



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

FACULTAD DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA

**PERFIL DE EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA eIF3f EN
CULTIVOS CELULARES DE EUCARIOTAS SUPERIORES POR
CITOMETRÍA DE FLUJO**

TESIS

PRESENTA:

DULCE LORENA MEDINA GARCÍA

**PARA OBTENER EL GRADO DE:
QUÍMICO FARMACOBIOLOGO**

DIRECTORA DE TESIS:

D. EN C.B. ANA EDITH HIGAREDA MENDOZA

Morelia, Michoacán, Noviembre 2016



El presente trabajo se desarrolló en el laboratorio de Biología Celular Humana de la Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas “Dr. Ignacio Chávez” de la U.M.S.N.H., bajo la dirección de la D. en C.B. Ana Edith Higareda Mendoza.

AGRADECIMIENTOS

A mis padres y hermanos: Gracias por haberme apoyado a lo largo de mi formación académica, por su comprensión, esfuerzo y apoyo incondicional; porque si no fuera por ustedes no hubiera sido posible este triunfo.

A mi novio Hugo: por siempre estar a mi lado; por su comprensión, paciencia y amor.

A mi mejor amiga: Jacqueline por compartir momentos inolvidables a su lado a lo largo de la carrera.

A mis compañeras y grandes amigas de laboratorio: “Larelia” y “Rous” gracias por todo su apoyo, regaños, ideas y sobre todo por llevarme a los tacos.

A la D.C. Ana Edith Higareda Mendoza mi Directora de Tesis por haberme dado la oportunidad y confianza de realizar este proyecto de investigación, además de compartir sus conocimientos y tenerme mucha paciencia ya que gracias a esta experiencia aprendí a ver otra perspectiva de las ciencias biológicas y es por ello quiero continuar en el área de investigación.

Al D.C. Marco Aurelio Pardo Galván, por sus apreciados y relevantes aportes y críticas durante el desarrollo de esta investigación y sobre todo por ayudarme a confiar en mí misma.

Al D.C. Carlos Cortés Penagos que fue mi mentor durante la mayor parte de mi carrera y mi ejemplo a seguir.

Agradezco a mi comité tutorial:

D.C. Ma. Soledad Vázquez Garcidueñas

D.C. Virginia Robinson Fuentes

M.C. Dafne Vannesa García Chávez

Por la lectura del manuscrito y las sugerencias y críticas constructivas:

UN AGRADECIMIENTO ESPECIAL PARA TODOS MIS AMIGOS QUE
CONTIBUYERON A ESTE TRIUNFO.

ÍNDICE

| | |
|---|----|
| ÍNDICE DE FIGURAS | 7 |
| ÍNDICE DE TABLAS | 8 |
| ABREVIATURAS | 9 |
| Resumen..... | 10 |
| Abstract | 11 |
| Capítulo I Marco teórico..... | 12 |
| 1.1 El ciclo celular..... | 12 |
| 1.2 Fases del ciclo celular..... | 13 |
| 1.3 Regulación del ciclo celular | 14 |
| 1.4 Puntos de control en el ciclo de división celular..... | 18 |
| 1.5 Síntesis de proteínas en eucariontes..... | 21 |
| 1.6 Factor eucariótico de iniciación de la traducción 3 | 24 |
| 1.7 eIF3f..... | 25 |
| 1.8 Técnica de citometría de flujo..... | 28 |
| 1.8.1 Fundamento de la citometría de flujo..... | 28 |
| 1.8.2 Generación de dispersión (Scatter)..... | 29 |
| 1.8.3 Fluorescencia | 30 |
| 1.8.4 Ciclo celular por citometría de flujo..... | 31 |
| 1.8.5 Ventajas y desventajas de la citometría de flujo..... | 31 |
| Capítulo II Justificación | 34 |
| Capítulo III Hipótesis..... | 34 |
| Capítulo IV Objetivos | 35 |

| | |
|---|-----------|
| 4.1 Objetivo general..... | 35 |
| 4.2 Objetivos específicos..... | 35 |
| Capítulo V Estrategia Experimental | 36 |
| Capítulo VI Materiales y métodos..... | 37 |
| 6.1 Material biológico | 37 |
| 6.1.1 Líneas celulares | 37 |
| 6.1.2 Aislamiento de linfocitos..... | 38 |
| 6.1.3 Aislamiento de leucocitos de rata..... | 38 |
| 6.2 Técnicas celulares..... | 39 |
| 6.2.1 Mantenimiento y manejo de las líneas celulares | 39 |
| 6.2.2 Descongelado de células..... | 39 |
| 6.2.3 Resiembra | 39 |
| 6.2.4 Determinación de concentración celular y viabilidad | 40 |
| 6.3 Preparación de las muestras para la citometría de flujo | 41 |
| 6.4 Detección de eIF3f y fase del ciclo celular | 42 |
| 6.5 Análisis estadístico | 42 |
| Capítulo VII Resultados | 43 |
| Capítulo VIII Discusión..... | 46 |
| Capítulo IX Conclusión | 49 |
| Capítulo X Referencias | 50 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Una visión general del ciclo celular. | 13 |
| Figura 2. Ciclinas involucradas en el ciclo celular de mamíferos | 15 |
| Figura 3. Activación y degradación de ciclinas | 16 |
| Figura 4. Traducción..... | 23 |
| Figura 5. Expresión de la proteína eIF3f..... | 27 |
| Figura 6. Vista general esquemática de la configuración de un típico citómetro de flujo ... | 29 |
| Figura 7. Propiedades de dispersión de luz de una célula. | 30 |
| Figura 8. Las ventajas del análisis de células individuales. | 30 |
| Figura 9. Distribución de células A549 en las fases G0/G1, S y G2/M del ciclo celular. | 44 |
| Figura 10. Análisis de la expresión de la proteína eIF3f (FL1-A) por subpoblaciones celulares específicas a una fase del ciclo celular | 44 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|---|----|
| Tabla 1. Inhibidores de los complejos ciclina..... | 17 |
| Tabla 2. Comparación de citometría de flujo y western blot..... | 32 |
| Tabla 3. Líneas y tipos celulares utilizadas..... | 39 |
| Tabla 4. Análisis de la expresión de la proteína eIF3f (FL1-A) en líneas celulares asincrónicas..... | 45 |

ABREVIATURAS

| | |
|-------|--|
| ADN | Ácido desoxirribonucleico |
| APC/C | Complejo promotor de la anafase |
| ARN | Ácido ribonucleico |
| CDK | Quinasa dependiente de ciclina |
| Cip | Proteína que interactúa con quinasas dependientes de ciclina |
| CKI | Inhibidores de quinasas dependientes de ciclina |
| E2F | Factor de transcripción de genes para la entrada a la fase S |
| eIF | Factor de inicio de la traducción en eucariotes |
| eIF3f | Factor eucariótico de inicio de la traducción 3, subunidad f |
| FSC | Forward scatter (Detector de dispersión frontal) |
| INK4 | Inhibidores de quinasa dependiente de ciclina 4 |
| Kip | Proteína inhibidora de quinasa |
| MEC | Matriz extracelular |
| MPF | Factor promotor de la mitosis |
| MPN | Dominio Mpr1p, Pad1p N-terminal |
| PI | Yoduro de propidio |
| PCNA, | Factor de procesividad de la ADNpol |
| Rb | Retinoblastoma |
| S6K | Quinasa serina/treonina |
| SSC | Side scatter (Detector de dispersión lateral) |
| SCF | Skp1-Cullin-F-complejo proteínico de caja -o box- |

Resumen

La subunidad f del complejo multiproteico 3 del inicio de la traducción (eIF3f) está involucrada en diferentes procesos celulares, como el control de la síntesis de proteínas y la proliferación celular. En células tumorales humanas A549 su expresión durante el ciclo celular es bifásica, circunscrita a la fase S temprana y a la transición G2/M del ciclo; una desregulación en su expresión induce a muerte celular programada (Higareda-Mendoza y Pardo-Galván 2010). No se conoce si esto es una característica de células tumorales, por lo cual, es importante definir si existen diferencias en su perfil de expresión con respecto a tipos celulares de origen embrionario distinto, entre células normales y tumorales, e incluso entre especies mamíferas o de distintos reinos. En este trabajo se determinó, por citometría de flujo, el perfil de expresión de la proteína eIF3f en varias líneas celulares humanas (A549, C33A, Ramos, CaLo, HepG2, Caski, Raji y Ramos), en preosteoblastos murinos MC3T3-E1, en linfocitos humanos y murinos, y en leucocitos de rata. Se encontró que la expresión de eIF3f es dependiente de la fase del ciclo celular en los distintos tipos celulares, como lo ya reportado para la línea celular A549 (Higareda-Mendoza y Pardo-Galván 2010). La expresión de eIF3f es bifásica respecto al ciclo celular en mamíferos, presentando máximos de expresión en la fase S temprana y en la transición G2/M.

Palabras clave: eIF3f, ciclo celular, citometría de flujo, expresión genética, fase S

Abstract

The f subunit of the eukaryotic translation initiation factor 3 (eIF3f) is involved in different cellular processes, as the control of protein synthesis and cell proliferation. In A549 human tumor cells, its expression during the cell cycle is biphasic and circumscribed to the early S phase and G2/M transition of the cell cycle; a deregulation in its expression induces programmed cell death (Higareda-Mendoza y Pardo-Galván 2010). It is not known if this is a specific characteristic of tumor cells. Because of this reason, it is important to define if there are any differences in the eIF3f expression profile with respect to cell types of different embryonic origin, between normal and tumor cells, and even between different mammalian cells. The expression profile of the eIF3f protein was determined by flow cytometry in many human cell lines (A549, C33A, Ramos, CaLo, HepG2, Caski, Raji, and Ramos), in MC3T3-E1 mouse pre-osteoblasts, in human lymphocytes, and in rat leukocytes. It was found that the expression of eIF3f is dependent of the phase of the cell cycle in the different cell types, as it was previously reported for cell line A549 (Higareda-Mendoza y Pardo-Galván 2010). The expression of eIF3f is biphasic with respect to the cell cycle in mammals, with maximal expression peaks in early S phase and in the G2/M transition.

Key words: eIF3f, cell cycle, flow cytometry, cellular expression, S phase

Capítulo I Marco teórico

1.1 El ciclo celular

De acuerdo con el tercer principio de la teoría celular, las nuevas células se originan sólo de otras células vivas. El proceso por el cual esto ocurre se denomina división celular. Para que un organismo multicelular, tal como un humano o un roble, adquiera una organización y complejidad celular, tiene que sufrir innumerables divisiones a partir de un cigoto unicelular. La división celular no se detiene con la formación del organismo maduro, continúa en ciertos tejidos a lo largo de la vida. En una población de células que se dividen, ya sea en el interior del cuerpo o en una placa de cultivo, cada célula pasa a través de una serie de etapas definidas, que constituyen el ciclo celular.(Karp, 2010)

La proliferación celular es un proceso regulado de forma estrecha en el que participan muchas moléculas y vías celulares interrelacionadas. La replicación de las células se estimula por factores de crecimiento o mediante la transmisión de señales de los elementos de la matriz extracelular (MEC) a través de las integrinas. Para conseguir la replicación y división del ADN, la célula debe sufrir una serie de acontecimientos regulados, a los que se le llama ciclo celular. El ciclo celular incluye las fases G1 (presintética), S (síntesis de ADN), G2 (premitótica) y M (mitótica). Las células quiescentes que no han entrado en el ciclo celular se sitúan en la fase G0. Cada fase del ciclo celular depende de la activación adecuada y la culminación de la fase previa, y el ciclo se detiene en los lugares en los que falla la función de un gen esencial. Dado el papel central en el mantenimiento de la homeostasis tisular y la regulación de procesos de crecimiento fisiológico, como la regeneración y la reparación, el ciclo celular dispone de múltiples controles y redundancias, sobre todo durante el paso de la fase G1 a la fase S (Cooper y Hausman, 2007).

1.2 Fases del ciclo celular

El ciclo celular se puede dividir en dos fases principales sobre la base de las actividades celulares fácilmente visibles con un microscopio de luz: fase M y la interfase (Fig. 1). La fase M incluye (1) el proceso de la mitosis, durante la cual los cromosomas duplicados se separan en dos núcleos y, (2) la citocinesis, durante la cual toda la célula se divide en dos células hijas. La interfase es el periodo entre dos divisiones celulares, donde se dedica a las diversas actividades metabólicas, entre las que destacan el crecimiento celular y la duplicación del material genético. Mientras que la fase M por lo general dura sólo una hora, la interfase puede extenderse por días, semanas, o más, dependiendo del tipo de célula (Karp, 2010).

