



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO
FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS Y BIOLÓGICAS
"DR. IGNACIO CHÁVEZ"
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

Tesis:

**Perfil de interacción del receptor adrenérgico alfa 1B con eIF3f
durante el ciclo celular de células humanas A549**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS DE LA SALUD

P R E S E N T A:

Química Farmacobióloga
Karina Jazmín Tenorio Martínez

Dirección de tesis:
Doctora en Ciencias Biológicas
Ana Edith Higuera Mendoza

Co- Dirección de tesis:
Doctor en Investigación Biomédica Básica
Marco Aurelio Pardo Galván



Morelia, Michoacán,
México

Agosto, 2018

El Comité Tutorial designado por la División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas “Dr. Ignacio Chávez” de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo aprobó la tesis presentada por:

Química Farmacobióloga
Karina Jazmín Tenorio Martínez

Doctor en Farmacología
Daniel Godínez Hernández
Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

Doctor en Ciencias (Biología Celular)
Carlos Cortés Penagos
Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

Doctora en Ciencias Biomédicas
Graciela María Eugenia Letechipia Vallejo
Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

Esta tesis fue realizada en el programa de posgrado
Maestría en Ciencias de la Salud de la
Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo
acreditado en el Programa Nacional de Posgrado de Calidad – CONACYT
como programa Consolidado

La estudiante de la Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas
“Dr. Ignacio Chávez” de la
Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo
agradece al CONACyT la beca que le fue otorgada
durante la realización de su tesis.

La presente investigación se realizó en:

Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas

“Dr. Ignacio Chávez”

División de Estudios de Posgrado

Laboratorio de Biología Celular Humana

y

Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

Instituto de Investigaciones Químico Biológicas

Laboratorio Biología Molecular

DEDICATORIA

Este proyecto está dedicada a mis padres, pilares fundamentales en mi vida. Sin ellos, No hubiese podido conseguirlo. Su lucha y tenacidad han hecho lo que ahora soy, no solo para mí, sino para mis hermanos.

También dedico este proyecto a mi novio, Carlos. Quien fue mi apoyo en todo momento, sobre todo en esos momentos de desánimo, gracias.

Por último, a mis compañeros de tesis y a mi directora de tesis quién nos ayudó siempre.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a la Dra. Ana Edith Higareda Mendoza, gracias, por su apoyo y disposición, por su paciencia y la confianza que me brindó para llevar a cabo este proyecto de investigación. Al Dr. Marco Aurelio Pardo Galván por su paciencia y dedicación para la formación de sus alumnos.

De igual manera agradezco a Comité tutorial por el tiempo que me dedicaron, sus consejos y el aporte de su conocimiento para mi trabajo de investigación, ha sido invaluable.

A la Dra. Alicia Rivera Gutiérrez, jefa de la división de estudios del posgrado; así como a todo el personal que se encuentra laborando en este posgrado, por sus atenciones prestadas.

Y por último a mis compañeros del laboratorio de Biología Celular Humana, siempre estaré eternamente agradecida por la fortuna de haber coincidido con cada uno de ustedes.

TABLA DE ABREVIATURAS

A	Adenina
aa	Aminoácidos
ADN	Ácido desoxirribonucleico
Akt	Proteína cinasa B
AMP	Adenosín monofosfato
AP	Proteína adaptadora
APC	Complejo promotor de la anafase
APC/C	Complejo promotor de la anafase/ciclosoma
ARN	Ácido ribonucleico
ARNasa	Ribonucleasa
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ARNr	Ácido ribonucleico ribosomal
ARNt	Ácido ribonucleico de transferencia
ATCC	"American Type Culture Collection"
ATM	Cinasa relacionada a ataxia telangiectasia mutada
ATR	Cinasa relacionada a ataxia telangiectasia y Rad-3
BSA	Albúmina sérica de bovino
CAK	Cinasa activadora de cinasas dependiente de ciclina
CCP	Vesículas revestidas de clatrina
Cdk	Cinasa dependiente de ciclina
CDKI	Inhibidores de las cinasas dependientes de ciclinas
Cip	Proteína que interactúa con cinasas dependientes de ciclina
Chk1, 2	Cinasa de punto de control 1 ó 2
CKI	Inhibidores de cinasas dependientes de ciclina
CO ₂	Dióxido de carbono
CRLR	Similar al receptor de calcitonina
DAPI	4', 6-diamidino-2-fenilindol
DG	Diacilglicerol
E2F	Factor de transcripción de genes para la entrada a la fase S
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
eIF	Factor de inicio de la traducción en eucariotas
eIF3	Factor eucariótico de inicio de la traducción 3
eIF3f	Subunidad f del factor eucariótico de inicio de la traducción 3
ER	Retículo endoplasmático
ERGIC	Transporte retículo endoplásmico-Golgi
FC	Factor de conversión de la cámara
FD	Factor de dilución

FSC	Dispersión frontal
G	Guanina
GAP	Proteínas aceleradoras de actividad GTPasa
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
GDP	Guanosin difosfato
GEF	Factore de intercambio de nucleótidos de guanina
GF	Factor de crecimiento
GPCR	Receptor acoplado a proteína G
GRK	Cinasas receptoras acopladas a proteínas G
GSK	Cinasa de la glucógeno sintetasa
GTP	Guanosina-5'-trifosfato
h	Hora
HRP	Peroxidasa de rábano
HU	Hidroxiurea
IF	Factores de iniciación
IF3	Factor de iniciación 3
INK4	Inhibidores de cinasa dependiente de ciclina 4
IP3	Inositol 1,4,5-trifosfato
IUPHAR	Unión Internacional de Farmacología Básica y Clínica
kDa	Kilodalton
Kip	Proteína inhibidora de cinasa
MEM	Medio mínimo esencial
MeOH	Metanol
MPF	Factor promotor de la mitosis
MPN	Dominio Mpr1p, Pad1p N-terminal
mTOR	Proteína blanco de la rapamicina en mamíferos
mTORC1	Complejo mTOR/Raptor sensible a rapamicina
mTORC2	Complejo mTOR/Rictor insensible a rapamicina
NaHCO ₃	Bicarbonato de sodio
OCD	Ornitina descarboxilasa
PABP	Proteína de unión al Poli(A)
PBS	Amortiguador salino de fosfatos
PBS-T	Amortiguador salino de fosfatos con tween-20
PCNA	Antígeno de proliferación nuclear
PI3K	Fosfoinositol 3 cinasa
PIP	Fosfatidilinositol fosfato
PIP2	Fosfatidilinositol 2 fosfato
PIP3	Fosfatidilinositol 3 fosfato
PLK1	Cinasa Polo 1
PLC	Fosfolipasa C
Pol	Polimerasa

PVDF	Difluoruro de polivinilideno
RA	Receptores adrenérgicos
RA α 1	Receptor adrenérgico alfa 1
RA α 1A	Receptor adrenérgico alfa 1A
RA α 1B	Receptor adrenérgico alfa 1B
RA α 1D	Receptor adrenérgico alfa 1D
Rb	Retinoblastoma
RR	Ribonucleótido reductasa
SC	Sin cambios
SCF	Skp1-Cullin-F-complejo proteínico de caja -o box-
SDS- PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico
SFB	Suero fetal bovino
SSC	Dispersión lateral
T	Timina
T-25	Frasco de cultivo celular de 25 cm ²
T-75	Frasco de cultivo celular de 75 cm ²
TBS	Solución salina tamponada con Tris
TBS-T	Solución salina tamponada con Tris y Tween-20
TM	Transmembranales
U	Uracilo
VIH	Virus de inmunodeficiencia humana

CONTENIDO

I. RESUMEN	1
II. SUMMARY	2
1. INTRODUCCIÓN	3
2. MARCO TÉORICO	6
2.1 Ciclo celular	6
2.1.1 Fases del ciclo celular	6
2.2 Control del ciclo celular	8
2.2.1 Puntos de control	9
2.3 Componentes reguladores del ciclo celular	11
2.3.1 Reguladores positivos	11
2.3.2 Reguladores negativos	14
2.4 Síntesis de proteínas	15
2.5 Complejo eIF3	17
2.5.1 Subunidad eIF3f	20
2.6 Receptores de superficie celular	23
2.6.1 Receptores acoplados a proteínas G	24
2.6.2 Estructura de los GPCR	25
2.6.3 Clasificación de GPCR	27
2.7 Proteína G, GTPasas y mecanismos de transducción de GPCR	27
2.8 Ciclo de vida de los GPCR	30
2.8.1 Trafico de retículo endoplásmico/Golgi a membrana plasmática	30
2.8.2 Regulación de los GPCR	31
2.9 Receptores adrenérgicos	33
2.9.1 Receptores adrenérgicos α	34
2.9.2 Receptores adrenérgicos $\alpha 1$	35
2.9.3 Receptores adrenérgicos $\alpha 1B$	38
3. JUSTIFICACIÓN	42
4. HIPÓTESIS	42
5. OBJETIVOS	42

5.1 Objetivo general	42
5.2 Objetivo particular	42
6. MATERIALES Y MÉTODOS	43
6.1 Cultivo celular de A549	43
6.1.1 Mantenimiento y manejo de la línea celular	43
6.1.2 Resiembra	43
6.1.3 Determinación de la concentración y viabilidad celular	44
6.2 Sincronización de la línea celular A549	45
6.3 Extracción de proteína total	45
6.3.1 Determinación de proteína total por el método de Bradford	45
6.4 Determinación del índice mitótico	46
6.5 Ensayo de Western blot	46
6.5.1 Electroforesis	46
6.5.2 Transferencia	47
6.5.3 Bloqueo e inmunodetección	47
6.6 Inmunoprecipitación e inmunodetección del complejo eIF3f-RA α 1B	49
6.7 Delimitación de las fases del ciclo celular por citometría de flujo	50
7. RESULTADOS	51
7.1 Ciclo celular de A549	51
7.1.1 Ciclo celular de A549 por índice mitótico	51
7.1.2 Ciclo celular de A549 por citometría de flujo	53
7.2 Perfil de expresión del RA α 1B con respecto al ciclo celular de A549	55
7.3 Interacción eIF3f-RA α 1B con respecto al ciclo celular de A549	59
8. RESUMEN DE RESULTADOS	61
9. DISCUSIÓN	62
10. CONCLUSIONES	65
11. REFERENCIAS	66

Índice de Figuras

1. El ciclo celular y sus puntos de control	8
2. Vía de iniciación de la traducción eucariótica	18
3. Modelos del complejo proteico eIF3	19
4. Secuencia de aminoácidos de la proteína eIF3f en seres humanos	21
5. Expresión bifásica de la proteína eIF3f	23
6. Características estructurales de los GPCR	25
7. Ciclo de activación de la proteína G	30
8. Esquema representativo del tráfico de receptores acoplados a proteínas G	32
9. Modelo para la función de la familia de receptores adrenérgicos α	34
10. Expresión de p27 ^{Kip1} al modificar la actividad de los receptores adrenérgicos $\alpha 1$	38
11. Mecanismo propuesto de transducción de señales para RA $\alpha 1B/eIF3f$	40
12. Micrografías de células en la interfase del ciclo celular y en mitosis	52
13. Perfil de la proporción de la población de células A549 en la fase M, posterior a la liberación del cultivo en la fase S del ciclo celular	52
14. Templado de citometría de flujo para ciclo celular de células A549	54
15. Análisis representativo del ciclo celular de A549 con el software FlowJo®	56
16. Perfil de distribución de las distintas fases del ciclo celular de A549 por citometría de flujo	57
17. Expresión del RA $\alpha 1B$ en cultivos A549 sincronizados	58
18. Perfil de la expresión relativa del RA $\alpha 1B$ en cultivos A549 sincronizados	58
19. Inmunodetección del complejo eIF3f- RA $\alpha 1B$ en células A549	19
20. Perfil de interacción del complejo eIF3f-RA $\alpha 1B$ con respecto al ciclo celular de A549	20

Índice de Tablas

1. Reguladores positivos del ciclo celular de mamíferos	14
2. Inhibidores de los complejos ciclina/Cdk	15
3. Subunidades de eIF3 presentes en diferentes organismos	20
4. Efecto de la estimulación de los receptores adrenérgicos $\alpha 1$ sobre la expresión de genes reguladores del ciclo celular	37
5. Anticuerpos primarios utilizados	48
6. Anticuerpos secundarios utilizados	48
7. Máximos de expresión del RA $\alpha 1B$ y de formación del complejo eIF3f-RA $\alpha 1B$	61

I. RESUMEN

Introducción: Los receptores adrenérgicos (RA) pertenecen a la familia de receptores acoplados a proteínas G heterotriméricas. El RA $\alpha 1B$, una proteína de membrana plasmática que participa en la vasoconstricción y proliferación celular, puede funcionar como un protooncogen cuando se altera su acoplamiento con la proteína G. Cuando se estimula al RA $\alpha 1B$ con una catecolamina, como epinefrina, se altera la expresión de varios genes reguladores del ciclo celular; específicamente, se da un aumento en la expresión de genes involucrados en la transición G1/S del ciclo celular, provocando la desregulación del mismo. Estudios demuestran que la subunidad f del factor eucariótico de iniciación 3 (eIF3f) interactúa físicamente con el RA $\alpha 1B$. La síntesis de eIF3f también está relacionada con el ciclo celular, está circunscrita a puntos específicos como a la transición G2/M, a la fase S y, en menor medida, a la fase G1 temprana. Sin embargo, se desconoce la función de la interacción eIF3f-RA $\alpha 1B$ y si está involucrada en el control de la división celular, por lo que resulta interesante estudiar la dinámica de interacción de estas dos proteínas durante las distintas fases del ciclo celular. **Objetivo:** Determinar el perfil de expresión del RA $\alpha 1B$ y la interacción de éste con eIF3f durante el ciclo celular de células humanas A549. **Materiales y métodos:** Como modelo de estudio se utilizó la línea celular A549, proveniente de un adenocarcinoma pulmonar humano. Se delimitaron las distintas fases del ciclo celular por índice mitótico y por citometría de flujo utilizando cultivos sincronizados. Para determinar el perfil de expresión del RA $\alpha 1B$ durante las distintas fases de ciclo celular se utilizaron los mismos cultivos sincronizados y la expresión relativa se obtuvo por Western Blot en condiciones desnaturizantes. La determinación del perfil de interacción del RA $\alpha 1B$ con eIF3f durante el ciclo celular se realizó de manera similar, pero en condiciones nativas, inmunoprecipitando el complejo con anti-eIF3f, resolviendo en un gel desnaturizante e inmunodetectando con anti-RA $\alpha 1B$. **Resultados:** Los resultados indican que el RA $\alpha 1B$ no presenta una expresión constitutiva, sino que fluctúa mostrando mayor expresión en las transiciones de las fases G1/S, S/G2 y M/G1, y en la fase M del ciclo celular. Esto sugiere que la expresión del RA $\alpha 1B$ está relacionada al ciclo celular. Respecto a la interacción del RA $\alpha 1B$ con eIF3f durante el ciclo celular, estas interacciones sólo se presentan en las transiciones G1/S, S/G2 y M/G1.

Palabras clave: Receptor adrenérgico alfa 1B, eIF3f, ciclo celular, receptores acoplados a proteína G, receptores adrenérgicos.

II. SUMMARY

Introduction: Adrenergic receptors (AR) belong to the family of heterotrimeric G protein-coupled receptors. AR α 1B, a plasma membrane protein that participates in vasoconstriction and cell proliferation, may function as a proto-oncogene when its coupling to G protein is altered. When RA α 1B is stimulated with a catecholamine, such as epinephrine, the expression of several cell cycle regulatory genes is altered; specifically, there is an increase in the expression of genes involved in the G1/S transition of the cell cycle, causing its deregulation. Studies show the eukaryotic translation initiation factor 3, subunit f (eIF3f) physically interacts with AR α 1B. The synthesis of eIF3f is also related to the cell cycle, its expression is circumscribed to specific moments of the cell cycle, such as the G2/M transition, the S phase, and in a lesser extent, the early G1 phase. However, the function of the eIF3f-AR α 1B interaction and its involvement in the control of cell division are unknown. Therefore, it is interesting to study the interaction dynamics of these two proteins during the different phases of the cell cycle. **Objective:** To determine the expression profile of AR α 1B and its interaction with eIF3f during the cell cycle of human A549 cells. **Materials and methods:** A549 cell line, derived from a human lung adenocarcinoma, was used as a study model. The different phases of the cell cycle were delimited by mitotic index and by flow cytometry using synchronized cultures. To determine the expression profile of the AR α 1B during the different phases of the cell cycle, the same synchronized cultures were used and the relative expression was obtained by Western Blot, under denaturing conditions. The determination of the interaction profile of AR α 1B with eIF3f during the cell cycle was achieved in a similar manner, but under native conditions, immunoprecipitating the complex with anti-eIF3f, resolving in a denaturing gel, and immunodetecting with anti-AR α 1B. **Results:** The results indicate that the AR α 1B does not present a constitutive expression; rather it fluctuates, showing greater expression in the transitions of the phases G1/S, S/G2, and M/G1, as well as in the M phase of the cell cycle. This suggests that the expression of AR α 1B is related to the cell cycle. Regarding the interaction of AR α 1B with eIF3f during the cell cycle, these interactions only occur in transitions G1/S, S/G2, and M/G1.

Key words: Alpha 1B adrenergic receptor, eIF3f, cell cycle

1. INTRODUCCIÓN

Todos los organismos están formados por una o más células. La célula es la unidad básica estructural y funcional de todo ser vivo. La célula está delimitada por una membrana formada por lípidos, proteínas y, en menor medida, por glúcidos. La relación de los componentes de la membrana puede variar con respecto a la identidad de ésta. En la membrana celular encontramos proteínas que están embebidas en su bicapa lipídica y se extienden de un lado al otro de las mismas, estas proteínas se conocen como proteínas receptoras o receptores de superficie celular, como los receptores asociados a canales iónicos, los asociados a proteínas G y los asociados a enzimas. Estos receptores se caracterizan por detectar una señal extracelular que desencadena señales internas en la célula, tanto activadoras como inhibitorias de distintos procesos celulares. Así, estos receptores le confirieren a la célula la capacidad de recibir, transmitir y responder a señales externas mediante el proceso conocido como transducción de señales. Las células utilizan diferentes vías de señalización para regular sus procesos celulares. En procesos celulares interrelacionados, participan varias vías de señalización que están interconectadas, formando redes complejas. Durante la activación, la señal puede viajar en algunas vías de señalización particulares por una ruta preferencial o ruta canónica, o eventualmente por una ruta alterna o ruta no-canónica (Valdespino-Gómez *et al.* 2015).

En el contexto intracelular, una biomolécula específica provoca la activación particular de una vía de señalización intracelular por la interacción directa de proteína-proteína, o por sus modificaciones covalentes como fosforilación y acetilación. Esta activación requiere una adecuada coordinación de sus componentes en espacio y tiempo. Las vías de señalización intracelular regulan un sin número de complejos procesos, como el desarrollo, la proliferación, la diferenciación, la respuesta al estrés, apoptosis, etc. En el proceso de proliferación celular, las células se reproducen a sí mismas por crecimiento intracelular para luego dividirse en dos copias iguales. Esto implica que la célula requiere como mínimo incrementar su biomasa y replicar su genoma. En sí, la proliferación celular es un proceso altamente regulado e irreversible que responde a necesidades específicas del organismo. La activación de la división celular se da en gran parte por diferentes

factores de crecimiento (GF) que activan a las células de la interface del ciclo celular a que incrementen su masa celular, repliquen su genoma y se dividan. Es decir, los GF activan vías de señalización anabólicas que resultan en el aumento en la biosíntesis de macromoléculas requeridas para el proceso de división celular. Alteraciones en la regulación de las vías de señalización conducen a una activación de la respuesta celular inadecuada y al inicio de muchas enfermedades (Valdespino-Gómez *et al.* 2015). Por lo anterior, es de suma importancia dilucidar la función de biomoléculas que controlen el ciclo celular o ejerzan efectos sobre las vías de señalización que regulan el proceso de proliferación, así como, dilucidar vías de señalización intracelulares que permitan comprender los mecanismos moleculares involucrados en la proliferación celular.

La familia de receptores adrenérgicos $\alpha 1$ (RA $\alpha 1$), conformada por tres miembros ($\alpha 1A$, $\alpha 1B$ y $\alpha 1D$), participan en la regulación del ciclo celular (González-Cabrera *et al.* 2004); sin embargo, se sabe poco sobre los mecanismos moleculares involucrados. González-Cabrera y colaboradores (2004) encontraron que cuando se estimula a estos receptores con catecolaminas se altera de manera diferencial la transcripción de varios genes reguladores del ciclo celular, como son las ciclinas E, D1 y B, las cinasas dependientes de ciclina (Cdk) Cdk2 y Cdk1, el antígeno de proliferación nuclear (PCNA), el promotor de Cdc2, los inhibidores de cinasas dependientes de ciclina (CKI) p27Kip1 y p21Cip1, y las ADN polimerasas I-IV. En el caso específico del RA $\alpha 1B$, el resultado de la estimulación por catecolaminas fue un aumento en la expresión de genes involucrados en el avance del ciclo celular, causando así una desregulación del ciclo celular y de la proliferación celular. Es decir, la activación del RA $\alpha 1B$ por catecolaminas se sugiere estar involucrada en la degradación de inhibidores de complejos ciclina/Cdk en la fase S, estimulando la progresión del ciclo celular; para los RA $\alpha 1A$ y $\alpha 1D$ se produjo la detención del ciclo celular en la fase G1/S. Por otro lado, Gutiérrez-Fernández y colaboradores (2015) reportaron que el RA $\alpha 1B$ interacciona físicamente con la subunidad f del factor de iniciación eucariótico 3 (eIF3f) formando un complejo proteico estable. Se ha reportado que eIF3f es esencial para la proliferación celular y que su expresión proteica presenta máximos en las fases S y M del ciclo celular (Higareda-Mendoza y Pardo-Galván 2010). Por lo anterior, es que se genera la necesidad de

estudiar la expresión del RA α 1B y su interacción con la proteína eIF3f durante las distintas fases del ciclo celular, donde pudieran estar actuando como un enlace regulador en la transducción de señales de la proliferación y/o el control de la síntesis de proteínas.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Ciclo celular

La célula es considerada la unidad básica de la vida, procede de otra célula preexistente y se origina por la división de esta última. La célula se divide a través de una serie ordenada de procesos denominados ciclo celular; en él la célula aumenta su tamaño, duplica su material genético y, al final del proceso, se divide en dos células hijas. El ciclo celular es un proceso que está controlado por una serie de proteínas y moléculas de tipo interno como las ciclinas, las proteínas cinasas y los inhibidores de proteínas cinasas, o de tipo externo como los factores de crecimiento y hormonas. Los procesos coordinados por estas moléculas son el crecimiento celular, la replicación del ADN y la correcta división celular, entre otros. (Valdespino-Gómez *et al.* 2015)

El ciclo celular es la base para la reproducción de los organismos. Su función no es solamente originar nuevas células, sino asegurar que el proceso se realice en forma debida y con la regulación adecuada. La visión global del ciclo celular permite observar cómo la célula transcurre de manera ordenada y sin discontinuidad por dos grandes etapas o fases bien diferenciadas: la fase M y la interfase. La fase de mitosis se divide en profase, prometafase, metafase, anafase, telofase y citocinesis (Lomanto *et al.* 2003).

La interfase se divide en las fases G1, S y G2. Durante la interfase, la célula se prepara para la siguiente división duplicando su tamaño (aumentando todo su contenido, p. ej., de proteínas, ARN, organelos y membranas) y su material genético (ADN), antes de dividirse en dos células hijas. Cuando las células dejan de proliferar, ya sea debido a señales antimitogénicas o a la ausencia de una señalización mitogénica adecuada, salen del ciclo y entran en un estado de reposo, en el que no se dividen, conocido como G0. (Lomanto *et al.* 2003)

2.1.1 Fases del ciclo celular

La fase G1 es la brecha entre el final de la citocinesis de una división previa y el comienzo de la fase S, durante la cual ARNs y proteínas son sintetizados, produciendo la

masa necesaria para sostener la bipartición celular. Durante la fase G1 la célula sintetiza la mayor cantidad de organelos (Barnum y O'Connell 2014, Poon 2016, Wenzel y Singh 2018). En G1 tardía se presenta el primer punto de control, llamado "Punto de Restricción" en mamíferos y "START" en levadura. Algunas células comienzan nuevamente el ciclo celular en esta fase, después de un periodo de división.

