



Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo
Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas
"Dr. Ignacio Chávez"
División de Estudios de Posgrado

**PERFIL DE EXPRESIÓN DEL GEN eIF3f EN LAS LÍNEAS CELULARES
HUMANAS HepG2 y Ramos**

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS DE LA SALUD

PRESENTA:

Cirujano Dentista María Guadalupe Carreón Garcidueñas

DIRECTORA DE TESIS:

D. en C.B. ANA EDITH HIGAREDA MENDOZA

Comité Tutorial:

M. en C. Juan Carlos Cortés García

D. en C. Soledad Vázquez Garcidueñas

D. en C. Virginia Angélica Robinson Fuentes

D. en C. Marco Aurelio Pardo Galván

Morelia, Michoacán, Junio del 2012.

1. CONTENIDO

RESUMEN	1
1. INTRODUCCIÓN	2
1.1 Ciclo celular	3
1.1.1 Fases del ciclo celular	4
1.2 Control del ciclo celular	6
1.3 Diferenciación celular.....	10
1.4 Regulación de la expresión génica en eucariotes	12
1.5 Síntesis de proteínas en eucariontes	14
1.6 Factor eucariótico de iniciación de la traducción 3.....	16
1.6.1 eIF3f.....	17
2. JUSTIFICACIÓN.....	21
3. HIPOTESIS	22
4. OBJETIVOS	22
4.1 Objetivo General	22
4.2. Objetivos específicos.....	22
5. MATERIAL Y MÉTODOS.....	23
5.1 Material Biológico	23
5.1.1 TÉCNICAS CELULARES.....	23
5.1.2 Mantenimiento y manejo de las líneas celulares HepG2 y Ramos.	23
5.1.3 Descongelado de células	24
5.1.4 Propagación.....	24
5.1.5 Resiembra.....	24

5.1.6 Determinación de concentración celular y viabilidad.....	25
5.1.7. Ecuación de Monod.....	26
5.2 Sincronización de cultivos	26
5.3 Determinación de proteína por el método de Bradford	27
5.4 Ensayo Western Blot	28
5.5 Análisis estadístico	30
6. Resultados y Discusión	31
7. CONCLUSIONES	44
8. BIBLIOGRAFÍA	45

ESTE TRABAJO FUE REALIZADO EN EL LABORATORIO DE BIOLOGÍA CELULAR HUMANA EN LA DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS Y BIOLÓGICAS “DR. IGNACIO CHÁVEZ” DE LA UMSNH BAJO LA ASESORÍA DE LA D. EN C. ANA EDITH HIGAREDA MENDOZA.

*Con todo mi amor para la bendición más grande que Dios me pudo haber dado,
mi hijo Gabriel.*

AGRADECIMIENTOS

A Dios por darme la vida y todas las bendiciones que me envía mediante las valiosas personas que han formado parte de mi vida.

A mis padres Guillermo e Irma por haberme dado el ejemplo que ha normado mis actos así como por el amor y apoyo incondicional que me han brindado a lo largo de mi vida.

A mis hermanos Memo, Moy y Lulú por el amor y apoyo que siempre me ha motivado a seguir adelante.

A mi compañero de vida, mi esposo Luis, gracias por tu apoyo incondicional, por la paciencia, pero sobre todo por todo el amor que me das día a día....y por supuesto a mi hijo Gabriel mi principal motivo para seguir adelante, los amo.

A mis asesores la D. en C. Ana Edith Higareda Mendoza y el D. en C. Marco Aurelio Pardo Galván por haberme transmitido sus invaluable conocimientos por su paciencia, además del apoyo y tiempo que me dedicaron en el desarrollo de este trabajo.

A mis sinodales el M. en C. Juan Carlos Cortes García, la D. en C. Soledad Vázquez Garcidueñas, y la D. en C. Virginia Robinson Fuentes por sus valiosas observaciones las cuales me ayudaron a perfeccionar este trabajo.

A mis compañeros de laboratorio: César, Dulce, Luz, Sandra, César Adrian, Mely, Mario, Julio, por los buenos recuerdos, pero de manera muy especial a Kary y a Cris, no encuentro las palabras que mejor puedan describir todos los sentimientos que me llevo impresos en mi cabeza y en mi corazón producto de todos los momentos, enseñanzas vividas pero sobre todo por la amistad que me brindaron, muchas gracias.

Finalmente quiero agradecer al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CONACYT por el apoyo económico que me proporcionó durante la realización de este trabajo

RESUMEN

El desarrollo de organismos multicelulares se sustenta en la compartimentalización de funciones a través de la expresión diferencial de genes en tipos celulares definidos, que generan los diversos fenotipos celulares de cada tejido. Esta expresión depende de señales externas e internas a la célula que conforman una red reguladora que genera el perfil específico de expresión génica de cada tipo celular. A nivel traduccional, la fase de iniciación es el principal punto de control de la síntesis de proteínas, donde participan varios factores de iniciación (eIF en eucariontes). El factor de iniciación 3 (eIF3) es el factor de mayor complejidad, que en humanos consta de hasta 13 subunidades. Una de ellas, la subunidad f, se le ha adscrito una función moduladora del proceso. En células A549 el nivel de expresión del gen eIF3f está abatido en estado quiescente, comparado con células en proliferación, donde la expresión del gen eIF3f presenta dos máximos durante las fases S temprana y M del ciclo celular (perfil de expresión bifásico). Nos interesó conocer si el perfil de expresión de eIF3f en A549 era específico a esta línea celular o si su expresión es una característica de células humanas. Se determinó el perfil de expresión del gen eIF3f por experimentos tipo Western blot en las líneas celulares humanas HepG2 y Ramos en cultivos sincronizados en las diferentes fases del ciclo celular. Anterior a esto se realizó una cinética de crecimiento para establecer las condiciones óptimas. Se realizaron cinéticas de crecimiento para establecer las condiciones óptimas de resiembra y sincronización en medio de cultivo MEM 10 % SFB. Resultados: La línea celular HepG2 y Ramos presentaron características morfológicas que la distinguen de la línea A549 en cuanto a que la línea HepG2 crece en islotes que se van agrupando al alcanzar una confluencia superior al 90% y la línea Ramos no presenta una morfología epitelial sino en suspensión. El tiempo de duplicación es más prolongado (37 horas) en HepG2, comparado con A549 (24 horas) mientras que la Ramos fue de (30 horas). La sincronía de ambas líneas celulares fue mayor utilizando afidicolina 1 ug/mL. Al realizar los experimentos tipo WB de ambas líneas celulares obtuvimos un perfil bifásico muy semejante al de A549.

1. INTRODUCCIÓN

Se admite hoy en día que prácticamente todas las enfermedades tienen una causa molecular. Cualquier patología, se relaciona en mayor o menor medida con alteraciones en la estructura, propiedades, metabolismo o función de las moléculas. Entre las causas que inducen la enfermedad se encuentran agentes físicos, ambientales y biológicos como virus, bacterias, parásitos, y trastornos genéticos, hormonales, inmunológicos, nutricionales, etc. Todos ellos se traducen en disfunciones celulares, temporales o permanentes, variaciones en la función de órganos y sistemas y se reflejan, en último término, en forma de enfermedad. Incluso aquellos debidos a cambios externos, que obviamente son consideradas de causa no molecular, se convierten una vez iniciados en enfermedades celulares. El que se relacionen distintas patologías con alteraciones genéticas, especialmente aquellas que tienen un papel clave en el control del ciclo celular, ha permitido comprender la trascendencia que tiene conocer los mecanismos de funcionamiento de este control.

Asimismo, el conocer los elementos que regulan los procesos involucrados en la división celular nos permite entender y, en su caso, solucionar patologías relacionadas a problemas de división celular como el cáncer.

Recientemente existen reportes en la literatura donde se estudian a las subunidades de eIF3 en relación al ciclo celular. Higareda-Mendoza y Pardo Galván (2010) reportan que en células A549 el nivel de expresión del gen eIF3f está abatido en estado quiescente, comparado con células en proliferación, y que la expresión del gen eIF3f presenta dos máximos durante las fases S temprana y M del ciclo celular (perfil de expresión bifásico). Asimismo Dong et al. (2009) reportaron que la expresión de la subunidad a del factor multiproteico eIF3 (eIF3a) está relacionada al ciclo celular, mientras que la expresión de las subunidades b (eIF3b) y d (eIF3d) no lo están. Ellos reportan que la expresión de eIF3a decrece en fibroblastos de ratón (NIH3T3) durante el estado quiescente, de manera similar a lo que se observó con eIF3f en células A549 quiescentes; en cambio, la expresión de eIF3b y eIF3d es similar tanto en estado

proliferativo como en el estado quiescente. Esto nos sugiere que diferentes subunidades de eIF3 están implicadas en distintos procesos celulares.

1.1 Ciclo celular

Todos los seres vivos se componen de células y estas se clasifican dentro de dos categorías: las células procariotas, que son carentes de núcleo (dentro de los no nucleados están las arqueas, pero se consideran como un dominio aparte de las bacterias); y las células eucariotas que son organismos nucleados. Cada célula se origina a partir de la división celular de una célula preexistente, y al proceso mediante el cual la célula se origina, crece y se divide es llamado ciclo celular (Margulis y col., 2000). Para que el ciclo celular se presente se necesita de la activación de una compleja cascada de traducción de señales intracelulares, cuyos efectos se verifican en la proliferación celular de modo cíclico a través de una serie de pasos relativamente bien caracterizados.

El periodo entre dos divisiones mitóticas define el ciclo celular somático, y el tiempo transcurrido desde el fin de una mitosis y el inicio de la siguiente es llamado interfase. El periodo de división, correspondiente a la mitosis visible, es llamado fase M (Lewin, 2000). Estos dos periodos a su vez se dividen de la siguiente manera:

Interfase, que consta de:

- Fase S (Síntesis): En esta etapa la célula duplica su material genético para proporcionar una copia idéntica del genoma a cada una de las células hijas resultantes al final del ciclo.
- Fase G1 y G2 (Gap = intervalo): Entre la fase S y M de cada ciclo hay dos fases denominadas intervalo en las cuales la célula es altamente activa en su biosíntesis, lo cual le permite incrementar su tamaño aumentando el número de proteínas y organelos y proveer de material necesario para la siguiente fase.

Fase M. Mitosis: En esta fase se reparte a las células hijas el material genético duplicado, a través de la segregación de los cromosomas. Para su estudio se divide en:

- Profase
- Metafase
- Anafase
- Telofase

1.1.1 Fases del ciclo celular

La proliferación de células eucariotas requiere periodos discretos de síntesis de ADN (fase S) y división mitótica (fase M) con un periodo postsintético, premitótico llamado G2 y un periodo posmitótico, presintético llamado G1 (Stein y col., 2002) (Fig. 1).

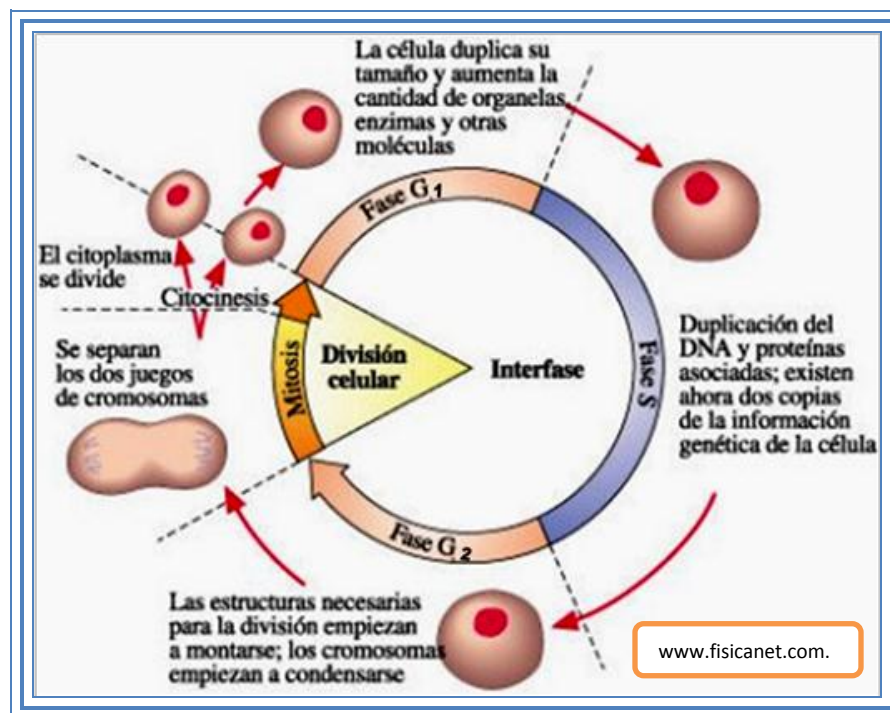


Figura1. Ciclo celular

Fase G₁. Las células son llevadas de mitosis a esta fase, durante la cual ARNs y proteínas son sintetizados, produciendo la masa necesaria para sostener la bipartición celular; de esta fase pasa a la fase S. (Lewin, 2000). En G₁ tardía se presenta el Primer Punto de Control llamado “Punto de Restricción” en mamíferos y “START” en levadura.

