



**UNIVERSIDAD MICHOACANA  
DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO**

**FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS Y BIOLÓGICAS  
“DR. IGNACIO CHÁVEZ”**

**DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

**“PRODUCCIÓN Y EFECTO DE RNAi SOBRE *eIF3f*  
DE CÉLULAS TUMORALES HUMANAS”**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRO EN FARMACOLOGÍA BÁSICA**

**PRESENTA  
Q.F.B. ALBERTO MENDOZA PINEDA**

**DIRECTORA DE TESIS:  
M. en B. ANA EDITH HIGAREDA MENDOZA**

**CO-DIRECTOR DE TESIS  
MC ASDRUBAL AGUILERA MENDEZ**

**Morelia, Michoacán, Noviembre del 2008.**

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Biología Celular Humana de la Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas “Dr. Ignacio Chávez” bajo la asesoría y dirección de la M. en B. Ana Edith Higareda Mendoza, gracias al apoyo otorgado al proyecto COECYT 2007-02 titulado “Diseño y Producción de RNAs de Interferencia contra la Expresión del Monogen eIF3f para la Inducción de Muerte Celular Programada en Líneas Celulares Humanas con Características Tumorigénicas” por el Consejo Estatal de Ciencia Tecnología del Estado de Michoacán y la Coordinación de la Investigación Científica de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

## CONTENIDO

ÍNDICE GENERAL.....	ii
RESUMEN.....	iv

## ÍNDICE GENERAL

	PÁGINA
<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	1
I.1 Cáncer	3
I.1.1 Factores de riesgo	5
I.1.2 Epidemiología y Etiología del Cáncer	6
I.2 Tratamientos para combatir el cáncer	7
I.2.1 Cirugía	7
I.2.2 Radioterapia	7
I.2.3 Quimioterapia	8
I.2.4 Otras estrategias	8
I.2.5 Terapia génica	8
<b>II. MARCO TEÓRICO</b>	10
II.1 Terapia génica	10
II.2 Oncogenes y Genes supresores de tumores	11
II.3 Ciclo celular	13
II.4 Control del ciclo celular	16
II.5 Necrosis y apoptosis	16
II.6 RNA de interferencia	19
II.7 Antecedentes de <i>eIF3f</i>	22
<b>III. JUSTIFICACIÓN</b>	24
<b>IV. HIPÓTESIS</b>	25
<b>V. OBJETIVOS</b>	25
V.1 Objetivo general	25
V.2 Objetivos específicos	25
<b>VI. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	26
VI.1 Cepa bacteriana y línea celular	26
VI.2 Medios de cultivo, reactivos y soluciones	26
VI.3 Preparación de células electrocompetentes	29
VI.4 Electroporación	29
VI.5 Extracción de DNA plasmídico por lisis alcalina	30
VI.6 Electroforesis en geles de agarosa	30
VI.7 Electroforesis en geles de agarosa desnaturalizante	31
VI.8 Purificación de DNA	31
VI.9 Síntesis de RNA de interferencia (RNAi)	31
VI.10 Cultivo celular de la línea A549	34
VI.11 Transfección mediada por liposomas	35
VI.12 Tinción con azul de tripano	35
VI.13 Tinción con naranja de acridina / bromuro de etidio	35

<b>VII.</b>	<b>RESULTADOS</b>	37
VII.1	Diseño de RNAi	37
VII.2	Producción de RNAi	40
VII.3	Síntesis del RNA de interferencia (RNAi)	44
VII.4	Determinación de muerte celular	49
<b>VIII.</b>	<b>DISCUSIÓN</b>	55
VIII.1	Diseño de RNAi	55
VIII.2	Producción de dsRNA y RNAi	56
VIII.3	Determinación de muerte celular	57
<b>IX.</b>	<b>CONCLUSIONES</b>	58
<b>X.</b>	<b>PERSPECTIVAS</b>	58
<b>XI.</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	59