En la Fase S se produce la replicación del ADN y cada cromosoma se duplica, convirtiéndose en dos cromátidas hermanas. Conjuntamente, en esta fase se activan genes para sintetizar proteínas requeridas en el empaquetamiento del ADN. (Barnum y Connell 2014, Poon 2016, Wenzel y Singh 2018)

La fase G2 se caracteriza por la síntesis de proteínas necesarias para la progresión a la 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, así como la síntesis de factores reguladores para la fase M. Igualmente, ocurren modificaciones estructurales de la cromatina que facilitan la condensación de los cromosomas. 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. (Barnum y Connell 2014, Wenzel y Singh 2018)

La fase M o mitosis es el proceso de división celular. Durante la mitosis la envoltura del núcleo se descompone, los contenidos del núcleo se condensan formando cromosomas visibles y los microtúbulos se reorganizan formando el huso mitótico que finalmente separará los cromosomas. Esta fase se subdivide en diferentes etapas: la profase, donde la cromatina se condensa hasta formar los cromosomas, se dejan de observarse los nucléolos y aparece el huso mitótico; la prometafase, donde comienza a romperse la membrana nuclear; la metafase, donde los cromosomas se alinean en plano ecuatorial; la anafase, donde los cromosomas se dividen por sus centrómeros y son separados en cromátidas hacia los polos opuestos de la célula; y la telofase, donde comienzan a descondensarse los cromosomas y se forman membranas nucleares para delimitar dos núcleos. Estas etapas culminan con la citocinesis, la cual implica la división de la célula en dos células idénticas. (Herráez *et al.* 2012, Barnum y Connell 2014, Wenzel y Singh 2018)

2.2 Control del ciclo celular

El ciclo celular está controlado por numerosos mecanismos que aseguran la correcta división de la célula. Los puntos de control en el ciclo celular son mecanismos de vigilancia que monitorean el orden, la integridad y la fidelidad de los principales eventos del ciclo celular. Éstos incluyen el crecimiento apropiado de la célula, la replicación e integridad de los cromosomas y su segregación precisa en la mitosis. 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. Para reducir al mínimo este tipo de errores se supervisa el progreso de la célula en al menos cuatro puntos de control bien definidos (Fig. 1). (Poon 2016, Barnum y O’connell 2014, Wenzel y Singh 2018)

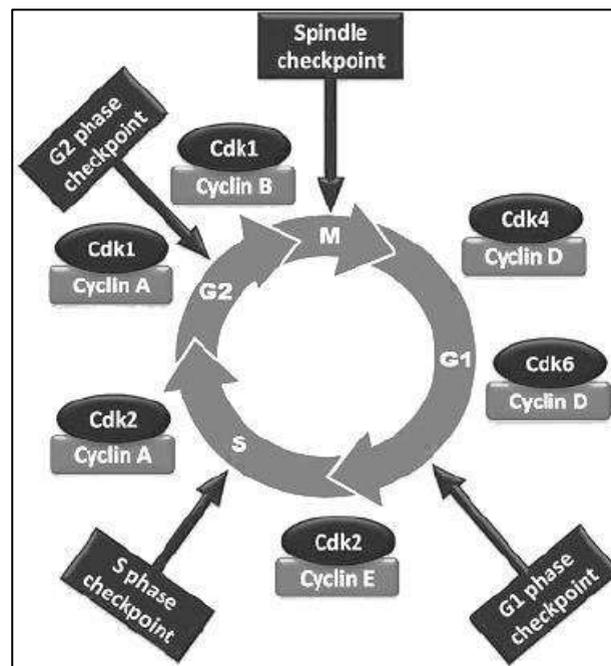


Figura 1. El ciclo celular y sus puntos de control. Las ciclinas se sintetizan individualmente y se degradan en una forma distintiva de fase, se unen y activan Cdk's específicas que coordinan la progresión secuencial de las fases del ciclo celular. Hay cuatro puntos de control principales, uno en cada fase del ciclo celular, responden a diferentes tipos de "agravios" de ADN y promueven la detención del ciclo celular para dar lugar a la reparación del daño del ADN. (Spoerri *et al.* 2015)

2.2.1 Puntos de control del ciclo celular

Punto de control en G1/S: ubicado al final de la fase G1, justo antes de entrar en la fase S. También se le conoce como punto R o de restricción en mamíferos. Es un instante crucial del ciclo, en el cual la célula decide si debe o no avanzar hacia la mitosis o si entra a G0. Esto depende de la integración de diferentes señales extracelulares y la suficiencia de nutrientes. Así, si la célula sufre privación de factores del crecimiento o se dan señales inhibitorias del ciclo celular, la célula sale del ciclo; por otro lado, si los nutrientes son suficientes, la masa celular incrementa y se continúa el ciclo celular.

La progresión del ciclo celular es activada directamente por una serie de heterodímeros formados por las ciclinas y las Cdk's. La decisión de una célula para entrar a la fase S está estrechamente controlada por el complejo ciclina D/Cdk4/6 y los complejos ciclina E/Cdk2, seguido del complejo ciclina A/Cdk2 a lo largo de la fase S. La progresión de la fase G1 a S también está regulada por la proteína de retinoblastoma (Rb), una proteína supresora de tumor que desempeña un papel fundamental en el control negativo de ciclo celular. La proteína Rb inhibe la expresión de los genes necesarios para la entrada en la fase S a través del secuestro de los factores de transcripción de la familia E2F. La ciclina D, al formar un complejo con las cinasas dependientes de ciclina Cdk4 o 6, activa la acción de la cinasa cuyo sustrato principal es la proteína Rb, a la cual fosforila. El complejo ciclina E/Cdk2 hiperfosforilan a Rb al final de G1, liberando a E2F y permitiendo así la expresión de genes que darán continuidad al ciclo. (Barnum y O'Connell 2014, Poon 2016, Wenzel y Singh 2018)

Punto de control en S: la progresión de S a G2 es controlada por complejos Ciclina-Cdk, junto con otras proteínas como la cinasa Polo 1 (PLK1, por sus siglas en inglés Polo-like kinase 1) y las cinasas Aurora (Aurora A y Aurora B). Adicionalmente, el daño al ADN es percibido por proteínas especializadas que detienen la progresión del ciclo celular en G1, S o G2. Los puntos de control están regulados por la cinasa 2 (Chk2, por sus siglas en inglés, checkpoint kinase 2) y p53 en G1 y por la cinasa 1 (Chk1, por sus siglas en inglés, checkpoint kinase 1) en S o G2. Existen diferentes tipos de daño al ADN los cuales pueden activar a diferentes puntos de control, afectando la actividad de los complejos

Cdk. Dependiendo del tipo de daño al ADN, las proteínas cinasas ATR (por sus siglas en inglés, Ataxia Telangiectasia and Rad-3 related) o ATM (por sus siglas en inglés Ataxia Telangiectasia Mutated) fosforilan y activan a Chk1. Chk1 es un mediador esencial del daño al ADN, permitiendo la detención del ciclo celular en la fase S y G2 hasta que culmine el proceso de reparación. (Otto y Sicinski 2017)

Punto de control G2/M: ocurre al final de G2, antes del inicio de la mitosis. La progresión de G2 a M también es controlada por complejos ciclina/Cdk, junto con otras proteínas como PLK1, Aurora A y Aurora B. En este punto se evita que las células inicien la mitosis si éstas sufren un daño en su ADN durante esta fase o en fases previas (G1 o S) (Kastan *et al.* 2004). Este punto está regulado principalmente por el factor promotor de la mitosis (MPF, por sus siglas en inglés, formado por ciclina B/Cdk1). Después de que la ciclina B es sintetizada y se une a Cdk1 para su completa activación, requiere ser fosforilada en el residuo de Tre161 por CAK (por sus siglas en inglés, Cdk activating kinase). Sin embargo, para evitar una entrada prematura en mitosis, el complejo es mantenido en estado inactivo mediante su fosforilación en Tre14 por la cinasa Myt1 y en la Tir15, por la cinasa Wee1. Una vez verificada la completa y correcta replicación y la presencia de todos los componentes 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 activada, teniendo así lugar la mitosis (Farías y Pardo, 2005).

Punto de control del ensamblaje del huso: este punto de control se ejerce durante la mitosis. Se ha demostrado que la ubiquitin ligasa APC/C es indispensable para la transición rápida e irreversible de la metafase a la anafase. La APC/C funciona mediante la degradación de dos proteínas, securina y ciclina B. La ubiquitinación del inhibidor de la anafase, llamado securina, mediante la actividad de la ubiquitin ligasa de APC tiene como resultado la degradación proteolítica y la activación de la separasa. La separasa, con su actividad proteasa, escinde los anillos de cohesina para separar las cromátidas hermanas, estableciendo el inicio de la anafase (Wild y Matos 2016, Lim *et al.* 2016)

2.3 Componentes reguladores del ciclo celular

2.3.1 Reguladores positivos

El ciclo celular eucariótico está regulado por la activación temporal de diferentes complejos de Cdk y ciclina, también conocidos como reguladores positivos. Éstos, al asociarse y formar el complejo ciclina/Cdk, son los componentes centrales de la maquinaria que impulsa la progresión del ciclo celular (Hydbring *et al.* 2016).

Las ciclinas son una familia de proteínas implicadas en la regulación del ciclo celular, estructuralmente identificadas por regiones conservadas denominadas "caja de ciclina". La caja de ciclina tiene aproximadamente 100 aminoácidos de longitud y está localizada en la porción media de cada ciclina. Si bien la secuencia de aminoácidos precisa de la caja de ciclina varía de miembro a miembro de la familia, existe un motivo altamente conservado en todas las cajas de ciclina. Las ciclinas son subunidades reguladoras de los complejos ciclina/Cdk y este complejo controla la progresión a través de los puntos de control del ciclo celular mediante la fosforilación de residuos serina o treonina y la inactivación de sustratos diana (Golias *et al.* 2004). Son llamadas ciclinas porque se someten a un ciclo de síntesis y degradación en cada ciclo celular. De acuerdo a su expresión y funciones en el ciclo, las ciclinas se dividen en cuatro clases. Tres de estas clases están directamente involucradas en el control de eventos del ciclo celular, estas son las ciclinas G1/S, las ciclinas S y las ciclinas M. La cuarta clase, las ciclinas G1, controlan la entrada al ciclo celular en respuesta a factores de crecimiento extracelulares o mitógenos (Yang 2012).

Las ciclinas G1 están compuestas por las ciclinas de tipo D, que incluye las ciclinas D1, D2 y D3. Junto con sus asociados, Cdk4 y Cdk6, las ciclinas G1 actúan de manera temprana en la fase G1 del ciclo celular. El nivel de ciclinas G1 es bajo en la fase G0 y aumentan progresivamente con la adición de factores de crecimiento o mitógenos a las células. Los GF activan la vía MAPK/Ras/RAf/ERK para inducir la síntesis de las ciclinas D (D1, D2 y D3) y otras proteínas reguladoras positivas de mitosis (Myc y Jun). Tras a la recepción de los GF por la célula se sintetiza rápidamente la ciclina D, que persiste a lo largo de todo el ciclo de división celular. La ciclina D1 se une a Cdk4/6 para formar un complejo eficaz para activar varios sustratos requeridos para iniciar el ciclo

celular, como Myc y AP-1. La expresión de la ciclina D1 es promovida por la unión de diferentes factores de transcripción a su promotor (p. ej., AP-1, SP-1, E2F, OCT-1). Estos factores de transcripción son inducidos por la activación de las vías ERK1/ERK2 y ERK5, o las vías PI3K/Akt y Wnt/ β -catenina (u otras como NF- κ B, JAK/STAT). Algunos conjuntos de factores de transcripción, organizados en complejos funcionales como MuvB, B-Myb, FoxM1, DREAM, E2F, utilizan diferentes circuitos de retroalimentación para interactuar en tiempos diferentes con la ciclina D1 y conducir la progresión del ciclo celular en las etapas tempranas y tardía de la fase G1 (Valdespino-Gómez *et al.* 2015). Una vez sintetizada, la ciclina D1 tiene una vida media corta y se degrada proteosomalmente, evento dependiente de la fosforilación de la ciclina D1 por la glucógeno sintasa cinasa 3 β (GSK-3 β). Es decir, la disponibilidad de la ciclina D1 en la célula es controlada por un balance entre su síntesis dependiente de Ras/Raf/MAPK y la de su estabilidad dependiente de Ras/PI3K/AKT, GSK3 y SCF. Los GF previenen la degradación de ciclina D1, inhibiendo la fosforilación dependiente de GSK-3 β . La unión de la ciclina D con Cdk4/6 forma un complejo que fosforila a la proteína Rb, la cual tiene una función importante en la restricción de la transición entre las fases G1 y S del ciclo celular (Yang 2012). La fosforilación de Rb elimina el efecto inhibitorio sobre la familia de factores de transcripción E2F, lo cual conduce a la activación de la transcripción de los genes de ciclinas E y A, de la fosfatasa cdc25A que remodelan la cromatina; luego son activados los complejos ciclina E/Cdk2 y ciclina A/Cdk2 para iniciar la síntesis del ADN, mientras que la función de la cdc25A permite la activación de la ciclina B/Cdk1 para iniciar el ensamblado del huso mitótico. (Valdespino-Gómez *et al.* 2015, Yang 2012)

Las ciclinas G1/S, involucradas en la transición G1/S del ciclo celular, comprenden a las ciclinas E1 y E2 (consideradas colectivamente como ciclina E). Como se describió anteriormente, su transcripción está regulada por E2F, que es activado debido a la fosforilación estimulada por ciclina D/Cdk4/6 de Rb. La síntesis de la ciclina E aparece como un pico en la parte final de la fase G1 del ciclo celular, con lo cual la cantidad de complejo ciclina E/Cdk2 es máxima en las fases G1 tardía y S temprana. El complejo ciclina E/Cdk2 contribuye a la progresión del ciclo celular a través de fosforilar a Rb, remover a p21, p27 y p57 e iniciar la síntesis del ADN (Valdespino-Gómez *et al.* 2015); es

decir, su función no se limita al control de la transición G1/S, también está involucrado en el origen, disparo y control de la replicación del ADN. En la fase S temprana, la actividad ciclina E/Cdk2 cesa abruptamente como consecuencia de la degradación proteosómica de la ciclina E. Esto está mediado por la fosforilación de GSK-3 β y Cdk2, que estimula la ubiquitinación de la ciclina E por la ligasa EFF de SCFFbw7 (Yang 2012).

Las ciclinas S incluyen a las ciclinas A1 y A2. La ciclina A1 está restringida a los linajes de células germinales y la ciclina A2 se expresa de forma ubicua en todos los tipos celulares. En los límites G1/S se detectan niveles bajos de ciclina A2 y éstos aumentan constantemente a medida que las células comienzan a replicar su ADN, disminuyendo hasta su degradación a finales de la fase G2 del ciclo celular; es decir, la ciclina A sólo se sintetiza en las fases S y G2. En la fase S, el complejo ciclina A/Cdk2 es activado para iniciar la replicación del ADN a partir de complejos de iniciación de la replicación preformados. También se requiere el complejo ciclina A/Cdk2 para coordinar el final de la fase S, esto con la activación de la ciclina mitótica y sus Cdk's (Yang 2012).

Las ciclinas M incluyen a las ciclinas B1, B2 y B3. Durante la fase G2, las ciclinas S (ciclinas A) se degradan por proteólisis mediada por ubiquitina y se sintetizan las ciclinas M (ciclinas B); las ciclinas B también se expresan en la fase M del ciclo celular. Como consecuencia, Cdk1 (también conocido como Cdc2) se une a ciclina B para formar un complejo que es requerido para el comienzo de la mitosis. El complejo ciclina B/Cdk1 regula los eventos del ciclo celular durante la transición G2/M, así como la progresión a través de la mitosis. Esto es logrado por la fosforilación de más de 70 proteínas por los complejos ciclina B/Cdk1, aunque el número de sustratos podría ser mucho más grande. La fosforilación de proteínas diana conduce a numerosos eventos que incluyen la separación de centrosomas, la condensación de cromosomas y el desmontaje del aparato de Golgi, entre otros. Finalmente, se requiere la inactivación de los complejos ciclina B/Cdk1 para la salida adecuada de la mitosis y esta inactivación se logra por la degradación de las ciclinas B mediante ubiquitinación, que está regulada por el complejo promotor de la anafase/ciclosoma (APC/C). (Yang 2012)

Las cinasas dependientes de ciclina (Cdk's) son serina/treonina, cinasas cuyas actividades catalíticas están moduladas por interacciones con ciclinas e inhibidores de las

Cdk's. Sólo pueden ejercer su actividad enzimática cuando están asociadas con una ciclina; por ello, se las llama cinasas dependientes de ciclina o Cdk; se considera que en el complejo activo ciclina/Cdk, la subunidad catalítica es la Cdk y la subunidad reguladora es la ciclina (Lim y Kaldis 2013).

A diferencia de las ciclinas, la concentración de las Cdk's no varía de forma importante durante el ciclo celular (expresión constitutiva), aunque puede estar regulada por señales estimuladoras o inhibitoras del crecimiento. En algunos organismos existe sólo una Cdk que se une a distintas ciclinas (p. ej., levaduras) y, por tanto, que actúa tanto en el punto de control G1/S como en el de G2/M (uniéndose); mientras que en otros organismos, esas funciones se distribuyen entre varias Cdk's (p. ej., mamíferos). En humanos se han encontrado al menos 9 miembros de esta familia y, de éstos, cuatro están activos durante el ciclo celular (Tabla 1). Durante la fase G1, del ciclo celular de mamíferos, están activas Cdk4, 6 y 2; durante la fase S, Cdk2; y durante las fases G2 y M, Cdk1. (Duroní y Xion 2013, Vermeulen *et al.* 2003)

Tabla 1. Reguladores positivos del ciclo celular de mamíferos

Complejo ciclina/Cdk	Ciclina	Cinasa
Ciclinas G1/Cdk	Ciclina D	Cdk4, Cdk6
Ciclinas G1-S/Cdk	Ciclina E	Cdk2
Ciclinas S/Cdk	Ciclina A	Cdk2, Cdk1
Ciclinas M/Cdk	Ciclina B	Cdk1

2.3.2 Reguladores negativos

Los reguladores negativos del ciclo celular (Tabla 2) son los llamados inhibidores de cinasa dependientes de ciclina (CDKI). Éstos se pueden unir a complejos Ciclina/Cdk e inhibir las actividades de la Cdk (Hydbring *et al.* 2016). Los CDKI's se agrupan en dos familias, en función de su estructura, modo de acción y especificidad de sustrato: la familia Ink4 y la familia Cip/Kip.

La familia Ink4 consta de los miembros p16^{Ink4a}, p15^{Ink4b}, p18^{Ink4c} y p19^{Ink4d}; éstos comparten aproximadamente un 40% de homología entre sí y se unen específicamente a Cdk4 y Cdk6, inhibiendo su actividad catalítica; es decir, bloqueando la progresión del ciclo celular al inhibir al complejo ciclina D/Cdk4/6 (Sherr y Roberts 1999). (Quereda *et al.* 2016, Duroni y Xion 2013)

Por otro lado, los miembros de la familia Cip/Kip son capaces de unir e inhibir varios complejos ciclina/Cdk. La familia Cip/Kip está formada por p21^{Cip1}, p27^{Kip1} y p57^{Kip2} y puede unirse tanto a Cdk2 como a Cdk4/6, por lo que inhiben a los complejos de ciclinas G1 (ciclina E/Cdk2 y ciclina D/Cdk4/6). Como resultado de la inhibición, estos CDKI's previenen la fosforilación de la proteína Rb causando la detención del ciclo celular en la fase G1 (Quereda *et al.* 2016, Duroni y Xion 2013). Sin embargo, esta familia no limita su acción a sólo estos complejos de ciclinas G1, sino que pueden unirse a la mayoría de los complejos de ciclina/Cdk (Nakayama y Kitagawa 1999).

Tabla 2. Inhibidores de los complejos ciclina/Cdk

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

2.4 Síntesis de proteínas

Uno de los mecanismos celulares que está estrechamente relacionado con el flujo de la información genética es la síntesis de proteínas, o también llamado traducción. La síntesis de proteínas es un proceso de equilibrio delicado entre la velocidad y fidelidad. El

ADN es el soporte de la información genética en todos los seres vivos y está hecho de un alfabeto de sólo cuatro letras (A, T, G, C) que representan los cuatro nucleótidos. La secuencia de estos nucleótidos forma el genoma, parte del cual es traducido en forma de proteína. La información llevada por el ADN es transcrita en ARN mensajero (ARNm), también de cuatro nucleótidos (A, U, G, C). En un primer paso, los ARNm son transcritos y en un segundo paso son traducidos en aminoácidos que componen a las proteínas. La síntesis de proteínas permite el paso de un alfabeto de cuatro letras (nucleótidos) que componen al ADN y ARNm a un alfabeto de aminoácidos, que forman las proteínas necesarias para la célula. (Macé *et al.* 2015)

La traducción de ARNm a proteína en eucariotas requiere de una máquina molecular compleja y dinámica que consiste de ARNm, ARN de transferencia (ARNt), factores proteicos y ribosomas (Macé *et al.* 2015). Los ribosomas eucariontes están formados por dos subunidades distintas, compuestas ellas mismas por ARN ribosomal (ARNr) y proteínas. Éstas son la subunidad pequeña 40S, integrada por alrededor de 33 proteínas ribosomales y el ARNr 18S, y la subunidad grande 60S compuesta de 49 proteínas ribosomales y de 3 ARNr (28S, 5S y 5.8S), que al acoplarse y formar el ribosoma funcional (80S) dejan entre ambas un conducto por el cual se desliza el ARNm (Macé *et al.* 2015).

La síntesis de proteínas es un proceso cíclico que se puede dividir en iniciación, elongación, terminación y reciclaje. En la fase de iniciación se ensambla el ribosoma con el ARNt iniciador. Posteriormente tiene lugar la fase de elongación, donde se forman los enlaces peptídicos en el centro catalítico del ribosoma y finaliza con la fase de terminación. Dentro de este marco, la etapa de iniciación se considera un objetivo regulador importante. Esta etapa involucra diferentes factores de inicio de la traducción (eIF, por sus siglas en inglés *eukaryotic translation initiation factors*) y diferentes características de ARNm, los cuales tienen funciones importantes en el control de la traducción (Haimov *et al.* 2015).

La iniciación de la traducción (Fig. 2) comprende los siguientes pasos subsecuentes: I) formación del complejo ternario que contiene eIF2, GTP y el iniciador metionilARNt; II) formación de complejo de preiniciación que incluye el complejo ternario,

la subunidad ribosomal pequeña (40S) y los factores de iniciación 1, 1A, 2, 3 y 5; III) mientras tanto, el ARNm se une a eIF4 y a PABP (por sus siglas en inglés, Poly(A)-binding protein) para formar una ribonucleoproteína mensajera activada (RNPm) que es reclutada al complejo de preiniciación; IV) una vez unido el complejo de preiniciación al extremo 5' del ARNm, inicia el escaneo para localizar el codón de inicio AUG (secuencia de Kozak); V) el reconocimiento del codón de inicio desencadena la liberación de eIF1 y la conversión de eIF2 a su estado unido con GDP para detener el proceso de escaneo; VI) se disocian el eIF2 unido al GDP y eIF5, despejando el camino para la unión de la subunidad ribosomal 60S; VII) finalmente, el complejo formado sufre una hidrólisis de GTP por eIF5B, ocasionando la disociación de los factores del complejo de iniciación, dando paso a la fase de elongación. (Aitken y Lorsch 2012, Jackson *et al.* 2010)

Los eIF tienen una función importante en inicio de la traducción, son proteínas que ayudan a estabilizar la formación del complejo ribosomal alrededor del codón de inicio y proporcionan la maquinaria reguladora en la iniciación de la traducción; comprenden a eIF1, eIF1a, eIF2, eIF2b, eIF3, eIF4a, eIF4e, eIF4g, eIF4b, eIF4h, eIF5, eIF5b y eIF6. Las subunidades eIF4a, eIF4e y eIF4g forman el complejo denominado eIF4F. La mayoría de los eIF son un complejo de proteínas de varias subunidades no idénticas y la desregulaciones en su expresión por sobreexpresión, baja regulación o fosforilación conducen a la progresión oncogénica (Sonenberg y Hinnebusch 2009, Hershey 2014, Ali *et al.* 2017).