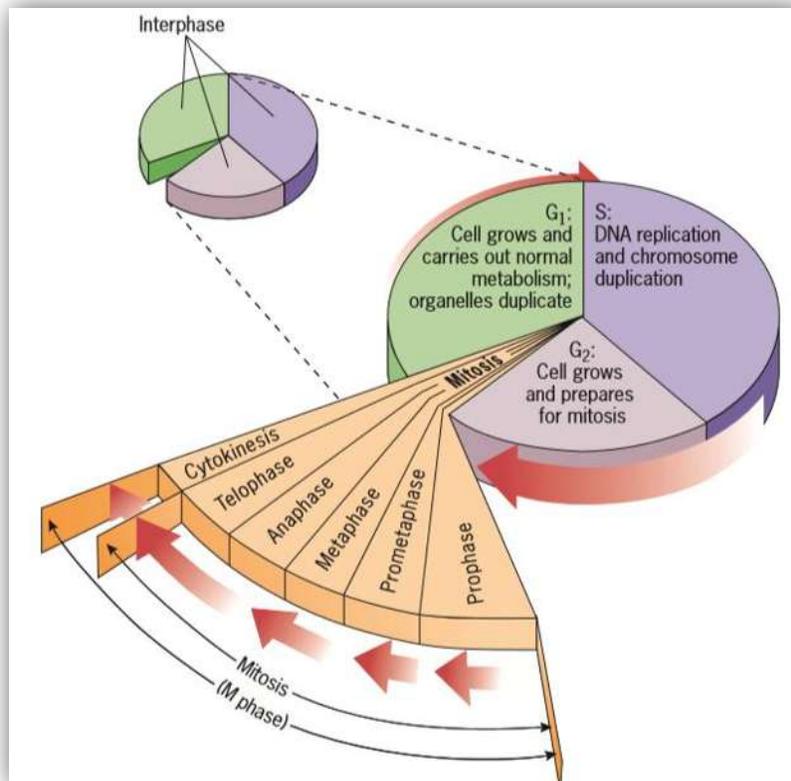


Figura 1. Una visión general del ciclo celular. Diagrama del ciclo celular que indica las etapas por las que pasa una célula de una división a otra. El ciclo celular se divide en dos fases principales: la fase M y la interfase. (Karp, 2010)

Las células de la mitosis pasan a la fase G1, durante la cual se sintetizan los ARN y las proteínas, pero no hay replicación de ADN. El inicio de la replicación del ADN determina o marca la transición desde la fase G1 al periodo de la fase S. La fase S se define como el tiempo en que todo el ADN se ha replicado. Durante la fase S el contenido de ADN aumenta desde un estado diploide $2n$ $2C$ hasta el valor de replicación $2n$ $4C$. El periodo desde el final de la fase S hasta la mitosis se llama fase G2; durante este periodo, la célula tiene dos juegos diploides completos de cromosomas (Lewin, 2001).

1.3 Regulación del ciclo celular

Las concentraciones de las ciclinas, las subunidades reguladoras de las proteínas quinasas heterodiméricas que controlan los eventos del ciclo celular, aumentan y disminuyen conforme se progresa a través del ciclo celular (Fig. 2). Las subunidades catalíticas de estas quinasas, llamadas quinasas dependientes de ciclina (CDKs), no tienen actividad de quinasa, a menos que se asocian con una ciclina. Cada CDK puede asociarse con diferentes ciclinas, y la ciclina asociada determina qué proteínas son fosforiladas por un complejo ciclina-CDK particular (Lodish et al., 2005).

Existen cuatro clases de ciclinas, cada una de las cuales está definida por la etapa del ciclo celular en la que se une a las Cdk y actúan. Todas las células eucariotas necesitan tres de estas clases:

1. Las ciclinas G1/S activan las Cdk en las postrimerías de G1 y así ayudan a desencadenar la progresión del ciclo, quedando la célula comprometida a entrar en el ciclo celular; sus niveles descienden en la fase S (Alberts et al., 2010). Estos complejos preparan a la célula para la fase S al estimular la síntesis de enzimas que participan en la duplicación del ADN; en células humanas, la Cdk2 y la ciclina E son las que forman estos complejos (Luque y Herráez, 2002).

2. Las ciclinas S se unen a las Cdk poco después de la progresión a través del inicio y ayudan a estimular la duplicación de los cromosomas. Los niveles de ciclinas S permanecen elevados hasta la mitosis y estas ciclinas también contribuyen al control de algunos acontecimientos mitóticos iniciales (Alberts et al., 2010). En células humanas la Cdk2 y la ciclina A son las que forman estos complejos (Luque y Herráez, 2002).
3. Las ciclinas M activan las Cdk que estimulan la entrada en la mitosis (Alberts et al., 2010). Los complejos se forman durante la fase S y G₂, pero permanecen inactivos hasta que se completa la síntesis de ADN. Una vez activados inducen la condensación cromosómica, la desintegración de la envoltura nuclear, el armado de huso mitótico y la alineación de los cromosomas en la placa ecuatorial durante la metafase. Además permiten el inicio de la anafase y la migración de los cromosomas hacia los polos del huso. Luego de estos acontecimientos, las ciclinas mitóticas son degradadas, lo cual permite que los cromosomas se descondensen, se reconstituya la envoltura nuclear y se divida el citoplasma. En células humanas la Cdk1 y la ciclina B son las que forman estos complejos (Luque y Herráez, 2002).

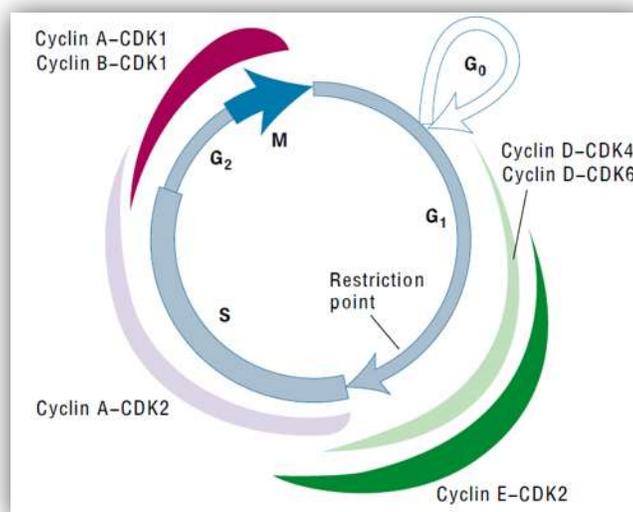


Figura 2. Ciclinas involucradas en el ciclo celular de mamíferos. (Lodish et al., 2010)

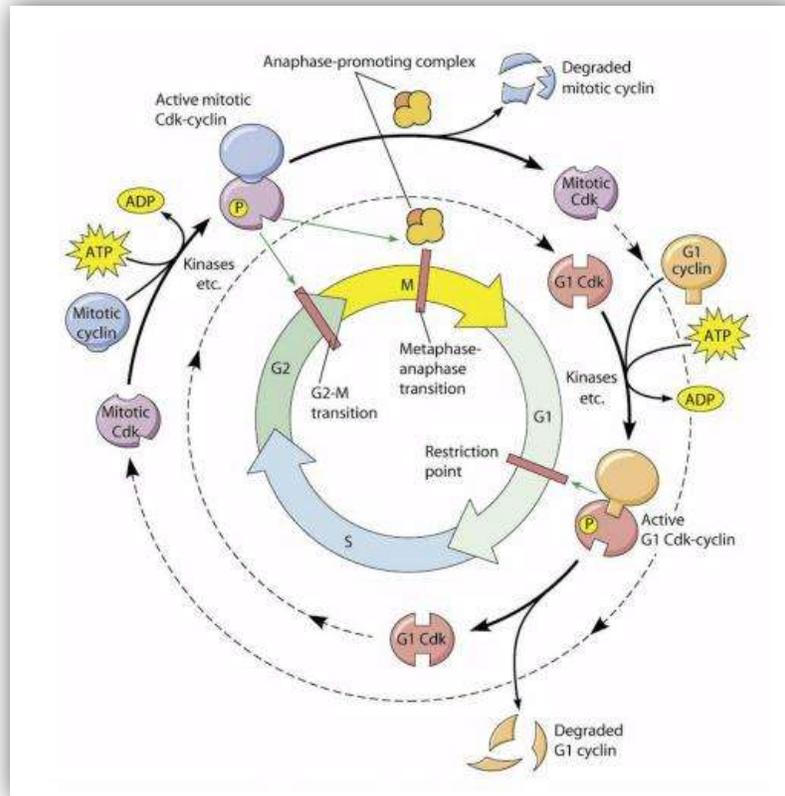


Figura 3. Activación y degradación de ciclinas. Una vez expresadas, las ciclinas se encuentran sujetas a proteólisis mediada por ubiquitina. La disponibilidad de cdk para formar los complejos se encuentra además limitada por la regulación temporal de su compartimentalización subcelular. (www.mun.ca/biology/desmid/brian/BIOL2060/BIOL2060-19/19_41.jpg)

La activación de las Cdk como proteínas quinasa no consiste simplemente en su unión con su ciclina, sino que su regulación depende de otros mecanismos (Fig. 3).

- a) La posibilidad de que se forme el complejo Cdk-ciclina depende de la disponibilidad de ambas proteínas.
 - Tasa de síntesis de la ciclina: La síntesis está controlada en función de la etapa del ciclo, aumentando en ciertos puntos del mismo, diferente para las ciclinas A y B, que para las D y E.
 - Tasa de degradación de la ciclina: determina, junto con la síntesis, la concentración disponible para su unión a las Cdk.
- b) Una vez formado el complejo Cdk-ciclina, su actividad como quinasa está sometida a regulación por otras proteínas.

- Modificación de la Cdk por fosforilación y desfosforilación: la actividad del complejo Cdk-ciclina precisa la fosforilación de ciertos residuos aminoacídicos de la Cdk y no de otros, lo cual está regulado por distintas quinasas y fosfatasas, que a su vez están reguladas por la propia Cdk activa.
- Interacción de las quinasas con proteínas inhibidoras: el último mecanismo regulador de la actividad de los complejos Cdk-ciclina se basa en la existencia de muchas proteínas que se unen a las Cdk, inhibiendo directamente su actividad, y se les llama inhibidores de los complejos Cdk-ciclina, o CKI. Su efecto es bloquear el ciclo de división, por lo que funcionan como oncosupresoras (Luque y Herráez, 2002).

Los CKI se agrupan en dos familias en función de su estructura, modo de acción y especificidad de sustrato, como se muestra en la Tabla 1 (Jiménez- Alcántar, 2014).

Tabla 1. Inhibidores de los complejos ciclina .

| Familia | Nombre de la proteína inhibidora | Otros nombres | Acción inhibidora |
|---------|----------------------------------|---------------|---|
| Cip/Kip | p21 | CIP1 WAF1 | Preferentemente sobre los complejos Cdk-ciclina de G1 y S; en menor medida sobre complejos Cdk-ciclina de G2. |
| | p27 | KIP1 | |
| | p57 | KIP2 | |
| INK4 | p16 | INK4a MTS1 | Específicamente sobre los complejos de ciclinas de G1 con Cdk4 o Cdk6, pues compiten con las ciclinas D |
| | p15 | INK4b MTS2 | |
| | p18 | INK4c | |
| | p19 | INK4d ARF | |

1.4 Puntos de control en el ciclo de división celular

Los puntos de control se definen como los instantes del ciclo celular eucarionte en los que puede detenerse la progresión hasta que las condiciones celulares sean las adecuadas. Si las células progresan a la próxima fase del ciclo celular antes de que la fase anterior se complete de manera adecuada puede producirse daño genético y/o celular. Los procesos moleculares que regulan la replicación cromosómica y la división celular son similares en todas las células eucariotas (Farias-Escalera et al., 2005).

1. El **punto de control en G1/S** vigila la integridad del ADN antes de la replicación. Este punto de regulación se definió por primera vez en estudios de levadura de gemación (*Saccharomyces cerevisiae*), donde se le conoce como START. Una vez que las levaduras han rebasado el START, quedan determinadas a entrar a fase S y sufrir el ciclo de división celular. Sin embargo rebasar el punto de START es un proceso finamente regulado, siendo controlado por señales externas, como disponibilidad de nutrientes y por el tamaño celular. A diferencia de las levaduras, el paso de las células animales a través del ciclo celular se regula, principalmente por factores de crecimiento extracelulares que son señales de proliferación celular en vez de por la disponibilidad de nutrientes. (Cooper y Hausman, 2007)

En células animales, la progresión a través del punto de restricción G1/S es mediada por la vía Rb/E2F. La proteína Rb (pRB) es una fosfoproteína nuclear de 105 a 110 kDa que es forforilada por los complejos de CDK2/ciclina D y E en múltiples residuos de serina/treonina y funciona como supresor de tumores en estado hipofosforilado o activo. La proteína Rb hipofosforilada atrapa al factor transcripcional E2F y posterior a este evento, el complejo E2F/pRB promueve la unión de la histona desacetilasa a los promotores de los genes regulados por E2F. La desacetilación de las histonas centrales da como resultado una estructura más compacta de la cromátide que impide la unión del complejo de transcripción a los

promotores y, por lo tanto, inhibe la transcripción de los genes regulados por E2F (Harbour y Dean, 2000). Se ha reportado que E2F activa la transcripción de varios genes cuyos productos son importantes para la entrada a la fase S, así como para la replicación; algunas de estas proteínas son: p107, PCNA, topo1, ADN polimerasa α , dihidrofolato reductasa (DHFR), ciclina D1, ciclina A, ciclina E, p21Cip1, Cdk2, Cdc2 y Cdc25. El factor E2F puede activar la transcripción de estos genes sólo si se encuentra en estado libre, ya que su unión a Rb lo inactiva. Sin embargo, la activación completa de E2F tiene lugar al dimerizarse con otra proteína denominada DP (Sherr y Roberts, 1999).