## RESUMEN

El cáncer es la segunda causa de muerte en México por enfermedad, y su costo en la salud y economía de la población es muy alto. En los últimos años, tanto la cirugía como la quimioterapia y la radioterapia han sido fundamentales en el tratamiento del cáncer. Sin embargo, han sido insuficientes para mejorar la calidad y la supervivencia de los pacientes, lo que hace indispensable el buscar nuevas alternativas de tratamiento, como la terapia génica. El principio de acción de la terapia génica contra cáncer consiste en la introducción a la célula cancerosa de un ácido nucleico (AN) con la intención de añadir o eliminar una función específica y cuyo efecto final sea la destrucción de dicha célula maligna. Nuestra propuesta consiste en eliminar la función de un monogen, esencial para un proceso celular como la división celular, mediante el uso de una técnica de frontera llamada RNAs de interferencia (RNAi).

Higareda-Mendoza y col. (2006) han descrito que el monogen humano eIF3f es indispensable para la división celular, y que la eliminación de su función detiene el crecimiento de la célula, abriendo programas de muerte (apoptosis). eIF3f codifica para la proteína del mismo nombre conocida también como p47 o subunidad 5 del complejo eIF3 (Asano y col., 1997); participa en el inicio de síntesis de proteínas dependientes de "cap", que corresponde a más del 70% de la síntesis proteica global. La estrategia utilizada hasta ahora del RNA antisentido es ineficiente, por lo que es indispensable implementar estrategias que optimicen la eliminación de la función de eIF3f. Por lo anterior, nuestro objetivo fue el implementar la metodología de producción *in vitro* de RNAi y optimizar el silenciamiento del gen eIF3f para inducir muerte celular en la línea celular humana A549.

Se diseñaron pequeños RNAi (siRNA), específicos al mensajero de eIF3f, mediante un análisis estructural de las secuencias nucleotídicas y aminocídicas, así como la clonación del templado codificante para los siRNAs; se produjeron mediante la transcripción *in vitro* del templado. Se evaluó el efecto de los siRNAs sobre la proliferación de células A549 y se determinó que la viabilidad del cultivo disminuye en más del 50 %, 24 horas posteriores a la transfección, y un 60 % de la población celular adherente se encuentra en estado apoptótico después de 48 horas. Los resultados son similares a los observados con RNA antisentido, pero más eficientes en cuanto a que disminuye en más del 50 % el efecto citotóxico dado por el uso de AN.

## I. INTRODUCCIÓN

De acuerdo a la Norma Oficial Mexicana de la Secretaría de Salud, el cáncer se define como una “patología caracterizada por la proliferación desordenada de células que pueden invadir y destruir estructuras adyacentes y propagarse a sitios alejados para causar la muerte”. La Organización Mundial de la Salud reporta que a nivel mundial, en el 2007, el cáncer fue la causa de mortalidad del 13% del total; más de 7 millones de muertes a causa del cáncer. El cáncer no es más que un desequilibrio en la relación proliferación/muerte, a favor de la acumulación de células, y es provocado por mecanismos genéticos o epigenéticos. Estas alteraciones pueden ser congénitas, adquiridas o ambas, y son producidas por mutaciones en cualquier célula susceptible del organismo, alterando el funcionamiento normal de algunos genes involucrados en la proliferación celular, apoptosis, envejecimiento celular y la reparación del ADN. Estas lesiones genéticas producen la enfermedad cancerosa.

Dado que no están totalmente descritas las funciones moleculares y celulares, ni se conocen todos los genes que pudieran estar participando en el desarrollo del cáncer, es necesario el desarrollo de nuevas estrategias que incidan sobre áreas de la medicina molecular.