2.5 Complejo eIF3

El factor 3 de iniciación de la traducción (eIF3) humano desempeña una función central en el ensamblaje de complejos de iniciación de la traducción, como organizar la formación del complejo de preiniciación de la traducción 43S. eIF3 humano es un complejo proteico de 800 kDa que contiene 13 subunidades no idénticas, denominadas de eIF3a a eIF3m, con masas que varían de 165 a 25 kDa (Fig. 3), respectivamente. (Sun *et al.* 2011, Querol-Audi *et al.* 2013, Sanchez *et al.* 2013, Hershey 2014)

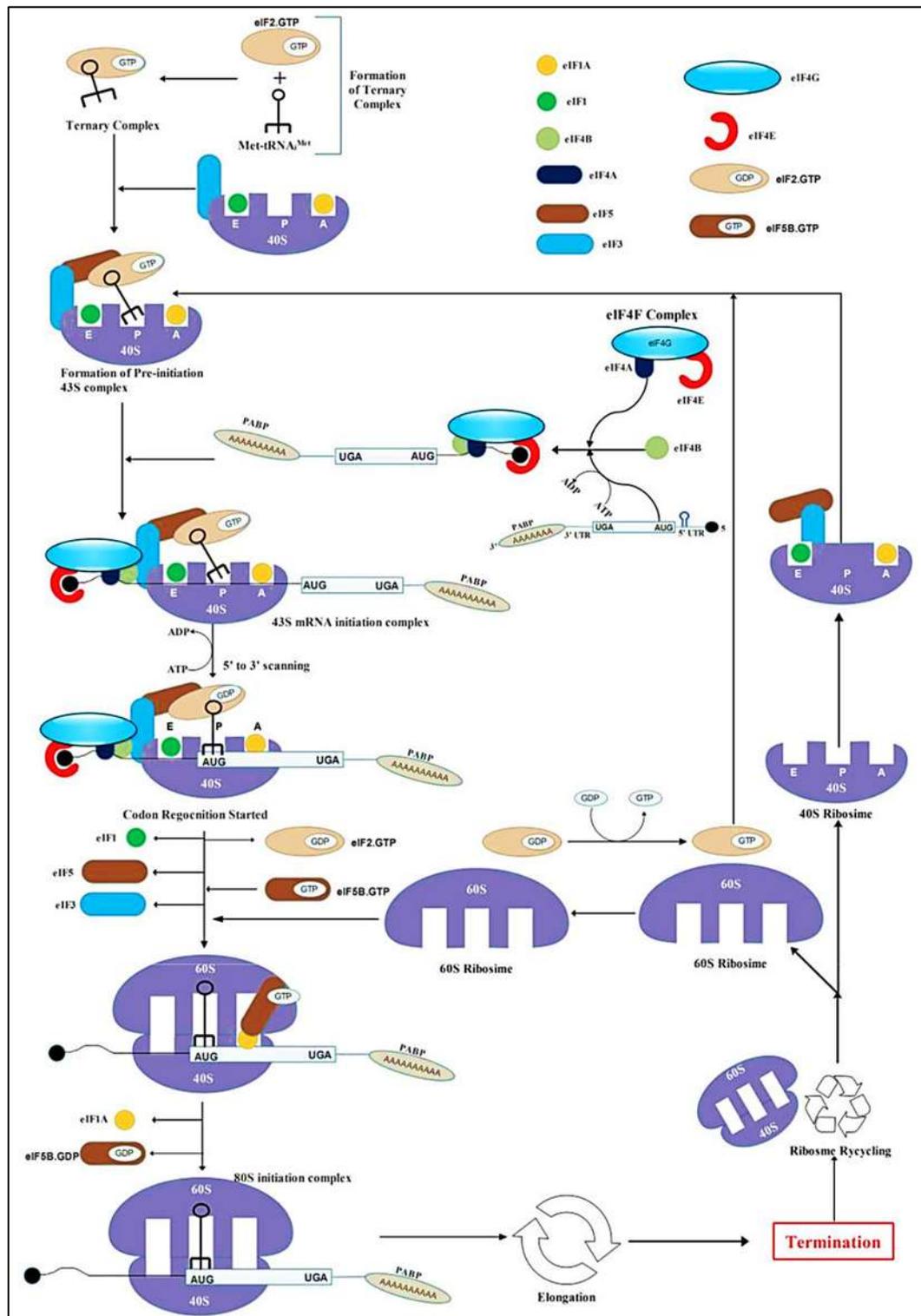


Figura 2. Vía de iniciación de la traducción eucariótica (Ali *et al.* 2017).

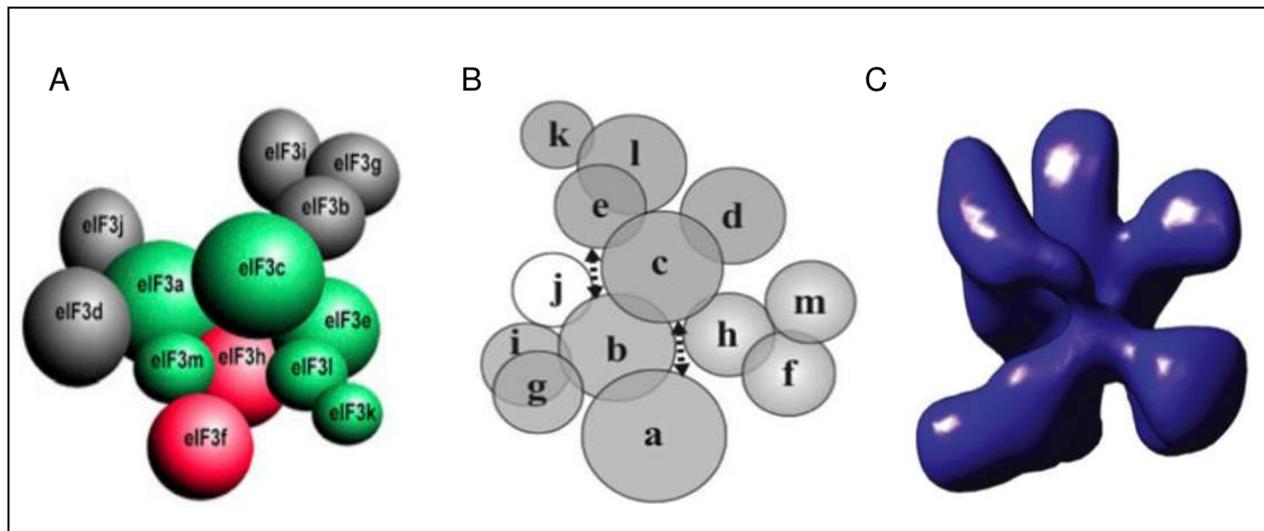


Figura 3. Modelos del complejo proteico eIF3. A) Subunidades del modelo humano de eIF3 (Querol-Audi *et al.* 2013). B) Interacciones de las subunidades de eIF3 humana determinadas por análisis espectrométrico de masas (Hershey 2014). C) Estructura de la eIF3 humana, determinada por cryo-EM a 30 Å de resolución (Hershey 2014).

Las funciones del complejo eIF3 durante el inicio de la traducción consisten en participar conjuntamente con otros factores en la disociación del ribosoma 80S, posterior a la fase de terminación de la traducción, manteniendo a las subunidades 40S y 60S en estado disociado; unir el complejo ternario a la subunidad ribosomal 40S; estabilizar la formación del complejo de preiniciación 43S; y estimular la unión del ARNm al complejo de preiniciación 43S. También se le ha relacionado con el proceso de escaneo y selección del codón de inicio (secuencia de Kozak) (Dong *et al.* 2006, Marchione *et al.* 2013, Simonetti *et al.* 2016).

El factor eIF3 ha sido purificado en diversas especies eucariotas (Tabla 3), de los cuales se han obtenido distintos números de subunidades dependiendo del organismo de donde se extrajo. En *S. cerevisiae*, eIF3 consta de 6 subunidades; sin embargo, sólo 5 subunidades (eIF3a, eIF3b, eIF3c, eIF3g y eIF3i) presentan proteínas homólogas en otras especies, tan diversas como *H. sapiens*, *S. pombe* y *A. thaliana*. Se propone que estas cinco subunidades, conservadas en todos los organismos, forman el corazón

catalítico y las subunidades restantes, que parecen ser evolutivamente divergentes, tienen funciones moduladoras en el proceso de síntesis de proteínas (Marchione *et al.* 2013).

Tabla 3. Subunidades de eIF3 presentes en diferentes organismos
(Marchione *et al.* 2013)

Subunidad	<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. pombe</i>	<i>A. thaliana</i>	<i>H. sapiens</i>
eIF3a	✓	✓	✓	✓
eIF3b	✓	✓	✓	✓
eIF3c	✓	✓	✓	✓
eIF3d	---	✓	✓	✓
eIF3e	---	✓	✓	✓
eIF3f	---	✓	✓	✓
eIF3g	✓	✓	✓	✓
eIF3h	---	✓	✓	✓
eIF3i	✓	✓	✓	✓
eIF3j	✓	---	---	✓
eIF3k	---	---	✓	✓
eIF3l	---	---	✓	✓
eIF3m	---	✓	---	✓

2.5.1 Subunidad eIF3f

La subunidad f de eIF3 está codificada por un gen antiguo y monogénico; en humanos está organizado en 8 exones y se encuentra en el cromosoma 11p15.4. Existe una segunda copia del gen en el cromosoma 2 que sólo presenta la secuencia codificante (sin intrones). La identidad entre las dos secuencias de aminoácidos es del 97%. En las líneas celulares humanas A549 y 293H se ha demostrado que la copia del cromosoma 2 no es funcional, sugiriéndose que se trata de un retropseudogen (Higareda-Mendoza y Pardo-Galván 2010). El gen eIF3f codifica a una proteína de 357 aa (Querol-Audi *et al.* 2013). La masa molecular de la proteína de eIF3f en humanos es de 37.5 kDa, sin embargo, en condiciones electroforéticas desnaturizantes (SDS-PAGE) tiene una

movilidad electroforética de 47 kDa, posiblemente por su alto contenido de prolina en la región N-terminal. Este contenido de prolina junto con la alanina (Fig. 4), abarcan aproximadamente el 63% de los aminoácidos (aa) en la región N-terminal; región que comprende del aa 1 al 91 (Gutiérrez-Fernández *et al.* 2015). En la parte intermedia de la proteína se encuentra el dominio Mpr1p, Pad1p N-terminal (MPN, por sus siglas en inglés) que abarca del aa 92 al 195 y, por contener este dominio, pertenece a la familia génica Mov34. 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 (Sanches *et al.* 2007). En el extremo C-terminal se encuentra un motivo denominado TOS que interactúa con mTOR/Raptor (Csibi *et al.* 2010).

Región N-terminal						
1	MATPAVPVSA	PPATPTPVPA	AAPASVPAPT	PAPAAAPVPA	AAPASSSDPA	AAAAATAAPG
61	QTPASAQAPA	QTPAPALPGP	ALPGPFPGGR	VVRLHPVLA	SIVDSYERRN	EGAARVIGTL
121	LGTVDKHSVE	VTNCFVSPHN	ESEDEVAVDM	EFAKNMYELH	KKVSPNEUL	GWYATGHGIT
181	EHSVLIHEY	SREAPNPIHL	TVDTSLQNGR	MSIKAYVSTL	MGVPGRTMGV	MFTPLTVKYA
241	YYDTERIGVD	LIMKTCFSPN	RVIGLSSDLQ	QVGGASARIQ	DALSTVLQYA	EDVLSGKVSA
301	DNTVGRFLMS	LVNQVPKIVP	DDFETMLNSN	INDLLMVTYL	ANLTQSQIAL	NEKLVNL
						Región C-terminal

Figura 4. Secuencia de aminoácidos de la proteína eIF3f en seres humanos. En verde se resaltan los aa de alanina y prolina de la región N-terminal; en rojo el dominio MPN y en azul el motivo TOS que está en la posición del aa 323 al 327 de la región C-terminal. (Gutiérrez-Fernández *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. Sin embargo, eIF3f es considerada como una proteína ubicua, ya que presenta características de unión proteína-proteína excepcionales, siendo capaz de interactuar con proteínas diferentes a las del complejo eIF3. Se ha reportado que la región N-terminal de eIF3f (1-91 aa) y eIF3f en su longitud

completa inhiben la replicación del VIH-1 al interferir con la edición de la región 3' del ARNm del virus y consecuentemente disminuir los niveles de mensajero (Valente *et al.* 2009, Sanchez 2013). Por otra parte, se ha demostrado que eIF3f interactúa y estabiliza a la proteína hMSH4 que participa en la reparación del ADN, esta interacción es mediada por la región N-terminal de ambas proteínas (Chu *et al.* 2013). En un modelo muscular se ha encontrado que la ubiquitin-E3 ligasa llamada MAFbx (Atrogin1/MAFbx) tiene como blanco a eIF3f; ubiquitina a eIF3f y lo degrada en el proteosoma, ocasionando una disminución global de la síntesis de proteínas que conlleva a la atrofia muscular (Lagirand-Cantaloube *et al.* 2008, Sanchez 2013). En otro escenario, el mismo grupo de trabajo reportó que eIF3f sirve como andamio entre mTORC1 y S6K1 en la vía de síntesis de proteínas. Si se incrementa la expresión de eIF3f, se incrementa la actividad de mTORC1, lo que conlleva a la fosforilación de S6K1 y 4EBP1 (inhibidor del proceso de activación de los ARNm) y como resultado se tiene el aumento en la síntesis de proteínas en un modelo muscular (Csibi *et al.* 2010, Marchione *et al.* 2013).

Estudios del grupo de trabajo han demostrado la estrecha relación entre eIF3f y el ciclo celular, en donde se cree en la posibilidad de que la función o funciones del gen eIF3f estén relacionadas al crecimiento y la división celular. En células de tabaco TBX-2 la expresión transcripcional del gen eIF3f está circunscrita a la transición G2/M del ciclo celular (Higareda-Mendoza y Pardo-Galván 2010). Asimismo, se reportó que en células humanas, la expresión de la proteína eIF3f es bifásica y circunscrita a las fases S y M del ciclo celular (Fig. 5) y que su expresión en G0 está disminuida en línea celular A-549, a nivel de ARNm y de proteína; es decir, la expresión de eIF3f está altamente regulada (Higareda-Mendoza y Pardo-Galván 2010); al sobreexpresar o silenciar al gen eIF3f se afecta al crecimiento celular y se induce apoptosis (Higareda-Mendoza y Pardo-Galván 2010). De igual manera, en el grupo de trabajo se reporta que la proteína eIF3f es fosforilada en la serina 258 por el complejo Ciclina B/Cdk1, componentes principales para la transición de la fase G2 a M del ciclo celular (Gómez-Correa 2013).

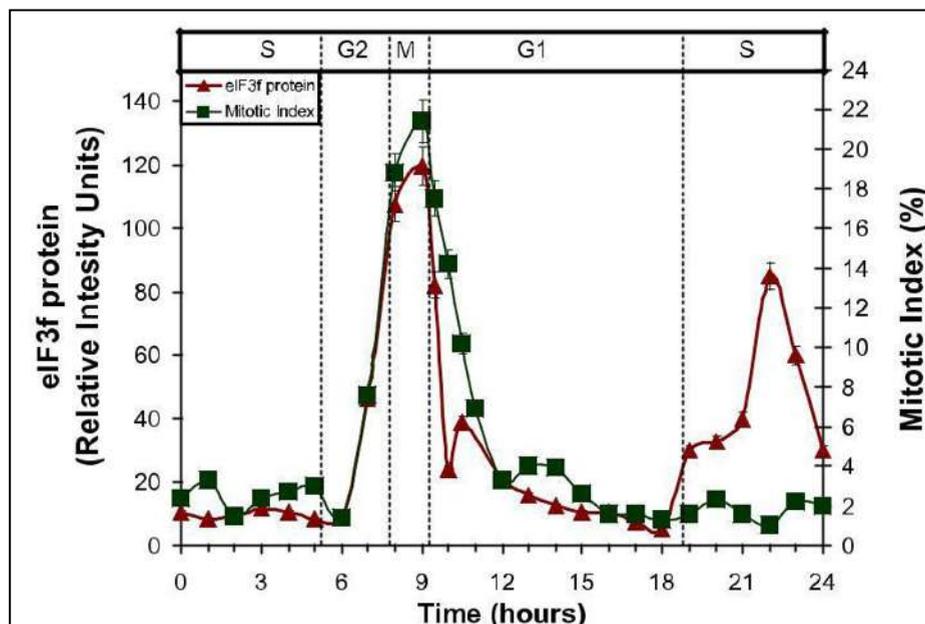


Figura 5. Expresión bifásica de la proteína eIF3f (Higareda-Mendoza y Pardo-Galván 2010).

2.6 Receptores de superficie celular

Todos los organismos han desarrollado complejos mecanismos de señalización para adaptarse al medio que les rodea, así como para asegurar la homeostasis de sus células. Una gran cantidad de procesos fisiológicos provocan respuestas celulares específicas a través de receptores de superficie, estas respuestas están controladas por vías de transducción de señales que convierten la información extracelular en funciones intracelulares, desencadenando dentro de la célula una respuesta (Sánchez-Fernández *et al.* 2014).

La transducción de señales es un proceso biológico fundamental que coordina las funciones celulares, manteniendo la homeostasia en todos los organismos. Muchas actividades celulares están reguladas por señales extracelulares generadas por agonistas (primer mensajero), los cuales son reconocidos provocando una activación de diferentes clases de receptores según sea el caso, localizados en la superficie celular; así, las proteínas de membrana (receptores) actúan como una interfaz de comunicación entre los ambientes externos e internos de la célula. De tal forma que el primer mensajero ejerce su efecto sobre la célula diana al unirse a su receptor específico, formando un complejo

ligando-receptor. A partir de esta primera unión se desencadenan una serie de procesos en la célula diana que varían en función de la naturaleza del primer mensajero, del receptor y del tipo celular al que llega el mensaje. Por tanto, un mismo mensaje puede desencadenar respuestas distintas, incluso opuestas, dependiendo de la célula diana que lo reciba (Castillo-Sarmiento 2009, Hoelz *et al.* 2013, Sánchez-Fernández *et al.* 2014).

Los receptores son moléculas de elevado tamaño, de carácter proteico, las cuales normalmente atraviesan la membrana plasmática, al menos una vez, aunque también encontramos receptores en otros órganos subcelulares (receptores intracelulares) (Castillo-Sarmiento 2009). En general, existen dos tipos de respuestas celulares ante una determinada señal en función del tipo de receptor que la recibe. Por un lado, los receptores metabotrópicos, tras la detección de la señal, interaccionan de forma compleja con una serie de proteínas, denominadas proteínas G, las cuales interaccionan a su vez con distintos sistemas enzimáticos que, en último término, producen alteraciones bioquímicas en el interior celular en los niveles de segundos mensajeros. Por otro lado, los receptores ionotrópicos constituyen canales iónicos, los cuales, como consecuencia de la unión de su ligando, podrían variar su estado funcional permitiéndose la entrada o la salida de iones, lo que variaría el potencial de membrana (Castillo-Sarmiento 2009).

2.6.1 Receptores acoplados a proteínas G

Entre las varias familias de receptores de membrana se encuentra la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G (GPCR, por sus siglas en inglés *G protein-coupled receptors*), proteínas de membrana integrales que residen en la membrana plasmática de las células eucariotas. Los GPCR comparten una arquitectura estructural común de siete dominios transmembranales (TM) y constituyen la mayor superfamilia de proteínas codificadas en el genoma humano, con más de 800 genes. Cuando se activan son responsables de transducir señales extracelulares al entorno intracelular, información proporcionada por una variedad diversa de estímulos en forma de péptidos, neurotransmisores, hormonas, olores, luz, iones, nucleótidos o aminoácidos; estos receptores actúan en conjunto con proteínas citosólicas conocidas como proteínas G que activan una cascada de señales al interior de la célula y generan una respuesta celular (Hoelz *et al.* 2013, Stewart y Fisher 2015, Grisshammer 2017).

2.6.2 Estructura de los GPCR

La estructura de un GPCR se puede dividir en tres partes, la región extracelular que consiste en el extremo N-terminal y tres bucles extracelulares (ECL1-ECL3), la región TM que consta de siete hélices α (TM1-TM7), y la región intracelular que consta de tres bucles intracelulares (ICL1-ICL3) y un extremo C-terminal (Fig. 6). En un sentido amplio, la región extracelular modula el acceso al ligando y desempeña una función importante en la accesibilidad del bolsillo de unión al ligando; la región TM forma el núcleo estructural y transduce esta información a la región intracelular a través de cambios conformacionales; la parte intracelular recibe las señales que se transduce de la región TM-7 hacia ella, donde los residuos de la región intracelular interactúan con los efectores de señalización como son las proteínas G citosólicas, las arrestinas, las cinasas receptoras acopladas a proteína G (GRK), entre otros, para iniciar vías de señal descendentes (Venkatakrishnan *et al.* 2015, Zhang *et al.* 2015).

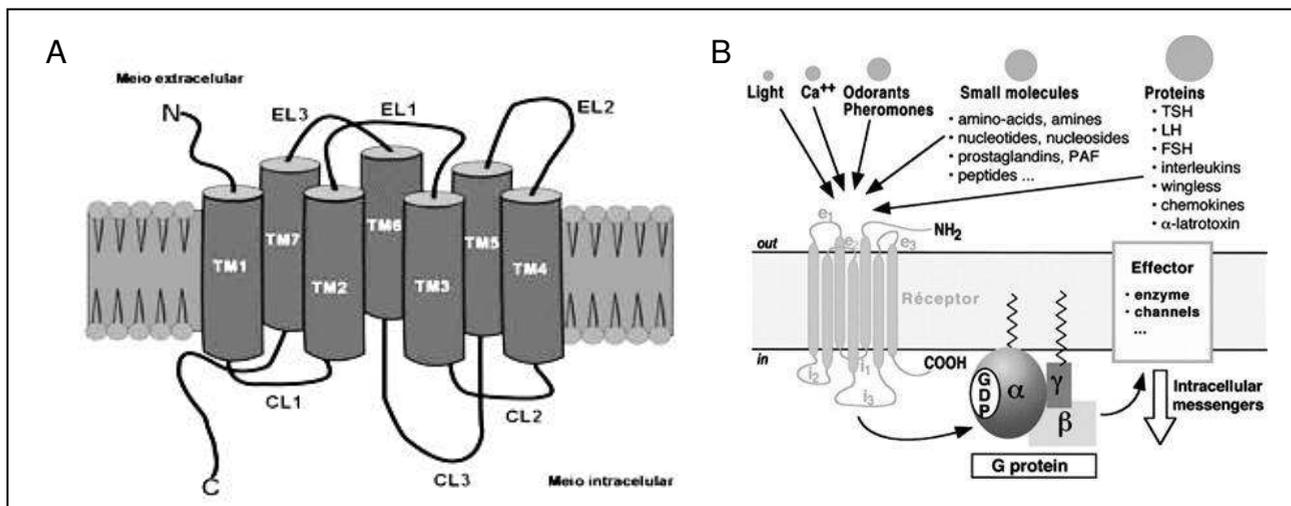


Figura 6. Características estructurales de los GPCR. A) Representación esquemática de los dominios de los GPCR. Los GPCR tienen un núcleo central común formado por siete hélices transmembrana (TM-1 a TM-7) conectadas por tres bucles intracelulares (ICL1, ICL2, ICL3) y tres bucles extracelulares (ECL1, ECL2, ECL3). B) Diversidad de señales que activan a los receptores GPCR (Hoelz *et al.* 2013, Kochman 2014).

Como anteriormente ya se ha comentado, los GPCR se encuentran involucrados en el reconocimiento y la transducción de mensajes tan diferentes como Ca^{2+} , luz, residuos de aminoácidos, nucleótidos, péptidos y proteínas. Ellos regulan (Fig. 7) la actividad de enzimas, de canales iónicos y de transporte de vesículas a través de la

catálisis del intercambio GDP-GTP en proteínas G heterotriméricas ($G\alpha\beta\gamma$) (Kochman 2014).

La comparación de las secuencias entre las diferentes proteínas de GPCR muestra que no existe una gran similitud de secuencia entre ellas. Sin embargo, tienen en común un dominio central que consiste en siete hélices transmembrana (TM1-TM7), conectado por tres bucles intracelulares (IC1-IC3) y tres bucles extracelulares EC1-EC3. Dos residuos cisteínas están presentes en EC1 y EC2 formando enlaces disulfuro, que se conservan en la mayoría de los GPCR, y que son altamente importantes para el embalaje y la estabilización de un número de conformaciones entre las siete regiones TM. Individualmente, los GPCR tienen diferente longitud y función en su dominio N-terminal, C-terminal y sus bucles intracelulares. Las siete regiones TM constituyen el dominio central de estos receptores, y un cambio en la conformación en esta región es ciertamente responsable e importante para la activación del receptor. El cambio de la inactivación a un estado conformacional activo se asocia con un cambio paralelo en la orientación relativa de TM-3 y TM-6, con una rotación del TM-6 y su separación del TM-3, que desenmascara los sitios de unión a la proteína G (Kochman 2014).

Los GPCR pueden existir y funcionar como dímeros u oligómeros. Muchas veces la dimerización y la oligomerización modulan varias funciones de GPCR, tales como la dirección de superficie celular, cooperatividad, activación, acoplamiento de proteína G, señalización e internalización. Cabe mencionar que los requisitos de dímeros o tetrámeros de GPCR para la activación de la proteína G no ha sido establecido contundentemente (Syrovatkina *et al.* 2016).

El descubrimiento de homo o heterodimerización de los GPCR hizo una revolución en los conceptos actuales de estructuras y funciones. El análisis funcional de receptores quiméricos y mutados reveló que se pueden dimerizar posiblemente a través de una interacción en TM-6. De hecho, un péptido correspondiente al TM-6 del RA $\beta 2$ inhibe tanto la dimerización del receptor como la activación, lo que sugiere que la dimerización de GPCR puede ser importante para la activación de la proteína G. Ciertos GPCR necesitan formar heterodímeros con una proteína de dominio TM, para estar

correctamente plegado, exportado a la membrana, como en el caso de CRLR (calcitonina receptor- tipo receptor) para obtener su identidad (Kochman 2014).