La decisión para entrar al ciclo celular en eucariotes es tomada durante G1, un tiempo en el que las células están listas para transducir señales de factores de crecimiento que en última instancia interactúan con la maquinaria básica de división celular compuesta de cinasas dependientes de ciclinas (Cdks) (Ye y col., 2003). Las células entran a G1 a través de dos caminos: estando en la fase G0 son estimuladas por factores de crecimiento extracelulares; o por la entrada directa al término de la división previa. También es en esta fase donde la célula se diferencia. (Lodish, 2005).

Fase S. La replicación del ADN eucariótico está restringido a la fase S del ciclo celular. El aparato de replicación comienza a sintetizar la molécula ADN, copiando el ADN pre-existente y dejando a la célula con una copia de cada cromosoma. Además en esta fase se activan genes para sintetizar proteínas requeridas en el empaquetamiento del ADN. En células de vertebrados, la transición desde G1 a fase S es controlada por la actividad de las cinasas dependientes de ciclina E y ciclina A (Bashir y col, 2000, Lodish, 2005).

Fase G2. Se caracteriza por la síntesis de proteínas necesarias para la progresión a mitosis, entre las cuales destaca la tubulina que dará lugar a los microtúbulos que constituirán el huso mitótico. Durante esta fase también ocurre la replicación de los centriolos, mitocondrias y otros orgánulos, así como la síntesis de factores reguladores y modificaciones estructurales de la cromatina que facilitan la condensación de los cromosomas (Farías y col., 2005). En la etapa tardía de esta fase, durante la transición G2/M, se encuentra el punto de control, donde la célula evalúa que se hayan realizado exitosamente las fases anteriores (Lewin, 2000).

Fase M. Los materiales duplicados se reparten en proporciones iguales entre las dos células hijas. El complejo MPF (Factor Promotor de la Mitosis: Cdk1/cycB) es activado en esta fase, mediando la condensación cromosomal, el rompimiento de la envoltura nuclear y promueve la formación de los microtúbulos para la formación del

huso mitótico (Stein y col., 2002). Durante la mitosis, se observan cuatro etapas: profase, metafase, anafase y telofase (Farías y col., 2005). Es entre estas etapas que se localiza el tercer y cuarto punto de Control del ciclo celular. Las etapas que la definen son (Nigg, 2001):

- Profase. La membrana nuclear desaparece, la cromatina se condensa en cromosomas bien definidos y comienza el ensamble del huso mitótico.
- Metafase. A través de ésta los cromosomas toman una posición central en el plano ecuatorial, indicando que están bajo tensión debido a un equilibrio de fuerzas.
- Anafase. Ésta es marcada por la simultánea separación de todas la cromátidas hermanas por pérdida de cohesión entre ellas.
- Telofase. A la llegada de los cromosomas a los polos, la envoltura nuclear se restablece alrededor de los dos nuevos grupos de cromosomas.

La **Citocinesis**, puede ser considerada una etapa más que completa la división celular. En células animales la división citoplasmática resulta de la contracción de un anillo de actino-miosina, mientras que en plantas esto involucra la construcción de una nueva pared celular en el centro de la célula. Ésta comienza durante la anafase de mitosis y su terminación marca el fin de la fase M (Nigg, 2001).

1.2 Control del ciclo celular

En un organismo multicelular, los diferentes tipos de células que se dividen, lo hacen en forma regulada. Cada periodo del ciclo celular requiere la expresión selectiva de genes que codifican proteínas regulatorias. Un amplio espectro de mecanismos de señalización integran y amplifican redes de regulación relacionadas a crecimiento que median la fidelidad del control del ciclo celular (Stein y col., 2002).

Cuando el control del ciclo celular no ocurre, un grupo particular de células de crecimiento excesivo puede invadir otros tejidos y así interrumpir la organización y las funciones normales del organismo. Esto es lo que sucede en caso del cáncer. Ciertas situaciones externas como la falta de nutrientes, cambios de temperatura, o pH pueden detener el crecimiento y la división, mientras que ciertas hormonas y factores de crecimiento pueden estimular la mitosis. Los factores de crecimiento se unen típicamente a proteínas receptoras de la células blanco. Esa unión produce una cascada de acontecimientos dentro de la célula que dispara la división. (Ruiz-Godoy 2008).

Pero la célula no solo responde a estímulos externos sino que cuenta con mecanismos de regulación interna. Así en cierto momento del ciclo celular, la célula decide si va a dividirse o no, en este punto de decisión intervienen controles. (Paniagua 2009).

Hoy sabemos que el ciclo está regulado por la fosforilación y la degradación de proteínas que forman complejos. Estos complejos constan de dos subunidades una reguladora y otra catalítica, es decir con función de enzima. La subunidad reguladora se llama ciclina debido a que varía cíclicamente su concentración acompañando los cambios que experimenta la célula durante el ciclo celular. La subunidad catalítica es una cinasa, es decir una enzima que cataliza la transferencia de un grupo fosfato del ATP a otra molécula. Esta cinasa se denomina cinasa dependiente de ciclinas (Cdk), ya que solo actúa cuando está asociada a una ciclina. La transferencia del grupo fosfato por parte de complejos Cdk- ciclinas, o fosforilación, activa ciertas proteínas que a su vez desencadenan procesos clave del ciclo celular. (Farías y col.2005,).

Existen distintos tipos de Cdk que pueden asociarse con diferentes tipos de ciclinas, dependiendo de qué ciclina se trate, el complejo Cdk-ciclina fosforilará unas proteínas y no otras. (Morgan, 1997,2007, Norbury, 1992). Por ejemplo, para la Cdk2 la fosforilación del residuo de treonina 160, cerca del C-terminal de la cinasa, por otra cinasa activadora de Cdk (CAK) es necesaria para la actividad. En cambio, la fosforilación de dos residuos cerca del extremo N-terminal (Tre14 y Tir15 para Cdc2) es inhibitoria. Adicionalmente la regulación negativa es provista por la unión de inhibidores

de Cdk específicos (CKI) que interrumpen el sitio activo e interfieren con la unión del ATP. (Farías y col., 2005, Luque-Herráez 2010).

Hay tres clases de complejos Cdk-ciclina que controlan el tránsito de una célula por las fases G1, S, G2 y la mitosis del ciclo celular y que actúan en secuencia. (Fig. 2).

- Complejos de Cdk-ciclina G1/S. Estos complejos preparan a la célula para la fase S al estimular la síntesis de enzimas que participan en la duplicación del DNA; en células humanas la Cdk2 y la ciclina E son las que forman estos complejos.
- Complejos de Cdk-ciclina S. Los complejos de la fase S estimulan el ingreso en esta fase de síntesis activa, al fosforilar en forma selectiva, y así activa, a las proteínas que participan en la replicación del DNA; esto ocurre solo una vez por cada ciclo celular, de manera que, en cada vuelta del ciclo, cada cromosoma se replica solo una vez y así se mantiene constante la cantidad de cromosomas en las células hijas. En células humanas la Cdk2 y la ciclina A son las que forman estos complejos.
- Complejos de Cdk-ciclina M o factor promotor de la mitosis (MFP). Se forma durante la fase S y G2 pero permanecen inactivos hasta que se completa la síntesis de DNA. 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-Herráez 2010).

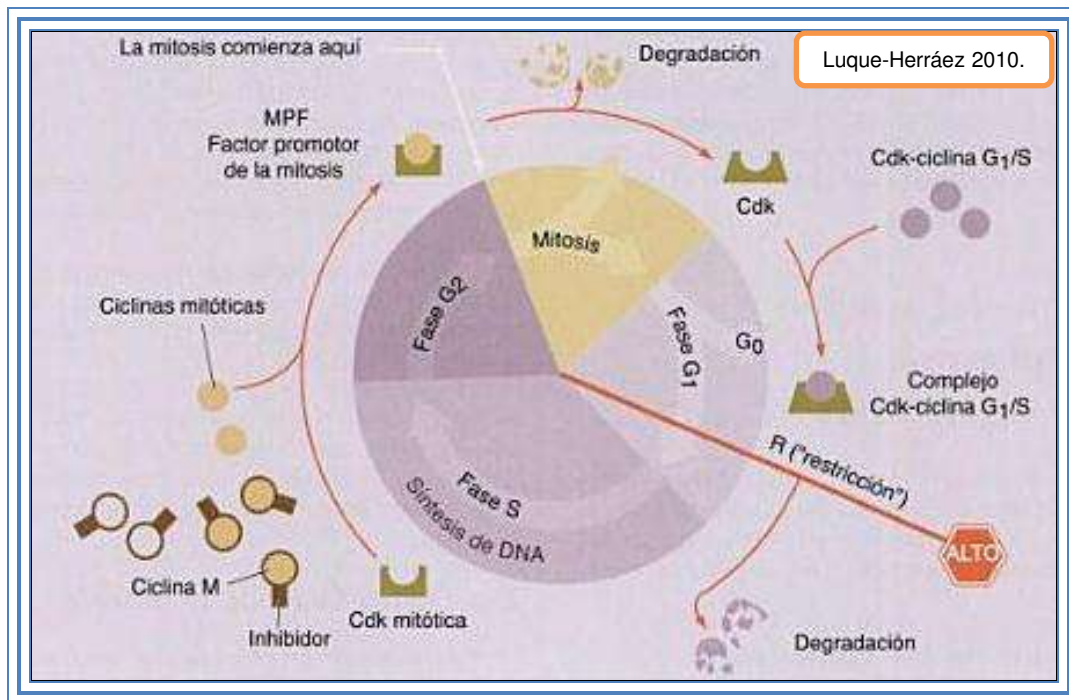


Figura 2. Regulación del ciclo celular

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. (Ruiz-Godoy 2008)

El que se haya podido relacionar distintas patologías con alteraciones genéticas, especialmente aquellas que tienen un papel clave en el control del ciclo celular, ha permitido comprender la trascendencia que tiene conocer los mecanismos de funcionamiento de este control, ya que distintas alteraciones en las proteínas que regulan el ciclo de división celular pueden tener como consecuencia la división celular excesiva o incontrolada, dando lugar a una proliferación celular desmedida con acumulación de anomalías genéticas y fisiológicas en las células. (Luque Herráez 2010).

1.3 Diferenciación celular

Se puede definir la diferenciación celular como el proceso por el cual se generan diferencias entre las células de un individuo, es decir es la especialización gradual en estructura y función que sufren las células durante la histogénesis. La diferenciación de una célula por lo general implica la pérdida simultánea de otras posibilidades de desarrollo. (Finn; Geneser 2000).

La célula huevo fecundada o cigoto tiene posibilidades máximas de desarrollo, es totipotencial, dado que da origen a todos los tipos celulares del organismo (Fig. 3). En cuanto los sucesores del cigoto comienzan a diferenciarse se crea una limitación que se hace más notoria por cada diferenciación ulterior. En los mamíferos la diferenciación de los sucesores del cigoto comienza ya en el estadio celular 16-32 de la mórula, dado que allí las células ya no son totipotenciales. (Finn; Geneser 2000).

Una célula se ha determinado o comprometido cuando se ha fijado su destino, después de la determinación se produce una diferenciación estructural.

La diferenciación celular se basa en variaciones de la actividad del material genético, debe ir acompañada por una preferencia en la síntesis de determinadas proteínas, por ejemplo, hemoglobina en los estadios inmaduros de los eritrocitos, actina y miosina en las células musculares, etc. Por el contrario no se modifica el material genético durante el desarrollo embrionario, dado que se considera que todos los sucesos del cigoto poseen igual conformación genética que este, debido a la naturaleza de la mitosis, en otras palabras la especialización como consecuencia de la diferenciación no se basa en diferencias genéticas, sino en los distintos genes que se expresan. Por lo general, el conjunto de genes del organismo se clasifican en genes de mantenimiento (housekeeping genes) que representan alrededor del 20% de los genes y se expresan en prácticamente todos los tipos celulares, dado que codifican para proteínas necesarias en las funciones estructurales y metabólicas básicas de las células, y genes específicos de tejido que representan alrededor del 80% del genoma y que solo se

expresan en determinados momentos y en ciertos tipos celulares, dado que codifican para proteínas con funciones especializadas.(Luque -Herráez 2010).