Las medidas terapéuticas tradicionales incluyen la cirugía, la quimioterapia y la radioterapia. Estas estrategias se consideran agresivas, por lo que se han buscado terapias alternativas que sustituyan o coadyuven a las tradicionales, como la inmunoterapia y la terapia hormonal. El objetivo de estas terapias es detener, controlar o suprimir los procesos proliferación; estimular/reforzar el sistema inmune para que reconozca y destruya con mayor facilidad a las células cancerosas; alterar el patrón de crecimiento de las células cancerosas para fomentar que se comporten como células sanas; bloquear o revertir el proceso que hace que una célula normal o célula precancerosa se convierta en célula cancerosa; e impedir que las células cancerosas se diseminen a otras partes del cuerpo. Dentro de las terapias alternativas, la Terapia Génica es un tratamiento experimental en el cual se introduce material genético a las células de una persona para combatir una enfermedad, como el cáncer; es decir, se suple o elimina la función de un gen. La estrategia en la que se suple la función de un gen tiene diversas desventajas como el que los más de 200 tipos de cáncer resultan del daño en varios genes, por lo que se tendría que suplir la función de varios genes

defectuosos. Por esta razón el cáncer no es curable en la actualidad con esta estrategia. En cuanto a la estrategia de eliminar la función de un gen, ésta resulta ser más prometedora. Se están realizando diversos estudios en donde se elimina la función anormal de oncogenes (c-myb, bcr/abl, c-myc, PCNA, H-c-ras, CDC2, p53, etc.), corrigiendo la secuencia mutada o interfiriendo su expresión.

Los oligonucleótidos usados para esta estrategia de silenciar la expresión de un gen son ribozimas, RNA antisentido y RNAs de interferencia (RNAi). De éstos, los RNAi prometen ser la elección para el desarrollo de esta estrategia ya que su efectividad es mayor en organismos, se obtienen y emplean en condiciones fisiológicas y su efecto citotóxico es menor. (Khanna y col., 2007). La transcripción y digestión con RNAsa III, *in vitro*, genera RNAi de alta eficiencia, además de ser económica. Los trabajos reportados con esta estrategia de silenciamiento se basan en el uso de genes blanco cuya función está involucrada en uno o más de los procesos alterados durante el desarrollo del cáncer. Resulta interesante utilizar como blanco un gen involucrado en un proceso no alterado, como la división celular, y que sea monogénico: *eIF3f*.

El gen *eIF3f* expresa una proteína que se ha encontrado en un complejo multiproteico denominado eIF3. El factor de iniciación 3 de la traducción en mamíferos (eIF3), es un complejo de aproximadamente 600 kDa y consiste de al menos 13 subunidades no idénticas, una de las cuales es la subunidad *eIF3f*, la cual pertenece a la familia de proteínas Mov34. El eIF3 se une a la subunidad ribosomal 40S, manteniéndola disociada de la subunidad 60S, permite que se una a ella el complejo ternario y facilita su unión al RNA mensajero (Asano y col., 1997).

El *eIF3f* de mamíferos es un inhibidor de la síntesis de proteínas, ya que su sobreexpresión (Farías, 2002; Shi y col., 2006). En el genoma humano, *eIF3f* se encuentra codificado en el cromosoma 11, es un gen con 8 exones y codifica una proteína de 357 aminoácidos.

En plantas y animales se ha observado que *eIF3f* es esencial para la progresión del ciclo celular, se expresa en la transición de G2 a mitosis y la eliminación de *eIF3f* por RNA antisentido conduce a muerte celular (Higareda-Mendoza y col., 2006).

Dado que *eIF3f* juega un papel importante tanto en la síntesis de proteínas como en la división celular y la eliminación de su función conduce a muerte celular, nos optimizar el silenciamiento de la expresión de *eIF3f* por RNAi específicos en células humanas tumorales en cultivo.

## I.1 CÁNCER

El cáncer es el término que se le da a cualquiera de los diversos tumores malignos, cuyas células crecen y se dividen sin control, invaden el tejido que las rodea y suelen diseminarse (metástasis) hacia otros sitios (Lodish y col., 2005).