2.6.3 Clasificación de los GPCRs

Actualmente no existe un acuerdo global acerca de cómo organizar la clasificación de los GPCR. Las clasificaciones realizadas hasta la fecha han respondido bien a aspectos biológicos, farmacológicos o computacionales. La dificultad de su clasificación radica en que, a pesar de que la estructura tridimensional se ha mantenido a lo largo de la evolución, la secuencia primaria de estos receptores apenas se parece (Milligan 2006).

Uno de los primeros esquemas de clasificación propuesto para los GPCR y la más ampliamente utilizada es el establecido en la base de datos de la IUPHAR (de sus siglas en inglés, Unión Internacional de Farmacología Básica y Clínica, accesible en <http://www.guidetopharmacology.org>) el cual se basa para su clasificación en la homología de secuencia, dividiendo a los GPCR en seis familias: clase A (tipo rodopsina), clase B (familia de receptores de secretina), clase C (glutamato metabotrópico), clase D (receptores de feromonas de apareamiento fúngico), clase E (receptores de AMP cíclicos) y clase F (frizzled/smoothened). De éstos, las clases D y E no se encuentran en los vertebrados. Otra manera de clasificar a la superfamilia de GPCR es aquella dada por el sistema de clasificación GRAFS (representado por las iniciales de glutamato, rodopsina, adherencia, frizzled/taste2 y secretina), donde divide a los GPCR basado en la similitud de la secuencia de aminoácidos dentro de los siete segmentos helicoidales transmembrana. Divide los GPCR de vertebrados en cinco clases, superponiéndose con la nomenclatura A-F: clase A (familia rodopsina con 701 miembros), clase B (familia de la secretina con 15 miembros), familia de adhesión (24 miembros), clase C (familia del glutamato con 15 miembros) y clase F (familia frizzled/taste2 con 24 miembros. (Schiöth y Fredriksson 2005, Fredriksson *et al.* 2003).

2.7 Proteína G, GTPasas y mecanismos de transducción de los GPCR

La mayoría de los receptores acoplados a proteínas G se activan tras la unión con su agonista, el cual provoca una serie de cambios conformacionales en el receptor

capaces de promover su interacción con proteínas G, estimulando el intercambio de GDP por GTP, lo que ocasiona la disociación en dos subunidades funcionales, $G\alpha$ -GTP y $G\beta\gamma$ (Kobilka, 2007).

Las proteínas reguladoras de unión a nucleótidos de guanina heterotrimérica (proteínas G) retransmiten directamente las señales de los GPCR. Estas proteínas G están compuestas las subunidades de α , β y γ . Las subunidades β y γ están estrechamente asociadas. Las proteínas G funcionan como interruptores binarios moleculares con actividad biológica determinada por el nucleótido unido a ellas. La característica común de esta familia de proteínas es que unen nucleótidos de guanina, en concreto intercambian GDP por GTP. Tras la unión del agonista, los GPCR aumentan el intercambio del GDP vinculado a la subunidad $G\alpha$ con GTP. Esto lleva a la disociación de la subunidad $G\alpha$ del dímero $G\beta\gamma$, que resulta en dos subunidades funcionales ($G\alpha$ y $G\beta\gamma$). Ambas subunidades, $G\alpha$ y $G\beta\gamma$, señalizan varias vías celulares (Syrovatkina *et al.* 2016).

Las proteínas G se identifican por sus subunidades $G\alpha$. Basado en la secuencia de las similitudes funcionales, las proteínas $G\alpha$ se agrupan en cuatro familias: Gas, Gai, Gaq, y $G\alpha_{12}$. En la familia Gas hay dos miembros, Gas y Gaolf. Mientras Gas (s, significa estimulación) se expresa en la mayoría de los tipos de células, Gaolf (olf, representa olfacción) se expresa específicamente en las neuronas sensoriales olfativas. La familia Gai es la más grande y la más diversa e incluye a Gai1, Gai2, Gai3, Gao, Gat, Gag y Gaz. Las proteínas Gai (i, es inhibición) se han detectado en la mayoría de los tipos de células. Gao está altamente expresado en neuronas y tiene dos variantes empalmadas, GaoA y GaoB. Gat tiene dos isoformas, Gat1 que se expresa en las células de barra en el ojo, y Gat2 que está en las células de cono del ojo. Gag (g significa gustducin) se encuentra en las células receptoras del gusto y Gaz es expresada en tejidos neuronales y en plaquetas. En humanos, la familia Gaq consiste en Gaq, $G\alpha_{11}$, $G\alpha_{14}$ y $G\alpha_{16}$. Gaq y $G\alpha_{11}$ son expresadas de forma ubicua, mientras que la expresión de $G\alpha_{14}$ y $G\alpha_{15/16}$ es más restringida. $G\alpha_{14}$ se encuentra principalmente en el riñón, el pulmón y el hígado, y $G\alpha_{15/16}$ se expresa específicamente en células hematopoyéticas.

En la familia $G\alpha_{12}$ encontramos a $G\alpha_{12}$ y $G\alpha_{13}$, que se expresan en la mayoría de los tipos de células (Syrovatkina *et al.* 2016).

Además de estas subunidades $G\alpha$, las proteínas G heterotriméricas contienen subunidades $G\beta\gamma$. Hay genes 5 $G\beta$ y 12 $G\gamma$ en los genomas humanos y de ratón. $G\beta_1$, $G\beta_2$, $G\beta_3$ y $G\beta_4$ comparten altas similitudes de secuencia (entre 80 y 90%), mientras que $G\beta_5$ es ~50% similar a otras subunidades $G\beta$. Mientras que $G\beta_5$ se encuentra principalmente en el cerebro, otras subunidades $G\beta$ están ampliamente distribuidas. Las subunidades $G\gamma$ son más diversas y comparten similitudes de secuencia que van del 20% al 80%. Aunque al purificar las subunidades $G\beta\gamma$ se encuentran diferentes combinaciones de las isoformas $G\beta$ y $G\gamma$, generalmente tienen actividades bioquímicas similares en ensayos *in vitro* (Syrovatkina *et al.* 2016).

Las proteínas G funcionan bioquímicamente en un ciclo de GTPasa. Las GTPasas son interruptores moleculares que utilizan una simple estrategia bioquímica para controlar procesos celulares complejos. Estas tienen un ciclo entre dos estados conformacionales obligados, un estado activo GTP y un estado inactivo GDP. Al unirse un agonista a un GPCR, se inicia la señalización corriente abajo. Los GPCR actúan como factores de intercambio de nucleótidos de guanina (GEF), induce un cambio conformacional en la proteína G promoviendo la liberación de GDP- $G\alpha$, dando como resultado la disociación de $G\beta\gamma$ y generando un estado activo: GTP- $G\alpha$. GTP unida a $G\alpha$ y $G\beta\gamma$ libres son capaces de iniciar señales al interactuar con proteínas efectoras corriente abajo. La señalización de la subunidad $G\alpha$ finaliza con la activación intrínseca de la GTPasa ($G\alpha$) que hidroliza el GTP a GDP. Las proteínas activadoras de GTPasa (GAP), como las proteínas RGS, se unen con $G\alpha$ para acelerar la baja de la actividad GTPasa de la subunidad $G\alpha$. La señalización de $G\beta\gamma$, por otro lado, termina con su reagrupamiento $G\beta\gamma$ - $G\alpha$ -GDP. (Syrovatkina *et al.* 2016).

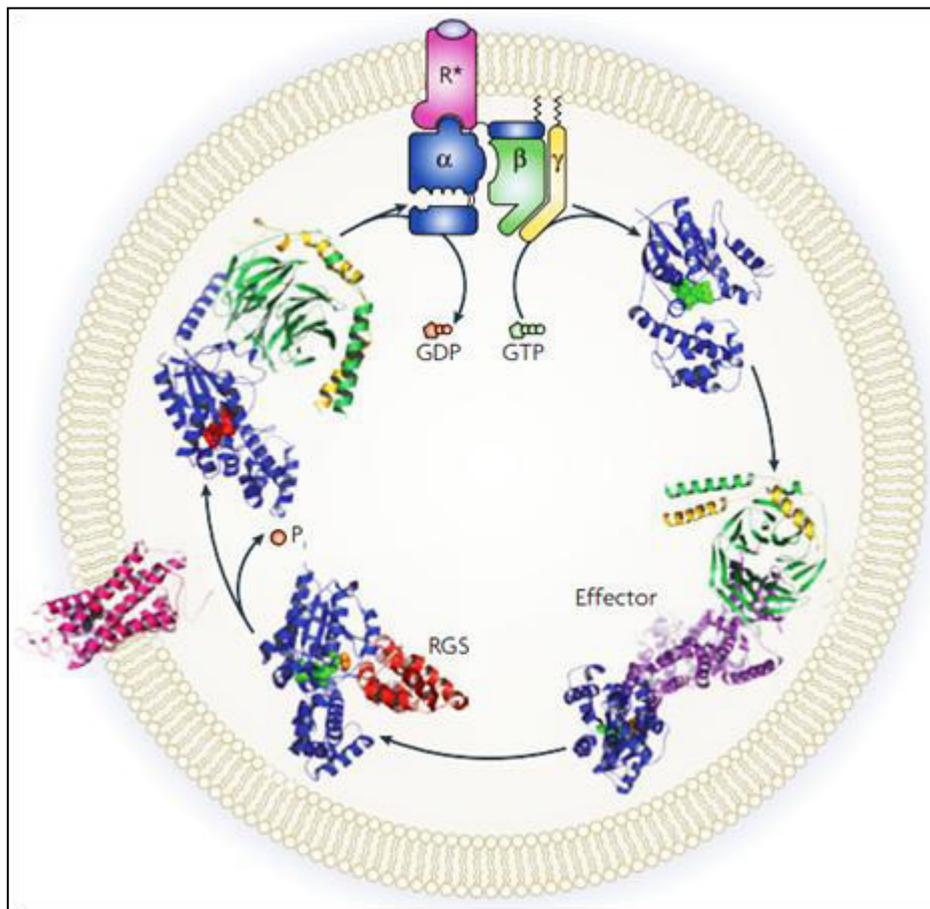


Figura 7. Ciclo de activación de la proteína G (Oldham y Hamm 2008).

2.8 Ciclo de vida de los GPCR

2.8.1 Tráfico de retículo endoplásmico/Golgi a membrana plasmática

Al igual que muchas otras proteínas de membrana, los GPCR se sintetizan y procesan en el retículo endoplásmico (ER). Las modificaciones postraduccionales, tales como glicosilación, ubiquitinación, oligomerización con otras moléculas receptoras, asociación con proteínas chaperonas accesorios y el plegamiento, tienen lugar en este compartimiento y son necesarios para la exportación. El tráfico subsiguiente a través del ER, compartimento intermedio retículo endoplásmico-Golgi (ERGIC) y aparato de Golgi facilita la maduración y su correcta orientación a la superficie de la célula. Los tres compartimentos son conocidos por actuar como un estricto sistema de control de calidad

para el mal plegamiento y la acumulación de proteínas. Este sistema de control de calidad incluye chaperones residentes de ER, como calnexin, calreticulin y miembros de la familia de la proteína disulfuro-isomerasa (p. ej., ERP-57). El sistema de control de calidad también proporciona una asociación correcta con otras proteínas chaperonas al regular el plegamiento y/o el transporte a través del ER/Golgi. Si el plegamiento de la proteína falla, el GPCR defectuoso se dirige al proteosoma para su degradación. (Jean-Alphonse y Hanyaloglu 2011)

2.8.2 Regulación de los GPCR

Una característica general de las redes de señalización ligadas a GPCR es que están ampliamente reguladas, particularmente a nivel del mismo receptor. Clásicamente, la señalización de GPCR está estrechamente reguladas por GPCR cinasas (GRK) y β -arrestinas, proteínas que interactúan y se ven implicadas en la regulación del acoplamiento de GPCR/proteína G, donde juegan un papel central en la desensibilización (desacoplamiento) de la señalización de GPCR/proteína G, endocitosis de los GPCR y resensibilización (Hislop y Von Zastrow 2011, Park *et al.* 2016).

Los mamíferos expresan siete GRK (GRK1-GRK7) y cuatro isoformas de arrestina, de las cuales GRK1, GRK7, arrestin1 y arrestin4 son específicamente localizadas al sistema visual. Las proteínas GRK (GRK2, GRK3, GRK5, GRK6) y arrestinas 2 y 3 (β -arrestin1 y β -arrestin2, respectivamente) son ubicuamente expresados (Magalhaes *et al.* 2011). Las GRK y las β -arrestinas desempeñan una función clave en la modulación funcional de los GPCR; no sólo determinan la velocidad y extensión de los procesos de desensibilización y resensibilización, sino también la naturaleza de las cascadas de señalización estimuladas por el receptor. En efecto, estas proteínas también dotan al receptor desensibilizado de nuevas capacidades de señalización al interactuar directamente con otras moléculas transductoras como c-Src, ERK1/2, PI3K, Ral GDS, etc. (Bhattacharya *et al.* 2002, DeWire *et al.* 2007).

Existen numerosos mecanismos que modulan la funcionalidad de los GPCR, actuando sobre la síntesis del receptor, su tráfico intracelular y maduración o estabilidad. Entre los mecanismos dinámicos y reversibles que determinan el estado de activación de los GPCR destacan los procesos de desensibilización o atenuación de la señalización de

receptores, tras la exposición crónica o aguda a estímulos; es decir, a un agonista (Salcedo de Haro 2007). Los GPCR pueden unirse a su ligando, que activa al receptor e inicia cascadas de señalización. La rápida internalización inducida por un ligando (agonista) contribuye a una señal aguda de terminación o desensibilización de la señalización de proteína G (Fig. 8). (Salcedo de Haro 2007)

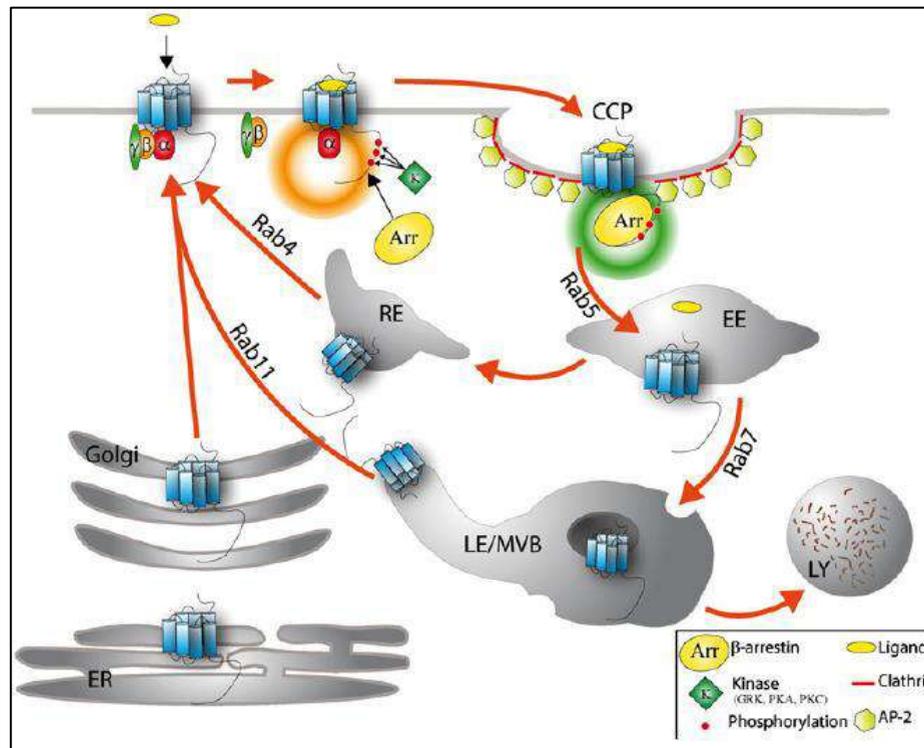


Figura 8. Esquema representativo del tráfico de receptores acoplados a proteínas G (Jean-Alphonse y Hanyaloglu 2011).

La internalización de muchos GPCR ocurre principalmente a través de vesículas revestidas de clatrina (CCP) que implican un mecanismo mediante el cual las proteínas adaptadoras de la familia arrestina, β -arrestina 1 y 2, desempeñan una función central en este modelo. La β -arrestina es reclutada del citoplasma por la fosforilación y activación de GPCR por miembros de la familia de GRK, lo que provoca el desacoplamiento del receptor de su proteína G afin. La β -arrestina también conduce al agrupamiento del receptor en CCP, a través de su capacidad para unir ambos, GPCR y proteínas CCPs; es decir, la subunidad β de la proteína adaptadora AP2 y cadena pesada de clatrina (Fig. 8). Una vez que los GPCR se concentran en CCP, la escisión de vesículas de la membrana

plasmática por la GTPasa dinamina, la cual es reclutada por el CCP, lo que resulta en la internalización de la carga al compartimento endosomal. Los receptores así internalizados son posteriormente dirigidos de nuevo a la membrana plasmática tras su defosforilación en endosomas (reciclaje o resensibilización) o marcados para su degradación lisosomal (Salcedo de Haro 2007).

2.9 Receptores adrenérgicos

Los receptores adrenérgicos (RA) pertenecen a la familia de los receptores acoplados a proteínas G (GPCR), encontrándolos en la subfamilia A según la clasificación de la IUPHAR antes mencionada (Veulens y Rodríguez 2009). La familia de RA está actualmente dividida en tres subclases de receptor distintas: β , $\alpha 2$ y $\alpha 1$. La familia de los RA incluye nueve productos diferentes de genes. De la subclase de receptores β están los receptores $\beta 1$, $\beta 2$ y $\beta 3$; de la subclase de receptores $\alpha 1$ están los receptores $\alpha 1A$, $\alpha 1B$ y $\alpha 1D$; y de los receptores $\alpha 2$ están los receptores $\alpha 2A$, $\alpha 2B$ y $\alpha 2C$.

Los múltiples efectos metabólicos y neuroendocrinos de la adrenalina y la noradrenalina (catecolaminas) están mediados por una clase de proteínas unidas a la membrana designadas como RA. Las catecolaminas activan varios mecanismos celulares de transducción de señales uniéndose a estos receptores, que a su vez activan la fijación de GTP regulatorio a las proteínas G, y que a su vez modulan efectores como adenilato ciclasa o fosfolipasa C (Strosberg 1993). La adrenalina, la noradrenalina y la dopamina son sintetizados a partir del aminoácido tirosina; contienen un grupo catecol y un grupo amino. El precursor de todos ellos es la tirosina, que se usa como fuente en las neuronas catecolaminérgicas (productoras de catecolaminas). La adrenalina y noradrenalina median las funciones del sistema nervioso simpático mediante la activación RA acoplados a proteínas G. En cuanto a la fijación de ligandos, experimentos de marcación y mutagénesis de sitio dirigido han mostrado que las regiones de ampliación de transmembrana conservadas tienen una participación crucial en la fijación de ligandos (Strader *et al.* 1994, Hutchins 1994). Estas regiones parecen crear un saco para la fijación de ligandos que colocan las catecolaminas en sentido horizontal o perpendicular

respecto a la bicapa lipídica. Cada subtipo muestra mayor preferencia por una clase particular de proteínas G, por ejemplo, los RA α_2 a Gi, los RA β a Gs y los RA α_1 a Gq.

2.9.1 Receptores adrenérgicos α

Los RA α se clasifican en α_1 que se subclasifican en α_1A , α_1B , α_1D y α_2 que de igual manera se subclasifican en α_2A , α_2B y α_2C . Los RA α_1 actúan uniéndose a las subunidades G α_q de las proteínas G, lo que provoca la activación de fosfolipasa C (PLC). La PLC convierte fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato en inositol trifosfato (IP₃) y diacilglicerol (DAG), que tienen efectos posteriores sobre el Ca²⁺ citosólico. Los RA α_2 se unen a G α_i , lo que inhibe la adenilato ciclasa y decrecen los niveles de AMP cíclico. DAG altera la actividad de la proteína cinasa C y el AMP cíclico activa la proteína cinasa A (Fig. 9). (Ziolkowski y Grover 2010)

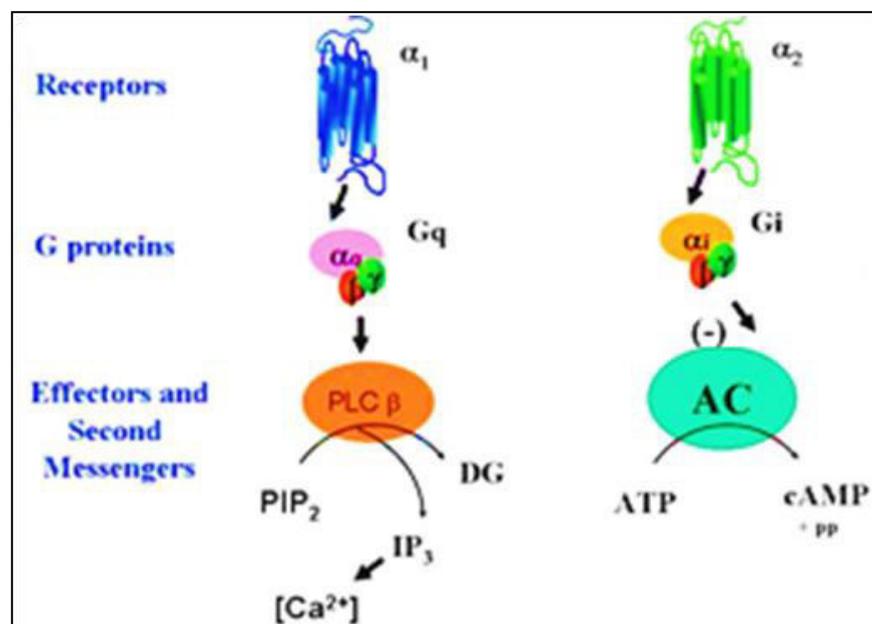


Figura 9. Modelo para la función de la familia de receptores adrenérgicos α (García-Sáinz *et al.* 2011).

Dentro de los dominios transmembrana, los tres receptores α_1 comparten una identidad aproximada de 75% en cuanto a residuos aminoácidos, al igual que los tres receptores α_2 , pero los subtipos α_1 y α_2 no son más semejantes que lo que son los subtipos α y β , aproximadamente 30 a 40% de homología (Goodman y Gilman 2007).

2.9.2 Receptores adrenérgicos $\alpha 1$

Los tres subtipos de RA $\alpha 1$ ($\alpha 1A$, $\alpha 1B$ y $\alpha 1D$) son acoplados a Gq/11. Los RA $\alpha 1$ funcionan como receptores estimuladores y cada subtipo está codificado por un gen separado y localizado en diferentes cromosomas: RA $\alpha 1A$ en el cromosoma 8, $\alpha 1B$ en el 5 y $\alpha 1D$ en el 20 (Guimarães y Moura 2001, Nalepa *et al.* 2013). El RA $\alpha 1A$ se clasificó farmacológicamente por afinidad de unión a los agonistas, como metoxamina y oximetazolina, y a antagonistas, como 5-metil urapidil, niguldipina y WB4101. Por el contrario, el RA $\alpha 1B$ tiene una menor afinidad de unión por los ligandos anteriores (Piascik y Perez 2001).

Los RA $\alpha 1$ se expresan en varios órganos, incluidos cerebro, corazón, vasos sanguíneos, hígado, riñones, próstata y bazo, en el que intervienen una gran variedad de efectos funcionales, tales como la modulación de la neurotransmisión, la vasoconstricción, inotropismo cardíaco, entre otros (Cotecchia 2010). Se le atribuye también la regulación de varias funciones centrales, incluyendo la transmisión sináptica, la plasticidad, la actividad motora, así como la atención y la memoria. Por ejemplo, se cree que la activación del RA $\alpha 1$ atenúa la excitabilidad piramidal de neuronas en el hipocampo, mientras que, en las zonas de la corteza cerebral, la activación de RA $\alpha 1$ potencia la excitación en respuesta al glutamato o acetilcolina. La activación de RA $\alpha 1$ es principalmente excitatoria en regiones como el núcleo reticular talámico, dorsal de rafe y las neuronas motoras espinosas. Estas características funcionales implican una complejidad creciente de la señalización y la regulación de los subtipos de RA $\alpha 1$ que podrían representar la base mecánica de su especificidad funcional en diversos tejidos (Cotecchia 2010).