2. En el **punto de control en G₂/M** se comprueba la integridad del ADN tras la replicación y vigila si la célula puede entrar en la mitosis de forma segura. Cuando una célula percibe un daño en el ADN, la activación del punto de control retrasa el ciclo celular para activar los mecanismos de reparación del ADN. Cuando las alteraciones del ADN son demasiado graves para poder repararlas, las células se eliminan mediante apoptosis o entran en una fase de no replicación, que se llama senescencia, principalmente mediada por mecanismos dependientes de p53. Los defectos de los puntos de control que permiten que células con roturas en las hebras del ADN o alteraciones del cromosoma se dividan, producen mutaciones en las células hijas y pueden ocasionar neoplasias (Cooper y Hausman, 2007). El carácter oncosupresor del gen p53 se debe a las funciones de la proteína normal sintetizada que consisten en inducir la apoptosis y actuar como freno en el punto de control G₁/S. La presencia de daños en el ADN es detectada por varias proteínas, entre ellas una proteína quinasa que fosforila a p53. La forma fosforilada de p53 es un factor de transcripción que induce la expresión de algunos genes y reprime otros. Entre las proteínas cuya expresión aumenta destaca en primer lugar p21, que inhibe la actividad quinasa del complejo Cdk2-ciclinaE, necesarias para superar G₁/S. En segundo lugar GADD (grown arrest on DNA damage, detención del crecimiento por daños en el ADN) una proteína que, al igual que p21

secuestra el PCNA, factor de procesividad de la ADNpol, impidiendo de este modo la replicación (Luque y Herráez, 2002). El componente clave de esta fase en todos los eucariontes es el factor promotor de la mitosis, o MPF, formado por la subunidad catalítica p34cdc2 y su regulador positivo, la ciclina B (Uversax et al., 2003). Una vez formado el factor promotor de la maduración (MPF), requiere ser fosforilado en el residuo de Tre161 por CAK. Sin embargo, para evitar una entrada prematura en mitosis, el complejo es mantenido en estado inactivo mediante su fosforilación en Tre14 por la quinasa Myt1 y en la Tir15, por la quinasa Wee1. Una vez verificada la completa y correcta replicación y la presencia de todos los componentes necesarios para la mitosis, el MPF es desfosforilado en Tre14 y Tir15 por la fosfatasa Cdc25, misma que requiere ser fosforilada por el MPF para ser activa, y tiene así lugar la mitosis (Farias-Escalera et al., 2005).

3. El tercer control, punto M, se ejerce durante la mitosis, entre la metafase (cromosomas condensados dispuestos en el plano ecuatorial de la célula) y la anafase (separación de las cromátidas hermanas unidas al huso mitótico hacia cada polo celular). Asegura que la célula no se divida si hay errores en la formación del huso acromático o en la alineación de los cromosomas en la placa ecuatorial. Es el punto de control cuyo mecanismo es menos conocido, pero posiblemente también depende de las ciclinas mitóticas (Luque y Herráez, 2002). El regulador clave de la transición de la metafase a la anafase es el complejo promotor de la anafase o ciclosoma (APC/C: anaphase-promoting complex, o cyclosome), un miembro de la familia ubiquitina ligasa. APC/C cataliza la ubiquitinación y degradación de dos proteínas principales. La primera es la segurina, la cual normalmente protege los enlaces proteicos que mantienen unidas a las cromátidas hermanas al comienzo de la mitosis. La degradación de la segurina en la transición de la metafase a la anafase, activa una proteasa que separa las cromátidas hermanas y desencadena la anafase. Las ciclinas S y M son la segunda diana principal del APC/C. Cuando estas ciclinas son degradadas,

la mayoría de las Cdk se inactivan. Como consecuencia de ello, muchas proteínas fosforiladas por las Cdk desde la fase S hasta el inicio de la mitosis son desfosforiladas por diferentes fosfatasas presentes en la célula anafásica. Esta desfosforilación de las dianas de las Cdk es necesaria para la finalización de la fase M (Alberts et al., 2010). El sistema de control del ciclo celular también utiliza otra ubiquitina ligasa denominada SCF. El SCF ubiquitina ciertas proteínas CKI a finales de G1 y facilita en gran medida el control de la activación de Cdk-S y la replicación del ADN (Alberts et al., 2010). Aunque tanto el APC/C como el SCF son grandes complejos proteicos que contienen algunos componentes homólogos, su regulación es diferente. La actividad APC/C cambia durante el ciclo celular, fundamentalmente como consecuencia de su asociación con una subunidad activadora: Cdc20 durante la anafase o Cdh1 desde la postrimetrias de la mitosis hasta G1 temprana. Estas subunidades ayudan al APC/C a que reconozca a sus proteínas diana. La actividad de SCF también depende de las subunidades denominadas de caja F, las cuales ayudan a que el complejo reconozca a sus proteínas diana. Sin embargo, a diferencia del APC/C la actividad del SCF es constante durante el ciclo celular. La ubiquitinación mediada por SCF está regulada por cambios en el estado de fosforilación de sus proteínas diana, ya que las subunidades con caja F sólo reconocen proteínas fosforiladas de forma específica (Alberts et al., 2010).

1.5 Síntesis de proteínas en eucariontes

La síntesis de proteínas es uno de los procesos que consumen más energía en las células eucariotas; a través de este evento, la información genética se traduce de un código de ácido nucleico en un lenguaje de aminoácidos para producir proteínas (Marchione y Leibovitch, 2013).

Las proteínas son los mediadores activos en la mayoría de los procesos celulares, llevando a cabo las funciones determinadas por la información codificada en el ADN. La síntesis de proteínas, junto con la modificación pos-traduccional, son la

etapa final de la expresión genética (Cooper y Hausman, 2007). La maquinaria para la síntesis de proteínas consta de cuatro componentes principales: el mRNA, ARNs adaptadores conocidos como ARN de transferencia (tARN), aminoacil-tARN sintetasas que se adhieren a los aminoácidos t ARNs, y el ribosoma, que es un complejo de múltiples subunidades de proteínas y ARN que cataliza la formación del enlace peptídico. El mRNA contiene la secuencia codificante de proteínas y elementos de reconocimiento para la iniciación y terminación de la traducción (Whatson et al. ,2014).

El inicio de la traducción es un proceso sumamente regulado, en el que además de un mRNA maduro con las señales adecuadas de inicio y las unidades funcionales de los ribosomas, se requiere de la participación ordenada de varios factores eucarióticos de inicio de la traducción o eIFs. Los eIFs son proteínas celulares que tienen la capacidad de realizar varias funciones durante la síntesis de proteínas, como la de reconocer al cap, dirigir la unión del ribosoma al mRNA, la disociación del ribosoma del mRNA, etc. Debido a que los eIFs son los que reconocen a los ARNs maduros que pueden ser traducidos, éstos pueden ser un factor limitante para el inicio de la traducción (Gutiérrez, 2006).

La iniciación de la traducción comienza con el ensamblaje del complejo 43S ribosomal, compuesto por la subunidad ribosomal 40S, eIF1, eIF1A, eIF3 y el eIF2/GTP/Met/tARNi formando el complejo ternario (Park et al., 2001). Para el reclutamiento del complejo 43S al extremo 5'cap del mRNA, eIF3 interactúa con el complejo eIF4F (compuesto por eIF4E, eIF4G y eIF3A), eIF4B y ATP. Múltiples interacciones entre eIF4E, eIF4G, eIF3 y la subunidad ribosomal 40S juegan un papel crítico en el reclutamiento del 5'cap del mRNA, formando el complejo 48S. Este último complejo escanea la región no traducida 5', apoyado por eIF1 y eIF1A, buscando un adecuado codón de iniciación (Park et al., 2001).

El factor de iniciación 5 (eIF5), unido a la subunidad ribosomal 40S, hidroliza el GTP unido a eIF2, estimulando así la disociación del complejo de preiniciación 43S, liberando al eIF2-GDP y al eIF3 (Jiménez-Alcántar, 2014).

Finalmente, con la liberación de los eIFs la subunidad 60S se une con el complejo 48S, formando el ribosoma 80S para continuar con la elongación (Dong y Ting, 2006).

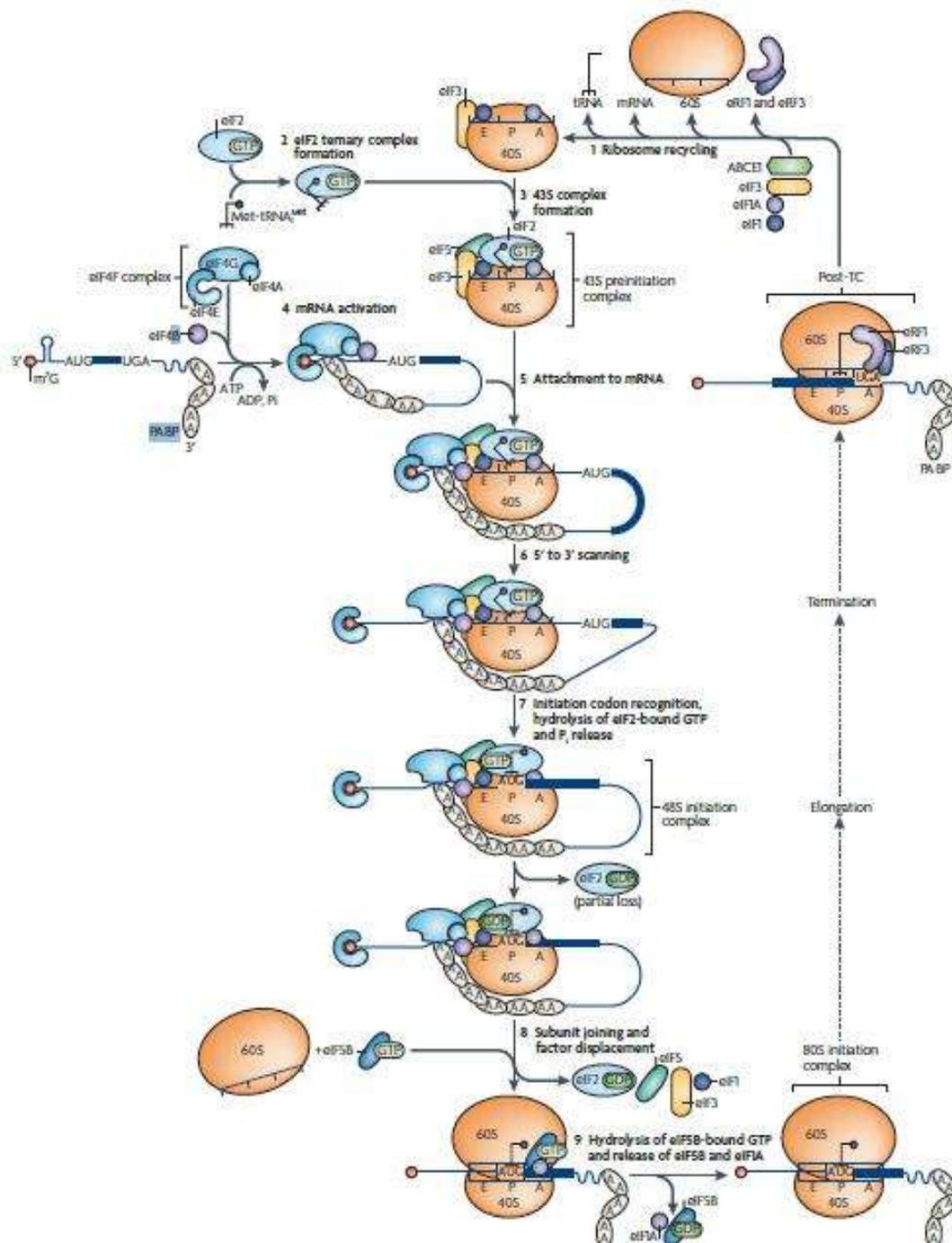


Figura 4. Traducción. Proceso de traducción o síntesis de proteínas en eucariotes (Jackson et al., 2010).

1.6 Factor eucariótico de iniciación de la traducción 3

El factor de iniciación 3 (eIF3) es un complejo proteínico con una masa aproximada a los 700 kDa que forma parte del complejo de iniciación 43S, es el factor de mayor complejidad en el proceso de inicio de síntesis de proteínas (Hall et al., 2004). eIF3 sirve como andamio y catalizador de la unión entre el mARN activado, la subunidad ribosomal 40S y el complejo ternario (Pestova y Kolupaeva, 2002).

En mamíferos consta de hasta 13 subunidades no idénticas que varían de tamaño, desde 28 hasta 170 kDa, y se denominan: eIF3a (p170), eIF3b (p116), eIF3c (p110), eIF3d (p66), eIF3e (p48), eIF3f (p47), eIF3g (p44), eIF3h (p40), eIF3i (p36), eIF3j (p35), eIF3k (p35), eIF3l (p28) y eIF3m (GA17) (Burkis et al., 2001).

El factor eIF3 ha sido purificado en diversas especies eucariontes, entre los que se incluyen mamíferos, plantas y levaduras, de los cuales se han obtenido distintos números de subunidades dependiendo del organismo de donde se extrajo. Se ha reportado que en *S. cerevisiae* eIF3 consta de 5 subunidades, las cuales, en un principio se denominaron de acuerdo al peso molecular, como p110, p90, p93, p33, y p39; estas subunidades son homólogas a las proteínas p170, p116, p110, p44 y p36, respectivamente, del eIF3 de mamíferos (Asano et al., 1997; Akiyoshi et al., 2001) y se cambió su denominación a: eIF3a, eIF3b, eIF3c, eIF3g y eIF3i (Browning et al., 2001). Se propone que estas cinco subunidades forman el corazón catalítico y que el resto tiene funciones moduladoras en el proceso de síntesis de proteínas (Burkis et al., 2001). Sin embargo, (Masutani et al., 2001) reportan que en mamíferos sólo tres de estas cinco subunidades (eIF3a, b, c) y tres subunidades no conservadas (eIF3e, f, h) son indispensables para mantener un nivel adecuado de síntesis de proteínas y que el resto de las subunidades sólo modulan la actividad del complejo eIF3 (Dong y Ting, 2006).