Para establecer la síntesis de proteínas específicas se deben activar ciertos genes en determinado momento, en células específicas. En otras palabras, cuando se diferencia la célula se deben activar determinadas zonas del genoma y otras zonas se deben desactivar. Estas variaciones de la actividad de los genes durante el desarrollo embrionario no están codificadas de antemano en todos sus detalles en la célula, sino que se producen en parte por la interacción con otras células. La modificación de la expresión del gen que tiene lugar durante la diferenciación celular es controlada por una serie de mecanismos moleculares, el control se ejerce desde la transcripción inicial del mRNA hasta la proteína terminada y su degradación en la célula. La mayor parte del control es ejercido a nivel transcripcional. (Finn; Geneser 2000).

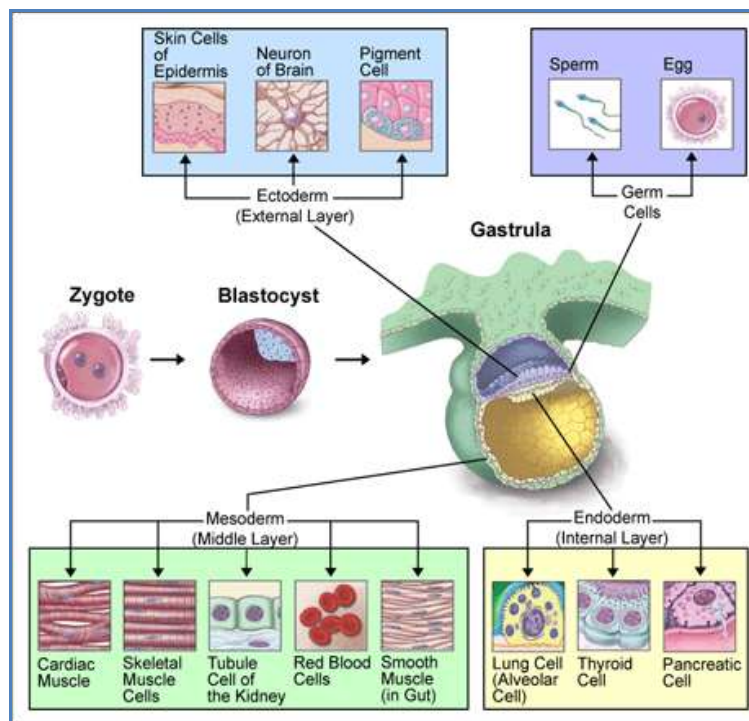


Figura 3. Diferenciación celular. Luque-Herráez 2010.

1.4 Regulación de la expresión génica en eucariotes

A pesar de que el contenido de ADN de diferentes tipos celulares en los organismos eucarióticos es generalmente idéntico, las proteínas producidas por diferentes tipos celulares son muy diferentes unas de otras. De modo similar, proteínas específicas son sintetizadas *de novo* en respuesta a la exposición de las células a un estímulo específico (Latchman 2001); por lo tanto, la regulación de los genes que codifican para estas proteínas es esencial para el normal desarrollo y funcionamiento de los eucariotes.

El control de la expresión de genes representa un proceso combinatorio que involucra una multiplicidad de eventos que incluye el reconocimiento y reconfiguración de la cromatina, modificación covalente de histonas, reclutamiento de cofactores y de los componentes de la transcripción basal, y el ensamble de un complejo de transcripción y elongación competente (Luque-Herráez 2010). La expresión de un gen puede ser regulada en múltiples niveles incluyendo la transcripción, el procesamiento del ARN, la estabilidad del ARN mensajero (ARNm), la traducción y la post-traducción (Fig. 4). De hecho, el paso inicial en la expresión de un gen es decidir si se transcribe o no (Drapkin y Reinberg, 2002).

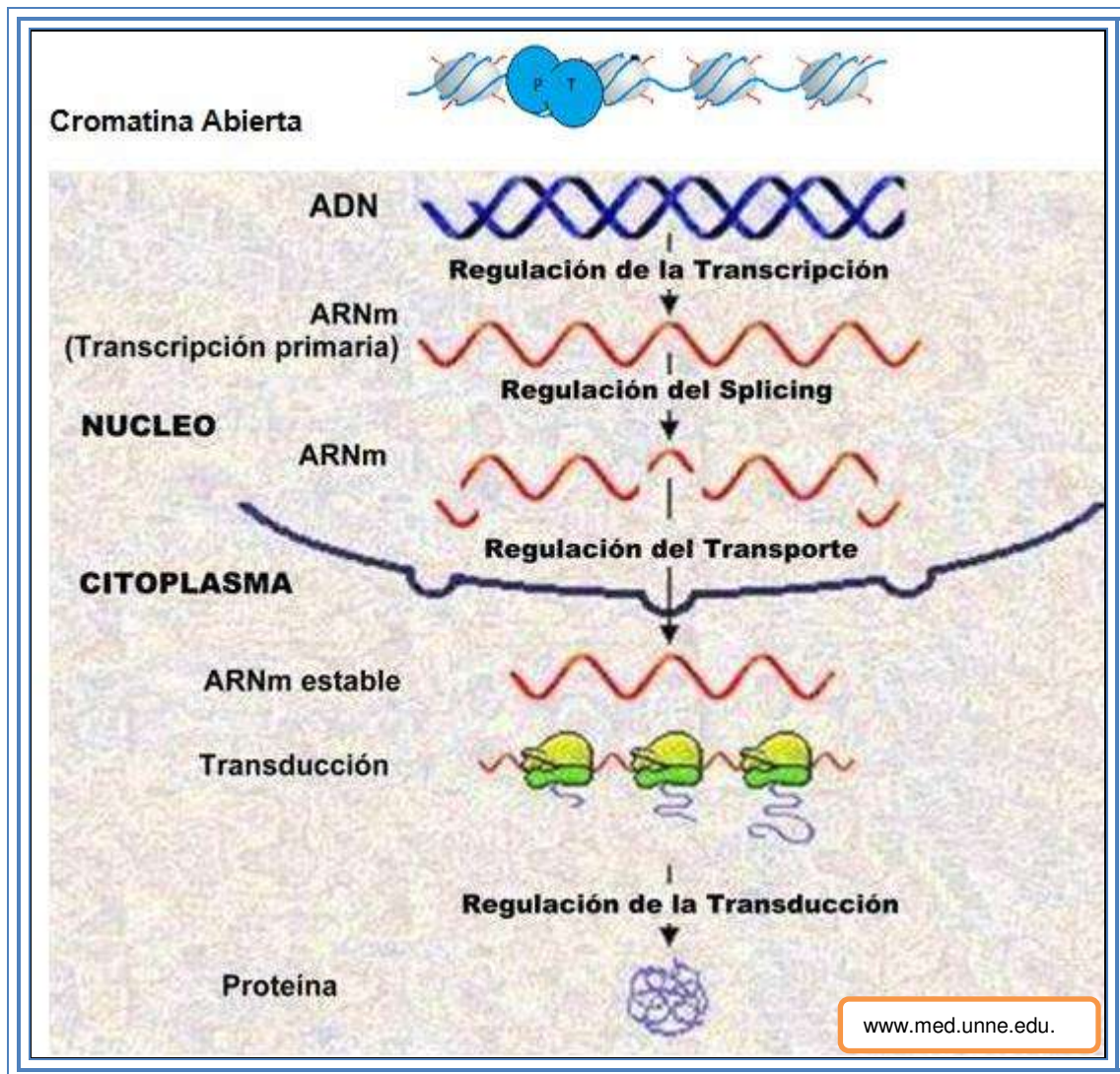


Figura 4. Niveles de regulación de la expresión génica en eucariontes. La expresión génica puede regularse a lo largo del ciclo en diferentes niveles: durante la síntesis del ARNm, en su procesamiento, en su traducción o después de formada la proteína. Sin embargo, la regulación que se da a nivel transcripcional es considerada la más importante.

1.5 Síntesis de proteínas en eucariontes

Si bien el ADN almacena información para la síntesis de proteínas y el ARNm transmite las instrucciones codificadas en el ADN, la mayoría de las actividades biológicas son realizadas por proteínas. El orden lineal de los aminoácidos determina su estructura tridimensional y su actividad. Por esta razón, el ensamblaje de aminoácidos en el orden correcto, como viene codificado en el ADN, es crítico para la producción de proteínas funcionales y por lo tanto para el funcionamiento correcto de células y organismos (Lodish 2009).

La traducción es el proceso mediante el cual la secuencia de nucleótidos de un ARNm es utilizada para ordenar y unir los aminoácidos en una cadena polipeptídica. En las células eucariontes, la síntesis de proteína tiene lugar en el citoplasma y retículo endoplásmico, específicamente en los ribosomas. El proceso dinámico de la traducción del ARNm es dividido usualmente en tres fases: iniciación, elongación y terminación. En la fase de iniciación se ensambla el ribosoma con el ARNm de transferencia iniciador. Posteriormente tiene lugar la fase de elongación, donde se forman los enlaces peptídicos en el centro catalítico del ribosoma y finaliza en la fase de terminación. Cada uno de los pasos de la traducción requiere diversas proteínas específicas que interaccionan con los participantes principales ya indicados; estas proteínas se denominan factores de iniciación (IF), factores de elongación (EF) y factores de liberación (RF). (Mathews 2007)

La síntesis de proteínas es un proceso que requiere de muchos componentes y varios niveles de control (Mathews 2007), y es la fase de iniciación traduccional el principal punto de control en la expresión genética relacionada a la síntesis de proteínas, regulando su velocidad. Dependiendo de su especificidad o expresión génica diferencial, estado o respuesta al estrés, la célula puede regular la síntesis de proteínas a través de la fosforilación de algunos factores de iniciación “eIFs” (Mathews 2007).

La iniciación de la traducción comprende cinco pasos subsecuentes: 1) disociación del ribosoma en las subunidades 40S y 60S por medio de la acción de los factores eIF3, y eIF1A; 2) formación del complejo de preiniciación 43S constituida por la subunidad ribosomal pequeña (40S), los factores de iniciación de la traducción eIF1, eIF1A, eIF2 (unido a GTP), eIF3 y eIF5, y el ARN de transferencia iniciador ($\text{Met-ARNt}_i^{\text{Met}}$); 3) el reclutamiento del complejo 43S al extremo 5'cap del ARNm y mediado por la interacción de eIF3 y eIF4G, que forma parte del complejo eIF4F (eIF4F está formado por cuatro factores: eIF4E que reconoce la estructura 5'cap, eIF4A y eIF4B que tienen actividad de ARN helicasa, y eIF4G que interacciona con eIF3); 4) escrutinio de la región 5' no traducida (5' UTR) del ARNm y el reconocimiento del codón de inicio (proceso dependiente del apareamiento correcto codón-anticodón desencadena la liberación de eIF2 y eIF3); y 5) unión de la subunidad ribosomal grande (60S) para ensamblar un ribosoma completo (80S), lo que conduce a la liberación del resto de los IFs quedando el $\text{Met-ARNt}_i^{\text{Met}}$ en el sitio P del ribosoma para proseguir con la elongación (Pestova 2002, Preiss 2003, Mathews 2007, Luque-Herráez 2010).

Por otra parte, la regulación de eIF4F está determinada por la disponibilidad de la subunidad eIF4E, la cual tiene el potencial de unirse tanto a eIF4G como a la proteína 4E-BP. La capacidad de 4E-BP de unirse a eIF4E es regulada por su estado de fosforilación y, en general, la fosforilación de 4E-BP inhibe su capacidad de unirse a eIF4E. En mamíferos, la cinasa Mnk1 fosforila el eIF4E, lo cual promueve su asociación con eIF4G (Merrick 2003).

Otra forma de regulación del inicio de la síntesis de proteínas, que es activada en condiciones de estrés, esta mediada por las proteínas cinasas mTOR y S6K, las cuales regulan los estados de fosforilación de las proteínas 4E-BPs (proteína de unión a eIF4E) y la proteína ribosomal S6, respectivamente. La proteína 4E-BPs se une al eIF4E bloqueando su unión con el eIF4G; la fosforilación de esta proteína promueve su disociación del eIF4E permitiendo que se una al eIF4G. Mientras que la fosforilación de S6 permite que los ribosomas que la presentan, traduzcan preferencialmente cierto tipo

de transcritos que presentan en la región 5' UTR rica en oligopirimidinas (Holz 2005, Merrick 2003).

El factor eIF3, que se encuentra formando parte del complejo de iniciación 43S, es el factor de mayor complejidad en el proceso de inicio de la síntesis de proteínas (Hall 2004). eIF3 sirve como andamio y catalizador de la unión entre el ARNm activado (interactuando físicamente con eIF4F), la subunidad ribosomal 40S y el complejo ternario. Una vez que se ha colocado el complejo de inicio 43S sobre el ARNm, éste se desliza sobre el transcrito en busca del codón de inicio de la traducción y al encontrarlo se coloca el primer ARNt sobre éste (Pestova 2002).