Respecto a la regulación los RA $\alpha 1B$, que se localizan principalmente en la membrana plasmática, se desensibilizan rápidamente e internalizan en respuesta a los agonistas adrenérgicos; pero, el RA $\alpha 1A$, que está localizado tanto en la superficie de la célula como intracelularmente, muestra una tasa de internalización más lenta en comparación con el RA $\alpha 1B$. Por el contrario, el RA $\alpha 1D$ está localizado predominantemente en vesículas intracelulares, y la localización intracelular de éste en células no estimuladas puede estar relacionada con su internalización continua derivada

de su actividad constitutiva. Por lo tanto, estos estudios implican la existencia de mecanismo(s) para regular la función del RA $\alpha 1D$. Curiosamente, se ha demostrado que los subtipos del RA $\alpha 1$ forman homo y heterooligómeros. La heterodimerización, en particular, parece regular la función de RA $\alpha 1D$, como la coexpresión de $\alpha 1D$ con $\alpha 1B$. Tal interacción modifica el perfil farmacología del RA $\alpha 1D$ y el dímero $\alpha 1D/\alpha 1B$ muestra una mayor respuesta a la noradrenalina en comparación con cualquiera de los monómeros solos. El estudio descrito anteriormente y otros estudios sugieren a la heterodimerización como un mecanismo adicional para regular la respuesta fisiológica mediada por subtipos RA $\alpha 1$. Sin embargo, este fenómeno no ha sido explorado *in vivo* (Nalepa *et al.* 2013).

Muchos GPCR son capaces de desencadenar cascadas de señalización que involucran a vías diferentes, tienen un amplio impacto en varios procesos fundamentales, que incluyen la comunicación célula-célula, la regulación de la expresión génica y la proliferación celular, pero lo que respecta a esta última, las etapas del ciclo celular en las que participan han sido menos estudiadas (Choi *et al.* 2015, Zhang y Eggert 2013)

Aunque se sabe poco sobre el mecanismo molecular por el que distintos subtipos de RA $\alpha 1$ regulan la proliferación celular, en el 2004, González-Cabrera y colaboradores encontraron en fibroblastos Rat-1, cuyas vías están estimuladas por los RA $\alpha 1$, que la activación por epinefrina altera la transcripción de varios genes reguladores del ciclo celular, entre estos genes se incluyen la ciclina E, ciclina D1, ciclina B, cinasas dependientes de ciclina (Cdk2 y Cdk1), antígeno de proliferación nuclear (PCNA), promotor de Cdc2, inhibidores de cinasas dependientes de ciclina (p27^{Kip1}, p21^{Cip1}) y ADN polimerasas I-IV (Tabla 4). Estos genes son reguladores clave de la progresión del ciclo celular a través de la fase G1, la transición de las fases G1 a S (síntesis de ADN), y la progresión a través de la fase G2 antes de la mitosis (M). De acuerdo a lo mencionado anteriormente en el primer capítulo, la progresión a través de G1 se da por la formación y la activación de los complejos ciclina/Cdk, predominantemente de ciclina D/Cdk4/6 y ciclina E/Cdk2. Además de la unión de subunidades reguladoras (ciclina), la actividad de las enzimas Cdk está regulada por la fosforilación-desfosforilación y la interacción con los inhibidores de Cdk (CDKIs), incluyendo p27^{Kip1} y p21^{Cip1}. Estos últimos son reguladores

negativos de la actividad Cdk, que se unen a los complejos ciclina/Cdk y conducen a la detención del ciclo celular. Los RA α 1A y α 1D fueron encontrados como inhibidores de genes involucrados en la replicación de ADN y en el control de la progresión a través de las fases del ciclo celular y, por tanto, deteniendo el ciclo celular; en contraste, el RA α 1B, causa una desregulación a favor de la progresión del ciclo celular. (González-Cabrera *et al.* 2004).

Tabla 4. Efecto de la estimulación de los receptores adrenérgicos α 1 sobre la expresión de genes reguladores del ciclo celular (González-Cabrera *et al.* 2004).

Gen	RA α 1A	RA α 1B	RA α 1D
Ciclina E	-3.3 \pm 0.7	SC	-4.4 \pm 0.2
Cdk2- α	2.4 \pm 0.7	SC	-4.1 \pm 0.2
PCNA	-2.1 \pm 0.1	SC	-3.3 \pm 0.0
ADN pol. α -subunidad I	-2.5 \pm 0.1	SC	-2.0 \pm 0.1
ADN pol. α -subunidad II	-4.9 \pm 1.0	SC	-3.9 \pm 1.0
ADN pol. α -subunidad III	-2.6 \pm 0.5	SC	-4.2 \pm 0.2
ADN pol. α -subunidad IV	-2.6 \pm 0.1	SC	-4.2 \pm 0.1
Ciclina B	-4.0 \pm 0.1	SC	-6.7 \pm 1.0
Promotor de Cdc2	-2.4 \pm 0.3	SC	-3.5 \pm 0.1
CCND1	SC	7.3 \pm 0.4	SC
Ciclina D1	SC	4.8 \pm 0.7	SC
p27 ^{Kip1}	13.7 \pm 1.2	6.5 \pm 1.2	13.4 \pm 0.7
p21 ^{Cip1}	SC	4.7 \pm 1.7	SC

Estímulo de RA con epinefrina 10 μ M durante 1h. Los datos indican un incremento (valores positivos) o un decremento (valores negativos) en la transcripción de genes y en comparación con células no estimuladas. SC, sin cambios; Pol, polimerasa.

González-Cabrera y colaboradores (2004), al investigar la asociación de los RA con la expresión de p27^{Kip1}, se encontró que al estimular a los RA α 1A y α 1D con epinefrina, existe un aumento en la expresión de p27 en comparación con aquellas células que no entraron en contacto con la epinefrina. Por el lado contrario, al agonizar al

RA α 1B con epinefrina, se encontró una disminución en la expresión de la proteína p27 (Fig. 10).

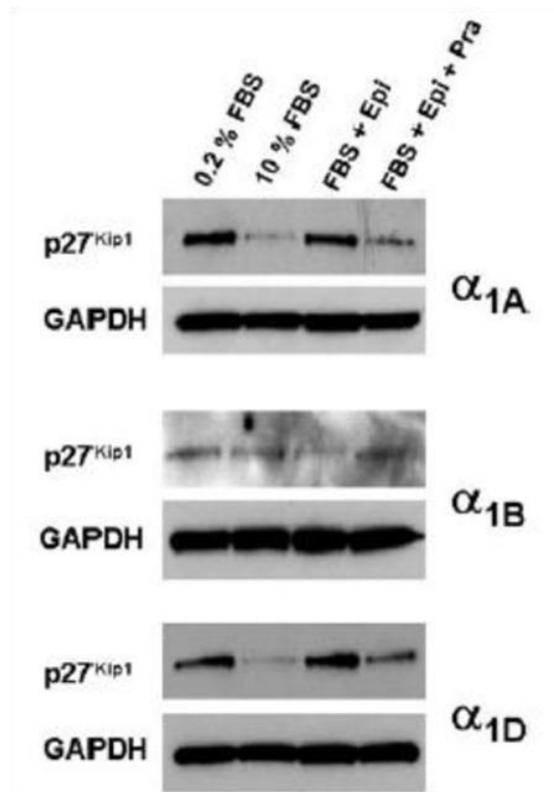


Figura 10. Expresión de p27^{Kip1} al modificar la actividad de los receptores adrenérgicos α 1. Las células estuvieron expuestas durante 48 h a distintos ambientes: Carril 1, bajo en suero fetal bovino (0.2% FBS); Carril 2, con 10% FBS; carril 3, con 10% FBS y epinefrina (10% FBS + Epi); Carril 4, con 10% FBS, epinefrina y prazosina (10% FBS + Epi + Pra). La expresión de p27 fue determinada por Western blot. Las membranas fueron “rasuradas” y detectadas con anti-GAPDH para comparar la carga de proteína.

2.9.3 Receptores adrenérgico α 1B

Los RA α 1B median muchas de las acciones de las catecolaminas naturales, pertenecen a la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G de siete dominios transmembranales y ejercen sus acciones principalmente a través de la activación de las proteínas Gq₁₁ y fosfolipasa C (PLC). La PLC convierte fosfatidilinositol 4,5-bifosfato en inositol trifosfato (IP₃) y diacilglicerol (DAG), que tienen efectos posteriores sobre la concentración de Ca²⁺ citosólico (García-Sáinz *et al.* 2011, Ziolkowski y Grover 2010).

El receptor adrenérgico $\alpha 1B$ puede funcionar como un protooncogen y ser activado por alguna alteración mutacional. La alteración mutacional en aminoácidos claves del C-terminal del tercer bucle intracelular (Arg288-Lys, Lys290-His y Ala293-Leu) son importantes para el acoplamiento de la proteína G y puede llegar a ser un mecanismo generalizado para la inducción de la actividad constitutiva de este RA y la consecuente activación de este protooncogén. *In vivo*, estas mutaciones se pueden presentar espontáneamente alterando la función normal de estos receptores y resultando en estados de enfermedades en las cuales existe un crecimiento celular incontrolado, es decir, se encuentra asociado a cáncer. Por otro lado, la identificación de mutantes en estos receptores podrían proporcionar marcadores específicos de la enfermedad y metas terapéuticas para intervención (Allen *et al.* 1991).

En 2015, Gutiérrez-Fernández y colaboradores reportaron la interacción estable de la proteína eIF3f con el RA $\alpha 1B$, formando un complejo estable de aproximadamente 120 kDa (Fig. 11) en las líneas celulares A549, HepG2, Ramos y MC3T3-E1, siendo esta última una línea celular inmortalizada de preosteoblastos normales de ratón. El dato confirma que el complejo (eIF3f- Ra $\alpha 1B$) no es específico de un tipo celular y sugiere que eIF3f podría participar en otros procesos celulares, además del inicio de síntesis de proteínas. Adicionalmente, se confirmó que la proteína eIF3f se asocia con el RA $\alpha 1B$, involucrado en proliferación celular, y que dicha asociación estimula la actividad adrenérgica.

El hecho de que eIF3f presente un perfil bifásico circunscrito a las fases S y G2/M del ciclo celular y que ahora se conozca que los RA $\alpha 1AR$ regulan la proliferación celular alterando la transcripción de varios genes reguladores del ciclo celular, sugiere que el complejo proteico formado por eIF3f y $\alpha 1BAR$ podría participar en el control del ciclo celular.

Por otro lado, un estudio mostró que, al estimular a los RA $\alpha 1$ con los agonistas fenilefrina y noradrenalina, se activa a la proteína cinasa B (Akt) mediante la fosforilación de su serina 473 (Strittmatter *et al.* 2012). La proteína Akt es una serina/treonina cinasa que tiene una función crucial en el balance celular de supervivencia o apoptosis. Akt constituye un nodo importante en diversas cascadas de señalización corriente abajo de

los receptores celulares, tiene una función importante en procesos tales como la proliferación y supervivencia celular, transcripción y síntesis de proteínas, y en la progresión a través del ciclo celular (Liao y Hung 2010).

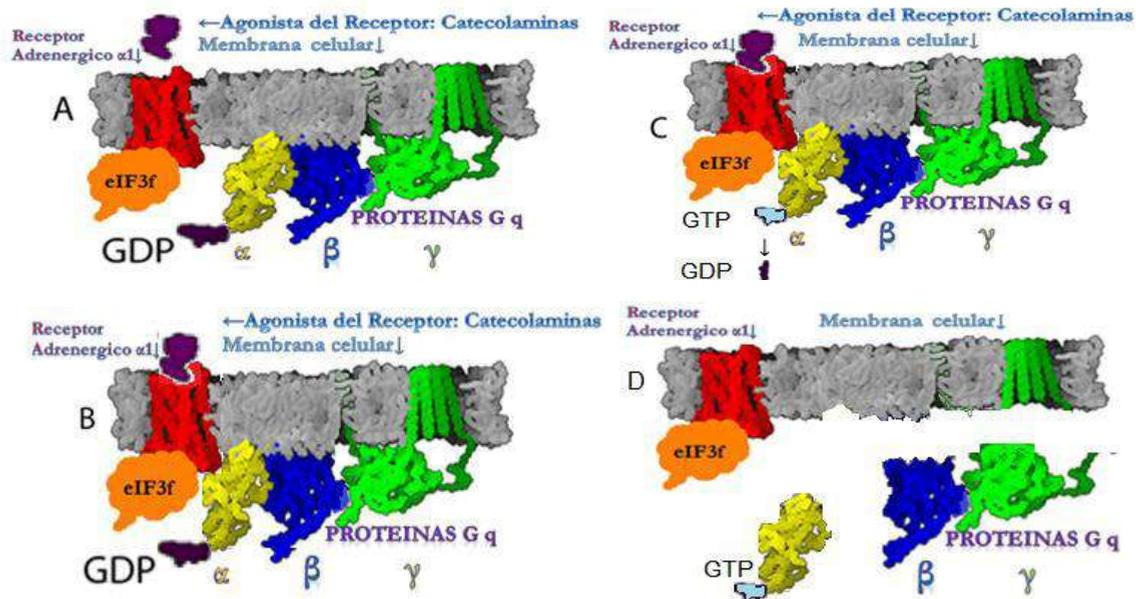


Figura 11. Mecanismo propuesto de transducción de señales para RA $\alpha 1B$ /eIF3f, por Gutiérrez Fernández *et al.* 2015. A) El receptor adrenérgico (rojo) es inactivo. eIF3f (naranja) está asociado al receptor de manera estable. La proteína Gq (amarillo) está unida a GDP. No hay transducción de señal. B) El receptor adrenérgico es activado por el agonista (negro). eIF3f al estar asociado al receptor estimula la señalización. La proteína Gq que está unida a GDP, se une al receptor. Inicia la transducción de señal. C) El receptor adrenérgico activo es estimulado por eIF3f. La proteína Gq inicia la translocación de GDP por GTP, activando y/o modulando a un segundo mensajero.

En el año 2010, Shanmugasundaram y colaboradores describieron una vía de transducción de señales que lleva como producto final la destrucción de la proteína $p27^{Kip1}$, liberando al complejo ciclina E/Cdk2 y dando progresión a la fase S del ciclo celular. La vía propuesta inicia con la activación de la proteína fosfoinositol 3 cinasa (PI3K), enzima que fosforila el grupo hidroxilo de la posición 3' del anillo inositol de las moléculas fosfatidilinositol (PIP2); y la fosforilación de PIP2, o su cambio a PIP3, activa a mTORC2 (o mTOR-2, complejo mTOR/Rictor insensible a rapamicina; mTOR, cinasa serina/treonina blanco de rapamicina de mamíferos) que controla el citoesqueleto de actina y la activación de proteína Akt. La vía de mTORC2 se encuentra regulada

entonces en células eucarióticas a través de la vía PI3K/Akt y es estimulada en respuesta a mitógenos y nutrientes.

Existe otro complejo que contiene mTOR, el complejo sensible a rapamicina también llamado complejo mTOR-1 o mTORC1, que se define por su interacción con la proteína Raptor; mTORC1 al ser activado, fosforila a los efectores S6K1 y 4EBP1 por medio de la proteína andamio eIF3f, activando la síntesis de proteínas cap dependiente.

Jiménez-Alcántar (2014) encontró que al sobreexpresar a la proteína eIF3f no existe un cambio significativo en la expresión global de Akt, pero sí un cambio significativo para su forma activa (Akt fosforilada en su serina 473). Por otro lado, al silenciar a eIF3f se vió un aumento significativo en la expresión tanto de la proteína Akt como de su forma activa, sugiriendo que la expresión de Akt y su activación son dependientes de la expresión de eIF3f. Se consideró la posibilidad de que los cambios en la concentración de Akt y Akt-Ser473 se debieran a cambios en la capacidad de síntesis de proteínas global por lo que evaluaron los cambios en la concentración de S6K fosforilada (forma activa) en condiciones de sobreexpresión y de silenciamiento de eIF3f, encontrándose que S6K activado fluctúa de acuerdo a lo ya reportado por Csibi y colaboradores (2010), donde S6K fosforilada se ve aumentada en condiciones de sobreexpresión de eIF3f y disminuida al silenciar a eIF3f. Estudios preliminares del grupo mostraron que al agonizar al RA α 1B se la actividad de S6K aumenta, sugiriendo que el RA α 1B se encuentra participando en dicha vía.

Derivado de lo antes expuesto, donde la evidencia sugiere que tanto eIF3f como el RA α 1B participan en el control del ciclo celular y que éstos interactúan físicamente formando complejo estable, nos preguntamos ¿cómo es el perfil de interacción del receptor adrenérgico alfa 1B con eIF3f durante el ciclo celular de células humanas A549?

3. JUSTIFICACIÓN

La subunidad f de eIF3 es una proteína poli-funcional, moduladora de la síntesis de proteínas, indispensable para la proliferación celular y esencial para la supervivencia de los organismos que la poseen. Se sabe que eIF3f tiene un perfil de expresión con máximos en la fase S temprana y en la fase M, que eIF3f y RA α 1B se encuentran unidos formando un complejo proteico, y que el RA α 1B altera la transcripción de varios genes reguladores del ciclo celular en la transición G1/S. Lo anterior nos sugiere que este complejo pudiera estar implicado en el control del ciclo celular a través de la transducción de señales proliferativas. Por lo anterior, es de importancia conocer el perfil de interacción de dicho complejo para profundizar en el entendimiento de los mecanismos reguladores del ciclo celular.

4. HIPÓTESIS

El RA α 1B interacciona con eIF3f durante la transición G1/S del ciclo celular.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Determinar el perfil de expresión del RA α 1B y la interacción de éste con eIF3f durante el ciclo celular de células humanas A549.

5.2 Objetivos particulares

1. Determinar el perfil de expresión del RA α 1B durante las distintas fases de ciclo celular.
2. Determinar el perfil de interacción del RA α 1B con eIF3f durante el ciclo celular.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

Para determinar el perfil de interacción del RA α 1B con eIF3f durante el ciclo celular se utilizó como modelo de estudio la línea celular A549 (ATCC® CCL185™), una línea celular adherente iniciada en 1972 a través del cultivo por explante de tejido carcinomatoso de pulmón de un varón caucásico de 58 años (Giard *et al.* 1973). Estas células epiteliales basales alveolares crecen como una monocapa *in vitro* y pueden inducir tumores en ratones inmunosuprimidos *in vivo*. Se eligió esta línea celular debido a que se determinó, en trabajos anteriores del grupo de trabajo, que posee un nivel de expresión mínimo para el subtipo RA α 1D y no expresa al RA α 1A (Jiménez-Alcántar 2014).

6.1 Cultivo celular de A549

6.1.1 Mantenimiento y manejo de la línea celular

La línea celular A549 se propaga en Medio Mínimo Esencial (MEM, por sus siglas en inglés) de Sigma-Aldrich®, suplementado con 18 mM NaHCO₃ (Sigma-Aldrich®), 2 mM L-glutamina (Sigma-Aldrich®), y suero fetal bovino (SFB) al 10% (Invitrogen™). Los cultivos se mantienen en la fase log de crecimiento a 37°C y en una atmósfera de CO₂ al 6%, realizando recambio de medio tres veces por semana. Se usa una cabina de seguridad biológica Clase II A2 (ThermoForma™) para trabajar con esta línea celular, ya que su nivel de bioseguridad es 1.

6.1.2 Resiembra

Se descarta el medio viejo del cultivo y se hacen 2 lavados con una solución salina amortiguada por fosfatos fría (PBS 1X, 1 M, pH 7.4), 2 mL por cada 25 cm² de sustrato (superficie disponible para el crecimiento de la monocapa). Para desprender las células, la superficie se impregna con una solución de tripsina-EDTA 1X (Sigma-Aldrich®), 0.5 mL por cada 25 cm², y se incuba a 37°C por 2-5 min. Se resuspenden las células con medio

MEM suplementado (2 mL por cada 25 cm²), se calcula la concentración y viabilidad celular, y se determina el volumen necesario para resembrar a una concentración de 8,000 células/cm² de superficie (0.2X10⁶ para un frasco T de 25 cm², 0.6X10⁶ células para uno de 75 cm²). Se adiciona medio de cultivo para tener un volumen final de 5 mL por cada 25 cm² y se devuelve el frasco a la incubadora, con la tapa floja para permitir el intercambio de gases.

6.1.3 Determinación de la concentración y viabilidad celular

Posterior al desprendimiento celular con tripsina y a la resuspensión en medio de cultivo, se procede a tomar un volumen conocido de la suspensión celular y se le adiciona azul de tripano (Sigma-Aldrich®) para tener una dilución 1:1. 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. 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.

La concentración celular se determina de la siguiente forma:

$$\frac{\text{No. de células} * 10^6}{\text{mL}} = (\text{Factor de conversión de la cámara}) * (\text{Factor de dilución}) * (\text{No. de células en 10 cuadros})$$

Donde:

$$\text{Factor de conversión de la cámara} = 0.001$$

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

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

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

6.2 Sincronización de la línea celular A549

La sincronización y acumulación de las células en fase S del ciclo celular se realiza en frascos T de 75 cm²; Cuando los cultivos están entre el 70 y 90% de confluencia, se añade hidroxIUrea (HU) a una concentración final de 0.8 mM (Sigma-Aldrich®). Después de 24 h de incubación, los cultivos se liberan del agente sincronizante mediante 4 lavados con PBS 1X frío (30 mL por cada 75 cm²). Posterior a esto, se desprenden las células y se resiembran en placas de cultivo de 35 mm de diámetro (8 cm²), colocando 2 mL de una suspensión celular a una concentración de 0.25X10⁶ células/mL. Se resiembran tantas muestras sean necesarias para tomar muestras por duplicado a distintos tiempos (p. ej., a las 0, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 16, 20 y 24 h): una para la extracción de proteína total o el análisis por citometría de flujo y otra para determinar el índice mitótico.

6.3 Extracción de proteína total

La extracción de proteína total se realiza mediante una lisis celular directa en la placa de cultivo de 8 cm², que se toma de la incubadora en los tiempos preestablecidos. A cada muestra se le retira el medio del cultivo y se lava 2 veces con PBS 1X. Se añaden 0.2 mL de solución de lisis (ProteoJET™ Mammalian Cell Lysis Reagent, Fermentas®) y se realiza un raspado con un policía hasta desprender y lisar por completo las células. Se transfiere el lisado a un tubo Eppendorf, se coloca en un agitador para microtubos a 1000 rpm durante 10 min y se centrifuga a 20,000 g durante 15 min. Se transfiere el sobrenadante clarificado a un nuevo microtubo y se almacena a -70°C hasta su uso.

6.3.1 Determinación de proteína total por el método de Bradford

La concentración de proteína total se determina mediante el método de Bradford (Bradford Protein Assay, Bio-Rad) para una cubeta de 1 mL, utilizando el espectrofotómetro Spectronic® 20 Genesys™ a una longitud de onda de 595 nm y una curva estándar de albúmina sérica de bovino (BSA, Santa Cruz Biotechnology®). Cada muestra se prepara con 798 µL de agua destilada estéril, 200 µL de reactivo Bradford y 2 µL de la muestra. Para el blanco se utilizan 2 µL de la solución de lisis y para la curva estándar de BSA se utilizan 2 µL de las distintas diluciones de BSA (0.625, 1.25, 2.5, 3.75

y 5 µg/µL para concentraciones finales entre 1.2 y 10.0 µg de BSA por mL de ensayo). A cada una de las absorbancias de los lisados se le resta la absorbancia de la solución de lisis y a la absorbancia resultante se sustituye en la ecuación de la recta obtenida de la curva estándar:

$$Y = 0.0004 * X + 0.0919$$

Donde:

X = Absorbancia a 595 nm

Y = Concentración de proteína en µg/ mL de ensayo Bradford

6.4 Determinación del índice mitótico

El índice mitótico representa el porcentaje de células en mitosis con respecto a la población total. Para su determinación se retira el medio de cultivo, se lava 2 veces con PBS 1X, se fija la muestra añadiendo 0.3 mL de una solución de formaldehído al 1% y glutaraldehído al 0.2% (Sigma-Aldrich®) e incubando a temperatura ambiente durante 10 min. Enseguida se retira la solución fijadora, se lava 2 veces con PBS 1X y se adiciona 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI) en PBS a una concentración final de 5 µg/mL (Sigma-Aldrich®). Se incuba a 4°C durante 20 min, pudiéndose almacenar hasta 24 h, para finalmente observar la muestra en un microscopio invertido con epifluorescencia (Leica) a 40X y contar células mitóticas y células en la interfase del ciclo celular.

6.5 Ensayo de Western blot

6.5.1 Electroforesis

El corrimiento electroforético se lleva a cabo en condiciones desnaturizantes utilizando geles de poliacrilamida (SDS-PAGE, *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) compuesto por el gel concentrador al 5% y el gel separador al 10% (Bio-Rad). De cada lisado se cargan 20 µg de proteína total, además del marcador de peso molecular (PageRuler Plus Prestained Protein Ladder, Thermo Scientific®), y se realiza el

corrimiento electroforético en solución SDS/Glicina/Tris-base pH 8.3 (Bio-Rad) a 80 V durante 90-120 min.