La característica fundamental de los eucariontes superiores es el periodo de vida definido, una propiedad que se extiende a la célula somática individual, cuyo crecimiento y división están altamente regulados. Una excepción son las células cancerígenas, que emergen como variantes que han perdido su control normal de crecimiento. Su habilidad para crecer en localizaciones inapropiadas o propagarse indefinidamente puede ser letal para el organismo en el que se produce.

Hay tres tipos de cambios que tienen lugar cuando una célula se vuelve cancerosa:

- 1- Inmortalización describe la propiedad de crecimiento indefinido, sin ningún otro cambio en el fenotipo necesariamente.
- 2- Transformación describe el fallo de los límites normales del crecimiento; por ejemplo, las células transformadas llegan a ser independientes de los factores que normalmente se necesitaban para el crecimiento celular (Lewin, 2001). Estas propiedades incluyen cambios en la morfología celular, capacidad para crecer sin adherirse a una matriz extracelular, menos requerimientos de factores de crecimiento, secreción de activador del plasminógeno y pérdida de microfilamentos de actina (Lodish y col., 2005).
- 3- Metástasis describe la etapa en la que la célula cancerígena desarrolla la habilidad de invadir el tejido normal, moviéndose así desde su lugar de origen y estableciendo una nueva colonia en cualquier parte del cuerpo (Lewin, 2001).

Las células que componen un tumor maligno, o cáncer, crecen y se dividen más rápido que las normales, no mueren en el tiempo previsto (por ejemplo la leucemia linfocítica crónica, un tumor de los glóbulos blancos), o invaden tejidos cercanos sin un cambio significativo en su velocidad de proliferación (por ejemplo tumores de las células gliales menos dañinos). Algunos tumores malignos como los de los ovarios o las mamas, permanecen localizados y encapsulados al menos durante algún tiempo. Cuando estos tumores progresan, las células invaden los tejidos circundantes, ingresan en el sistema circulatorio y establecen áreas secundarias de proliferación, que es el

proceso llamado metástasis. La mayoría de las células malignas adquieren finalmente la capacidad de metastatizar. En consecuencia, las principales características que diferencian los tumores malignos de los benignos son la invasividad y la diseminación (García, 2003).

Las células que componen a los tumores benignos se asemejan a las células normales y pueden funcionar como ellas. Las moléculas de adhesión celular que mantienen juntos los tejidos, mantienen las células benignas, localizadas en los tejidos donde se originaron. Por lo general una cápsula fibrosa delimita la extensión de un tumor benigno y lo convierte en blanco fácil para un cirujano. Estos tumores sólo representan un problema médico grave si, por su tamaño, interfieren en las funciones normales o secretan cantidades excesivas de sustancias con actividad biológica, como las hormonas, por ejemplo, la acromegalia, el crecimiento excesivo de la cabeza, manos y pies; es el resultado de un tumor hipofisario benigno y causa la sobreproducción de la hormona del crecimiento (García, 2003).

Las células cancerosas se distinguen de las normales en el examen microscópico. Por lo general son menos diferenciadas que las células normales o las de los tumores benignos. En un tejido específico, las células malignas suelen exhibir las características de las células de crecimiento rápido, una relación núcleo-citoplasma elevada, un núcleo prominente y una estructura relativamente poco especializada. La presencia de células invasoras en una sección de tejido que por lo demás sería normal es usada para diagnosticar la malignidad (García, 2003).

De acuerdo con Rugo, el primer evento en el proceso de transformación celular es la iniciación, donde una mutación en el material genético de la célula causado por un carcinógeno, la predispone a transformarse en cancerosa. El siguiente paso es la promoción, donde la célula se transforma en cancerosa. Los cambios en el material genético de las células son a menudo difíciles de detectar, pero algunas veces un cambio en el tamaño o forma de un cromosoma determinado indica un cierto tipo de cáncer. Por ejemplo, el cromosoma Filadelfia que se caracteriza por la translocación recíproca de los cromosomas 9 y 22 creando una fusión de los genes *abl* y *bcr*, se encuentra en el del 80 % de los pacientes de leucemia mieloide crónica (García, 2003). Otros cambios genéticos han sido también identificados en tumores cerebrales y en cánceres de colon, mama, pulmón y hueso (Cotran y col., 2000).