El factor eIF5 unido a la subunidad ribosomal 40S hidroliza el GTP unido al eIF2 de tal manera que se estimula la disociación del complejo de preiniciación 43S, liberando al eIF2-GDP y al eIF3. El factor eIF1 y eIF1A actúan sinérgicamente mediando el ensamblaje del ARNt en el codón de inicio. Una vez liberado el factor eIF3, se une la subunidad ribosomal mayor 60S formándose el ribosoma funcional 80S y continuando con la elongación de la cadena peptídica (Korneeva 2000).

1.6 Factor eucariótico de iniciación de la traducción 3

El factor eucariótico de iniciación de la traducción 3 (eIF3), que se encuentra formando parte del complejo de iniciación 43S, es el factor de mayor complejidad en el proceso de inicio de la síntesis de proteínas (Hall 2004). eIF3 sirve como andamio y catalizador de la unión entre el ARNm activado, la subunidad ribosomal 40S y el complejo ternario (Pestova 2002).

El factor de iniciación eIF3 es un complejo proteico con una masa aproximada a los 700 kDa. 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) (Burks 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 1997, Akiyoshi 2001) y se cambió su denominación a: eIF3a, eIF3b, eIF3c, eIF3g y eIF3i (Browning 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 (Burks 2001). Sin embargo, Masutani (2007) reportan que en mamíferos solo 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, 2009).

1.6.1 eIF3f

El gen eIF3f pertenece a la familia génica Mov34, que relaciona a sus miembros por contener un dominio Mpr1p, Pad1p N-terminal (MPN, por sus siglas en inglés) en el extremo amino terminal de la proteína. Se sugiere que este dominio está relacionado a la capacidad de la proteína de asociarse a complejos multiproteicos, involucrados en procesos tan diversos como la iniciación de la traducción, la regulación del proteosoma y la transcripción (Aravind 1998). Así también, la característica particular de cada proteína la determinaría su extremo carboxilo terminal.

En el genoma humano, *eIF3f* se encuentra codificado en el cromosoma 11; es un gen con 8 exones y 7 intrones (Hernández 2005) 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 (Higareda-Mendoza y Pardo-Galván 2010), tratándose de un retropseudogene.

Con respecto al proceso de síntesis de proteínas, experimentos *in vivo* e *in vitro*, muestran que eIF3f disminuye la velocidad de síntesis proteica (Higareda-Pardo 2003, Shi 2006), por lo que se considera un modulador del proceso. A parte de eIF3, eIF3f es capaz de interactuar con proteínas diferentes a las de este complejo multiproteico. Por ejemplo, se ha reportado que bajo condiciones basales, la cinasa ribosomal S6K1 interactúa con eIF3f a través del dominio MPN. En presencia de nutrientes y factores de crecimiento, la cinasa mTOR 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 2005, Harris 2006).

La proteína eIF3f muestra características de unión proteína-proteína excepcionales, ya que se le encuentra también interactuando 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 sensa los niveles exógenos de colesterol y se localiza en el retículo endoplásmico (Lee 2010). También, Lagirand-Cantaloube (2008) reportan que en células de mioblasto de ratón (C2C12), la ubiquitin-E3 ligasa Atrogin 1/MAFbx interacciona, a través de un dominio suyo 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 contenido de aminoácidos peculiar, con un 60% de prolinas y alaninas (dominio polyPA). Aunque aún se desconoce su función, se sabe que una serina de este dominio es fosforilada por la proteína cinasa relacionada a la apoptosis Cdk11p46 y ésta 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 ARNm retroviral, impidiendo su procesamiento (Valente 2009). En este sentido, un reporte previo indica que en células de melanoma humano A375 en estado apoptótico, la

Cdk11p46 fosforila a eIF3f en la serina 46 contenida en el dominio polyPA (Shi 2003). 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.* (2006) en la línea celular A375, por Higareda-Mendoza y Pardo-Galván (2010) en células A549, y por Llanderal-Mendoza (2003) en células de tabaco TBY-2. Se ha descrito que eIF3f se poliubiquitina y se degrada a través del proteosoma 26S (Lagrand-Cantaloube 2008). Así también, se fortalece la posibilidad de que la función o funciones del gen eIF3f estén relacionadas con crecimiento y la división celular debido a que en células de tabaco TBY-2 la expresión transcripcional del gen eIF3f está circunscrita a la transición G2/M del ciclo celular (Higareda 2003,2010, Llanderal-Mendoza 2003). Resultados recientes sugieren que es un regulador negativo de la traducción y que tiene una función en la señalización apoptótica (Shi 2006, Higareda y Pardo 2010).

Resultados de nuestro laboratorio con células humanas tumorales provenientes de un adenocarcinoma de pulmón (línea celular A549) muestran que tanto la sobre-expresión como el silenciamiento de la eIF3f conducen a una muerte celular programada independiente de la ruta de las caspasas (Higareda- Mendoza y Pardo Galván 2010). Sorprendentemente, en nuestro laboratorio se descubrió 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. Este perfil de expresión fue corroborado mediante estudios en cultivos asincrónicos y sincronizados en G0,M y S transfectados con la región promotora inmediata al gen eIF3f fusionada transcripcionalmente al gen reportero de luciferasa (Higareda-Mendoza y Pardo Galván 2010). Por otro lado, también sabemos que la sobre-expresión del gen inhibe la síntesis global de proteínas (Higareda y col., 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). Aunque la función sugerida de eIF3f es

como inhibidor de la síntesis de proteínas (Shi y col., 2006) Higareda-Mendoza y Pardo-Galván (2010) lo proponen como un modulador traduccional de la síntesis de proteínas.

Con estos antecedentes, y debido al perfil de expresión extraordinario del gen eIF3f, nos preguntamos si este patrón de expresión bifásico que se presenta en la línea A549 es general y se presenta en otras líneas celulares humanas o es tipo celular específico, si es una característica general nos indicaría que está relacionado al proceso de diferenciación, lo cual permitirá en un futuro darle un enfoque a eIF3f en terapia génica. También nos preguntamos si en estado quiescente hay un decremento significativo en el nivel de expresión de la proteína de eIF3f en otras líneas celulares humanas comparado con el nivel de proteína encontrado en estado proliferativo, lo cual nos indicaría que la función o funciones de eIF3f en células humanas estarían relacionadas a la división celular.

2. JUSTIFICACIÓN

Los antecedentes de eIF3f sugieren que es una proteína polifuncional e importante en el proceso de síntesis de proteínas y en la proliferación celular, por lo que el conocimiento de su(s) función(es) molecular(es) y celular(es), así como de su regulación génica, nos permitiría profundizar en el entendimiento de aquellos factores que intervienen o controlan a estos dos eventos fundamentales a la célula. La disminución significativa en el nivel de expresión de la proteína de eIF3f, en diversas líneas celulares comparada con el nivel de proteína encontrado en estado proliferativo, nos indicaría que la función o funciones de eIF3f en células A549 están relacionadas a la división celular, y su perfil de expresión bifásico nos daría información precisa para determinar que es una característica celular humana. Esta información nos diría si eIF3f es viable como blanco terapéutico en terapia génica contra padecimientos como el cáncer.

3. HIPOTESIS

La expresión del gen que codifica para eIF3f es dependiente del ciclo celular y su perfil de expresión bifásico encontrado en la línea celular A549 es una característica de toda célula humana.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo General

Determinar el patrón de expresión de eIF3f en las líneas celulares humanas HepG2 y Ramos.

4.2. Objetivos específicos

4.2.1 Determinar el nivel de expresión del gen eIF3f en estado quiescente (fase G0) en las líneas celulares antes mencionadas.

4.2.2 Determinar el perfil de expresión de eIF3f en cultivos sincronizados en las líneas celulares humanas antes mencionadas.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 Material Biológico

Para el análisis de los perfiles/patrones de expresión de eIF3f se utilizaron como modelos de estudio las líneas celulares HepG2 y Ramos; todas ellas son de origen humano y nivel de bioseguridad 1. La línea celular HepG2 proviene de un carcinoma hepatocelular y su morfología de crecimiento en cultivo es epitelial adherente. La línea celular Ramos proviene de un linfoma de Burkitt y su morfología de crecimiento en cultivo es el de linfocitos B en suspensión.

Las dos líneas celulares se propagan en Medio Mínimo Esencial (MEM por sus siglas en inglés) de Sigma, suplementado con NaHCO₃ 18 mM (Sigma), 2 mM L-glutamina (Sigma), 10 Hepes mM (Sigma), y suero fetal bovino (SFB) al 10% (Invitrogen). Los cultivos se mantienen en este medio con una atmósfera de CO₂ al 5% a 37 °C, realizando recambio de medio de dos a tres veces por semana y manteniendo la concentración celular en la fase log de crecimiento. Para la criopreservación (nitrógeno líquido) de células se utiliza una mezcla del 80% del mismo medio MEM suplementado, con SFB al 10% y DMSO (Dimetil sulfóxido) al 10 %.

5.1.1 TÉCNICAS CELULARES

5.1.2 Mantenimiento y manejo de las líneas celulares HepG2 y Ramos.

Para trabajar con las líneas celulares se usó 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.

5.1.3 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 5 ml ó 15 ml, respectivamente, de medio MEM-SFB 10%, que se temperiza 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 7.5. Cuando el cultivo llega a la población esperada se resiembra.

5.1.4 Propagación

Se aplica la misma metodología de resiembra pero una vez desprendidas se centrifugan a 120 x g y se descarta el sobrenadante; se resuspende la pastilla celular en 2 ml del mismo medio y se pasa al frasco T-25 cm² para dilución 1:10 ó T-75 cm² para dilución 1:15 con el mismo medio. Se devuelve el frasco a la incubadora. A las 24 h se revisa el crecimiento de las células para decidir el momento de la resiembra. Esto con la finalidad de obtener el número de células necesarias para la sincronización.

5.1.5 Resiembra

Se descarta el medio viejo del cultivo y se lava 2 veces con 2 ml de PBS 1X frío por cada 25cm². Para desprender las células se impregnan con 0.5 ml de una solución de tripsina-EDTA 1X (Sigma) por cada 25cm² y se incuba a 37°C por 2-5 minutos (esto únicamente para la línea celular HepG2). 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 x 10⁶ cel. /ml para frasco T-25 cm² ó 0.6 x 10⁶ cel. /ml para T-75. 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 y se resiembra constantemente con la finalidad de obtener una población de 90 millones de células en el caso de la HepG2 y 75 millones para la línea Ramos.

5.1.6 Determinación de concentración celular y viabilidad

Cada muestra de cultivo 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 e 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. 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 y el índice de viabilidad (porcentaje de células viables) se determinaron de la siguiente forma:

Donde:

$$\text{No. de Células} \times 10^6 / \text{ml} = \frac{(\text{Factor de conversión de la cámara})}{\text{X}} \times \frac{(\text{Factor de dilución})}{\text{X}} \times (\text{No. de células en 10 cuadros} \times 10^6)$$

Factor de conversión de la cámara = 0.001

Factor de dilución = $\frac{(\text{Volumen de la muestra} + \text{Volumen del colorante})}{(\text{Volumen de la muestra})}$

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

$$\% \text{ de viabilidad} = (\text{No. de células viables} / \text{No. de células totales}) * 100$$

5.1.7. Ecuación de Monod

La velocidad de crecimiento exponencial de células nuevas, se calculó mediante la ecuación de Monod.

$$R_g = \mu C_c$$

Donde R_g = velocidad de crecimiento celular, $\text{g/dm}^3 \cdot \text{s}$

C_c = concentración de células, g/dm^3

μ = velocidad de crecimiento específica s^{-1}

La velocidad de crecimiento celular específica se puede expresar como:

$$\mu = \mu_{\max} \frac{C_s}{K_s + C_s} \text{ s}^{-1}$$

Donde, $\mu_{\max}$ = velocidad de reacción de crecimiento específica máxima s^{-1}

K_s = Constante de Monod, g/dm^3

C_s = Concentración del sustrato, g/dm^3

5.2 Sincronización de cultivos

Para sincronizar el cultivo durante tiempos y fases específicas del ciclo celular se le agrega al cultivo un agente sincronizante, se incuba a 37°C y 5% de CO_2 y posteriormente se libera el cultivo mediante tres o más lavados con medio de cultivo fresco. Para sincronizar al mayor porcentaje del cultivo en la fase S, usamos afidicolina.

Para obtener un cultivo en estado quiescente (fase G0) se lava el cultivo con buffer PBS y se le añade medio de cultivo MEM con 0.1% de SFB durante 72 horas.

La sincronización y la acumulación de las células en fase S se llevó a cabo mediante la adición de afidicolina 0.5 μ g/ μ l. Después de 36 h de arresto con el agente sincronizante para la línea celular HepG2 y 30 h para la línea celular Ramos, se procedió a su liberación mediante dos lavados con el buffer PBS, recolección total de la muestra utilizando tripsina, la cual posteriormente se inhibirá con MEM/SFB al 10%, esto únicamente para la línea celular humana HepG2 y finalizando con la repartición en frascos T-25 los cuales se someten a un ambiente de 37°C y de CO₂ al 5.5% para brindarles un ciclo de duplicación a los cultivos (36h para la HepG2 y 30h para Ramos), para repartir posteriormente la muestra de cada T 25 en dos microtubos de 1.5 ml para la extracción de proteína y células fijadas con la finalidad de determinar parámetros en la fase S.