1.7 eIF3f

En el genoma humano, eIF3f se encuentra codificado en el cromosoma 11p15.4; es un gen con 8 exones y 7 intrones y codifica una proteína de 357 aminoácidos (aa). Existe una segunda copia del gen en el cromosoma 2 que sólo presenta la secuencia codificante (sin intrones) de una proteína de 361 aa. La identidad entre las 2 secuencias de aminoácidos es del 97%. En las líneas celulares humanas A549 y 293H se ha demostrado que la copia en el cromosoma 2 no es funcional tratándose de un retropseudogen (Higareda-Mendoza y Pardo-Galván, 2010).

La proteína eIF3f es un miembro de la familia Mov34; miembros de esta familia contienen un motivo Mpr1/Pad N-Terminal (MPN) que se encuentra en otras subunidades de complejos macromoleculares, tales como el proteasoma y el señalosoma COP9; se ha relacionado con la promoción de complejo-montaje que median las interacciones proteína-proteína. eIF3f está involucrado en diferentes procesos celulares como en la iniciación de la traducción y la regulación del proteosoma. (Higareda-Mendoza y Pardo-Galván, 2010; Gutiérrez et al., 2015)

Con respecto al proceso de síntesis de proteínas, experimentos *in vivo* e *in vitro* muestran que la sobreexpresión del gen de eIF3f disminuye la velocidad de síntesis proteica (Higareda-Mendoza y Pardo-Galván, 2010; Shi et al., 2006), por lo que se considera un modulador del proceso. La proteína eIF3f forma parte de eIF3, y es capaz de interactuar con proteínas diferentes a las de este complejo multiproteico. Por ejemplo, se ha reportado que bajo condiciones basales, la quinasa ribosomal S6K1 interactúa con eIF3f a través del dominio MPN. En presencia de nutrientes y factores de crecimiento, la quinasa diana de rapamicina en células de mamífero (mTOR, por sus siglas en inglés) interacciona con eIF3f a través del dominio señalizador de TOR (TOS, por sus siglas en inglés), y mTOR fosforila a S6K1 liberándola de eIF3f, y de esta manera fosforila a su segundo blanco, la proteína 4E-BP1 (Holz et al., 2005; Harris et al., 2006).

La proteína eIF3f muestra características de unión proteína-proteína excepcionales, ya que también interactúa establemente con proteínas

involucradas con procesos diferentes a los del complejo eIF3 y la síntesis proteica. Por ejemplo, recientemente se reportó que eIF3f se relaciona físicamente con la proteína TRC8, que es una ubiquitin-E3 ligasa, la cual se localiza en el retículo endoplásmico y sensa los niveles exógenos de colesterol (Lee et al., 2010).

También, Lagirand y colaboradores (2008) reportan que en células de mioblasto de ratón (C2C12), la ubiquitin-E3 ligasa Atrogin 1/MAFbx interacciona, a través de un dominio rico en residuos de leucina, con el dominio MPN de eIF3f. El dominio MPN de eIF3f humano abarca del aminoácido 90 hasta el 248. Sin embargo, posee un dominio en sus primeros 90 aminoácidos con un peculiar contenido de aminoácidos, con un 60% de prolinas y alaninas (dominio poly PA). Aunque aún se desconoce su función, se sabe que este dominio interactúa con la proteína quinasa relacionada a la apoptosis Cdk11p46 (Shi et al., 2006) o con la proteína 9G8 perteneciente a la familia de proteínas ricas en serina y arginina (proteínas SR) que agrupa factores de corte y empalme durante la edición del extremo 3' del pre-mARN del virus HIV e impide su procesamiento (Valente et al., 2009). En este sentido, en células de melanoma humano A375 en estado apoptótico, la Cdk11p46 fosforila a eIF3f en la serina 46 contenida en el dominio poly PA (Shi et al. 2006). Desde el punto de vista evolutivo, el hecho de que este dominio se conserve infiere un alto valor de selección (Gutiérrez et al., 2015).

Por otro lado, existe evidencia de que el sobre-expresar al gen eIF3f afecta al crecimiento celular e induce apoptosis, como fue reportado por Shi et al. y colaboradores (2006) en la línea celular A375, por Higareda-Mendoza y Pardo-Galván (2010) en la línea celular A549 y por Higareda y colaboradores (2003) en células de tabaco TBX-2. Asimismo, se reportó que la expresión de la proteína eIF3f es bifásica y circunscrita a las fases S y M del ciclo celular y que su expresión en G0 está abatida, esto en línea celular A-549. Este perfil de expresión fue corroborado mediante estudios en cultivos asincrónicos y sincronizados en G0, M y S, así como a través de la actividad transcripcional de eIF3f en cultivos transfectados con la región promotora inmediata al gen eIF3f fusionada al gen reportero de luciferasa (Higareda-Mendoza y Pardo-Galván, 2010). Por otro lado, también sabemos que la sobreexpresión del gen inhibe la síntesis global de

proteínas (Higareda et al., 2003) y si consideramos que la síntesis global de proteínas es inhibida en la transición G2/M y en la fase M del ciclo celular en mamíferos (Fan y Penman 1970), es coherente hacer la relación con su perfil de expresión y sugerir su contribución en este proceso. Es conveniente recordar que además del máximo de expresión en M, está el máximo en la fase S del ciclo celular y que durante esta fase no disminuye la síntesis de proteínas, por lo que se plantea una función diferente durante la misma (Higareda-Mendoza y Pardo-Galván, 2010).

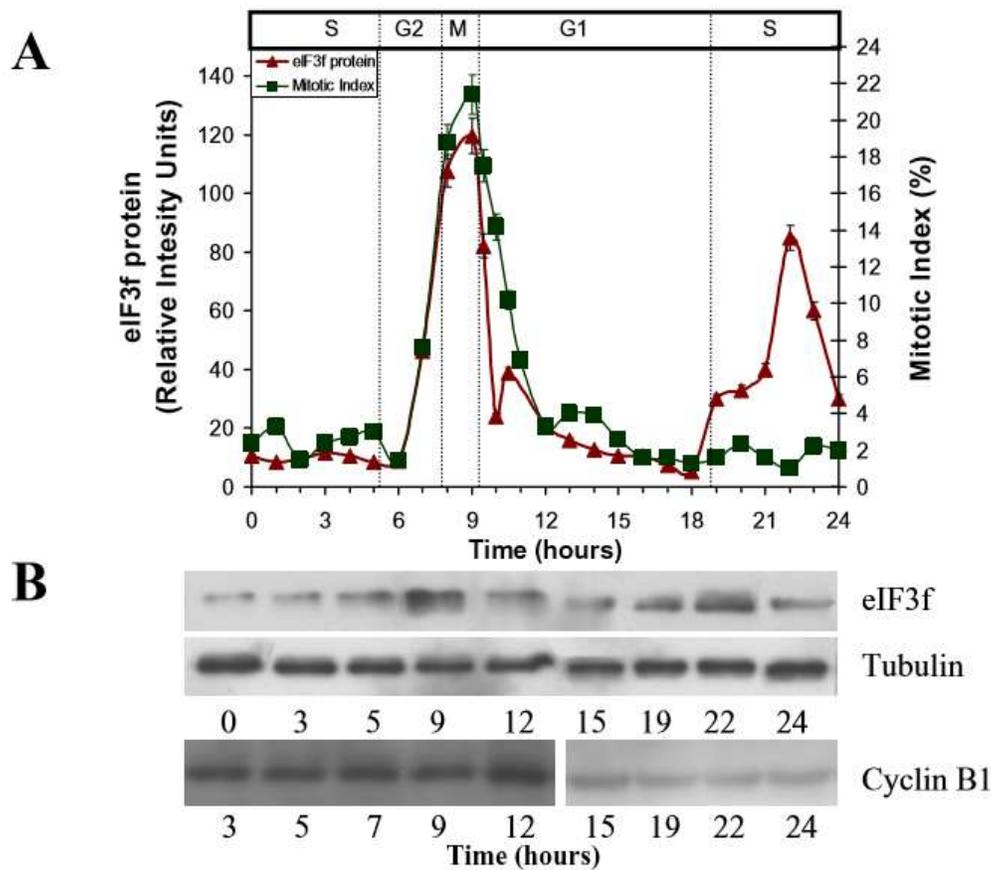


Figura 5. Expresión de la proteína eIF3f. A) Concentración de eIF3f en unidades de intensidad relativa (normalizada con tubulina, panel B de esta figura), y el índice mitótico (% verificado con la expresión de ciclina B1, panel B de esta figura) en un ciclo celular 24 horas en las células A549 después de la liberación de hidroxurea (t = 0 h). B) Análisis de WB de eIF3f (arriba), tubulina (centro) y ciclina B1 (inferior) a lo largo del ciclo de 24 células. Todas las proteínas se visualizaron mediante sus respectivos anticuerpos específicos. Una segunda membrana se utiliza para la ciclina B1, donde estaba la concentración de proteínas de carga verificada por WB de tubulina (no se muestra). (Higareda-Mendoza y Pardo-Galván, 2010)

Recientemente, Gutiérrez y colaboradores (2015) al analizar en la línea celular A549 interacciones proteicas con eIF3f, diferentes a la del complejo eIF3, encontraron su asociación con el receptor adrenérgico α 1B en un complejo de 105 kDa. Se replicaron los experimentos en tres líneas celulares más, la HepG2, la Ramos, y la MC3T3-E1, encontrando el mismo complejo de 105 kDa que corresponde a la asociación eIF3f-receptor adrenérgico α 1B. Este dato sugiere que eIF3f podría no ser tipo celular específico y además podría estar participando en otros procesos celulares, además del inicio de síntesis de proteínas.

1.8 Técnica de citometría de flujo

1.8.1 Fundamento de la citometría de flujo

Es una técnica que permite realizar un análisis celular multiparamétrico de forma rápida, sensible, específica y es capaz de proporcionar información cuantitativa sobre cada célula en particular. Por estas características, permite identificar en una muestra diferentes subpoblaciones celulares, incluso cuando están escasamente representadas (Juárez y Pérez, 2012).

El fundamento básico de este estudio es pasar células en suspensión alineadas por delante de un haz luminoso. Las señales luminosas detectadas se transforman en impulsos eléctricos que se amplifican y se convierten en señales digitales que son procesadas por una computadora. Dentro de las aplicaciones clínicas de la citometría de flujo se encuentra la inmunofenotipificación, que es el proceso para determinar marcadores expresados en la superficie celular. Esta detección se hace empleando anticuerpos monoclonales antígeno-específicos marcados con un fluorocromo dirigidos al marcador que queremos evaluar. La citometría de flujo también permite conocer aspectos físicos de la célula (como tamaño y complejidad) y determinar la presencia de determinados antígenos en la superficie celular, citoplasma, mitocondria y núcleo (Cano et al., 2014).

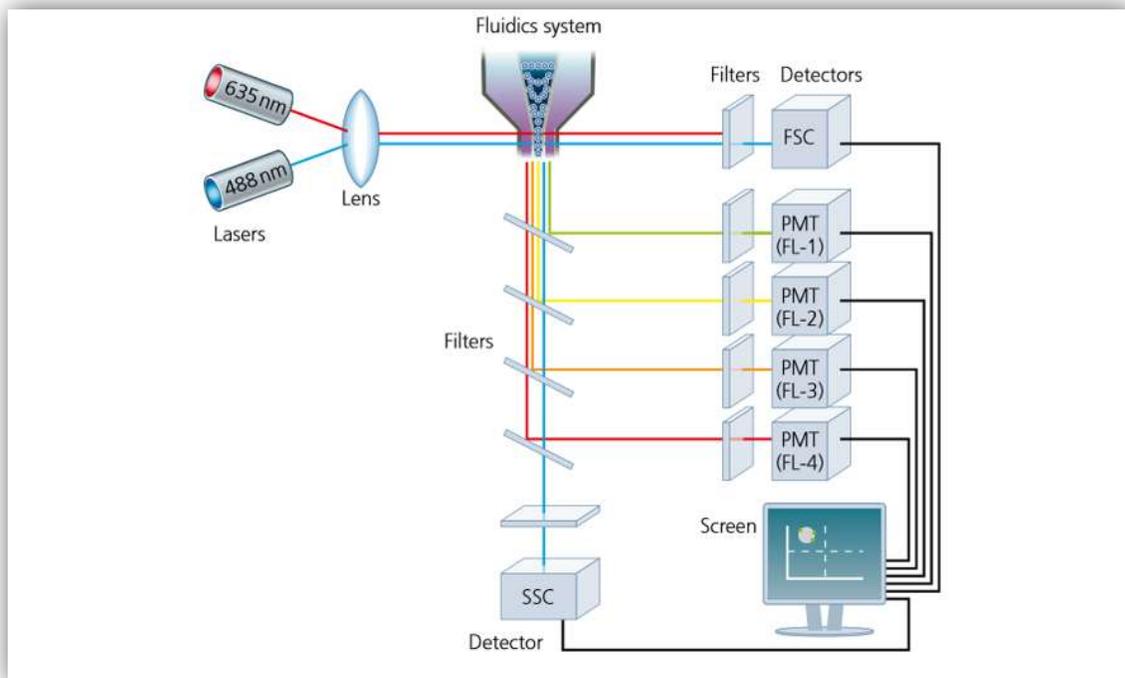


Figura 6. Vista general esquemática de la configuración de un típico citómetro de flujo. (Rahman, 2009)

1.8.2 Generación de dispersión (Scatter)

La dispersión de la luz ocurre cuando un haz de luz incide sobre una partícula, la medida en que esto ocurre depende de las propiedades físicas de una partícula, como su tamaño y su complejidad interna. Los factores que afectan de dispersión de luz son la membrana de la célula, núcleo, y cualquier material granular dentro de la célula. La forma de la célula y la topografía de la superficie también contribuyen a la dispersión de luz total. (Biosciences, 2000)

Se obtiene información óptica conocida como dispersión hacia adelante (FSC) y dispersión lateral (SSC), basado en el ángulo de la luz emitida desde la célula analizada (Jahan-Tigh et al., 2012).