6.5.2 Transferencia

Luego de la electroforesis, los geles se colocan en tampón Towbin o de transferencia (Tris-base 25 mM, glicina 192 mM, metanol 20%) (Sigma-Aldrich®) con agitación recíproca de 3 a 5 min; mientras que por otro lado, la membrana de difluoruro de polivinilideno (PVDF) se hidrata en metanol con agitación recíproca durante 20 s, se lava 2 veces con agua tridestilada y se coloca en tampón Towbin con agitación recíproca durante 5 min. La proteína se transfiere a una membrana de PVDF, colocando el gel en un “emparedado” de papeles filtro humedecidos previamente en tampón Towbin que llevan el siguiente orden ascendente dentro de una cámara de transferencia semiseca (Trans-blot SD semi-dry transfer cell, Bio-Rad): papel Criterion (Bio-Rad), papel Bio-Rad 920, membrana PVDF (EMD Millipore), gel de poliacrilamida, papel Bio-Rad 920 y Criterion, eliminando las burbujas en cada capa. Se limpia el exceso de tampón de la placa de transferencia, se cierra la cámara y se corre por 60 min a 20 V. La membrana se deja secar por 30 min, se hidrata con metanol, se lava 2 veces con agua tridestilada y se coloca en solución TBS 1X (NaCl 150 mM, Tris-Cl 20 mM, pH 7.6) (Sigma-Aldrich®) durante 5 min para su posterior bloqueo.

6.5.3 Bloqueo e inmunodetección

El bloqueo se lleva a cabo en una solución de leche en polvo sin grasa al 5% en PBS-T (PBS más Tween 20 al 0.05 %) (Sigma-Aldrich®) para la inmunodetección de RA α 1B; para la inmunodetección de eIF3f y gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) se utiliza BSA al 4% en TBS-T (TBS más Tween 20 al 1%). Se añade la solución de bloqueo correspondiente y se incuba a temperatura ambiente de 1-2 h con agitación recíproca suave. Una vez terminado el bloqueo se desecha la solución y se incuba la membrana con el anticuerpo primario correspondiente (Tabla 5). La incubación del anticuerpo primario se realiza durante toda la noche a 4°C en agitación suave. El anticuerpo se prepara en su solución de bloqueo correspondiente y se adiciona un volumen que cubra totalmente a la membrana.

Tabla 5. Anticuerpos primarios utilizados

Anticuerpo primario	Origen	Dilución	Marca
anti-eIF3f	Conejo	1:2000	BioLegend®
anti-GAPDH	Ratón	1:2000	Santa Cruz Biotechnology®
anti-RA α1B	Conejo	1:2000	OriGene®

Seguido de la incubación con el anticuerpo primario se realizan 5 lavados con agitación vigorosa y de 7 min cada uno, utilizando TBS-T o PBS-T según corresponda. Enseguida, se incuba la membrana a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario correspondiente (Tabla 6) bajo agitación suave durante 60 min. Posteriormente, se realizan 4 lavados de 6 min cada uno, bajo agitación moderada y con su correspondiente solución TBS-T o PBS-T. Los anticuerpos secundarios utilizados están unidos a peroxidasa de rábano (HRP) que cataliza la oxidación del luminol en presencia de peróxido de hidrógeno, reacción que genera luz. Si se coloca una película fotográfica sobre la membrana, la luz que se desprende de la reacción permite detectar la actividad enzimática de HRP, la cual es proporcional a la concentración de la proteína de interés.

Tabla 6. Anticuerpos secundarios utilizados

Anticuerpos secundarios	Origen	Dilución	Marca
anti-ratón IgG-HRP	Burro	1:3000	Santa Cruz Biotechnology®
anti-conejo IgG-HRP	Cabra	1:3000	Zymed Laboratories®

Una vez terminados los lavados, la membrana se impregna con la solución de detección del kit de revelado Amersham ECL Plus Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare®) que se prepara de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Se

incuba la membrana por 1 min, se fija en un casete para placas de rayos X y se cubre con película plástica autoadherible grado alimenticio. En cuarto oscuro se coloca una placa para rayos X sobre la membrana y se cierra el casete de 5 a 10 min. Finalmente, la placa se sumerge en solución de revelado (Fujifilm®) hasta que se hacen visibles las bandas, se enjuaga en agua destilada, se coloca en solución fijadora (Fujifilm®) por aproximadamente 2 min y se vuelve a enjuagar con agua. Se deja secar para proceder a digitalizar la señal con el software Kodak Digital Science ID.

6.6 Inmunoprecipitación e inmunodetección del complejo eIF3f-RA α 1B

Se realiza una electroforesis en geles de poliacrilamida para proteínas en condiciones nativas (PAGE-nativo) utilizando lisados celulares como los descritos anteriormente (sección 6.3). Se cargan 50 μ g de proteína total de cada muestra a analizar, además del marcador de pesos molecular (Novex NativeMark, Life Technologies®), en un gel de poliacrilamida al 8% y libre de dodecil sulfato de sodio (SDS). Terminado el corrimiento electroforético, se corta con bisturí la región del gel de 120 kDa, se eluye en solución de lisis (ProteoJET™ Mammalian Cell Lysis Reagent) y se centrifuga a 12,000 g durante 1 min para recuperar el sobrenadante en un microtubo nuevo. Se eliminan proteínas de unión inespecífica incubando el sobrenadante con un anticuerpo primario diferente los de interés (eIF3f o RA α 1B) por una hora a 4°C, seguido de la adición de perlas de proteína A-sefarosa 4B (Invitrogen™) e incubación por otra hora a 4°C. Se centrifuga a 12,000 g durante 1 min y se recupera el sobrenadante en un microtubo nuevo. El sobrenadante se incuba durante 2 h a 4°C con anticuerpo primario anti-eIF3f, seguido de la adición de perlas de proteína A-sefarosa 4B y otro periodo de incubación de 1 h. Se centrifuga a 12,000 g durante 1 min, se retira el sobrenadante y el precipitado se resuspende en la solución de lisis; este paso de lavado se realiza 4 veces, para finalmente resuspender el precipitado en el tampón de muestra para corrimientos electroforéticos desnaturizantes (2% de SDS, 20% de glicerol y 0.5% de azul de bromofenol en tampón Tris-HCl 62 mM, pH 6.8). Cada muestra se hierve 3 min y se somete a una electroforesis SDS-PAGE, como la descrita anteriormente en la sección 6.5. Las proteínas del gel se transfieren a una membrana de PVDF y se inmunodetecta

con anticuerpo anti-RA α 1B y su correspondiente anticuerpo secundario conjugado con HRP.

6.7 Delimitación de las fases del ciclo celular por citometría de flujo

Se utilizan cultivos sincronizados de A549 para delimitar las fases del ciclo celular. Se colectan muestras de cultivo a distintos tiempos, posteriores a la liberación del agente sincronizante. Se cosechan enzimáticamente (tripsina) 1,000,000 de células por muestra en un tubo Eppendorf de 1.5 mL; se centrifuga a 400 g por 10 min y se retira el sobrenadante. Se realizan 2 lavados, cada uno con 1 mL de PBS 1X, y se centrifuga a 400 g por 10 min. Posteriormente, se adicionan 200 μ L de solución fijadora (paraformaldehído al 2% en PBS 1X) y se incuba por 30 min a 4°C. Pasado el tiempo, se adiciona 1 mL de PBS 1X y se centrifuga a 400 g por 10 min. Se retira el sobrenadante, se resuspende en 1 mL de PBS 1X, se centrifuga a 400 g por 10 min y se retira el sobrenadante. Se resuspende en 1 mL de PBS 1X con 0.01 μ g/mL de RNAsa y Triton x-100 al 0.1%; se incuba durante 15 min a 37°C, se centrifuga a 400 g por 10 min y se retira el sobrenadante. Por último, se resuspende en 200 μ L de DAPI (5 μ g/mL), se incuba 30 min a 4°C en oscuridad y, posteriormente, se procede a leer en el citómetro de flujo. Se utilizó un citómetro CytoFLEX versión 1.2.11.0. (Beckman Coulter®) y los resultados fueron analizados con el software FlowJo® para cuantificar los porcentajes de células en cada una de las fases del ciclo celular. El citómetro se emplea para DAPI configurado con el láser de excitación de 358 nm y un detector de emisión de 450/45 BP.

7. RESULTADOS

El presente trabajo se desarrolló en dos ejes centrales. El primero fue determinar si la expresión del RA α 1B es constitutiva o si fluctúa con respecto al ciclo celular de A549. El segundo fue determinar si la interacción entre RA α 1B y eIF3f está adscrita a determinadas fases del ciclo celular. Para establecer estos perfiles de expresión e interacción, fue necesario realizar experimentos con cultivos celulares enriquecidos en las distintas fases del ciclo celular, o bien, mediante la selección de un grupo de células representativas a cada fase.

7.1 Ciclo celular de A549

Por lo anterior, lo primero que se realizó fue determinar la distribución celular en las distintas fases del ciclo celular con respecto al tiempo, partiendo de un cultivo que fue liberado del enriquecimiento en la fase S del ciclo celular con HU. Se colectaron muestras a distintos tiempos para abarcar un periodo completo del ciclo celular y se siguieron dos estrategias para establecer el perfil de distribución en las distintas fases del ciclo celular: por índice mitótico y por citometría de flujo, utilizando en ambos DAPI.

7.1.1 Ciclo celular de A549 por índice mitótico

Las muestras tomadas a distintos tiempos, posteriores a la liberación del agente sincronizante (HU), fueron teñidas con DAPI y evaluadas por duplicado realizando un conteo de 200 células por muestra. Se identificó la fase del ciclo celular en que se encontraba cada célula (interfase, profase, metafase, anafase, telofase) y se calculó el índice mitótico como se describió en la sección 6.4. La figura 12 muestra micrografías representativas de las células observadas por microscopía epifluorescente, pudiendo apreciar las diferencias entre una célula en la interfase y otra en mitosis (anafase). Los resultados de índice mitótico con respecto al tiempo se pueden observar en la figura 13, donde se aprecia un pico bien definido en la muestra de las 7 h, marcando el enriquecimiento de la población en la fase M del ciclo celular.

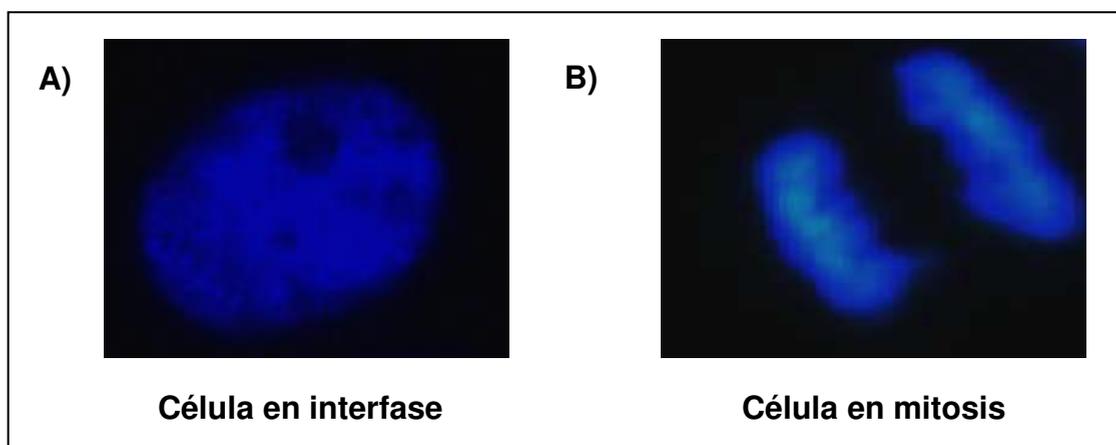


Figura 12. Micrográficas de células en la interfase del ciclo celular y en mitosis. Cultivo de células A549 teñidas con DAPI y observadas por microscopía epifluorescente a 40X.

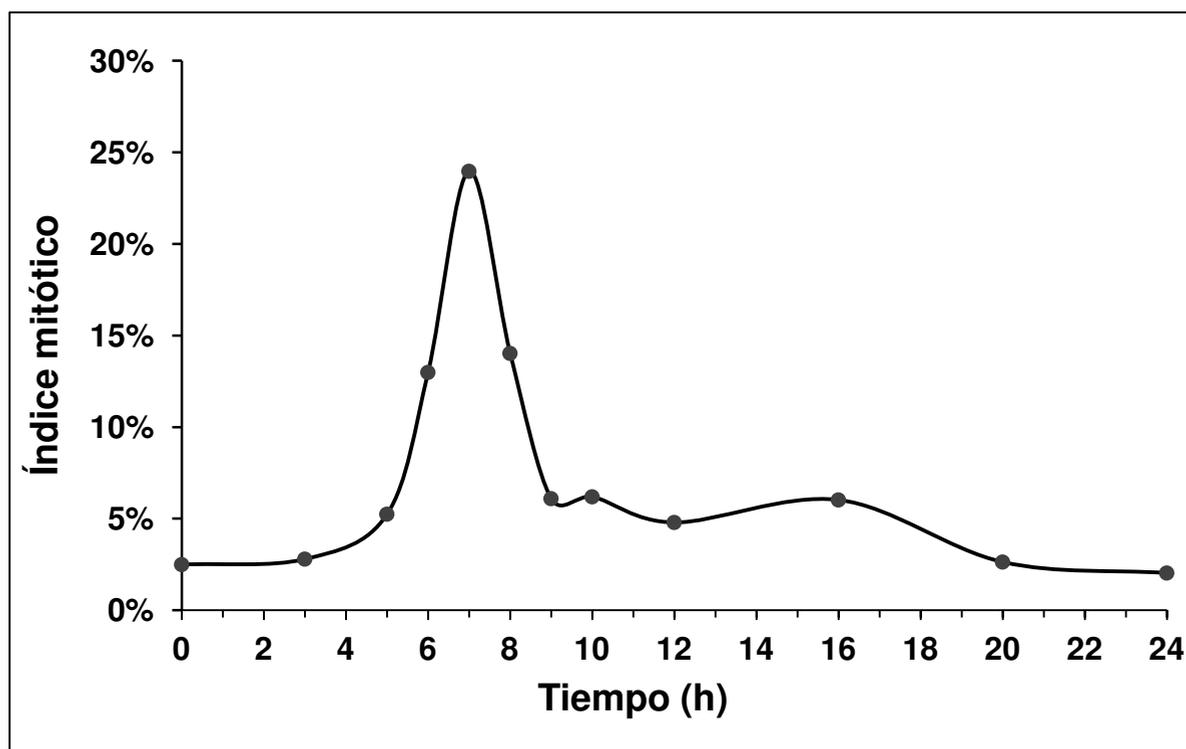


Figura 13. Perfil de la proporción de la población de células A549 en la fase M, posterior a la liberación del cultivo en la fase S del ciclo celular. Ensayo realizado posterior a la liberación de un cultivo celular A549, sincronizado con hidroxurea 0.8 mM.

7.1.2 Ciclo celular de A549 por citometría de flujo

Para afinar el análisis del ciclo celular de la línea celular A549 se determinó el perfil de distribución en las distintas fases del ciclo celular por citometría de flujo.

Se utilizó como control un cultivo de células asincrónicas, buscando así elaborar un templado de referencia para las muestras colectadas después de la sincronización con HU. Tanto el control como las células provenientes de los cultivos sincronizados se tiñeron con DAPI, permitiendo la cuantificación del contenido de ADN por citometría de flujo.

A) Elaboración de templado de referencia

En la citometría de flujo se crean ventanas para aislar poblaciones específicas dentro de una muestra heterogénea, permitiendo que el análisis se limite a una subpoblación de interés. El gráfico de puntos de acuerdo a la dispersión de luz FSC vs. SSC es el método más simple de depuración; tiene la ventaja de que las células muertas pueden excluirse del análisis. Para el cultivo de referencia (control asincrónico) se creó un gráfico de puntos donde se seleccionó la población de células vivas de acuerdo a su tamaño y complejidad (Fig. 14A). Con la población viable se creó una nueva ventana de puntos (Fig. 14B), utilizando las señales de altura (PB450-H) y área (PB450-A) para la intensidad de la fluorescencia de DAPI, con la finalidad de excluir dupletes (células dobles) y evitar la sobreestimación de la intensidad del fluorocromo, de acuerdo a lo establecido por Wersto y colaboradores (2001). Finalmente, con esta última población, se generó una ventana de histograma para determinar la distribución de la población en las distintas fases del ciclo celular, al establecer estas fases en base a la intensidad de DAPI (PB450-A) en escala lineal y considerando la intensidad en G0/G1 como el valor correspondiente a 2C, en G2/M a 4C y en S los valores intermedios. El resultado del análisis se observa en la figura 14C, donde se aprecia un 76.8% de la población en G0/G1, un 14.5% en S y un 8.4% en G2/M. Como control negativo se utilizó una muestra del mismo cultivo sin teñir con DAPI, observando la ausencia de señal en los gráficos análogos a B y C de la figura 14.

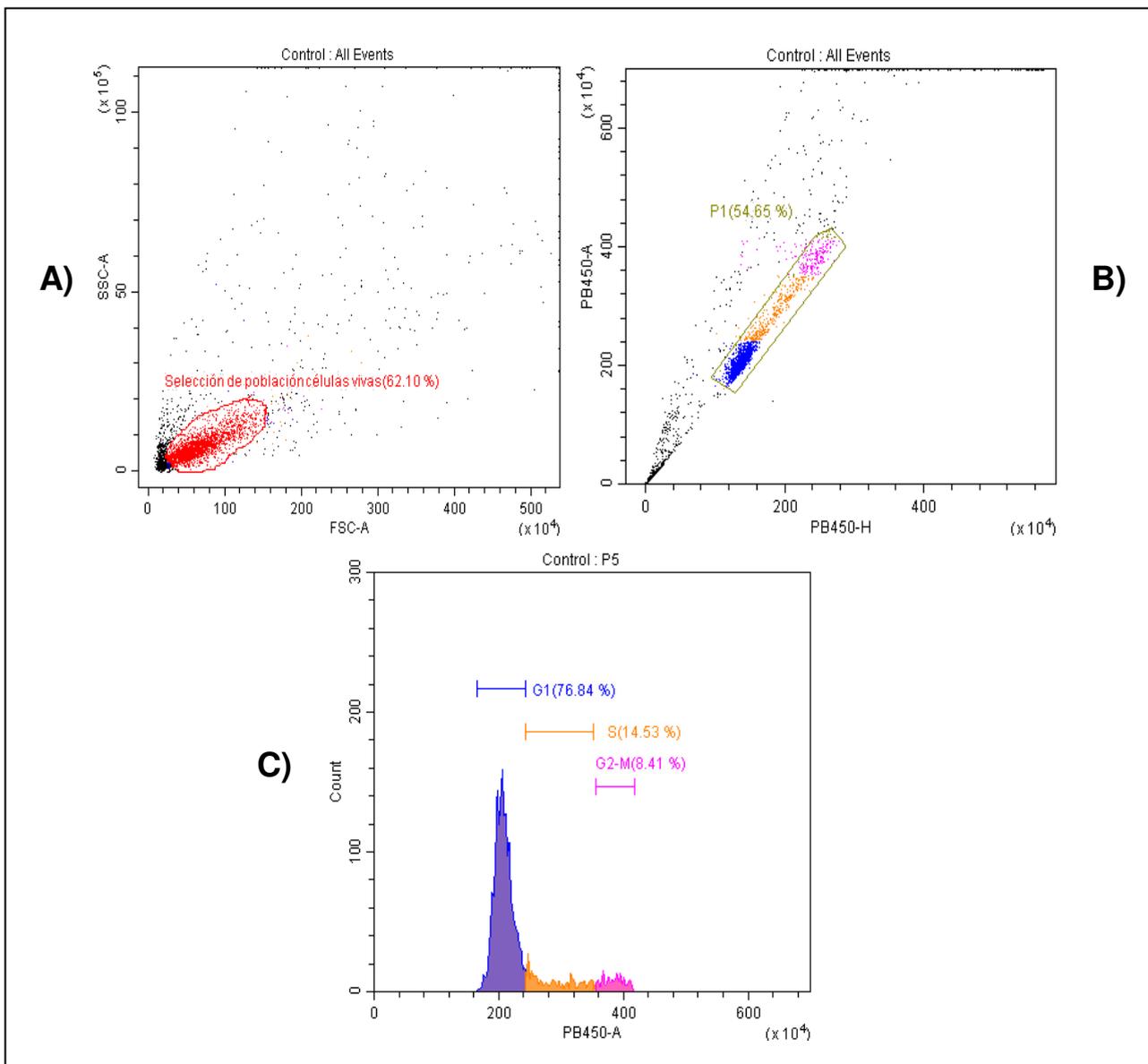


Figura 14. Templado de citometría de flujo para ciclo celular de células A549. A) Selección de la población celular viable utilizando un cultivo asincrónico de A549. **B)** Eliminación de dupletes. **C)** Histograma de selección de fases y determinación del porcentaje de células en las fases G0/G1 (morado), S (naranja) y G2/M (rosa) del ciclo celular.

B) Análisis de muestras sincrónicas por citometría de flujo

Teniendo el templado, se procesaron las muestras de la sincronización y los datos obtenidos de la citometría, junto con los datos del control, fueron exportados para ser analizados con el software FlowJo®, el cual permite delimitar y cuantificar los porcentajes

de cada una de las fases del ciclo celular con objetividad. La figura 15 muestra ejemplos representativos del análisis obtenido con el software, donde se aprecian los cambios en la proporción de cada fase con respecto al tiempo. El perfil del análisis global se muestra en la figura 16, donde la línea azul representa la población en G0/G1, la naranja la población en S y la gris la población en G2/M. De las 0 a las 3 h se observa que la población celular está en su mayoría en la fase S del ciclo celular, lo que es esperado dado que se utilizó un agente sincronizante para acumular células en esa fase; de las 3 a las 6 h, el porcentaje de células en la fase S disminuye gradualmente y a partir de las 6 h permanece relativamente constante. En cambio, el porcentaje de células en G2/M es bajo de las 0 a las 3 h, donde incrementa gradualmente, hasta alcanzar un máximo a las 7 h (que coincide con el máximo de células en M, ver Fig. 13) y luego desciende gradualmente hasta las 16 h. Finalmente, para la población en la fase G0/G1, inicia con un porcentaje bajo y va incrementándose gradualmente con respecto al tiempo, de manera global; sin embargo, se aprecian dos puntos de inflexión que delimitan una pequeña disminución en el porcentaje de células en G0/G1; estos puntos de inflexión corresponden a las horas 6 y 9.

Con estos resultados y los del índice mitótico fue posible confirmar cómo se mueve el ciclo con respecto al tiempo para la línea celular A549, además de confirmar los tiempos de cada fase y estimar los tiempos en que ocurren las transiciones de fase S/G2, G2/M y M/G1 como 3, 6 y 9 h, respectivamente. La transición G1/S posiblemente se da a las 16 h, de acuerdo al tiempo de duplicación, pero la sincronía se pierde y es difícil corroborarlo.

7.2 Perfil de expresión del RA α 1B con respecto al ciclo celular de A549

Una vez establecido el índice mitótico y el perfil de distribución de la población celular en las distintas fases del ciclo celular, se prosiguió a evaluar la expresión RA α 1B durante las distintas fases de ciclo. La figura 17 muestra los resultados obtenidos por Western blot, en condiciones desnaturalizantes, de la inmunodetección del receptor. Se aprecia que no es constante la expresión del RA α 1B.