Para determinar el índice mitótico las células se fijaron con glutaraldehído al 1% formaldeído al 0.2% durante 5 min a temperatura ambiente, y se tiñeron con 4', 6 - diamidino-2-phenylindole (DAPI) 1mg/ml para su observación posterior en un microscopio (Leica DM IL FLUO, (Wetzlar, Alemania). Cada punto de tiempo se evaluó por triplicado, y al menos 200 células fueron anotadas en cada muestra. Para determinar la expresión de eIF3f se realizaron experimentos tipo Western blot en específico, de células privadas de suero (inactividad), y en proliferación 36 h después de la liberación de afidicolina para la línea celular HepG2 y 30 h para la línea celular Ramos .

5.3 Determinación de proteína por el método de Bradford

La concentración de proteína se determinó mediante el método de Bradford y utilizando albúmina sérica de Bovino (BSA) como estándar.

Para el Blanco buffer de lisis se utilizaron: 799 μ l de agua destilada estéril, 1 μ l de proteojet y 200 μ l de reactivo de Bradford.

A cada absorbancia a 595 nm de los lisados se le restó la absorbancia del buffer de lisis y a la absorbancia resultante se sustituyó con la ecuación de la recta obtenida de nuestra curva estándar:

$$Y = 57.333x + 0.3136$$

Donde:

x = es la absorbancia y

Y = es la concentración de proteína en μ g/muestra de ensayo Bradford.

5.4 Ensayo Western Blot

Las muestras de células se lavan dos veces con PBS, se resuspenden en un buffer de lisis (P1 ProteoJET Mammalian Cell Lysis Reagen) .Las células se rompen por pipeteo para la extracción de proteína. Luego se centrifugan las muestras a 20000 g/15 min con la finalidad de quedarnos únicamente con el sobrenadante, almacenándose a -70 °C.

De cada lisado se cargan 40 μ g de proteína para separarlas por SDS page utilizando un gel separador al 10% y un gel concentrador al 5%; la corrida se realizó a 80V por 100 min. Enseguida el gel se colocó en buffer Towbin con agitación recíproca por 10 min, mientras que por otro lado la membrana de difluoruro de polivinilideno (PVDF) se hidrató en MeOH con agitación recíproca durante 20 seg, se lavó dos veces con agua tridestilada y se colocó en buffer Towbin con agitación recíproca por 10 min. La proteína fue transferida a membrana de PVDF, colocando el gel en un “emparedado” de papeles humedecidos previamente en buffer Towbin que llevó el siguiente orden ascendente dentro de una cámara de transferencia semiseca (Bio-Rad trans-blot SD semi-dry transfer cell): papel Criterion, papel Bio-Rad 920, membrana, gel, papel Bio-Rad 920 y Criterion, eliminando las burbujas en cada capa. Se limpió el exceso de buffer de la

placa de transferencia, se cerró la cámara y se corrió por 90 min a 20 V. La membrana se dejó secar por 30 min, se hidrató con MeOH, se lavó dos veces con agua y se colocó en TBS 1X durante 5 min, el bloqueo se hizo en una solución de leche en polvo sin grasa al 5%, Tween 20 al 0.05%, disuelto en TBS 1X durante 60 min a T.A con agitación recíproca suave. Se incubó la membrana con el anticuerpo primario de conejo contra eIF3f (BIOLEGEND Purified Anti-eIF3F Antibody) (1:1000 en solución bloqueadora) toda la noche en agitación suave. Después se hicieron 5 lavados de 7 min cada uno con TBS-T (TBS más Tween 20 al 0.1), con agitación vigorosa. Se incubó la membrana con un anticuerpo secundario de chivo contra IgG de conejo conjugado a peroxidasa de rábano (HPR) (1:5000 en solución bloqueadora) agitando durante 60 min y se repitió el lavado, se realizaron 4 lavados de 6 min cada uno con TBS-Tween 20 con agitación vigorosa. Se impregnó la membrana con solución de detección del kit de revelado ECL Plus Western Blotting Detection Reagent, GE Healthcare (rpn2132, Amersham) que se preparó siguiendo las instrucciones del fabricante. Se incubó por 5 min y se fijó sobre egapack dentro del cassette. En cuarto oscuro se colocó una película de rayos X sobre la membrana, cerrando por 30 minutos el cassette. Finalmente la película se reveló, se enjuagó en agua destilada, se colocó en solución fijadora por aproximadamente 2 min y se volvió a enjuagar.

Por otro lado, la membrana se lavó para realizar la inmunodetección con GADPH como control de carga. El lavado se realizó incubando dos veces la membrana en mild stripping buffer por 10 min cada incubación, con agitación suave. Enseguida se lavó dos veces con PBS, por 10 min cada vez, se continuó con dos lavados más con TBS-T por 5 min cada vez. Se dejó secar la membrana y se hidrató con MeOH por 20 seg, se lavó dos veces con agua y se colocó en TBS 1X durante 5 min. El bloqueo y la inmunodetección se realizaron como se describió anteriormente, solo que como anticuerpo primario se utilizó un anticuerpo primario de ratón contra GAPDH (MILLIPORE Anti-Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase) (1:1000) y un secundario de chivo contra IgG de ratón conjugado a peroxidasa de rábano (HPR) (1:2000).

Finalmente, las placas se fotografiaron y analizaron utilizando un sistema y software de Kodak Digital Science ID para relacionar la intensidad de la banda con la concentración relativa de eIF3f.

5.5 Análisis estadístico

Los experimentos se repitieron al menos tres veces y cada muestra se tomó por triplicado, para determinar promedios y desviaciones estándar a cada muestra. Para la comparación de variables numéricas se utilizará la prueba t de Student y se consideraran diferencias estadísticamente significativas las asociadas a un valor de $p \leq 0.05$

6. Resultados y Discusión

El objetivo central del presente trabajo fue determinar si la expresión bifásica del gen eIF3f Humano encontrado en la línea celular humana A549 es una característica celular humana o es tipo celular específico.

Para poder determinar el perfil de expresión de eIF3f y para poder sustentar nuestra hipótesis utilizamos dos líneas celulares humanas que procedieran de dos orígenes embrionarios diferentes; estas líneas fueron HepG2 (endodermo) y Ramos (mesodermo).

Línea celular HepG2

La línea celular HepG2 se considera una línea de difícil manejo para estudios de ciclo celular por su dificultad para sincronizarla y por la morfología que presenta en adherencia. Ante esta situación, se procedió a realizar cinéticas de crecimiento para establecer las condiciones óptimas de resiembra y sincronización con diferentes agentes químicos: hidroximetilurea (1 y 5 mM) y afidicolina (5µg/µl)). La línea celular HepG2 presenta características morfológicas que la distinguen de la línea A549 en cuanto a que no presenta una morfología epitelial y crece en islotes que se van agrupando al alcanzar una confluencia superior al 90%. En la figura 5 se pueden observar las micrografías de las características antes mencionadas.

El tiempo de duplicación del cultivo es más prolongado (36 h) en HepG2, comparado con A549 (22 h), como puede apreciarse al comparar las cinéticas de crecimiento de ambas líneas celulares (Fig. 6).

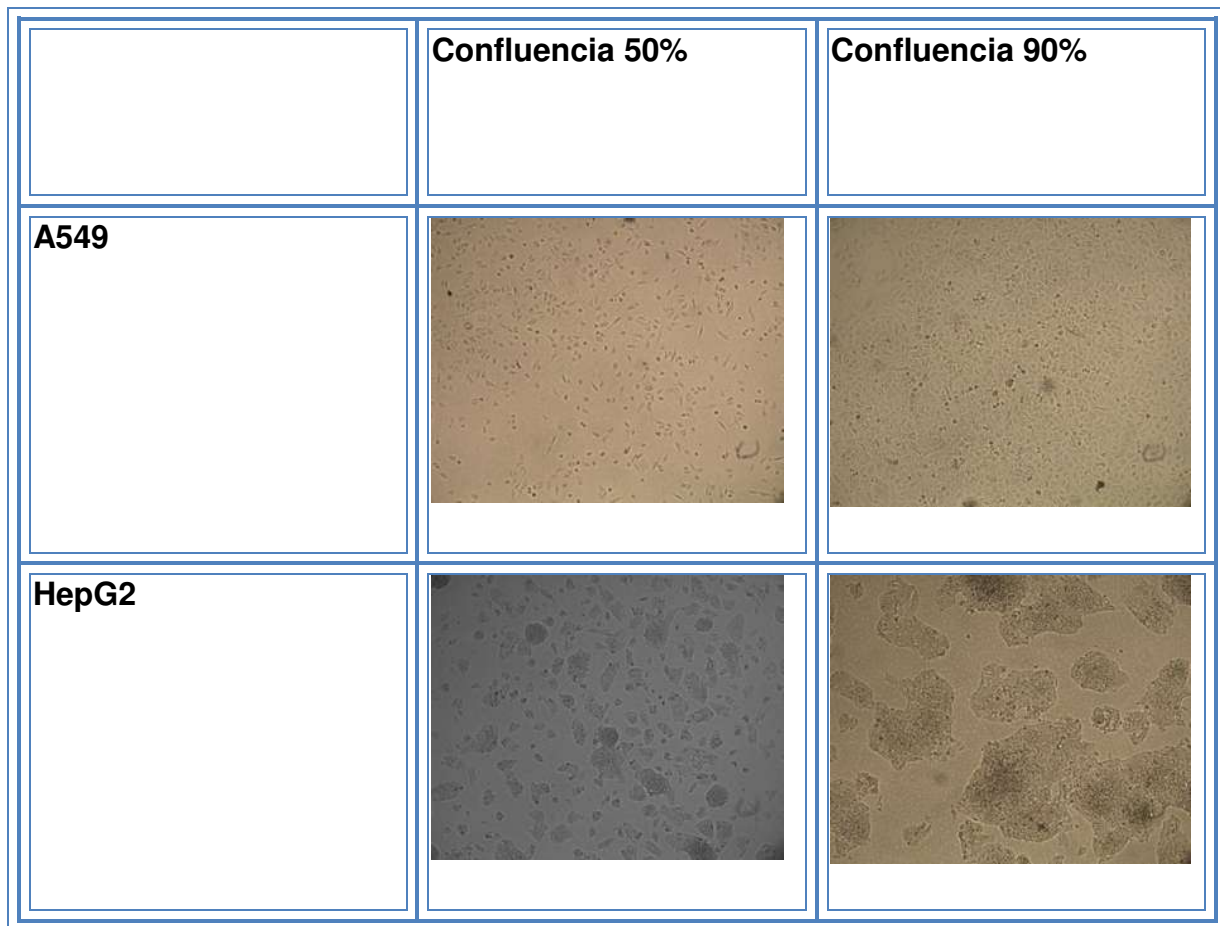


Figura 5. Micrografías de las líneas celulares A549 y HepG2.

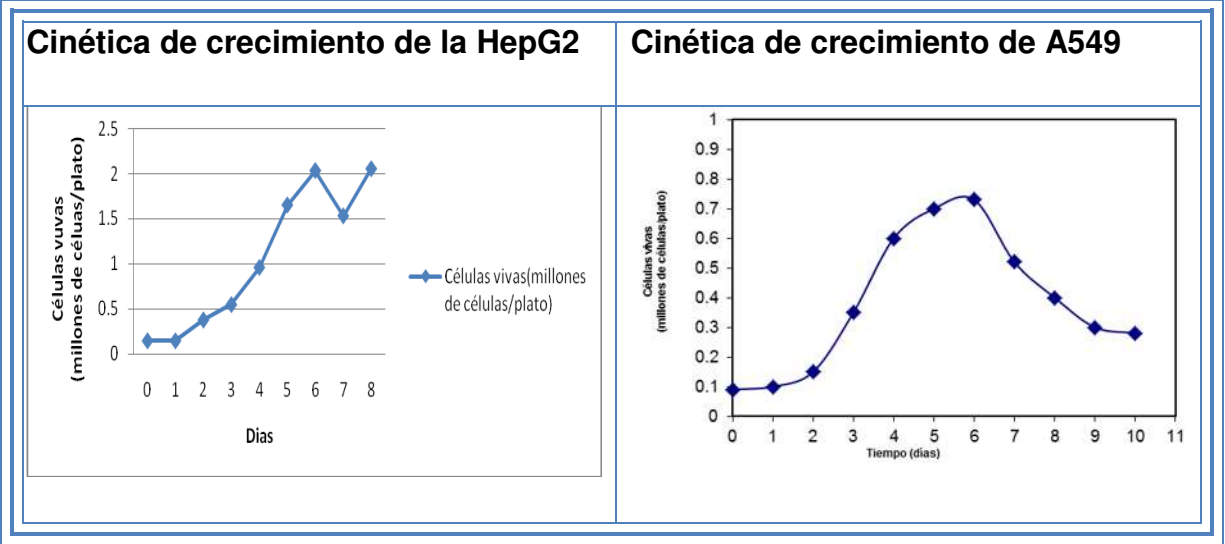


Figura 6. Cinética de crecimiento de las líneas celulares HepG2 y Ramos.