Clásicamente, FSC es luz dispersada en un ángulo pequeño y detectada por un sensor en el lado opuesto de la longitud de onda de 488 nm / fuente de láser azul. FSC proporciona esencialmente la información que se correlaciona con el tamaño de celda. La luz que se esparce fuera de la célula en un ángulo de 90°, llamada "dispersión de lado "(SSC), es recogida por una serie adyacente de sensores y proporciona información sobre la granularidad de la célula o complejidad interna. Mediciones correlacionadas de FSC y SSC pueden permitir la diferenciación de tipos de células en una población celular heterogénea (Jahan-Tigh et al., 2012; Biosciences, 2000).

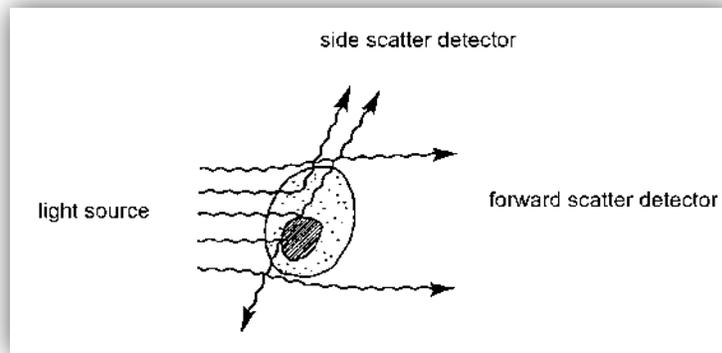


Figura 7. Propiedades de dispersión de luz de una célula. (Biosciences, 2000)

1.8.3 Fluorescencia

Un compuesto fluorescente absorbe energía de la luz en un rango de longitudes de onda que es característico para ese compuesto. Esta absorción de la luz hace que un electrón en el compuesto fluorescente se eleve a un nivel de energía más alto. El electrón excitado decae rápidamente a su estado fundamental, emitiendo el exceso de energía en forma de un fotón de luz. Esta transición de la energía se llama fluorescencia. El rango en el que un compuesto fluorescente puede ser excitado se denomina espectro de absorción. Como se consume más energía en las transiciones de absorción que en las transiciones de emisión de fluorescencia, las longitudes de onda emitidas serán más largas que las absorbidas. La gama de

longitudes de onda emitidas por un compuesto particular se denomina su espectro de emisión. El láser de iones de argón se utiliza comúnmente en la citometría de flujo porque la luz 488-nm que emite excita más de un fluorocromo. Uno de estos fluorocromos es isotiocianato de fluoresceína (FITC). Más de un fluorocromo se puede utilizar simultáneamente si cada uno es excitado a 488 nm y si las longitudes de onda dan picos de emisión no muy cerca uno del otro. (Biosciences, 2000)

Cuando un colorante fluorescente se conjuga con un anticuerpo monoclonal, puede ser utilizado para identificar un tipo de célula particular sobre la base de los marcadores de superficie antigénicos individuales de la célula. En una población mixta de células, diferentes fluorocromos FL pueden ser utilizados para distinguir subpoblaciones separadas. El patrón de tinción de cada subpoblación, combinado con los datos de FSC y SSC, se puede utilizar para identificar qué células están presentes en una muestra y para contar sus porcentajes relativos. (Biosciences, 2000).

1.8.4 Ciclo celular por citometría de flujo

Utilizando fluorocromos en solución, capaces de unirse estequiométricamente al ADN y ARN de las células, intercalándose en la doble hebra de ácidos nucleicos (yoduro de propidio, bromuro de etidio, naranja de acridina, DAPI, etc), es posible evaluar el contenido de ADN y las diferentes fases del ciclo celular (Castillo et al., 1999).

Las células marcadas con un fluorocromo, que se une estequiométricamente a los ácidos nucleicos, emiten fluorescencia proporcional al contenido cromosómico global. De esta manera se produce un patrón característico que refleja las fases del ciclo celular dentro de la población de células en estudio (Castillo et al., 1999).

El ciclo celular puede reflejarse en una curva que muestre las variaciones del contenido de ADN versus el número de células analizadas. La fluorescencia medida en las células en fase de reposo (G₀) y en fase de síntesis de ADN

(G1), produce un pico con distribución normal. De la misma forma, las células en G2, que tienen duplicado su ADN con respecto a las células en G1, también producen un pico distribuido como una normal. Los mismos factores que afectan la amplitud de los picos G0/G1 y G2/M, también afectan la amplitud de la fase S, por lo que en un histograma de ADN, las células que inician la fase S se superponen con las células G1, como también lo hacen las células al final de la fase S con las células en G2. El término coeficiente de variación (CV) describe la amplitud o ancho de la curva ($CV = 100 \times SD / \text{media del pico}$). (Castillo et al., 1999)

1.8.5 Ventajas y desventajas de la citometría de flujo

Tabla 2. Comparación de citometría de flujo y Western blot. (Kruzick et al., 2003)

| WESTERN BLOT | CITOMETRÍA DE FLUJO |
|--|--|
| Análisis de poblaciones <i>Obtener valor promedio de varias celdas.</i> | Análisis de células individuales Recopila los datos de cada célula individual. |
| Muestra homogénea <i>Limitado a las células cultivadas purificadas.</i> | Tipos celulares heterogéneos Complejos de muestras primarias, es decir, las células inmunes. |
| Un parámetro <i>Obtener conjuntos de datos o purificados.</i> | Multiparámetros Correlacionar múltiples marcadores simultáneamente. |
| Gran número de células <i>Requiere cultivos in vitro derivados de células.</i> | Pequeño número de células El análisis directo de tipos de células. |
| Consume tiempo para grandes conjuntos de muestras | Rápido y escalable |
| Tamaño de la proteína y de la especificidad Ab <i>Ab selectividad por objetivo claramente visible.</i> | El anticuerpo debe ser validado Ab debe tener una alta afinidad y selectividad. |

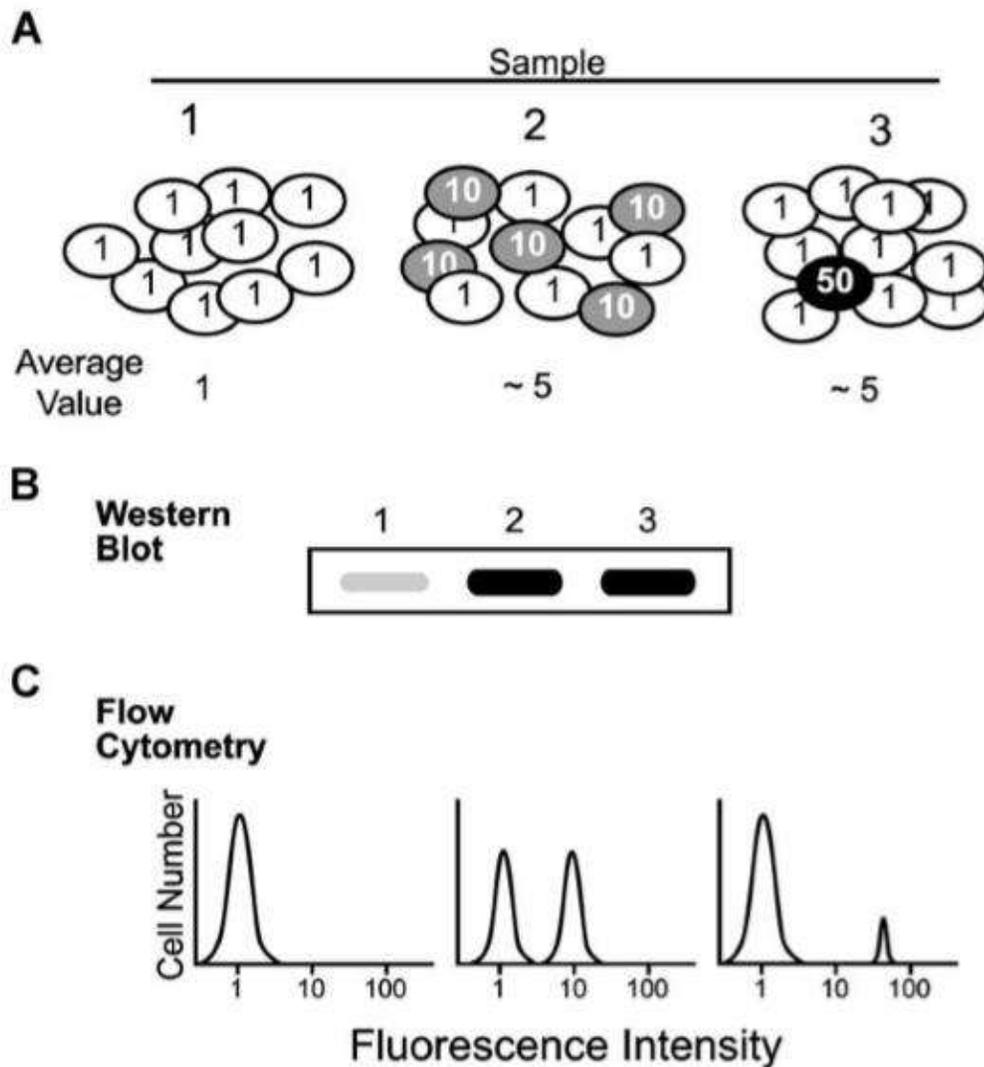


Figura 8. Las ventajas del análisis de células individuales. A) En este experimento hipotético, se obtienen tres muestras que contienen una proteína de interés (eIF3f) a las 1, 10, o 50 copias por célula como se indica. El número promedio de moléculas de proteína por célula es 1 para la muestra 1, y 5 para ambas muestras 2 y 3. B) Cuando estas poblaciones de células se analizaron por Western blot, las muestras 2 y 3 mostrarán bandas oscuras, pero aparecerá idéntico uno a otro. C) Cuando las muestras se tiñeron para la proteína eIF3f con anticuerpos marcados fluorescentemente y se analizaron por citometría de flujo, uno puede ver claramente que la muestra 2 contiene células en dos poblaciones distintas que están igualmente representados, mientras que en la muestra 3, sólo 1 de cada 10 células tiene un nivel elevado de proteína. (Krutzik et al., 2003)

Capítulo II Justificación

Antecedentes de eIF3f sugieren que desempeña un papel importante en la traducción y la proliferación celular. En células humanas A549 su expresión durante el ciclo celular es bifásica y una desregulación en su expresión induce muerte celular. No se conoce si esto es una característica general a células tumorales o incluso de especie, por lo cual, es importante definir si existen diferencias en su perfil de expresión con respecto a tipos celulares de origen embrionario distinto, entre células normales y tumorales, incluso entre especies mamíferas.

Capítulo III Hipótesis

La expresión de la proteína eIF3f es dependiente de la fase del ciclo celular, presentando un perfil de expresión bifásico en células de distinto origen embrionario.