El sistema inmunológico puede destruir una célula cancerosa, antes de que se reproduzca y se establezca como un cáncer. El cáncer se desarrolla cuando la respuesta inmunitaria no funciona adecuadamente, como en personas con SIDA, en personas que toman fármacos inmunosupresores y en quienes padecen ciertas enfermedades autoinmunes, como anemia perniciosa, enfermedad de Addison, artritis reumatoidea, lupus eritematoso sistémico y esclerosis múltiple. El cáncer puede proliferar a pesar del buen funcionamiento del sistema inmunitario (Frey y Monu, 2006).

Los procesos de formación del cáncer, denominados oncogénesis o tumorogénesis, resultan de una interacción entre la genética y el medio ambiente. La probabilidad de las mutaciones en los genes, puede multiplicarse de forma sustancial cuando una persona se expone a ciertos factores de riesgo, como químicos, físicos y biológicos.

### **I.1.1 Factores de riesgo**

La predisposición hereditaria se asocia con antecedentes familiares de un cáncer (Rugo, 2005). Las familias con una especial tendencia al cáncer ya presentan mutaciones en uno o más genes del genoma heredado. Así pues, en sus miembros bastará con pocas mutaciones adicionales para que se empiece a desarrollar un cáncer (Guyton y Hall, 2001). El cáncer de mama, en algunas ocasiones, se debe a una mutación en los genes BRCA-1, BRCA-2 o genes supresores de tumores que tienen la función de controlar el crecimiento y muerte celular, que es más frecuente en algunos grupos étnicos (Cotran y col., 2000). Las mujeres con esta mutación genética tienen entre un 80 y 90 por ciento de probabilidades de desarrollar cáncer de mama y un 40 a 50 por ciento de probabilidad de desarrollar cáncer de ovario.

La exposición a las radiaciones ionizantes (longitud de onda corta) durante un tiempo prolongado predispone a desarrollar un cáncer en las células de la sangre, como la leucemia aguda (Cuevas y Santos, 1985).

La dieta es otro importante factor de riesgo de cáncer, particularmente del que afecta al sistema gastrointestinal. Se sabe con certeza que la nicotina, formaldehído, cianuro, arsénico, plomo, asbesto, uranio, etc. producen cáncer (Cotran y col., 2000).

Virus que inducen cáncer en los seres humanos. Por ejemplo, el papilomavirus causa verrugas genitales, es la causa principal del cáncer cervical en las mujeres. Entre las clases de virus de papiloma humano con alto riesgo de desarrollar este cáncer se

encuentran los tipos: 16, 18 (Sánchez y col., 2002). El citomegalovirus causa el sarcoma de Kaposi y el virus de la hepatitis B puede causar cáncer de hígado, aunque no ha sido aún determinado si es un carcinógeno o un promotor. Algunos retrovirus humanos, como el virus de la inmunodeficiencia humana, causa linfomas y otros cánceres de la sangre (Cotran y col., 2000). El virus Epstein Barr causa el linfoma de Burkitt en África y causa cánceres de nariz y faringe en China. Obviamente, se necesita algún factor adicional, ya sea ambiental o genético, para que este virus cause cáncer (Mostafa y col., 1999).

Parásitos, como el *esquistosoma* (sureste de Asia) de la especie *S. haematobium*, pueden causar cáncer de vejiga por irritación crónica de la misma (Mostafa y col., 1999). Sin embargo, otras causas de irritación crónica de la vejiga no provocan cáncer. La infección por *Clonorchis sinensis*, que es un trematodo (duelas), encontrada principalmente en Extremo Oriente, puede conducir al cáncer de páncreas y de los conductos biliares (Shin y col., 1996).