Posterior a la cinética de crecimiento se procedió a la sincronización de los cultivos para determinar el tiempo en que obteníamos el mayor porcentaje de células en sincronía, utilizando afidicolina (5 μ g/ μ l).

La figura 7 muestra el porcentaje de índice mitótico con respecto al tiempo, posterior a la liberación del cultivo en la fase S del ciclo celular. Se observa un índice mitótico del 28% a las 7 h; siendo este mayor que en A549 ya que en esta línea se logró un 21%. Si esto lo extrapolamos al tiempo de duplicación de esta línea celular podemos decir que estos porcentajes son similares de acuerdo a las características de cada línea celular. Así mismo obtuvimos un segundo índice mitótico del 9.5 % a las 24h, similar al de la línea celular A549, reforzando así el perfil bifásico que se observó en A549, teniendo un porcentaje menor en el segundo pico debido a que el agente sincronizante va perdiendo su efecto.

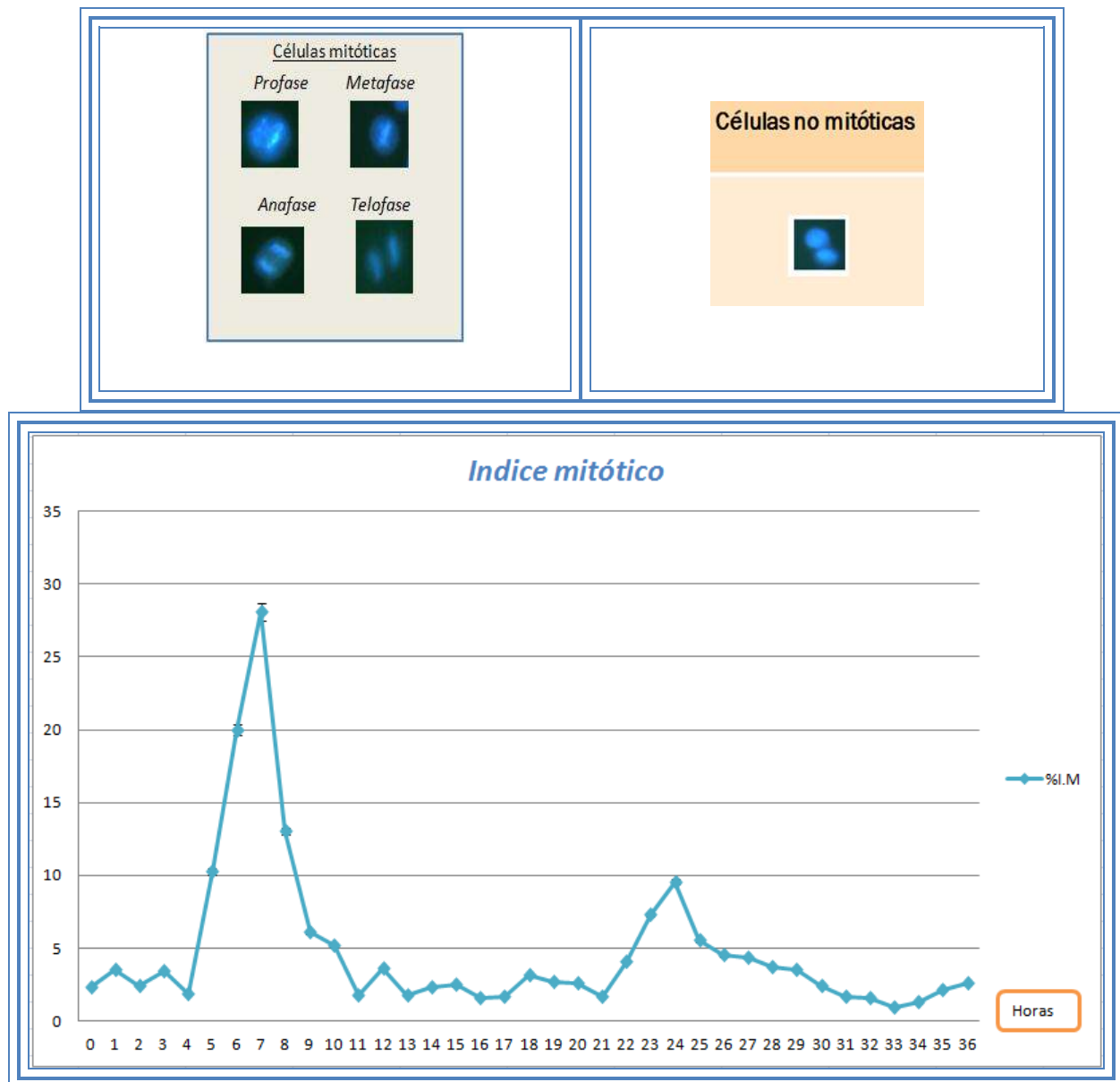


Figura 7. Proporción de la población de células HepG2 en la fase M del ciclo celular. Sincronización de un cultivo celular de la línea celular HepG2 utilizando Afidicolina 5 μ g/ml-

Línea celular Ramos

La línea celular Ramos es una línea de fácil manejo para estudios de ciclo celular por su facilidad para sincronizarla y por la morfología que presenta en suspensión. Ante esta situación, se procedió a realizar cinéticas de crecimiento para establecer las condiciones óptimas de resiembra y sincronización con afidicolina ($5\mu\text{g}/\mu\text{l}$). La línea celular Ramos presenta características morfológicas que la distinguen de la línea A549 y HepG2 en cuanto a que presenta una morfología en suspensión. En la figura 8 se pueden observar las micrografías de las características antes mencionadas. El tiempo de duplicación es más prolongado en la línea celular Ramos (30 h) comparado con A549 (22 h), pero menor que en la línea celular HepG2 (36 h) como puede apreciarse en la cinética de crecimiento de la línea celular Ramos (Fig. 9).

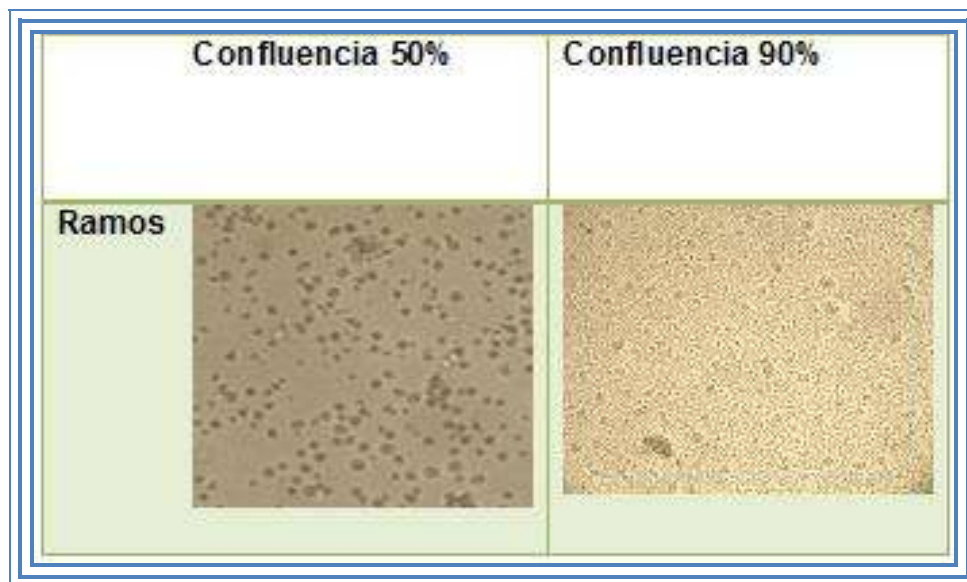


Figura 8. Micrografía de la línea celular Ramos.

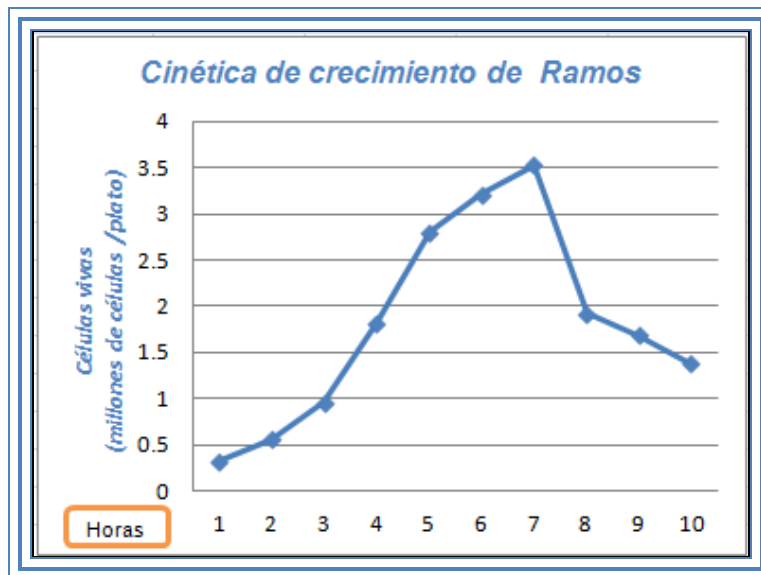
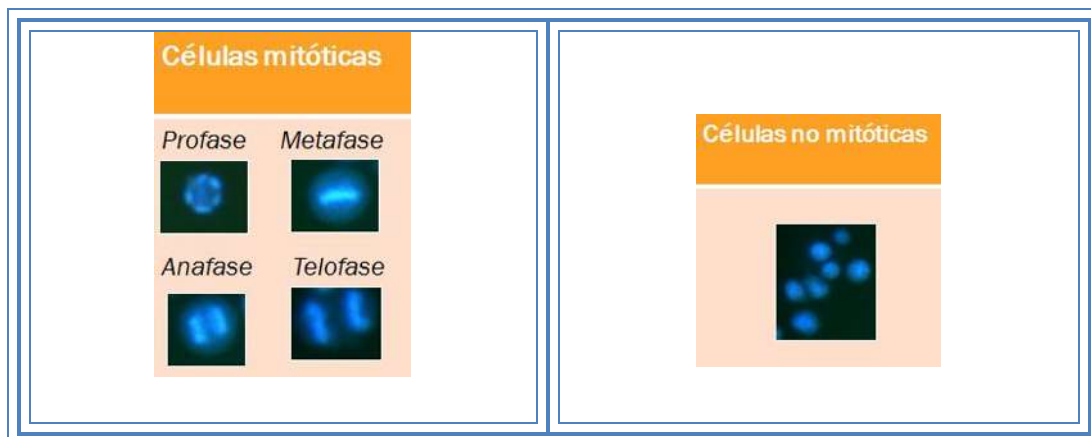


Figura 9. Cinética de crecimiento de la línea celular Ramos.

De igual manera se sincronizó la línea celular humana Ramos. La sincronía de la línea Ramos se realizó utilizando afidicolina (5 μ g/ml). La figura 10 muestra el índice mitótico con respecto al tiempo, posterior a la liberación del cultivo en la fase S del ciclo celular. Se observa un índice mitótico del 26% a las 7h siendo este mayor que en A549 ya que en esta línea se logró un 21%. Si esto lo extrapolamos al tiempo de duplicación de esta línea celular podemos decir que estos porcentajes son similares de acuerdo a las características de cada línea celular. Así mismo obtuvimos un segundo índice mitótico del 7 % a las 20h, similar al de las líneas celulares antes mencionadas.