Capítulo IV Objetivos

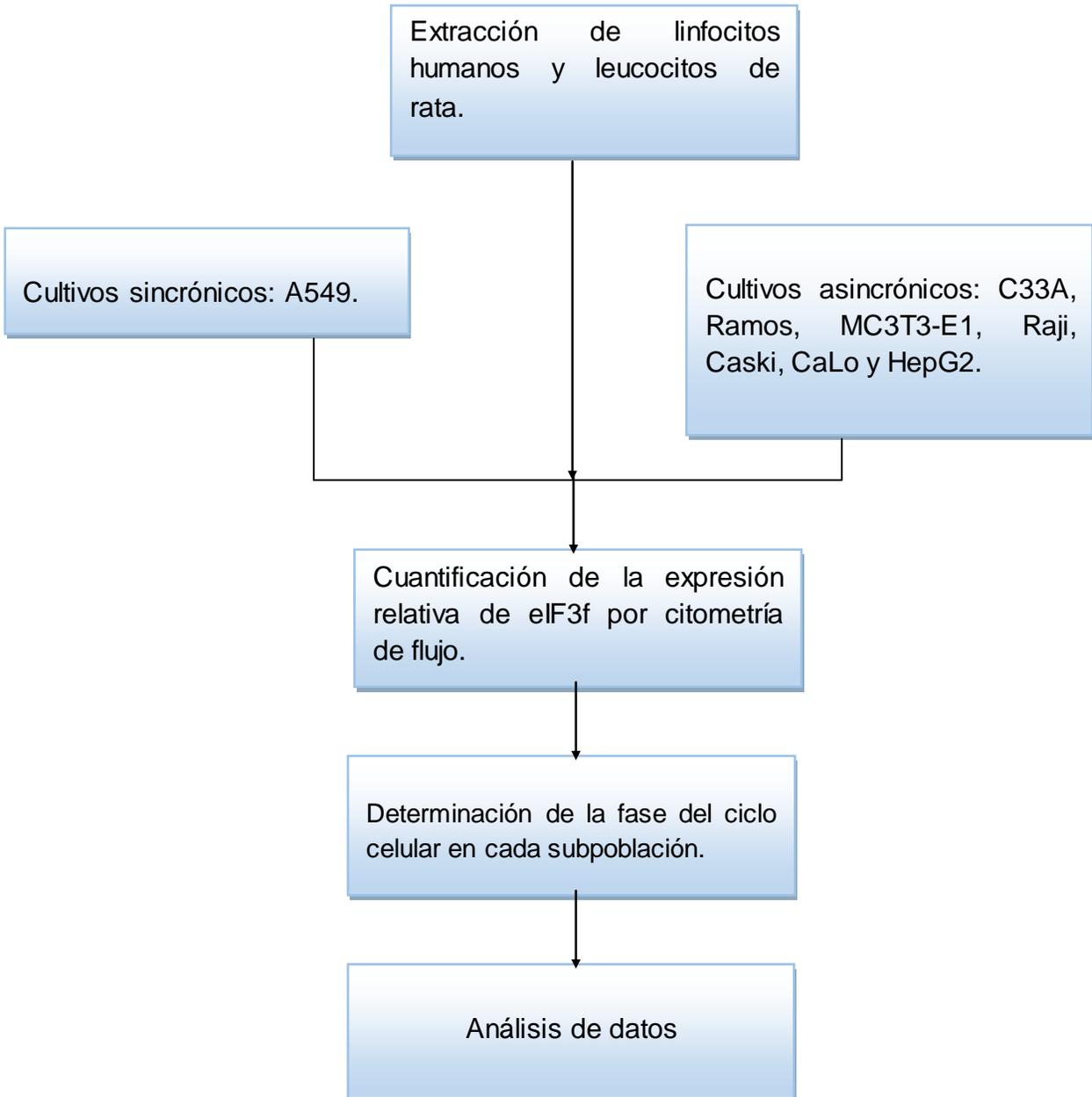
4.1 Objetivo general

Determinar por citometría de flujo el perfil de expresión de la proteína eIF3f durante las diferentes fases del ciclo celular para las líneas celulares A549, C33A, Ramos, MC3T3-E1, Raji, Caski, CaLo y HepG2, así como para linfocitos humanos y leucocitos aislados de rata.

4.2 Objetivos específicos

- Validar el método de citometría de flujo utilizando cultivos de la línea celular A549 enriquecidos en las fases G0/G1, S y G2/M del ciclo celular.
- Determinar el perfil de expresión de la proteína eIF3f en distintas fases del ciclo celular para las líneas celulares C33A, Ramos, MC3T3-E1, Raji, Caski, CaLo y HepG2, así como para linfocitos humanos y leucocitos aislados de rata.

Capítulo V Estrategia Experimental



Capítulo VI Materiales y métodos

6.1 Material biológico

6.1.1 Líneas celulares

Para determinar el nivel de expresión de la proteína eIF3f se emplearon líneas celulares como A549, C33A, MC3T3-E1, CaLo, HepG2, Caski, cuya morfología de crecimiento es adherente y cuentan con un nivel de bioseguridad 1. También se utilizaron las líneas celulares Ramos y Raji, ambas crecen en suspensión y cuentan con un nivel de bioseguridad 1. Todas las líneas celulares se obtuvieron del American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, Virginia, EUA). Por último, se utilizaron linfocitos humanos y leucocitos aislados de rata.

Tabla 3. Líneas y tipos celulares utilizados.

| Línea celular | Derivación |
|---------------|--------------------------|
| A549 | Adenocarcinoma pulmonar |
| C33A | Carcinoma de cérvix |
| MC3T3-E1 | Preosteoblastos murinos |
| CaLo | Carcinoma de cérvix |
| HepG2 | Carcinoma de hígado |
| Caski | Carcinoma cervicouterino |
| RAMOS | Linfoma de Burkitt |
| Raji | Linfoma de Burkitt |
| Tipo celular | Origen |
| Linfocitos | Humano |
| Leucocitos | Rata |

Las líneas celulares se propagaron en Medio Mínimo Esencial (MEM, por sus siglas en inglés) de marca Sigma, suplementado con NaHCO_3 18 mM (Sigma), 2 mM de L-glutamina (Sigma), Hepes 10 mM (Sigma), y suero fetal bovino (SFB) al 10% (Invitrogen). Los cultivos se mantienen con una atmósfera de CO_2 al 5% y a 37 °C, realizando recambio de medio de dos a tres veces por semana y manteniendo la concentración celular en la fase logarítmica de crecimiento. Para la criopreservación de las células (en nitrógeno líquido) se utiliza una mezcla del 80% del medio MEM suplementado con SFB al 10% y DMSO (Dimetil sulfóxido) al 10 %.

6.1.2 Aislamiento de linfocitos

Recoger la sangre humana en un tubo que contiene anticoagulante EDTA, después se diluye la sangre con un volumen igual de medio MEM. Se añaden 6 mL de sangre diluida a un tubo cónico de 15 mL, poco a poco se agrega Lympholyte®-H con una pipeta Pasteur permitiendo que el reactivo se coloque debajo de la sangre diluida. Continuar hasta que se han colocado 3 mL de Lympholyte®-H bajo la sangre diluida. Debido a que Lympholyte®-H es de mayor densidad, se forma una capa por encima del Lympholyte®-H, con una interfase distintiva a la suspensión celular. Se centrifuga a 800 g's por 20 minutos a temperatura ambiente. Después de centrifugar habrá una capa de linfocitos bien definida en la interfase; con una pipeta Pasteur se retiran las células y se transfieren a un nuevo tubo cónico. Se diluyen las células transferidas con medio para reducir la densidad de la solución. Se centrifuga a 800 g's durante 10 minutos para sedimentar los linfocitos, y a continuación se descarta el sobrenadante. Se lavan los linfocitos 2 a 3 veces con medio.

6.1.3 Aislamiento de leucocitos de rata

Se extrae la sangre en un tubo con EDTA como anticoagulante y se procede a realizar el aislamiento de leucocitos. Para la lisis de eritrocitos se utiliza un buffer de NH_4Cl (14 mL de buffer por cada mL de sangre total) y se incuba por 5 minutos

a 37 °C. Terminado el periodo de incubación se procede a centrifugar la muestra a 300 g's por 5 minutos a 30 °C; se aspira el sobrenadante y se resuspende el aglomerado en PBS 1X frío (2-8 °C); se centrifuga a 130 g's por 10 minutos a temperatura ambiente; después de la centrifugación se procede a resuspender las células en 3 mL de medio MEM/SFB10%.

6.2 Técnicas celulares

6.2.1 Mantenimiento y manejo de las líneas celulares

Para trabajar con las líneas celulares se utilizó una cabina de seguridad biológica Clase II A2 (ThermoForma™). Se realizaron diferentes técnicas indispensables para el mantenimiento y manejo de las células durante el desarrollo del proyecto.

6.2.2 Descongelado de células

Se descongela al criovial en termobañó a 37 °C y se transfieren las células a un frasco T-75 cm² ó T-25 cm² con 15 mL ó 5 mL, respectivamente, de medio MEM/SFB 10%, que se atempera previamente en incubadora a 37 °C y 5% de CO₂ por 10 minutos. Se devuelve el frasco a la incubadora con la tapa floja para oxigenar y que los gases circulen en su interior permitiendo así que el medio alcance las condiciones de pH 7.4. Cuando el cultivo llega a la población esperada, se resiembra.

6.2.3 Resiembra

Se descarta el medio viejo del cultivo y se hacen 2 lavados con 3 mL de PBS 1X frío por cada 25 cm². Para desprender las células se impregnan con 0.5 mL de una solución de tripsina-EDTA 1X (Gibco®) por cada 25 cm² y se incuba a 37 °C por 2-

5 minutos (esto únicamente para las líneas celulares adherentes, pues las líneas celulares en suspensión simplemente se diluyen con medio). Enseguida se resuspenden las células con 2 mL de medio MEM/SFB10%, se calcula la concentración y viabilidad celular para determinar el volumen a tomar de la cosecha y resembrar a una concentración inicial de 0.2×10^6 células para un frasco T-25cm² ó 0.6×10^6 células para un frasco T-75cm². El volumen determinado de resiembra se deja en el frasco y se descarta el resto, se agrega al frasco MEM, 5 mL en T-25 ó 15 mL en T-75. Se devuelve el frasco a la incubadora con la tapa floja.

6.2.4 Determinación de concentración celular y viabilidad

Cada muestra de cultivo adherente se lava 2 veces con una solución tampón de fosfatos (PBS) estéril con un pH de 7.4 a 1M. Las células se desprenden con tripsina, añadiendo 0.5 mL del regulador por cada 25 cm² de superficie de cultivo y posteriormente es incubando a 37 °C por un lapso de 3 min. Para inhibir la acción enzimática de la tripsina se añaden 3.5 mL de medio de cultivo suplementado con SFB al 10%. Las células resuspendidas se dividen en tres tubos y se realiza una dilución 1:1 con el azul de tripano, para realizar la determinación por triplicado. Para los cultivos en suspensión, se toma una muestra del cultivo y se realiza una dilución 1:1 con el azul de tripano; se divide en tres tubos para realizar la determinación por triplicado. Las células viables no permitirán el paso del colorante a través de la membrana celular, mientras que las células no viables se tiñen de azul. Se transfiere una pequeña cantidad de la mezcla a una cámara de Neubauer, dejando que la cámara se llene por capilaridad. La cámara de Neubauer se coloca en un microscopio óptico invertido (LEICA) a 40X y se cuentan las células vivas y muertas encontradas en el cuadro del centro y en los cuatro cuadrados de las esquinas de ambos lados de la cámara. La concentración celular se determina de la siguiente forma:

$$\text{No. Células} \cdot 10^6/\text{mL} = (\text{FC})(\text{FD})(\text{No. células en 10 cuadrantes})$$

Donde:

FC = Factor de conversión de la cámara = 0.001

FD = Factor de dilución

Y:

$$FD = \frac{\text{Volumen de muestra} + \text{Volmen de clorante}}{\text{Volmen de muestra}}$$

El porcentaje de viabilidad celular se calcula de la siguiente manera:

% de viabilidad = (No. de células viables / No. de células totales) * 100

6.3 Preparación de las muestras para la citometría de flujo

Se calcula la concentración celular del frasco T25 o T75 para determinar el volumen a tomar de la cosecha para obtener 500,000 células y se pasan a un tubo Eppendorf. Se centrifuga a 150 g's por 6 minutos, se retira el sobrenadante y se agrega 1 mL de solución de lavado (PBS1X/EDTA/SFB2%). Después se centrifuga a 150 g's por 6 minutos, se decanta el sobrenadante y se resuspende en 1 mL de solución de lavado (PBS1X/EDTA/SFB2%); nuevamente se centrifuga a 150 g's por 6 minutos y se retira el sobrenadante. Se agregan 500 µL de la solución fijadora (2% v/v formaldehído 0.2% v/v glutaraldehído, en 1X PBS) y se incuba por 15 minutos a 4 °C con agitación. Se centrifuga a 600 g's a 4 °C por 10 minutos, se decanta el sobrenadante y se lava con 1 mL de solución de lavado (PBS 1X, 2.5 µM EDTA, 5 mM EDTA, 2% SFB). Finalmente, se centrifuga y resuspende en 500 µL de solución de lavado. Se almacena a 4 °C hasta que se vaya a utilizar el citómetro.

6.4 Detección de eIF3f y fase del ciclo celular

Para la determinación de la expresión de eIF3f se centrifugan las muestras a 600 g's a 4 °C por 10 minutos y se resuspenden en 25 µL de solución de lavado, se le agrega el anticuerpo primario (eIF3f 1:50) y se deja incubar por 1h a 37 °C con agitación. Se centrifuga a 600 g's por 10 minutos y se lava con 1 mL de solución de lavado dos veces. Se centrifuga a 600 g's por 10 minutos y se resuspende en 25 µL de solución de lavado. Se añade el anticuerpo secundario (ratón anti conejo FITC 1:25) y se incuba en oscuridad 30 minutos a 37 °C con agitación. Se centrifuga a 600 g's por 10 minutos y se lava con 1 mL de solución de lavado, se lava por segunda ocasión en las mismas condiciones. Se resuspende en 500 µL de solución de lavado/ARNasa/solución de yoduro de propidio. Se homogeniza e incuba 15 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Posteriormente, se procede a leer en el citómetro de flujo.

6.5 Análisis estadístico

Los experimentos se repitieron al menos tres veces y cada muestra se determinó por triplicado para determinar promedios y desviaciones estándar. Para todos los datos colectados, se determinó el índice de dispersión de la media (CV_X , Coeficiente de variación de Pearson) y de la mediana (CV_{Me}) para la expresión de eIF3f en las distintas fases del ciclo celular, e independientemente del tipo celular, se consideró que valores de CV_X y CV_{Me} menores a 0.25 indican que la media y mediana, respectivamente, tienen alta representatividad y poca dispersión. Se compararon las distintas poblaciones celulares con respecto a las fases del ciclo celular utilizando la Prueba t de Student y Anova de una vía, cuando p resultó menor o igual a 0.05 se consideraron con diferencia significativa.