### **I.1.2 Epidemiología y Etiología del Cáncer**

El cáncer constituye la segunda causa de muerte en los Estados Unidos (Rugo, 2005). En México, según el Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática (INEGI), es la segunda causa de muerte en la población masculina (por debajo de enfermedades del corazón) y el tercero en la población femenina (por debajo de las enfermedades del corazón y la diabetes) (INEGI, 2006). El riesgo de desarrollar un cáncer ha cambiado con el paso del tiempo. Cánceres que eran muy poco comunes se han desarrollado, por ejemplo, en las mujeres el cáncer de pulmón, ha aumentado unas 20 veces y el cáncer de piel y los cánceres de boca. Algunos tipos de cáncer como el tumor de Wilms, la leucemia linfática aguda y el linfoma de Burkitt afectan casi exclusivamente a la gente joven. La razón por la cual estos cánceres aparecen en los jóvenes no se conoce bien y la predisposición genética es uno de los factores involucrados. Sin embargo, la mayoría de los cánceres son más comunes en la gente mayor. Muchos de ellos, como los de próstata, estómago y colon, tienen más probabilidad de aparecer después de los 60 años. El riesgo de desarrollar cáncer se duplica cada cinco años después de los 25 años de edad. El aumento del porcentaje de cáncer en la población es probablemente debido a la combinación de una creciente y

prolongada exposición a carcinógenos, asociado a un sistema inmunológico debilitado. (Frey y Monu, 2006; Rugo, 2005).

## **I.2 TRATAMIENTOS PARA COMBATIR EL CÁNCER**

Las medidas terapéuticas tradicionales incluyen la cirugía, la radiación y la quimioterapia. En la actualidad se estudia la utilidad de la inmunoterapia y la modulación de la respuesta biológica (Rugo, 2005).

### **I.2.1 Cirugía**

Una estrategia para el tratamiento curativo del cáncer es la escisión de masas tumorales malignas mediante una intervención quirúrgica. Las mejoras en las técnicas quirúrgicas, los conocimientos en fisiología, en anestesia y la disponibilidad de potentes antibióticos y hemoderivados, han permitido realizar cirugías más eficientes sin daño a órganos vecinos, con menos secuelas y más pronta recuperación. Sin embargo, la cirugía curativa no es posible cuando el cáncer está demasiado extendido, aunque puede ser beneficiosa si tiene el objetivo de disminuir la masa tumoral para permitir una mejor respuesta al tratamiento quimioterapéutico o radioterapéutico sucesivo (Rugo, 2005).

### **I.2.2 Radioterapia**

Las radiaciones ionizantes tienen la capacidad de producir radicales libres al interactuar con la materia, produciendo roturas de enlaces en moléculas biológicas, siendo la más sensible el DNA. Son capaces de penetrar en el cuerpo produciendo una destrucción tisular. La radiación utilizada puede variar tanto en su energía como en su forma de producirse, pudiéndose hablar de forma general de radioterapia de baja energía (producida por aparatos de rayos X) y radioterapia de alta energía producida por aparatos especiales como el Acelerador Lineal de Electrones (ALE) o alta energía procedente de material radiactivo como las bombas de cobalto. La utilización de una u otra energía depende fundamentalmente de la profundidad a la que se encuentra el cáncer que se vaya a tratar (Cappelli y col., 1998).

La sensibilidad de los tumores a las radiaciones es muy variable. Se requiere que el tumor tenga sensibilidad superior a la de los tejidos vecinos normales. Cuando tales

tumores son además accesibles pueden ser tratados mediante radioterapia. La propiedad de la radiación de destruir principalmente el DNA de las células cancerosas y de respetar hasta cierto punto los tejidos normales permite el tratamiento de tumores en zonas donde no es posible la cirugía por la proximidad de tejidos vitales o porque el tumor ha empezado a infiltrar estructuras adyacentes que no pueden ser sacrificadas. La radioterapia puede ser útil como coadyuvante a la cirugía (Cappelli y col., 1998).