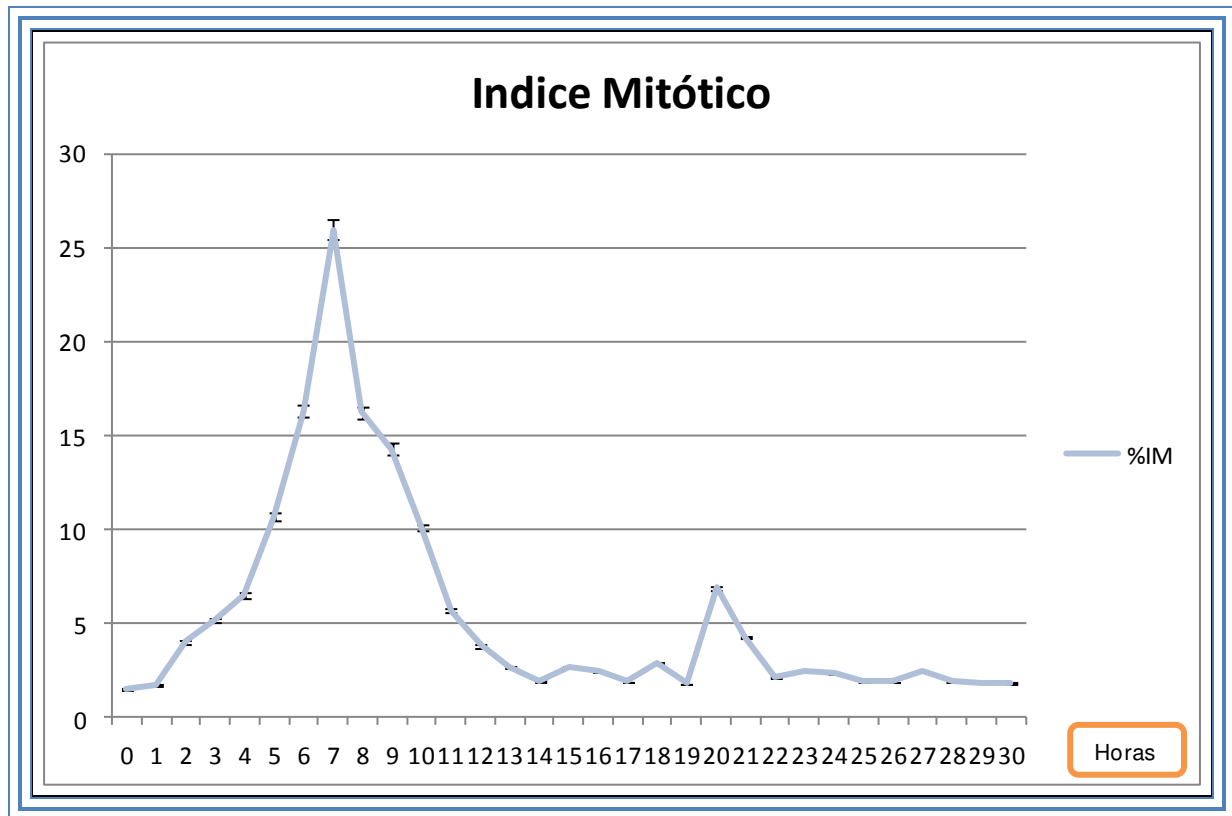
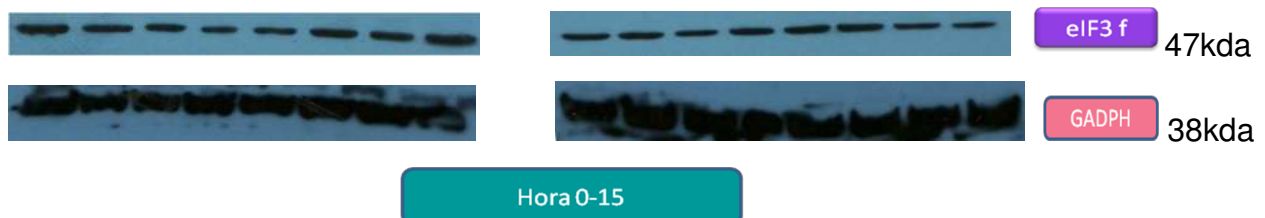


Figura 10. Proporción de la población de células Ramos en la fase M del ciclo celular.

Sincronización de un cultivo celular de la línea celular Ramos utilizando Afidicolina (5 μ g/ml)

Una vez establecido el tiempo de duplicación mediante la cinética de crecimiento e índice mitótico mediante la sincronización de las líneas celulares, se prosiguió a evaluar la expresión del mismo durante la progresión del ciclo celular mediante experimentos tipo Western Blot de ambas líneas celulares (Fig.11y 12).



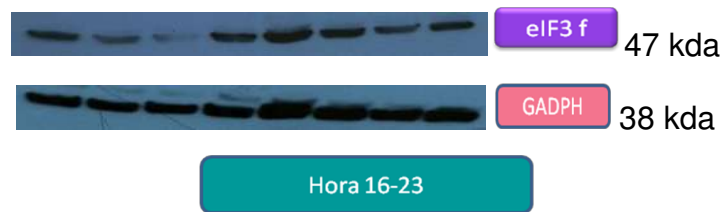


Figura11. Expresión de la proteína en la línea celular HepG2.



Figura 12. Expresión de la proteína en la línea celular Ramos.

La determinación del perfil de expresión de un gen durante el ciclo celular es un indicativo de los eventos a los que pudiera estar adscrito durante la división. Por ejemplo, la cinasa Cdk1 se expresa sólo durante la división celular y su función es requerida durante todo el proceso, por lo que su expresión es constante durante el mismo. En contraste, las Ciclinas B son requeridas en la transición S/G2/M, y su expresión se da en estas mismas fases.

Encontramos que la expresión de eIF3f en las líneas celulares HepG2 y Ramos oscila durante el ciclo celular, mostrando un máximo durante la fase S y otro durante la fase M del ciclo (Fig. 13 y 14), tal cual se observó en la línea A549.

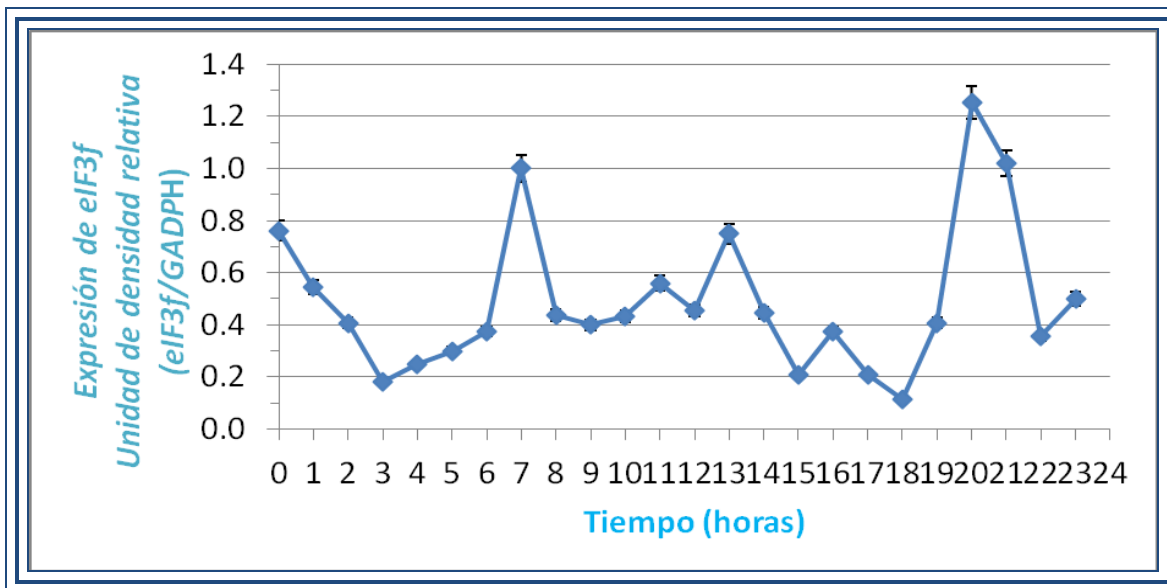


Figura 13. Expresión relativa de eIF3f de la línea celular HepG2.
Densitometría obtenida a partir de los WBs de la línea celular HepG2

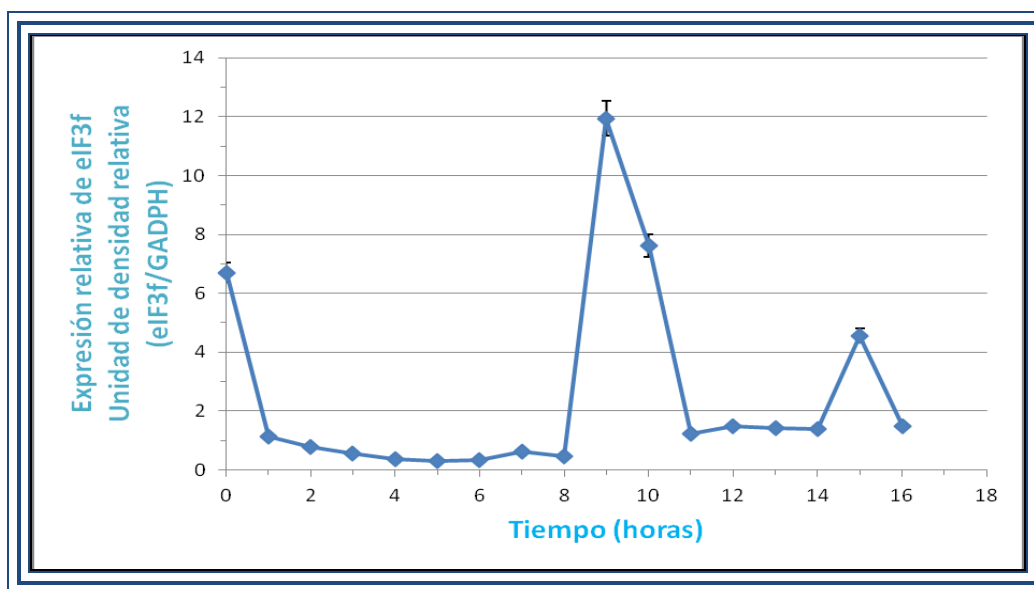


Figura 14. Expresión de eIF3f de la línea celular Ramos.
Densitometría obtenida a partir de los WBs de la línea celular Ramos

Considerando lo reportado en la literatura que eIF3f y eIF3a no forman parte del corazón catalítico de eIF3 y que, por lo tanto, tienen funciones moduladoras (Burks *et al.* 2001), puede esperarse que efectivamente eIF3f sea un regulador traduccional de la síntesis de proteínas específicas a las fases S y M de ciclo celular en células humanas y no tipo celular específico. De hecho, Shi *et al.* (2006) sugieren que eIF3f es un regulador negativo de la síntesis de proteínas y Masutani *et al.* (2007) reportan que eIF3f es indispensable para mantener un nivel adecuado de síntesis de proteínas. Fan and Penman (1970) reportan que la síntesis de proteínas es inhibida en la transición G2/M y en la fase M del ciclo celular de mamíferos, e Higareda-Mendoza y Pardo-Galván (2010) reportan que eIF3f se expresa en la fase M, sugiriendo que eIF3f contribuye a manera de modulador traduccional en la disminución observada en la síntesis de proteínas durante la fase M.

Hasta el momento, los únicos reportes en la literatura que indican una expresión transcripcional o traduccional bifásica durante el ciclo celular son, un reporte de una proteína que presenta un perfil de expresión bifásico, pero a nivel traduccional. Pyronnet (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 ARNm 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, e Higareda y Pardo (2010) reportan el perfil de expresión transcripcional bifásico de eIF3f el cual concuerda a nivel transcripcional y traduccional, sugiriendo que la regulación de la expresión de eIF3f se da sólo a nivel transcripcional.

Es importante resaltar que la expresión transcripcional de eIF3f en plantas y en hongos es monofásica (G2/M y G2, respectivamente), sugiriendo con ello que el máximo de expresión durante S en humano fue adquirido posteriormente por Animalia durante la evolución de esta rama filogenética.

Asimismo, el hecho de que el gen eIF3f se exprese en dos fases distintas del ciclo celular genera interrogantes acerca de su función (o funciones), ya que los circuitos morfogenéticos 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.

Al haber determinado en nuestro trabajo que la expresión bifásica de eIF3f es una característica humana, ya que es compartida por varios tipos celulares de diferente origen embrionario y recordando que el cigoto al tener posibilidades máximas de desarrollo, es decir al momento que es totipotencial, da origen a todos los tipos celulares del organismo, esto nos sugiere que es una función adquirida anterior al proceso de diferenciación, es decir en el momento en que la célula es totipotencial.

Con frecuencia, los genes relacionados al ciclo celular son importantes para la viabilidad de la célula, dado que la división celular es un proceso celular que requiere de la adecuada regulación del ciclo celular mediante la expresión y activación de proteínas específicas en tiempo, concentración y espacio.

En el estado quiescente en el que se reprime la expresión de algunos genes sin que signifique un estado de inactividad de la célula, la represión moderada o estricta de genes como los que son exclusivamente requeridos para el ciclo celular es necesaria puesto que esta condición fisiológica requiere funciones diferentes. Durante este estado fisiológico la expresión de eIF3f es abatida y la desregulación de este gen no es de importancia para la viabilidad celular de A549, de HepG2 y Ramos, como lo es para el estado proliferativo. Sin embargo como ya se mencionó en los antecedentes, la expresión de este gen en el estado quiescente (G0), inducido por limitación de nutrientes, no desaparece totalmente (Higareda-Mendoza y Pardo-Galván 2010), y

corroborado en este trabajo con las líneas celulares humanas HepG2 y Ramos (Fig.. 15 y 16) lo que sugiere una función diferente.