Capítulo VII Resultados

Con el programa ModFit LT 4.0 (Verity Software House, USA) se determinó el porcentaje de células en cada fase del ciclo celular (G0/G1, S y M) y para cada condición de cultivo: células acumuladas en la fase M (Fig. 9A), en la fase S (Fig. 9B) y en la fase G0 (Fig. 9C). Los datos fueron verificados con el propio “software” del equipo; con éste se generaron ventanas para analizar las distintas subpoblaciones (FL2-H) con respecto a la expresión de la proteína eIF3f, medida como la intensidad del fluorocromo FITC (FL1-A). La figura 10 ejemplifica cómo, al generar un gráfico FL2 contra FL1, se pueden seleccionar poblaciones celulares que son específicas a una fase del ciclo celular y que se agrupan de acuerdo a la concentración de la proteína de interés (medida a través de la intensidad de FITC), siempre que ésta presente una expresión diferencial con respecto a las distintas fases del ciclo celular. La tabla de la figura registra los promedios y medianas de la intensidad de FICT de las poblaciones seleccionadas y representan células en las fases G0/G1 (Plot 30), S (Plot 31) y G2/M (Plot 32), de los tres cultivos: enriquecidos en M (B01), S (C01) y G0 (D01).

Los resultados de tres experimentos independientes confirman que la expresión de la proteína eIF3f presenta un máximo de expresión en la transición G2/M del ciclo celular, una expresión importante durante la fase S y baja o nula expresión en la fase G1. Esto refuerza los resultados reportados anteriormente para la línea celular A549 (Higareda-Mendoza y Pardo-Galván, 2010).

Por otro lado, se utilizaron diferentes líneas celulares asincrónicas para determinar el porcentaje de células en cada fase del ciclo celular con el parámetro FL2-H y la intensidad de eIF3f (FL1-A) en cada subpoblación de cada línea celular. En la Tabla 4 se listan las líneas celulares utilizadas, así como un ejemplo representativo de los datos obtenidos para cada tipo celular. En general, obtuvimos que en la fase S y G2/M encontramos una mayor expresión de eIF3f.

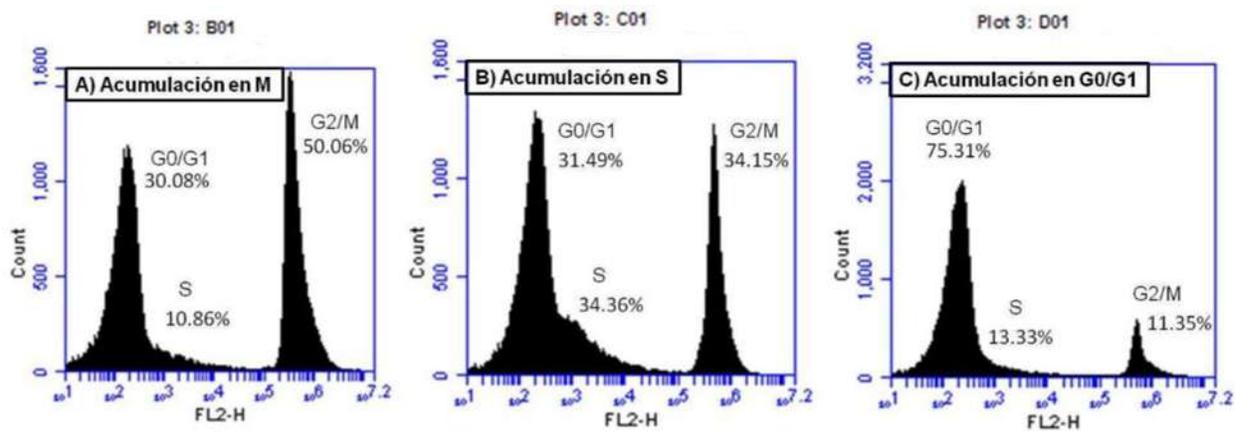


Figura 9. Distribución de células A549 en las fases G0/G1, S y G2/M del ciclo celular. Se observa el cambio de distribución dependiendo del enriquecimiento celular en las fases M (A), S (B) y G0 (C).

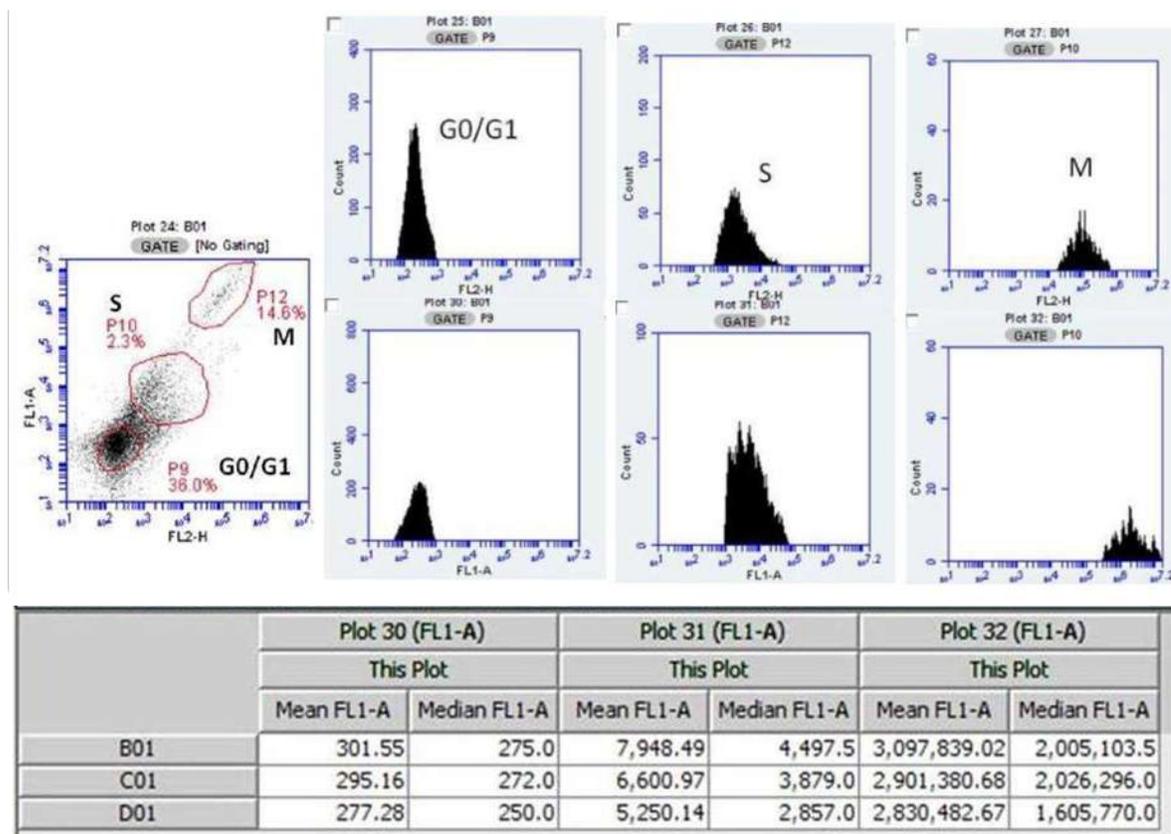


Figura 10. Análisis de la expresión de la proteína eIF3f (FL1-A) por subpoblaciones celulares específicas a una fase del ciclo celular.

Tabla 4. Análisis de la expresión de la proteína eIF3f (FL1-A) en líneas celulares asincrónicas.

| Muestra | G0/G1 | eIF3f (Intensidad relativa de FL1-A) | | S | eIF3f (Intensidad relativa de FL1-A) | | G2/M | eIF3f (Intensidad relativa de FL1-A) | |
|-----------------------|--------------|---|------------------------|--------------|---|------------------------|--------------|---|------------------------|
| | % Células | Media | Mediana | % Células | Media | Mediana | % Células | Media | Mediana |
| A549 | 90.9 | 542.3 | 423 | 5.5 | 9,415.3 | 5,007 | 3.6 | 1'990,532.1 | 1'551,065 |
| HepG2 | 84.0 | 615.7 | 455 | 8.4 | 10,099.0 | 6,101 | 7.6 | 1'878,283.5 | 1'328,293 |
| Ramos | 81.1 | 686.2 | 475 | 5.4 | 12,852.6 | 7,307 | 13.5 | 2'025,590.1 | 1'762,370 |
| Raji | 84.9 | 535.5 | 425 | 8.6 | 9,314.3 | 4,701 | 6.5 | 1'788,787.8 | 1'588,556 |
| CaLo | 70.5 | 374.1 | 315 | 10.7 | 15,037.3 | 7,960 | 18.8 | 2'093,637.0 | 1'692,135 |
| C33A | 78.9 | 493.9 | 389 | 12.6 | 11,828.7 | 6,844 | 8.5 | 2'201,812.5 | 2'314,869 |
| Caski | 79.2 | 634.3 | 482 | 9.1 | 12,905.9 | 7,023 | 11.4 | 2'220,776.5 | 1'411,933 |
| MC3T3-E1 | 85.6 | 652.6 | 469 | 2.7 | 12,368.2 | 6,084 | 11.8 | 2'140,594.3 | 1'644,455 |
| Linfocitos | 95.0 | 473.2 | 392 | 2.6 | 7,652.3 | 7,616 | 2.4 | 2'301,539.4 | 1'872,177 |
| Leucocitos de rata | 94.4 | 320.8 | 287 | 2.6 | 12,100.8 | 5,121 | 3.1 | 2'025,903.8 | 1'338,216 |
| Promedio | 86.3 | 532.3 | 407.5 | 5.7 | 11,161.6 | 6,658.3 | 7.9 | 2'051,326.5 | 1'674,871.2 |
| ± D.E. | ±2.9 | ±12.3 | ±12.1 | ±1.5 | ±506.1 | ±1,132.4 | ±1.5 | ±129,225.9 | ±151,845.1 |
| | | CV_x | CV_{Me} | | CV_x | CV_{Me} | | CV_x | CV_{Me} |
| | | 0.022 | 0.021 | | 0.044 | 0.116 | | 0.063 | 0.061 |

(D.E., Desviación estándar; CV_x, Coeficiente de variación de Pearson; CV_{Me}, Índice de dispersión de la mediana)

En la última fila de la tabla se representa el promedio y la desviación estándar (D.E.) resultante de un análisis que incluye todas las muestras y poblaciones celulares que pertenecen a una fase específica del ciclo celular. El coeficiente de variación de Pearson, así como el índice de dispersión de la mediana, resultaron menores a 0.25 para la expresión de eIF3f en las distintas fases del ciclo celular, indicando que la media y mediana son altamente representativas y poco dispersas. Asimismo, al comparar los promedios relativos de la concentración de eIF3f para el conjunto de poblaciones celulares y con respecto a las distintas fases del ciclo celular, se encontró una *p* menor a 0.00001, concluyendo que la diferencia en la expresión de eIF3f en la fase S y G2/M es significativa entre sí mismas, así como con respecto a G0/G1. Por lo anterior, se confirma que en líneas celulares mamíferas, tumorales y no tumorales, la expresión de eIF3f es mayor en la fase G2/M, moderada en la fase S y baja en la fase G0/G1.

Capítulo VIII Discusión

Esta investigación tuvo como objetivo determinar por citometría de flujo el perfil de expresión de la proteína eIF3f en cultivos celulares de eucariotas superiores. Para poder sustentar nuestra hipótesis se utilizaron las líneas celulares A549, C33A, Ramos, MC3T3-E1, Raji, Caski, CaLo y HepG2, así como linfocitos humanos y leucocitos aislados de rata. Encontramos que la expresión de eIF3f en todas las líneas y tipos celulares oscila durante el ciclo celular, mostrando un máximo durante la fase S y otro durante la fase G2/M, tal cual se observó en la línea A549 reportada por Higareda-Mendoza y PardoGalván (2010). Cabe mencionar que los experimentos realizados por Higareda-Mendoza y Pardo-Galván (2010) se realizaron por Western blot, limitándose a muestras homogéneas, ya que acudieron a la sincronización de células en cada fase del ciclo celular arrojando resultados promedio de cada cultivo. Sin embargo, al realizar los experimentos por citometría de flujo, nos permitió analizar tipos celulares heterogéneos asincrónicos en una muestra de una manera más fina y los datos arrojados fueron de cada célula individual; lo que nos permitió conocer la fase del ciclo celular en la que se encontraba la célula y la cantidad relativa de proteína eIF3f que contenía.

Hasta el momento, no hemos encontrado reportes en la literatura que indiquen una expresión transcripcional bifásica durante el ciclo celular. Sin embargo, existe un reporte de otra proteína que presenta un perfil de expresión bifásico, pero a nivel traduccional. Pyronnet y colaboradores (2000) reportaron que la expresión de la proteína ornitina decarboxilasa es bifásica en células HeLa, presentando máximos en G1/S y G2/M. En este caso, el mRNA de la ornitina decarboxilasa presenta un sólo máximo de expresión en G1/S, por lo que el máximo de expresión de la proteína observado en G2/M se da a nivel traduccional; así, la regulación de la expresión de la ornitina decarboxilasa se da a nivel transcripcional en la fase S y traduccional en la fase G2/M. El perfil de expresión transcripcional bifásico de eIF3f concuerda a nivel transcripcional y traduccional, sugiriendo que la regulación de la expresión de eIF3f se da principalmente a nivel transcripcional. Por supuesto, son

muchas las interrogantes con respecto a este perfil de expresión, y a su relación con la función o funciones de eIF3f.

