacol. Ther.* 149 (2015) 124-138.

- [106] N. Singh, D. Zaidi, H. Shyam, R. Sharma, A.K. Balapure, Polyphenols sensitization potentiates susceptibility of MCF-7 and MDA MB-231 cells to Centchroman, PLoS One 7 (2012) e37736.
- [107] W. Nakajima, N. Tanaka, Synergistic induction of apoptosis by p53-inducible Bcl-2 family proteins Noxa and Puma, J Nippon Med Sch 74 (2007) 148-157.
- [108] T. Sakamoto, H. Horiguchi, E. Oguma, F. Kayama, Effects of diverse dietary phytoestrogens on cell growth, cell cycle and apoptosis in estrogen-receptor-positive breast cancer cells, J Nutr Biochem 21 (2010) 856-864.
- [109] H. Jiang, L. Zhang, J. Kuo, K. Kuo, S.C. Gautam, L. Groc, A.I. Rodriguez, D. Koubi, T.J. Hunter, G.B. Corcoran, M.D. Seidman, R.A. Levine, Resveratrol-induced apoptotic death in human U251 glioma cells, Molecular cancer therapeutics 4 (2005) 554-561.
- [110] S. Shankar, Q. Chen, I. Siddiqui, K. Sarva, R.K. Srivastava, Sensitization of TRAIL-resistant LNCaP cells by resveratrol (3, 4', 5 tri-hydroxystilbene): molecular mechanisms and therapeutic potential, J Mol Signal 2 (2007) 7.
- [111] S. Shankar, I. Siddiqui, R.K. Srivastava, Molecular mechanisms of resveratrol (3,4,5-trihydroxy-trans-stilbene) and its interaction with TNF-related apoptosis inducing ligand (TRAIL) in androgen-insensitive prostate cancer cells, Mol. Cell. Biochem. 304 (2007) 273-285.
- [112] H.S. Kim, J.T. Hwang, H. Yun, S.G. Chi, S.J. Lee, I. Kang, K.S. Yoon, W.J. Choe, S.S. Kim, J. Ha, Inhibition of AMP-activated protein kinase sensitizes cancer cells to cisplatin-induced apoptosis via hyper-induction of p53, J. Biol. Chem. 283 (2008) 3731-3742.
- [113] L. Harhaji-Trajkovic, U. Vilimanovich, T. Kravic-Stevovic, V. Bumbasirevic, V. Trajkovic, AMPK-mediated autophagy inhibits apoptosis in cisplatin-treated tumour cells, Journal of cellular and molecular medicine 13 (2009) 3644-3654.

- [114] S. Fan, M.L. Smith, D.J. Rivet, 2nd, D. Duba, Q. Zhan, K.W. Kohn, A.J. Fornace, Jr., P.M. O'Connor, Disruption of p53 function sensitizes breast cancer MCF-7 cells to cisplatin and pentoxifylline, *Cancer Res.* 55 (1995) 1649-1654.
- [115] J.A. Menendez, R. Lupu, RNA interference-mediated silencing of the p53 tumor-suppressor protein drastically increases apoptosis after inhibition of endogenous fatty acid metabolism in breast cancer cells, *Int. J. Mol. Med.* 15 (2005) 33-40.
- [116] B. Wu, W. Li, C. Qian, Z. Zhou, W. Xu, J. Wu, Down-regulated P53 by siRNA increases Smad4's activity in promoting cell apoptosis in MCF-7 cells, *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* 16 (2012) 1243-1248.
- [117] A.P. Struckhoff, B. Patel, B.S. Beckman, Inhibition of p53 sensitizes MCF-7 cells to ceramide treatment, *Int. J. Oncol.* 37 (2010) 21-30.
- [118] A.R. Delbridge, S. Grabow, A. Strasser, D.L. Vaux, Thirty years of BCL-2: translating cell death discoveries into novel cancer therapies, *Nature reviews. Cancer* 16 (2016) 99-109.

American Cancer Society. (2017). What is Breast Cancer? Recuperado el 27 de mayo de 2018, de: <https://www.cancer.org/cancer/breast-cancer/about/what-is-breast-cancer.html>

Instituto Nacional de Estadística y Geografía. (2018). "ESTADÍSTICAS A PROPÓSITO DEL... DÍA MUNDIAL CONTRA EL CÁNCER (4 DE FEBRERO)". Recuperado el 28 de mayo de 2018, de: http://www.beta.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/aproposito/2018/cancer2018_Nal.pdf

Organización Mundial de la Salud [OMS]. (s. f.). Cáncer de mama: prevención y control. Carga de cáncer de mama. Recuperado el 28 de mayo de 2018, de: <http://www.who.int/topics/cancer/breastcancer/es/index1.html>

Secretaría de Salud. (2016). Estadísticas de Cáncer de Mama y Cáncer Cérvico Uterino. Recuperado el 28 de mayo de 2018, de:

Análisis de la fosforilación de p53 en S15, S20 y S46 inducidas por el Resveratrol y su asociación con la sensibilización a Cisplatino en células MCF-7_R resistentes

<https://www.gob.mx/salud/acciones-y-programas/informacion-estadistica>