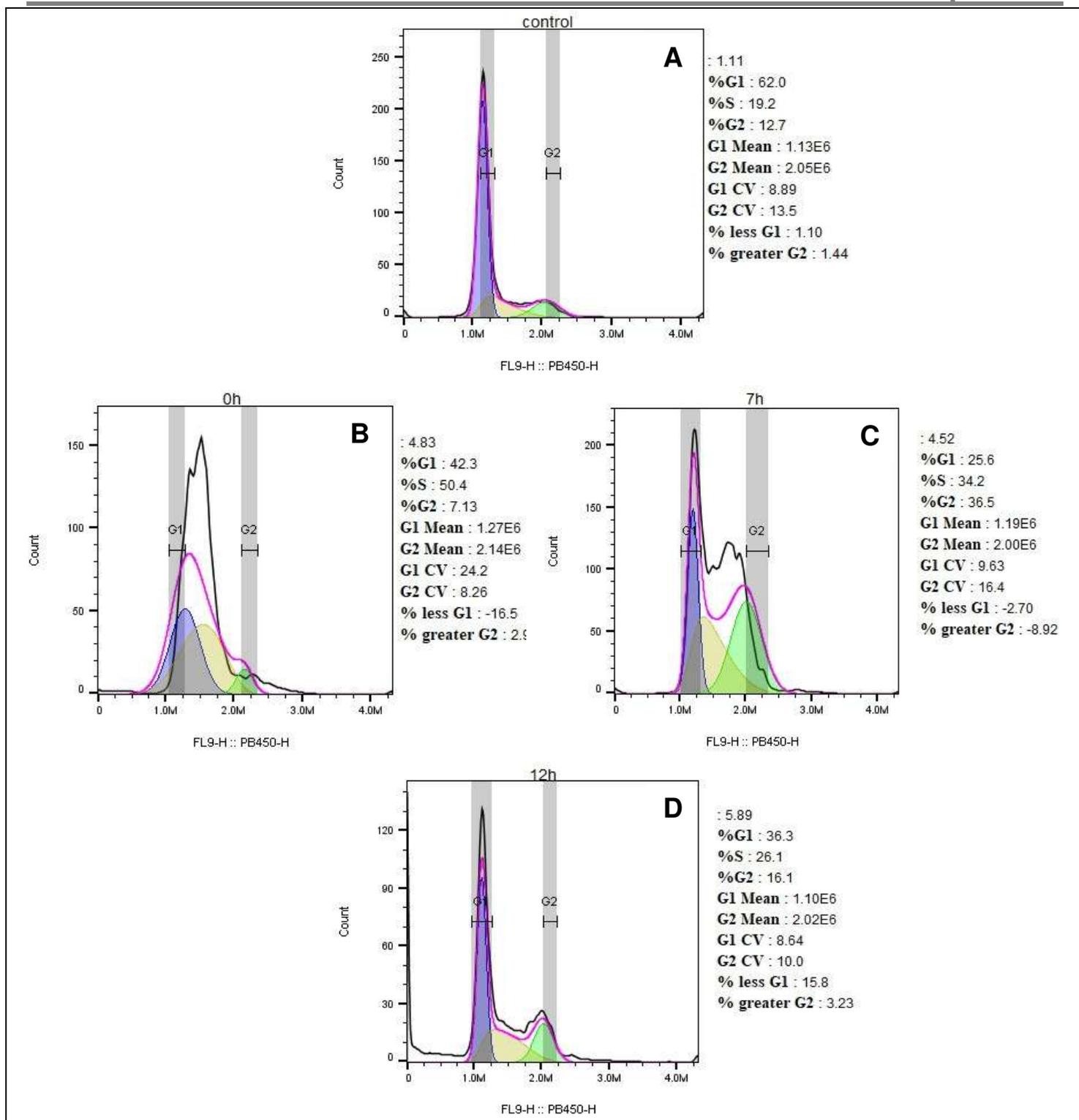


Figura 15. Análisis representativo del ciclo celular de A549 con el software FlowJo®. Datos obtenidos en un Citómetro CytoFLEX y analizados con el software FlowJo® **A)** Control asincrónico. **B)** Cultivo sincronizado en la fase S del ciclo celular, 0 h. **C)** Cultivo de 7 h posterior a la liberación de HU. **D)** Cultivo de 12 h posterior a la liberación de HU.

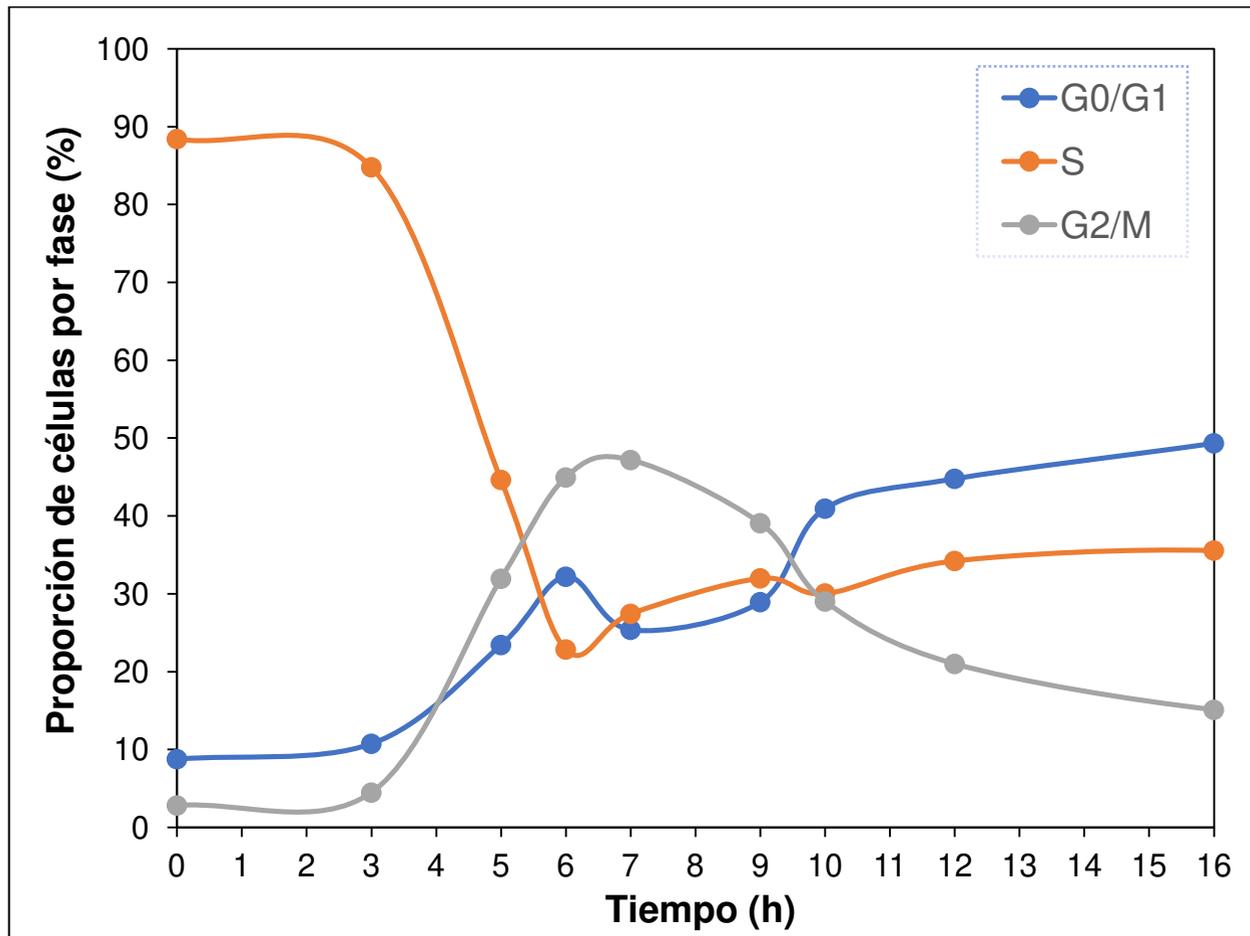


Figura 16. Perfil de distribución de las distintas fases del ciclo celular de A549 por citometría de flujo. Avance del ciclo celular de A549 durante 16 horas después de su liberación del agente sincronizante para la fase S (HU 0.8 mM). Datos obtenidos en un Citómetro CytoFLEX y analizados con el software FlowJo®. Línea azul, población en G0/G1; naranja, en S; gris, en G2/M.

Los valores de intensidad de la banda obtenidos para la proteína del RA $\alpha 1B$ fueron normalizados con los de GAPDH y expresados en unidades relativas de intensidad (URI). El RA $\alpha 1B$ no presenta expresión constitutiva, como se observa en la figura 18. Se obtuvo un perfil oscilante con un máximo de expresión a las 7 horas, que corresponde a la fase M del ciclo celular, y fluctuaciones con incrementos en la expresión en las transiciones de las fases S/G2 y M/G1, que corresponden a las horas 3 y 9, respectivamente. Además, se observa otro aumento en la expresión a las 16 h, mismo que se sugiere corresponde a la transición G1/S.

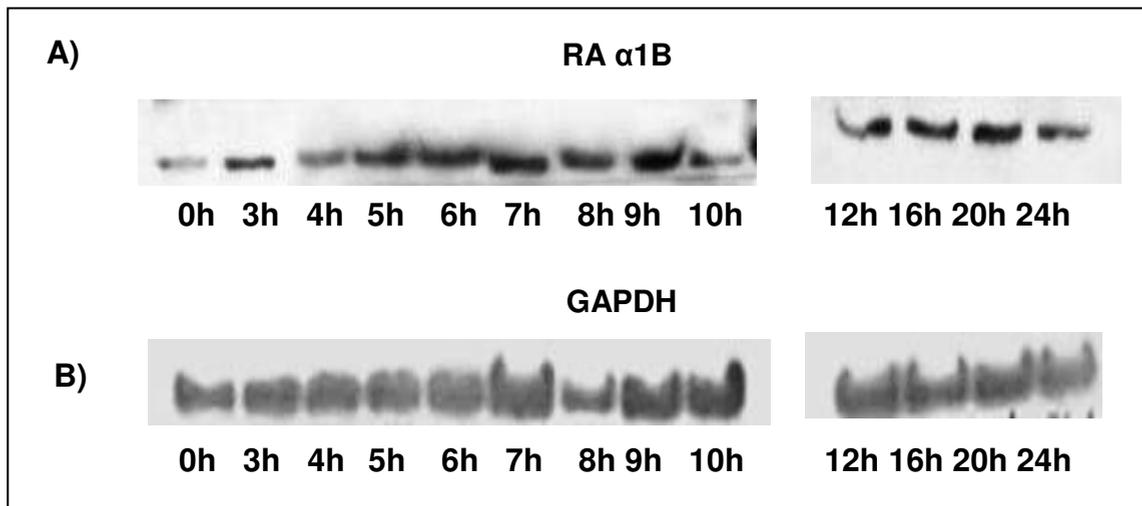


Figura 17. Expresión del RA α 1B en cultivos A549 sincronizados. Western blot realizado en condiciones desnaturalizantes con muestras tomadas de las 0 a las 24 h posteriores a la liberación del cultivo en la fase S del ciclo celular (hidroxiurea 0.8 mM) e inmunodetección con anti-RA α 1B. **A)** Expresión de la proteína del RA α 1B a distintos tiempos. **B)** Control de carga inmunodetectando con anti-GAPDH.

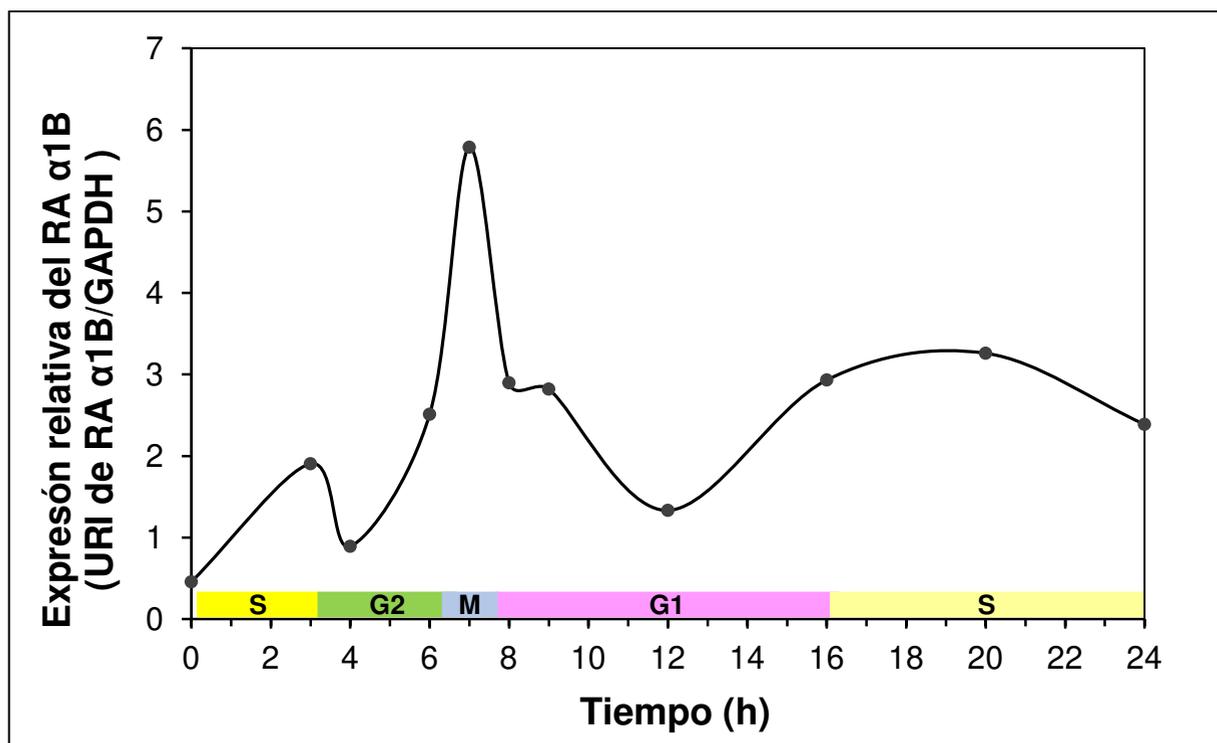


Figura 18. Perfil de la expresión relativa del RA α 1B en cultivos A549 sincronizados. Datos obtenidos de la densitometría de RA α 1B y GAPDH. Los datos fueron normalizados con GAPDH y representados como unidades relativas de intensidad (URI) de RA α 1B/GAPDH.

7.3 Interacción eIF3f-RA α 1B con respecto al ciclo celular de A549

Para responder al segundo objetivo, que fue determinar el perfil de interacción de eIF3f con el RA α 1B durante el ciclo celular, se evaluó su interacción inmunoprecipitando los complejos de eIF3f, de aproximadamente 120 kDa, e inmunodetectando al RA α 1B. Los resultados generados se muestran en la figura 19; se observa que utilizando la proteína total del lisado de un cultivo asincrónico (control positivo sin inmunoprecipitar) se inmunodetectan dos bandas para el RA α 1B, una de ellas corresponde al homodímero de 120 kDa y la otra a su forma monomérica (56.83 kDa). En la figura 19A se observan dos reiones de banda, la de mayor peso molecular corresponde al anticuerpo primario utilizado para inmunoprecipitar a eIF3f y la de menor peso molecular corresponde al monómero del RA α 1B que se inmunoprecipitó con eIF3f. La presencia de la banda de mayor peso es debida a que ambos son del mismo origen (rabit anti-eIF3f y rabit anti-RA α 1B).

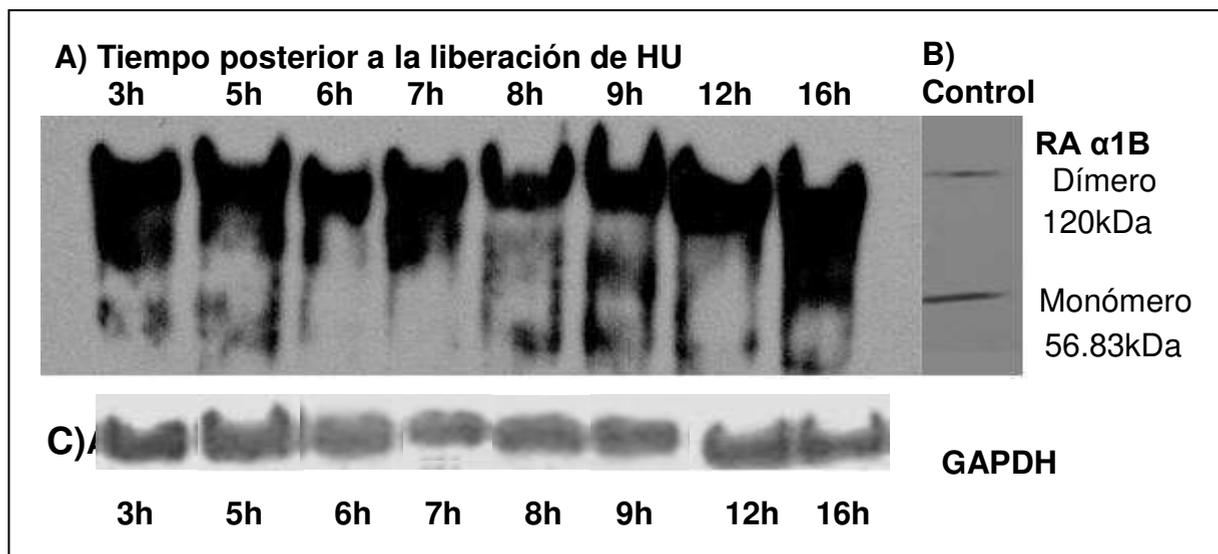


Figura 19. Inmunodetección del complejo eIF3f- RA α 1B en células A549. A) Inmunodección del RA α 1B posterior a la inmunoprecipitación con anti-eIF3f. B) Control positivo de anti-RA α 1B, proveniente de un lisado celular de cultivo asincrónico. C) Control de carga, anti-GAPDH.

Se cuantificaron las bandas obtenidas y se normalizaron con el control de carga (GAPDH), dando como resultado el grafico que se muestra en la figura 20; se observa

que a las 3, 9 y 16 h existe una interacción entre eIF3f y el RA α 1B, correspondiendo a las transiciones de fase S/G2, M/G1 y posible G1/S, respectivamente.

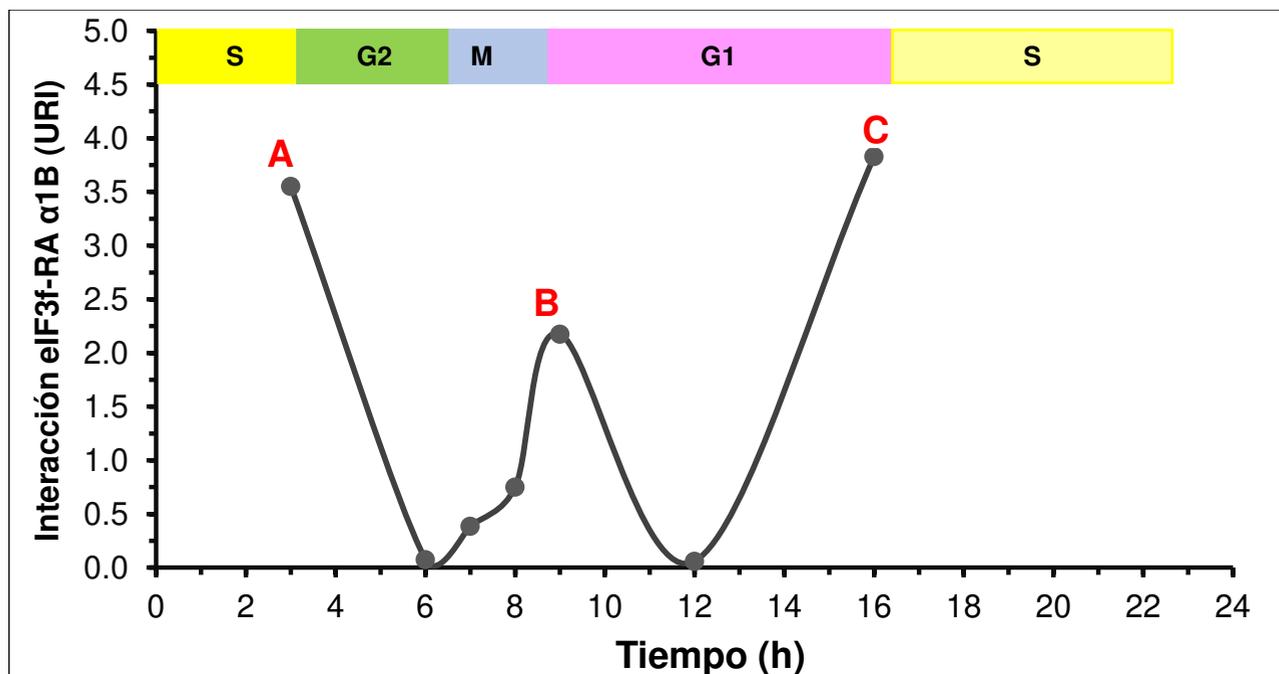


Figura 20. Perfil de interacción del complejo eIF3f-RA α 1B con respecto al ciclo celular de A549. Se observan máximos en las transiciones de las fases S/G2 (A), M/G1 (B), y posible G1/S (C) a las 3, 9 y 16 h, respectivamente. Datos obtenidos de la densitometría de RA α 1B y GAPDH. Los datos fueron normalizados con GAPDH y representados como unidades relativas de intensidad (URI) de RA α 1B/GAPDH.

8. RESUMEN DE RESULTADOS

La Tabla. 7 muestra un resumen de resultados, donde se determinó que la expresión máxima para el RA α 1B se da a las 7 h, que corresponde a la fase M del ciclo celular y que coincide con el máximo de expresión de eIF3f; además se observaron fluctuaciones con incrementos en las transiciones de fase S/G2 a las 3h, M/G1 a las 9 h y posible G1/S a las 16 h. En estos puntos de transición son donde se observaron los máximos picos de interacción entre eIF3f y el RA α 1B, no así donde se presenta una mayor concentración del RA α 1B o de eIF3f.

Tabla 7. Máximos de expresión del RA α 1B y formación del complejo eIF3f-RA α 1B.

Máximos de expresión de RA α 1B				
Fase	S/G2	M	M/G1	G1/S
horas	3h	7h	9h	16h
Interacción eIF3f-RA α 1B				
Fase-horas	S/G2=3h, M/G1=9h y G1/S 16h			

9. DISCUSION

La coordinación de procesos metabólicos y genéticos fundamentales a la supervivencia, la proliferación y la diferenciación celular están mediados principalmente por proteínas, de cuyas funciones dependen absolutamente. El control de la presencia y abundancia de proteínas específicas determina en gran medida la funcionalidad y éxito de estos procesos. Por ello resultan trascendentes los estudios relacionados al control de la síntesis de proteínas. Previamente, diferentes grupos de investigación reportaron que la función de la proteína eIF3f está asociada principalmente al proceso de inicio de la traducción o síntesis de proteínas (Hershey 2014, Marchione et al. 2013, Sanchez *et al.* 2013, Csibi *et al.* 2010, Lagirand-Cantaloube *et al.* 2008). Higareda-Mendoza y Pardo-Galván reportaron en el 2010 que la presencia y concentración de eIF3f es esencial para la proliferación celular humana; asimismo reportan que la síntesis de eIF3f está relacionada y circunscrita a momentos específicos durante el ciclo celular: en la fase S, en la transición G2/M y en menor medida, en la fase G1 temprana. Posteriormente, Gutiérrez-Fernández y colaboradores (2015) reportan que eIF3f se asocia físicamente al RA α 1B y modula su función transductora. Aunque la función del RA α 1B no ha sido relacionada al control de la síntesis de proteínas, sí existen algunos trabajos que lo relacionan al control de la proliferación celular. Es así que uno de los objetivos del presente trabajo fue dilucidar la cinética o perfil de expresión del RA α 1B durante el ciclo celular, es decir, si su síntesis es constitutiva o circunscrita a momentos específicos del ciclo, y compararla al de eIF3f. Otro objetivo fue determinar asimismo el perfil de asociación eIF3f-RA α 1B, también durante el ciclo y, a partir de esos resultados, poder sugerir una posible función de la asociación eIF3f-RA α 1B durante la división celular.

El resultado que dio respuesta al primer objetivo se presenta en la figura 18. Nos indica que la expresión del RA α 1B no es constitutiva durante el ciclo celular, es oscilante con máximos en S/G2, M, G1 temprana (saliendo de M/G1) y G1/S. Nos indica asimismo que el requerimiento o abundancia del receptor varía significativamente entre máximos, lo que sugiere una función distinta, al menos entre el máximo en M y los otros tres. Por otro lado, sorprende la extraordinaria similitud de perfiles de expresión entre RA α 1B y eIF3f,

coincidiendo en los tres máximos, tanto en tiempos como en concentración relativa, por lo que es posible que la expresión de ambos genes sean controlados por mecanismos comunes durante el ciclo celular; por lo que se añadiría fuerte evidencia que ubicaría al RA α 1B como un gen adscrito a la división celular.

Ahora bien, con dos proteínas que se asocian física y funcionalmente (eIF3f-RA α 1B), y que poseen un perfil de expresión similar durante el ciclo celular, fue evidente la interrogante sobre que cómo sería entonces el perfil de interacción entre ambas proteínas *durante* el ciclo celular. La respuesta la dio el experimento cuyos resultados se muestran en la figura 20. El perfil de interacción nos indica que no es constitutiva, con tres máximos: en S/G2, en G1 temprana (salida de M/G1) y en G1/S, coincidiendo con tres máximos de los cuatro del RA α 1B y con tres de eIF3f. Resulta sorprendente que a pesar de que tanto RA α 1B como eIF3f se encuentran en su máxima concentración durante la fase M, éstos no interactúan entre sí. Lo que significa que no basta su presencia para interactuar entre sí, sino que otro factor o factores son necesarios para que se facilite la interacción física; o bien, existen impedimentos para la interacción durante esta fase. En todo caso, la interacción eIF3f-RA α 1B no se lleva a cabo durante la fase M, excluyendo su función del proceso de división física *per se*.