Figura 15. Western Blot de GO y Asincrónico de las líneas celulares HepG2 y Ramos.

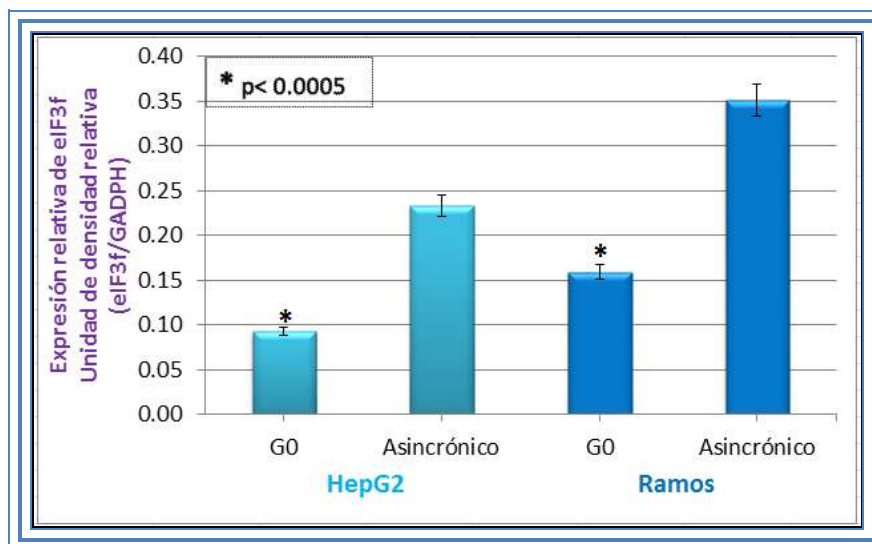


Figura 16. Relación eIF3f/GADPH.

Con todos los datos que se tienen y considerando que el cáncer es en última instancia, un grupo de células que son incapaces de detener su ciclo celular (división) y, el organismo que es incapaz de controlarlas y eliminarlas, incapacidad que frecuentemente lo lleva a la muerte. 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 Cdk's (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), 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 h 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.

7. CONCLUSIONES

- El perfil de expresión de eIF3f es bifásico presentándose en las fases S y M del ciclo celular.
- Dicho perfil está presente en líneas celulares humanas de origen embrionario diferente, lo cual nos habla de su esencialidad.
- En estado quiescente los niveles de expresión de eIF3f están abatidos lo que nos reafirma su esencialidad en el ciclo celular.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Akiyoshi, Y., J. Clayton, L. Phan, M. Yamamoto, A. G. Hinnebusch, Y. Watanabe y K. Asano. (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. Aravind L. y C. P. Ponting. (1998) **Homologues of 26S proteasome subunits are regulators of transcription and translation**. Protein Science 7: 1250-1260.
3. Asano, K., H. P. Vornlocher, N. J. Richter-Cook, W. C. Merrick, A. G. Hinnebusch y J. W. B. Hershey. (1997) **Structures of cDNAs encoding human eukaryotic initiation factor 3 subunits**. The Journal of Biological Chemistry 272: 27042-27052.
4. Bashir T., Hôrlein R., Rommelaere J., y Willwand K. 2000. **Cyclin A activates the DNA polymerase α -dependent elongation machinery in vitro: A parvovirus DNA replication model**. PNAS, vol. 97 (10): 5522–5527.
5. Browning K.S., D.R. Gallie, J.W. Hershey, A.G. Hinnebusch, U. Maitra, W.C. Merrick, C. Norbury. (2001) **Unified nomenclature for the subunits of eukaryotic initiation factor 3**. Trends in Biochemical Sciences 26(5): 284.
6. Bruce Alberts. (2010). **Introducción a la Biología Celular**. 3 edición. Editorial Panamericana, Argentina. 269-284 pp.
7. Burks E. A, P. P. Bezerra, H. Le, D. R. Gallie y K. S. Browning. (2001) **Plant Initiation Factor 3 Subunit Composition Resembles Mammalian Initiation**

Factor 3 and has a Novel Subunit. The Journal of Biological Chemistry 276: 2122-2131.

8. Drapkin R. I. y Reinberg D. F. 2002. **RNA Synthesis.** En: **ENCYCLOPEDIA OF LIFE SCIENCES.** John Wiley & Sons. Ltd: Chichester <http://www.els.net/> [doi: 10.1038/npg.els.0000843].
9. Dong, Z., Z.Liu, P.Cui¹². Dong, Z., Z. Liu, P. Cui, R. Pincheira, Y. Yang, J. Liu y J.T. Zhang. 2009. **Role of eIF3 in regulating cell cycle progression.** *Experimental Cell Research* 315:1889-1894.
10. Fan H. y S. Penman. 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.
11. Farías-Escalera A., Beltrán-Peña E. y Pardo-Galván M. A. 2005. **Control molecular del ciclo celular eucariótico.** *Ciencia nicolaíta* (42): 37 – 56.
12. Finn Geneser. 2000. **Histología.** Editorial Panamericana. 3a edición. México. pp.151-155.
13. Hall M. N., M. C. Raff y G. Thomas. (2004) **Cell growth: control of cell size.** Vol. 42. Cold Spring Harbor Monograph Series. CSHL Press. China. 652 pp.
14. Harris T. E., A. Chi, J. Shabanowitz, D. F. Hunt, E.R. Rhoads y Jr. J. C. Lawrence. (2006) **mTOR-dependent stimulation of the association of eIF4G and eIF3 by insulin.** *The EMBO Journal* 25: 1659-1668.
15. Hall M. N., M. C. Raff y G. Thomas. 2004. **Cell growth: control of cell size.** Vol. 42. Cold Spring Harbor Monograph Series. CSHL Press. China. 652 pp.

16. Hernández P. 2005. **Análisis estructural del gen y la proteína psif en eucariontes superiores.** Tesis de Licenciatura. Facultad de Biología. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Michoacán, México. 46 pp.
17. Higareda-Mendoza A. E., A. Farias, J. Llanderal, A. Méndez y M. A. Pardo-Galván. (2003) **A cell cycle and protein synthesis-related factor required for G2/M transition.** Miami Nature Biotechnology Short Reports 14: 111.
18. Higareda AE y Pardo 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.
19. Holz M. K., B. A. Ballif, S. P. Gygi y J. Blenis. (2005) **mTOR and S6K1 mediate assembly of the translation preinitiation complex through dynamic protein interchange and ordered phosphorylation events.** Cell 123: 569-580.
20. King, R. W., P. K. Jackson y M. W. Kirshner. 1994. **Mitosis in transition.** *Cell* 79: 563-571.
21. Korneeva, N. L., B. J. Lamphear, F. L. Colby-Hennigan y R. E. Rhoads. 2000. **Mutually Cooperative Binding of Eukaryotic Translation Initiation Factor (eIF) 3 and eIF4A to Human eIF4G-1.** *The Journal of Biological Chemistry* 275: 41369-41376.
22. Lagirand-Cantaloube J., N. Offner, A. Csibi, M. P. Leibovitch, S. Battonnet-Pichon, L. A. Tintignac, C. T. Segura y S. A. Leibovitch. (2008) **The initiation factor eIF3-f is a major target for Atrogin1/MAFbx function in skeletal muscle atrophy.** *The EMBO Journal* 27: 1266-1276.

23. Latchman D. 2001. **Transcriptional gene regulation in eukaryotes**. En: **ENCYCLOPEDIA OF LIFE SCIENCES**. John Wiley & Sons. Ltd: Chichester <http://www.els.net/> [doi: 10.1038/npg.els.0002322].
24. Lee J. P., A. Brauweiler, M. Rudolph, J. E. Hooper, H. A. Drabkin y R. M. Gemmill. (2010) **The TRC8 Ubiquitin Ligase Is Sterol Regulated and Interacts with Lipid and Protein Biosynthetic Pathways**. *Molecular Cancer Research* 8(1): 93-106.
25. Lewin B. 2007. **Genes IX**. Jones and Bartlett Publishers. 9a. ed. Boston, MA. USA. 912pp.
26. Llanderal-Mendoza J. 2003. **Estudios in vivo sobre la Función de la Proteína Psif en la División Celular de Nicotiana tabacum**. Tesis de Licenciatura. Facultad de Biología. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Michoacán, México. 64 pp.
27. Lodish, H., A. Berk, P. Matsudaira, A. C. Kaiser, M. Krieger, M. P. Scott, S. L. Sipursky y J. Darnell. 2005. **Biología Celular y Molecular**. 5ª. ed. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina. pp. 853-973.
28. Luque J. y A. Herráez. (2008) **Biología Molecular e Ingeniería Genética**. 1era ed. Editorial Elsevier, España. 307-311; 411-417 pp.
29. Margulis, L., Dolan, M. F. y Guerrero R. 2000. **The chimeric eukaryote: Origin of the nucleus from the karyomastigont in amitochondriate protists**. *PNAS* 97 (13): 6954-6959.
30. Masutani M., N. Sonenberg, S. Yokohama y H. Imataka. (2007) **Reconstitution reveals the functional core of mammalian eIF3**. *The EMBO Journal* 26: 3373-3383.

31. Mathews, M. B., N. Sonenberg y J.W.B. Hershey. (2007) **Translational Control in Biology and Medicine**. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY. 934 pp.
32. Merrick W. C. (2003) **Initiation of protein biosynthesis in eukaryotes**. *Biochemistry and Molecular Biology Education* 31: 378-385.
33. Morgan D. O. 1997. **Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and microprocessors**. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 13: 261-291.
34. Morgan D. O. 2007. **The cell cycle: principles and control**. New Science Press Ltd. And Oxford University Press. Corby, Northants, UK. 297: 2-54, 111-137.
35. Nigg E. A. 2001. **Mitosis**. En: Zheng Y. (Ed.) **Encyclopedia of Life Sciences**. 1a. ed. John Wiley & Sons, Ltd. USA. <http://www.els.net> [DOI: 10.1038/hpg.els.0001356].
36. Norbury C. y P. Nurse. 1992. **Animal cell cycles and their control**. *Annual Review of Biochemistry* 61: 441-470.
37. Paniagua Ricardo. **Biología Celular**. 4 edición. Editorial Mc-Graw Hill España. 71-129 pp.
38. Pestova, T. V. y V. G. Kolupaeva. (2002) **The role of individual eukaryotic translation initiation factors in ribosomal scanning and initiation codon selection**. *Genes & Development* 16: 2906-2922.

39. Pestova, T. V. y C. U. T. Hellen. 2000. **The structure and function of initiation factors in eukaryotic protein synthesis.** *Cellular and Molecular Life Sciences* 57: 651-674.
40. Preiss T. y M. W. Hentze. 2003. **Starting the protein synthesis machine: eukaryotic translation initiation.** *Bioessays* 25: 1201 – 1211.
41. Preiss T. y M. W. Hentze. (2003) **Starting the protein synthesis machine: eukaryotic translation initiation.** *Bioessays* 25: 1201 – 1211.
42. Ruiz-Godoy LM. (2008) **Biología Molecular en Cáncer** (Ciclo celular en Cáncer y Mecanismos Moleculares del Cáncer). Editorial DESA, México.
43. Shi, J., Y. Feng, A. C. Goulet, R. R. Vaillancourt, N. A. Sachs, J. W. Hershey y M. A. Nelson. (2003) **The p34cdc2-related Cyclin-dependent kinase 11 Interacts with the p47 Subunit of Eukaryotic Factor 3 during Apoptosis.** *The Journal of Biological Chemistry* 278: 5062-5071.
44. Shi J., A. Kahle, J. W. B. Hershey, B. M. Honchak, J. A. Warneke, S. P. L. Leona y M. A. Nelson. (2006) **Decreased expression of eukaryotic initiation factor 3f deregulates translation and apoptosis in tumor cells.** *Oncogene* 25: 4923-4936.
45. Stein, G., Wijnen, A. J., Stein, J. L., Lian J. B. y Owen T. A. 2002. **Cell Cycle.** En: *ENCYCLOPEDIA OF LIFE SCIENCES.* John Wiley & Sons. Ltd: Chichester <http://www.els.net/> [doi: 10.1038/npg.els.0001354].
46. Valente S.T., G. M. Gilmartin, C. Mott, B. Falkard y S. P. Goff. (2009) **Inhibition of HIV-1 replication by eIF3f.** *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 106(11): 4071-4078.

47. Ye X., Yue W., Grzegorz N., y Harper J. W. 2003. **The Cyclin E/Cdk2 Substrate p220^{NPAT} Is Required for S-Phase Entry, Histone Gene Expression, and Cajal Body Maintenance in Human Somatic Cells.** Molecular and cellular biology (23): 8586–8600.