Ante todo, es preciso considerar que la expresión transcripcional de eIF3f en plantas y en hongos es monofásica y está circunscrita a la fase G2/M; desde el punto de vista evolutivo, la expresión durante la fase G1/S en humano fue adquirido posteriormente por el reino Animalia. Ahora bien, si se considera que la expresión de eIF3f es bifásica en el ciclo celular, se generan interrogantes acerca de su función o funciones, ya que los circuitos morfogénéticos y bioquímicos son muy distintos en la fase S, en comparación a la fase M.

Existe evidencia que indica que eIF3f no se relaciona exclusivamente con eIF3, sino que se relaciona físicamente con proteínas ajenas a este factor traduccional, por lo que sería interesante conocer con cuáles (además de los ya descritos), y a través de este conocimiento, saber en qué otras vías metabólicas o genéticas se encuentra involucrado. Nuestro grupo de trabajo ha realizado diversas investigaciones sobre dónde pudiera estar involucrado eIF3f en los puntos máximos de expresión durante el ciclo (G1/S y G2/M). Fue interesante conocer que eIF3f es fosforilada en la serina 258 por el complejo CDK1/Ciclina B y este complejo actúa en la fase G2/M, por lo que se sugiere que puede estar regulando esta transición tan importante; de esta manera se explicaría el pico G2/M (Gómez-Correa, 2013).

Recientemente se descubrió que existe una interacción entre eIF3f y el receptor adrenérgico $\alpha 1B$ y que este complejo modula la degradación de p27, ya que éste bloquea la actividad de la ciclina E/cdk2 y la ciclina A/cdk2 en células detenidas en la fase G1 del ciclo celular. Por lo tanto, se sugiere que eIF3f y el receptor adrenérgico $\alpha 1B$ tienen actividad en la fase G1/S, explicando así el segundo pico de expresión (Jiménez-Alcántar, 2014).

Fue interesante determinar el perfil de expresión de eIF3f en otras especies, encontrando que el perfil de expresión bifásico durante el ciclo celular es una característica general a mamíferos. Con frecuencia, los genes relacionados al ciclo celular son importantes para la viabilidad de la célula, dado que la división celular

es un proceso que requiere de la adecuada regulación del ciclo celular mediante la expresión y activación de proteínas específicas en tiempo, concentración y espacio. La desregulación del ciclo celular o de la expresión proteica adecuada en tiempo-concentración-espacio puede conllevar a patologías como el cáncer, que es, en última instancia, un grupo de células que son incapaces de detener su ciclo de división. Una circunstancia que ha limitado el uso de terapia génica por silenciamiento de genes importantes para el ciclo celular, es que con frecuencia existen varias copias del mismo gen en el genoma, por lo que su concentración supera la capacidad silenciadora del antisentido o bien, otras proteínas similares sustituyen la función del gen silenciado, como sucede con las Cdks (Morris et al., 2005). eIF3f es un monogen y su función no es sustituida por otro gen. Aunque existe una secuencia similar en el cromosoma 2, Higareda-Mendoza y Pardo-Galván (2010) demostraron que se trata de un retropseudogen (inactivo). Así también se demostró que el silenciamiento de eIF3f por antisentido o por siARN genera muerte celular, por lo que no hay sustitución funcional. Merece atención especial la velocidad con que el silenciamiento de eIF3f genera apoptosis, que es de 24 a 48 horas posteriores al tratamiento, esto es, de uno a dos ciclos celulares. Esto significa que, en teoría, un tratamiento de terapia génica usando a eIF3f como blanco a silenciar eliminaría al cáncer en un corto periodo de tiempo.

Capítulo IX Conclusión

La expresión de eIF3f es bifásica, circunscrita a las fases S y G2/M. Dicho perfil está presente en líneas celulares tumorales y no tumorales, lo cual nos sugiere que pudiera ser una característica general en mamíferos. En estado quiescente y en la fase G1 del ciclo celular, los niveles de expresión de eIF3f están disminuidos en comparación con las fases G2/M y S, lo cual nos sugiere su esencialidad en el control del ciclo celular.

Capítulo X Referencias

1. Akiyoshi Y, Clayton J, Phan L, Yamamoto M, Hinnebusch AG, Watanabe Y, Asano K. (2001) Fission yeast homolog of murine Int-6 protein, encoded by mouse mammary tumor virus integration site, is associated with the conserved core subunits of eukaryotic translation initiation factor 3. *The Journal of Biological Chemistry*, 276: 10056-10062.
2. Alberts B, Bray D, Hopkin K, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. (2011) *Introducción a la Biología Celular*. 3ª Edición. Editorial Médica Panamericana, México. 609-650 pp.
3. Asano K, Vornlocher HP, Richter-Cook NJ, Merrick WC, Hinnebusch AG, Hershey JW. (1997) Structures of cDNAs encoding human eukaryotic initiation factor 3 subunits. *The Journal of Biological Chemistry*, 272: 27042-27052.
4. Biosciences BD. (2000) *Introduction to Flow Cytometry: A learning guide*. Becton, Dickinson and Company, San Jose, CA, United States of America. Manual Part Number: 11-11032-01.
5. Browning KS, Gallie DR, Hershey JW, Hinnebusch AG, Maitra U, Merrick WC, Norbury C. (2001) Unified nomenclature for the subunits of eukaryotic initiation factor 3. *Trends in Biochemical Sciences*, 26: 284.
6. Burks EA, Bezerra PP, Le H, Gallie DR, Browning KS. (2001) Plant initiation factor 3 subunit composition resembles mammalian initiation factor 3 and has a novel subunit. *Journal of Biological Chemistry*, 276: 2122-2131.
7. Cano-De la Vega RA, Gómez-Tello H, Espinosa-Padilla SE, González-Serrano ME. (2014) Expresión de WASp por citometría de flujo para el diagnóstico de Wiskott-Aldrich: un método sencillo y rápido actualmente disponible en México. *Alergia, Asma e Inmunología Pediátricas*, 23: 57-63.
8. Castillo JL, Kawaguchi F, Madariaga J, Venegas O, Lecannelier E, Ocampo S, Castillo M. (1999) Aspectos que afectan el análisis de contenido de ADN por citometría de flujo. *Revista Médica de Chile*, 127: 1385-1397.
9. Cooper GM, Hausman RE. (2007) *Cooper's La Célula*. 3ª Edición. Editorial Marban, Madrid, España. 281-319, 591-629 pp.
10. Dong Z, Zhang JT. (2006) Initiation factor eIF3 and regulation of mRNA translation, cell growth, and cancer. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 59: 169-180.

11. Fan H, Penman S. (1970) Regulation of protein synthesis in mammalian cells. II. Inhibition of protein synthesis at the level of initiation during mitosis. *Journal of Molecular Biology*, 50: 655-670.
12. Farías-Escalera A, Beltrán-Peña E, Pardo-Galván MA. (2005) Control genético del ciclo celular. *Ciencia Nicolaita*, 42: 37-56.
13. Gómez-Correa CA. (2013) Análisis de fosforilación en eIF3f humano por CDK1/Ciclina B. Tesis de Maestría en Ciencias de la Salud. Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas "Dr. Ignacio Chávez", Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Michoacán, México. 54 pp.
14. Gutiérrez-Escolano AL. (2006) Inicio de la traducción dependiente de IRES: un mecanismo alternativo para la síntesis de proteínas. *Revista de Educación Bioquímica*, 25: 12-19.
15. Gutiérrez-Fernández MJ, Higareda-Mendoza AE, Gómez-Correa CA, Pardo-Galván MA. (2015) The eukaryotic translation initiation factor 3f (eIF3f) interacts physically with the alpha 1B-adrenergic receptor and stimulates adrenoceptor activity. *BMC Biochemistry*, 16: 25.
16. Hall MN, Raff M, Thomas G. (2004) Cell growth: control of cell size. Cold Spring Harbor Monograph Series 52. CSHL Press, China. 652 pp.
17. Harbour JW, Dean DC. (2000) Rb function in cell-cycle regulation and apoptosis. *Nature Cell Biology*, 2: E65-E67.
18. Harris TE, Chi A, Shabanowitz J, Hunt DF, Rhoads RE, Lawrence JC Jr. (2006) mTOR-dependent stimulation of the association of eIF4G and eIF3 by insulin. *The EMBO Journal*, 25: 1659-1668.
19. Higareda-Mendoza AE, Pardo-Galván MA. (2010) Expression of human eukaryotic initiation factor 3f oscillates with cell cycle in A549 cells and is essential for cell viability. *Cell Division*, 5:10.
20. Higareda-Mendoza AE, Farias A, Llanderal J, Méndez A, Pardo-Galván MA. (2003) A cell cycle and protein synthesis-related factor required for G2/M transition. *Miami Nature Biotechnology Short Reports*, 14: 111.
21. Holz MK, Ballif BA, Gygi SP, Blenis J. (2005) mTOR and S6K1 mediate assembly of the translation preinitiation complex through dynamic protein interchange and ordered phosphorylation events. *Cell*, 123: 569-580.

22. Jackson JR, Hellen CU y Pestova TV. 2010. The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 11: 113-127.
23. Jahan-Tigh RR, Ryan C, Obermoser G, Schwarzenberger K. (2012) Flow cytometry. *Journal of Investigative Dermatology*, 132: e1-e6.
24. Jiménez-Alcántar P. (2014) Identificación de la vía de transducción de señales modulada por la interacción eIF3f/Receptor adrenérgico- α 1B en células humanas. Tesis de Maestría en Ciencias de la Salud. Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas "Dr. Ignacio Chávez", Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Michoacán, México. 86 pp.
25. Juárez-Velázquez R, Pérez-Vera P. (2014) Citometría de flujo en la evaluación de enfermedad mínima residual en leucemia linfoblástica aguda. *Acta Pediátrica de México*, 33: 198-206.
26. Karp G. (2010) *Cell and Molecular Biology: Concepts and Experiments*. 6ª Edición. Editorial John Wiley & Sons, Inc., New York, EUA. 560-604 pp.
27. Krutzik PO, Irish JM, Nolan GP, Perez OD. (2004) Analysis of protein phosphorylation and cellular signaling events by flow cytometry: techniques and clinical applications. *Clinical Immunology*, 110: 206-221.
28. Lagirand-Cantaloube J, Offner N, Csibi A, Leibovitch MP, Batonnet-Pichon S, Tintignac LA, Segura CT, Leibovitch SA. (2008) The initiation factor eIF3-f is a major target for Atrogin1/MAFbx function in skeletal muscle atrophy. *The EMBO Journal*, 27: 1266-1276.
29. Lee JP, Brauweiler A, Rudolph M, Hooper JE, Drabkin HA, Gemmill RM. (2010) The TRC8 Ubiquitin Ligase Is Sterol Regulated and Interacts with Lipid and Protein Biosynthetic Pathways. *Molecular Cancer Research*, 8: 93-106.
30. Lewin B. (2007). *Genes IX*. 9ª Edición. Editorial Jones and Bartlett Publishers, Boston, MA, EUA. 912 pp.
31. Lodish H, Berk A, Matsudaira P, Kaiser CA, Krieger M, Scott MP, Zipursky SL, Darnell J. (2005) *Biología Celular y Molecular*. 5ª Edición. Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires, Argentina. 854-881 pp.
32. Luque J, Herráez A. (2002) *Biología Molecular e Ingeniería Genética*. 1ª Edición. Editorial Elsevier Science, Madrid, España. 307-311, 411-417 pp.

33. Marchione R, Leibovitch SA, Lenormand JL. (2013) The translational factor eIF3f: the ambivalent eIF3 subunit. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 70: 3603-3616.
34. Masutani M, Sonenberg N, Yokoyama S, Imataka H. (2007) Reconstitution reveals the functional core of mammalian eIF3. *The EMBO Journal*, 26: 3373-3383.
35. Morris C, Jalinot P. (2005) Silencing of human Int-6 impairs mitosis progression and inhibits cyclin B-Cdk1 activation. *Oncogene*, 24: 1203-1211.
36. Park HS, Himmelbach A, Browning KS, Hohn T, Ryabova LA. (2001) A plant viral "reinitiation" factor interacts with the host translational machinery. *Cell*, 106: 723-733.
37. Pestova TV, Kolupaeva VG. (2002) The roles of individual eukaryotic translation initiation factors in ribosomal scanning and initiation codon selection. *Genes & Development*, 16: 2906-2922.
38. Pyronnet S, Pradayrol L, Sonenberg N. (2000) A cell cycle-dependent internal ribosome entry site. *Molecular Cell*, 5: 607-616.
39. Rahman M. (2009) Introduction to Flow Cytometry. AbD Serotec, Oxford, United Kingdom. 7 pp.
40. Sherr CJ, Roberts JM. (1999) CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes & Development*, 13: 1501-1512.
41. Shi J, Kahle A, Hershey JW, Honchak BM, Warneke JA, Leong SP, Nelson MA. (2006) Decreased expression of eukaryotic initiation factor 3f deregulates translation and apoptosis in tumor cells. *Oncogene* 25: 4923-4936.
42. Ubersax JA, Woodbury EL, Quang PN, Paraz M, Blethrow JD, Shah K, Shokat KM, Morgan DO. (2003) Targets of the cyclin-dependent kinase Cdk1. *Nature*, 425: 859-864.
43. Valente ST, Gilmartin GM, Mott C, Falkard B, Goff SP. (2009). Inhibition of HIV-1 replication by eIF3f. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 106: 4071-4078.
44. www.mun.ca/biology/desmid/brian/BIOL2060/BIOL2060-19/19_41.jpg