Los resultados nos muestran que en tres momentos coinciden los máximos de RA α 1B, de eIF3f y la interacción eIF3f-RA α 1B (3 h, 9 h y 16 h). ¿Qué eventos celulares coinciden con estos momentos y que pudieran tener alguna relación con la interacción eIF3f-RA α 1B? Veamos. Las nueve horas pos-liberación coincide con el momento más intenso de síntesis de proteínas durante el ciclo, esto es, en la fase G1 temprana. Durante este momento, la célula recupera masa perdida durante el ciclo de división anterior y sintetiza la necesaria para sostener el siguiente ciclo. Asimismo, a las 16 horas pos-liberación coincide con la transición G1/S, un periodo biosintético también intenso en la síntesis de biomoléculas, proteínas incluidas. Las tres horas pos-liberación coincide con la transición S/G2; nuevamente este es un momento de alta síntesis de proteínas, debido a que han de biosintetizarse los componentes específicos para la separación física en la transición G2/M y M. Esta coincidencia no es trivial debido a que, aún en organismos más antiguos, como en la levadura de fisión *Schizosaccharomyces pombe*

(Zhou *et al.* 2005), eIF3f está relacionado con el control de la síntesis de proteínas. Así entonces, y como en organismos de eucariotas inferiores no está presente el RA α 1B, entonces la interacción eIF3f-RA α 1B representaría un nuevo y más alto nivel de complejidad en el control de la síntesis de proteínas durante el ciclo celular de organismos superiores.

Por todo lo anterior, resulta relevante llevar a cabo experimentos que nos ayuden a confirmar o desechar las posibilidades antes descritas. Se pueden realizar, por ejemplo, experimentos en los que se altere la interacción eIF3f-RA α 1B, silenciando a uno de los miembros en momentos específicos del ciclo celular, y observar los niveles proteosintéticos en general, o en particular el de una proteína cuya síntesis esté relacionada a esa fase; también se podría tratar a la célula con antagonistas del RA α 1B, en momentos del ciclo donde se lleva a cabo la interacción, y luego observar la síntesis de proteínas global o la particular a una proteína con conocida función durante ese periodo.

Los resultados de este trabajo enriquecen la posibilidad de que el RA α 1B esté relacionado a un proceso celular más antiguo y profundo, que a los procesos a los que ha sido adscrito, él y los miembros de su familia, como la vasoconstricción. Esto explicaría, por ejemplo, el por qué el RA α 1B, a diferencia de sus “hermanos”, RA α 1A y RA α 1D, se expresa ubicuamente en prácticamente todos los tipos celulares. El control de la división celular sería una explicación razonable.

10. CONCLUSIONES

La expresión del R α 1B oscila durante el ciclo celular, con aumentos de expresión en las transiciones S/G2, M/G1 y posible G1/S, además de presentar un máximo de expresión en la fase M del ciclo celular de la línea celular A549.

El perfil de interacción del R α 1B-eIF3f coincide con las transiciones de la expresión del R α 1B.

11. REFERENCIAS

1. Aitken, C. E., y Lorsch, J. R. (2012). A mechanistic overview of translation initiation in eukaryotes. *Nature structural & molecular biology*, 19(6), 568-576. <http://doi.org/10.1038/nsmb.2303>.
2. Ali, M. U., Rahman, M.S., Jia, Z. y Jiang, C. (2017). Eukaryotic translation initiation factors and cancer. *Tumor Biology*, 39(6), 1-19. <http://doi.org/10.1177/1010428317709805>.
3. Allen, L.F., Lefkowitz, R.J., Caron, M.G., y Cotecchia, S. (1991). G-protein-coupled receptor genes as protooncogenes: constitutively activating mutation of the alpha 1B-adrenergic receptor enhances mitogenesis and tumorigenicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(24), 11354-11358. <http://doi.org/10.1073/pnas.88.24.11354>.
4. Barnum, J.K., y O'Connell, M.J. (2014). Cell Cycle Regulation by Checkpoints. *Methods in molecular biology*, 1170. 29-40. <http://doi.org/10.1007/978-1-4939-0888-2-2>.
5. Bhattacharya, M., Babwah, A.V., Dale, L.B., Anborgh, P. H., Dobransky, T., Benovic, J. L., Feldman, R. D., Verdi, J. M., Rylett, R. J., y Ferguson, S. S. (2002). Beta-arrestins regulate a Ral-GDS Ral effector pathway that mediates cytoskeletal reorganization. *Nature cell biology*, 4(8), 547-555. <http://doi.org/10.1038/ncb821>.
6. Castillo-Sarmiento, C.A. (2009). Mecanismos de regulación de los receptores de adenosina y Metabotrópicos de glutamato en células neuronales y de glía. Implicación en procesos de excitotoxicidad y muerte celular (Tesis doctoral). UCLM, Ciudad Real, España.
7. Choi, H. Y., Saha, S. K., Kim, K., Kim, S., Yang, G.M., Kim, B., Kim, J.H., y Cho, S.G. (2015). G protein-coupled receptors in stem cell maintenance and somatic reprogramming to pluripotent or cancer stem cells. *BMB Reports*, 48(2), 68-80. <http://doi.org/10.5483/BMBRep.2015.48.2.250>.
8. Chu, Y. L., Wu, X., Xu, Y., y Her, C. (2013). MutS homologue hMSH4: interaction with eIF3f and a role in NHEJ-mediated DSB repair. *Molecular cancer*, 12(51), 1-12. <http://doi.org/10.1186/1476-4598-12-51>.
9. Cotecchia, S. (2010). The α 1-adrenergic receptors: diversity of signaling networks and regulation. *Journal of Receptors and Signal Transduction*, 30(6), 410-419. <http://doi.org/10.3109/10799893.2010.518152>.

10. Csibi, A., Cornille, K., Leibovitch, M.P., Poupon, A., Tintignac, L.A., Sanchez, A.M.J., y Leibovitch, S.A. (2010). The translation regulatory subunit eIF3f controls the kinase dependent mTOR signaling required for muscle differentiation and hypertrophy in mouse. *PLOS ONE*, 5(2): e8994, 1-14. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0008994>.
11. DeWire, S. M., Ahn, S., Lefkowitz, R. J. y Shenoy, S. K. (2007). Beta-arrestins and cell signaling. *Annual Review Physiology*, 69, 483-510. <http://doi.org/10.1146/annurev.ph.69.013107.100021>.
12. Dong, Z., y Zhang, J. T. (2006). Initiation factor eIF3 and regulation of mRNA translation, cell growth, and cancer. *Critical reviews in oncology/hematology*, 59(3), 169-180. <http://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2006.03.005>.
13. Duronio, R.J., y Xiong, Y. (2013). Signaling Pathways that Control cell Proliferation. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5(3), 1-12. <http://doi.org/10.1101/cshperspect.a008904>.
14. Farías, E. A, y Pardo, M.A. (2005). Control molecular del ciclo celular eucariótico. *Ciencia Nicolaita*, 42, 37-56.
15. Fredriksson, R., Lagerström, MC., Lundin, LG., y Schiöth, H.B. (2003). The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. *Molecular Pharmacology*, 63(6), 1256–1272. <http://doi.org/10.1124/mol.63.6.1256>.
16. García-Sáinz, J. A., Romero-Ávila, M. T., y Alcántara-Hernández, R. (2011). Mechanisms involved in α_{1B} -adrenoceptor desensitization. *IUBMB Life*, 63(10), 811-815. <http://doi.org/10.1002/iub.519>.
17. Giard, D. J., Aaronson, S. A., Todaro, G. J., Arnstein, P., Kersey, J.H., Dosik, H., y Parks, W. P. (1973). In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *J. Natl. Cancer Inst.* 51(5): 1417-1423.
18. Golias, C.H., Charalabopoulos, A., y Charalabopoulos, K. (2004). Cell proliferation and cell cycle control: a mini review. *International Journal of Clinical Practice*, 58(12), 1134-1141. <http://doi.org/10.1111/j.1742-1241.2004.00284.x>.
19. Gómez-Correa, C. A., (2013). Análisis de fosforilación en eIF3f humano por CDK1/Ciclina B. (Tesis de Maestría). Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, México.
20. Gonzalez-Cabrera, P. J., Shi, T., Yun, J., McCune, D.F., Rorabaugh, B.R., y Perez, D.M. (2004). Differential Regulation of the Cell Cycle by α_1 -Adrenergic Receptor Subtypes. *Endocrinology*, 145(11), 5157–5167. <http://doi.org/10.1210/en.2004-0728>.

21. Goodman y Gilman. (2007). Neurotransmisión. Sistema nervioso autónomo y motor somático. Las bases farmacológicas de la terapéutica. Ed. McGraw-Hill. Pp. 167-170.
22. Grisshammer, R. (2017), New approaches towards the understanding of integral membrane proteins: A structural perspective on G protein-coupled receptors. *Protein Science*, 26(8), 1493-1504. <http://doi.org/10.1002/pro.3200>.
23. Guimarães, S., y Moura, D., (2001). Vascular adrenoceptors: an update. *Pharmacological Review*. 53(2), 319-56.
24. Gutiérrez-Fernández, M. J., Higareda-Mendoza, A. E., Gómez-Correa, C. A., y Pardo-Galván, M. A. (2015). The eukaryotic translation initiation factor 3f (eIF3f) interacts physically with the alpha 1B-adrenergic receptor and stimulates adrenoceptor activity. *BMC Biochemistry*, 16(25). <http://doi.org/10.1186/s12858-015-0054-5>.
25. Haimov, O., Sinvani, H. y Dikstein, R. (2015). Cap-dependent, scanning-free translation initiation mechanisms. *Biochimica et biophysica acta*, 1849(11), 1313-1318. doi:10.1016/j.bbagr.2015.09.006.
26. Herráez, Á., y Sánchez, Á. H. (2012). *Biología Molecular e ingeniería genética*. Elsevier Health Sciences.
27. Hershey, J. W. (2014). The role of eIF3 and its individual subunits in cancer. *Biochimica et biophysica acta*, 1849(7), 792-800. <http://doi.org/10.1016/j.bbagr.2014.10.005>.
28. Higareda-Mendoza, A. E., y Pardo-Galván, M. A. (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). <http://doi.org/10.1186/1747-1028-5-10>.
29. Hislop, J. N., y Von Zastrow, M. (2011). Role of ubiquitination in endocytic trafficking of G-protein-coupled receptors. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, 12(2), 137-148. <http://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2010.01121.x>
30. Hoelz, L. V. B., De Freitas, G. B. L., Torres. P. H. M., Fernandes, T. V. A., Albuquerque, M. G., Da Silva, J. F. M., Pascutti, P. G., y De Alencastro, R. B. (2013). Receptores Acoplados à Proteína G. *Revista Virtual de Química*, 5 (5), 981-1000. <http://doi.org/10.5935/1984-6835.20130071>.
31. Hutchins, C. (1994). Three-dimensional models of the D1 and D2 dopamine receptors. *Molecular Pharmacology*, 2, 7-23.

32. Hydbring, P., Malumbres, M., y Sicinski, P. (2016). Non-canonical functions of cell cycle cyclins and cyclin-dependent kinases. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 17(5), 280–292. <http://doi.org/10.1038/nrm.2016.27>
33. Jackson, R. J., Hellen, C. U., y Pestova, T. V. (2010). The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. *Nature reviews Molecular cell biology*, 11(2), 113-127. <http://doi.org/10.1038/nrm2838>.
34. Jean-Alphonse, F., y Hanyaloglu, A.C. (2011). Regulation of GPCR signal networks via membrane trafficking. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 15;331(2), 205-214. <http://doi.org/10.1016/j.mce.2010.07.010>.
35. Jiménez-Alcántar, P. (2014). Identificación de la vía de transducción de señales moduladas por la interacción eIF3f/Receptor adrenérgico- α 1B en células humanas. (Tesis de Maestría). Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, México.
36. Kastan, M. B., y Bartek, J. (2004). Cell-cycle checkpoints and cancer. *Nature*, 432(7015), 316-323. <http://doi.org/10.1038/nature03097>.
37. Kobilka, B. K. (2007). G Protein Coupled Receptor Structure and Activation. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1768(4), 794–807. <http://doi.org/10.1016/j.bbamem.2006.10.021>.
38. Kochman, K. (2014). Superfamily of G-protein coupled receptors (GPCRs) extraordinary and outstanding success of evolution. *Postepy Hig Med Dosw*, 31:68, 1225-1237, <http://doi.org/10.5604/17322693.1127326>.
39. Lagirand-Cantaloube, J., Offner, N., Csibi, A., Leibovitch, M. P., Batonnet-Pichon, S., Tintignac, L. A., y Leibovitch, S. A. (2008). The initiation factor eIF3-f is a major target for Atrogin1/MAFbx function in skeletal muscle atrophy. *The EMBO Journal*, 27(8), 1266–1276. <http://doi.org/10.1038/emboj.2008.52>.
40. Liao, Y., y Hung, M.C. (2010). Physiological regulation of Akt activity and stability. *American Journal of Translational Research*, 2(1), 19–42.
41. Lim, K. H., Song, M. H., y Baek, K. H. (2016). Decision for cell fate: deubiquitinating enzymes in cell cycle checkpoint. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 73(7), 1439-1455. <http://doi.org/10.1007/s00018-015-2129-2>.
42. Lim, S., y Kaldis, P. (2013). Cdks, cyclins and CKIs: roles beyond cell cycle regulation. *Development*, 140(15), 3079-3093. <http://doi.org/10.1242/dev .091744>.
43. Lomanto, L. D., Ortiz, O. L., Breton, C. O., Gómez, A. I., Mesa, V. M. El ciclo celular (2003). *El ciclo celular. Med UNAB*, 6(16). 21-29

44. Macé, K., Giudice, E., y Gillet, R., (2015). La synthèse des protéines par le ribosome: Un chemin semé d'embûches [Protein synthesis by the ribosome: a pathway full of pitfalls]. *Med Science*, 31(3), 282-290. <http://doi.org/10.1051/medsci/20153103014>.
45. Magalhaes, A. C., Dunn, H., y Ferguson, S.S. (2012). Regulation of GPCR activity, trafficking and localization by GPCR-interacting proteins. *British journal of pharmacology*, 165(6):1717-1736. <http://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01552.x>.
46. Marchione, R., Leibovitch, S. A., y Lenormand, J.L. (2013). The translational factor eIF3f: the ambivalent eIF3 subunit. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 70(19), 3603–3616. <http://doi.org/10.1007/s00018-013-1263-y>.
47. Milligan G. (2006). G-protein-coupled receptor heterodimers: pharmacology, function and relevance to drug discovery. *Drug Discovery Today*, 11(12), 541-549. <http://doi.org/10.1016/j.drudis.2006.04.007>.
48. Nakayama, K., Kitagawa, M., (1999). Down-regulation of p27(Kip1) by two mechanisms, ubiquitin-mediated degradation and proteolytic processing. *The Journal of Biological Chemistry*. 274(20), 13886-13893.
49. Nalepa, I., Kreiner, G., Bielawski, A., Rafa-Zabłocka, K., y Roman, A. (2013). $\alpha 1$ - Adrenergic receptor subtypes in the central nervous system: insights from genetically engineered mouse models. *Pharmacological reports*, 65(6), 1489-1497. [http://doi.org/10.1016/S1734-1140\(13\)71509-3](http://doi.org/10.1016/S1734-1140(13)71509-3).
50. Oldham, W. M., y Hamm, H. E. (2008). Heterotrimeric G protein activation by G-protein-coupled receptors. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9(1), 60–71. <http://doi.org/10.1038/nrm2299>.
51. Otto, T., y Sicinski, P. (2017). Cell cycle proteins as promising targets in cancer therapy. *Nature Reviews Cancer*, 17(2), 93-115. <http://doi.org/10.1038/nrc.2016.138>.
52. Park, J.Y., Lee, S.Y., Kim, H.R., Seo, M.D., y Chung, K.Y. (2016). Structural mechanism of GPCR-arrestin interaction: recent breakthroughs. *Archives of Pharmacal Research*, 39(3), 293-301. <http://doi.org/10.1007/s12272-016-0712-1>.
53. Piascik, M.T. y Perez, D.M. (2001). Alpha 1-adrenergic receptors: New insights and directions. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 298(2), 403-410.
54. Poon, R. Y. (2016). Cell Cycle Control: A System of Interlinking Oscillators. *Cell Cycle Oscillators: Methods and Protocols*, 1342, 3-19. http://doi.org/10.1007/978-1-4939-2957-3_1.

55. Quereda, V., Porlan, E., Cañamero, M., Dubus, P., y Malumbres, M. (2016). An essential role for Ink4 and Cip/Kip cell-cycle inhibitors in preventing replicative stress. *Cell Death and Differentiation*, 23(3), 430–441. <http://doi.org/10.1038/cdd.2015.112>.
56. Querol-Audi, J., Sun, C., Vogan, J. M., Smith, D., Gu, Y., Cate, J., y Nogales, E. (2013). Architecture of human translation initiation factor 3. *Structure* (London, England: 1993), 21(6), 920–928. <http://doi.org/10.1016/j.str.2013.04.002>.
57. Salcedo de Haro, A. (2007). Modulación de la estabilidad de la quinasa de receptores acoplados a proteínas G (GRK2) por la ligasa Mdm2: implicaciones fisiológicas en la migración y la proliferación celular. (Doctorado en Ciencias). Universidad Autónoma de Madrid Facultad de Ciencias, Departamento de Biología Molecular, Madrid, España.
58. Sanches, M., Alves, B. S., Zanchin, N. I., y Guimarães, B. G. (2007). The crystal structure of the human Mov34 MPN domain reveals a metal-free dimer. *Journal of molecular biology*, 370(5), 846-855. <http://doi.org/10.1016/j.jmb.2007.04.084>.
59. Sanchez, A.M., Csibi, A., Raibon, A., Docquier, A., Lagirand-Cantaloube, J., Leibovitch, S.A., Serge A. Leibovitch, M.P., y Bernardi, H. (2013). eIF3f: A central regulator of the antagonism atrophy/hypertrophy in skeletal muscle. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 45(10), 2158-2162. <http://doi.org/10.1016/j.biocel.2013.06.001>.
60. Sánchez-Fernández, G., Cabezudo, S., García-Hoz, C., Benincá, C., Aragay, A.M., y Mayor, F. Jr., Ribas. C. (2014). Gαq signalling: The new and the old, *Cellular Signalling*, 26(5), 833-848. <http://doi.org/10.1016/j.cellsig.2014.01.010>.
61. Schiöth, H.B., y Fredriksson, R. (2005). The GRAFS classification system of G-protein coupled receptors in comparative perspective. *General and Comparative Endocrinology*, 142(1-2),94-101. <http://doi.org/10.1016/j.ygcen.2004.12.018>.
62. Shanmugasundaram, K., Block, K., Nayak, B.K., Livi, C.B., Venkatachalam, M.A., y Sudarshan, S. (2010). PI3K regulation of the SKP-2/p27 axis through mTORC2. *Oncogene*, 32(16),2027-36. <http://doi.org/10.1038/onc.2012.226>.
63. Sherr, J. C. y Roberts, J.M. (1999). CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes & development*,15(13)1501-1512. <http://doi.org/10.1101/gad.13.12.1501>.
64. Shi, J., Kahle, A., Hershey, J. W., Honchak, B. M. Warneke, J. A., Leong, S.P., y Nelson, M. A. (2006). Decreased expression of eukaryotic initiation factor 3f

- deregulates translation and apoptosis in tumor cells. *Oncogene*, 25(35), 4923-4936. <http://doi.org/10.1038/sj.onc.1209495>.
65. Simonetti, A., Querido, J. B., Myasnikov, A. G., Mancera-Martinez, E., Renaud, A., Kuhn, L., y Hashem, Y. (2016). eIF3 Peripheral Subunits Rearrangement after mRNA Binding and Start-Codon Recognition. *Molecular cell*, 63(2), 206-217. <http://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.05.033>.
66. Sonenberg, N., y Hinnebusch, A. G. (2009). Regulation of translation initiation in eukaryotes: mechanisms and biological targets. *Cell*, 136(4), 731-745. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2009.01.042>.
67. Spoerri, L., Oo, Z. Y., Larsen, J. E., Haass, N.K., Gabrielli, B., Pavey, S. (2015). Cell Cycle Checkpoint and DNA Damage Response Defects as Anticancer Targets: From Molecular Mechanisms to Therapeutic Opportunities. Springer Dordrecht, 29-49. http://doi.org/10.1007/978-94-017-9421-3_3.
68. Stewart, A y Fisher, R. A. (2015) Chapter One - Introduction: G Protein-coupled Receptors and RGS Proteins. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, 133, 1-11. <http://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2015.03.002>.
69. Strader, C.D., Fong, T.M., Tota, M.R., Underwood, D., y Dixon, R.A. (1994). Structure and function of G protein-coupled receptors. *Annual Review Biochemistry*, 63, 101-132. <http://doi.org/10.1146/annurev.bi.63.070194.000533>.
70. Strittmatter, F., Walther, S., Roosen, A., Rutz, B., Schlenker, B., Limmer, S., Waidelich, R., Stief, C. G., Gratzke, C., y Hennenberg, M. (2012). Activation of protein kinase B/Akt by alpha1-adrenoceptors in the human prostate. *Life Sciences*, 90(11-12), 446-53. <http://doi.org/10.1016/j.lfs.2012.01.002>.
71. Strosberg, A. D. (1993). Structure, function, and regulation of adrenergic receptors. *Protein Science*, 2(8), 1198-1209. <http://doi.org/10.1002/pro.5560020802>.
72. Sun, C., Todorovic, A., Querol-Audí, J., Bai, Y., Villa, N., Snyder, M., Cate, J. H. D., Ashchyan, j., Lewis, C.S., Hartland, A., Gradian, C., Fraser, C.S., Doundna, J.A., y Nogales, E. (2011). Functional reconstitution of human eukaryotic translation initiation factor 3 (eIF3). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(51), 20473-20478. <http://doi.org/10.1073/pnas.1116821108>.
73. Syrovatkina, V., Alegre, K.O., Dey, R. y Huang, X.Y. (2016). Regulation, Signaling and Physiological Functions of G-proteins. *Journal of Molecular Biology*, 428(19), 3850-68. <http://doi.org/10.1016/j.jmb.2016.08.002>

74. Valdespino-Gomez, V.M., Valdespino-Castillo, P.M., Valdespino-Castillo, V.E. (2015) Interacción de las vías de señalización intracelulares participantes en la proliferación celular: potencial blanco de intervencionismo terapéutico. *Cirugía y Cirujanos*, 83(2),165-174. <http://doi.org/10.1016/j.circir.2015.04.015>.
75. Valente S.T., Gilmartin, G. M. Mott, C., Falkard., B., y Goff, S. P. (2009). Inhibition of HIV- 1 replication by eIF3f. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 106(11): 4071-4078. <https://doi.org/10.1073/pnas.0900557106>.
76. Venkatakrisnan, A. J., Deupi, X., Lebon, G., Tate, C.G., Schertler, G.F., y Babu, M. M. (2013). Molecular signatures of G-protein-coupled receptors. *Nature*, 494(7436), 185-194. <https://doi.org/10.1038/nature11896>.
77. Vermeulen, K., Van Bockstaele, D. R. y Berneman, Z. N. (2003). The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Proliferation*, 36(3), 131-149. <http://doi.org/10.1046/j.1365-2184.2003.00266.x>.
78. Veulens de la Nuez, A., y Rodríguez, R. (2009). G Protein-coupled receptors as targets for drug design. *Biotecnología Aplicada*. *Biotecnología Aplicada*, 26(1), 24-33.
79. Wenzel, E. S., y Singh A. T. K. (2018). Cell-cycle Checkpoints and Aneuploidy on the Path to Cancer. *In Vivo*, 32(1), 1-5 <http://doi.org/10.21873/invivo.11197>.
80. Wersto, R.P., Chrest, F.J., Leary, J.F., Morris, C., Stetler-Stevenson, M. y Gabrielson, E. (2001). Duplican la discriminación en el análisis del ciclo celular del ADN. *Cytometry*, 46(5), 296-306. <http://doi.org/10.1002/cyto.1171>.
81. Wild, P., y Matos, J. (2016). Cell cycle control of DNA joint molecule resolution. *Current opinion in cell biology*, 40, 74-80. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2016.02.018>.
82. Yang, V. W. (2012). The Cell Cycle. *Physiology of the Gastrointestinal Tract*, 1, 451-471. <http://doi.org/10.1016/B978-0-12-382026-6.00015-4>.
83. Zhang, D., Zhao, Q., y Wu, B. (2015). Structural Studies of G Protein-Coupled Receptors. *Molecules and Cells*, 38(10), 836–842. <http://doi.org/10.14348/molcells.2015.0263>.
84. Zhang, X., y Eggert, U. S. (2013). Non-traditional roles of G protein-coupled receptors in basic cell biology. *Molecular biosystems*, 9(4), 586–595. <http://doi.org/10.1039/c2mb25429h>.
85. Ziolkowski, N., y Grover, A.K. (2010). Functional linkage as a direction for studies in oxidative stress: alpha-adrenergic receptors. *Canadian journal of physiology and pharmacology*, 88(3), 220-232. <http://doi.org/10.1139/Y10-013>.