### **I.2.3 Quimioterapia**

Consiste en la utilización de fármacos para el tratamiento del cáncer. Es útil para tratar aquellos tumores inaccesibles a la cirugía y/o a la radioterapia. Las desventajas de la quimioterapia son la toxicidad y la resistencia tumoral al fármaco. Se puede utilizar la quimioterapia junto con la cirugía o con las radiaciones en la denominada terapia combinada (Rugo, 2005).

### **I.2.4 Otras estrategias**

Una estrategia alternativa de tratamiento para el cáncer es la terapia hormonal, en la cual se interfiere la actividad de la hormona u hormonas alteradas genéticamente que están causando el cáncer, o bien, se suprime la producción de las mismas (Rugo, 2005; Smalley y Oldham, 1984).

Alternativamente, se están empezando a emplear nuevas estrategias en el tratamiento del cáncer; por ejemplo, se usan agentes biológicos para estimular a determinadas células para que ataquen a las células malignas, como es la utilización de la interleucina 2 para estimular a los linfocitos "Killers" sensibles a linfocinas (células LAK). También se están elaborando anticuerpos antitumorales, los cuales reconocen y marcan a la célula cancerosa de manera directa o constituyendo el vehículo para un fármaco quimioterapéutico (Berd y col., 2004; Rochlitz, 2001; Smalley y Oldham, 1984).

### **I.2.5 Terapia génica**

La terapia génica consiste en la introducción de información genética a las células de un organismo con fines terapéuticos (Gutiérrez y col., 1992; Patil y col., 2005). La información introducida puede ser para suplir o para eliminar una función celular. La terapia génica se divide en dos categorías. La primera consiste en la alteración de células germinales (espermatozoides u óvulos), lo cual origina una

alteración permanente en todo el organismo y en generaciones posteriores. Esta terapia no se utiliza en seres humanos por cuestiones éticas. En la segunda categoría, uno o más tejidos somáticos son sometidos a la adición de genes o antígenos (genes antisentido) con fines terapéuticos, mediante tratamiento directo o previa extirpación del tejido. Esta técnica se ha utilizado para el tratamiento de cánceres, patologías sanguíneas, hepáticas o pulmonares (Toselli, 2003). La utilización de los ensayos clínicos con terapia génica en pacientes con cáncer, se debe a que genes defectuosos están implicados en esta enfermedad y la expresión del gen normal en la célula cancerosa detiene el crecimiento celular o conduce a su muerte, por ejemplo Rb o p53 (Patil y col., 2005; Rochlitz, 2001).

Se acepta que el cáncer surge por una acumulación de múltiples defectos genéticos a nivel molecular que culminan en la aparición de un fenotipo celular que se caracteriza por la proliferación irrestricta. Con base en tal dato, se han creado diversas estrategias de genoterapia como posibles métodos contra el cáncer (Gómez-Navarro y col., 1999). En algunos trastornos neoplásicos que carecen de un tratamiento realmente efectivo, como el tumor de páncreas, tumores avanzados de pulmón o en aquellos que muestran resistencia a la quimioterapia y radioterapia, la genoterapia quizá constituya un tratamiento eficaz en vez de las terapéuticas clásicas, en tanto que en otras circunstancias sería un coadyuvante o complemento, por ejemplo, empleando técnicas que bloqueen específicamente la expresión de un oncogén como los de la familia *ras* o caso contrario transfiriendo genes con función de reemplazamiento, por ejemplo en la pérdida de la función de *p53* (Goodman y Gilman 2003).

## II MARCO TEORICO

### II.1 TERAPIA GÉNICA

Una de las pretensiones de la terapia génica es curar enfermedades hereditarias, debidas a genes defectuosos, mediante la introducción de genes funcionales. Es aplicable también al tratamiento de enfermedades actualmente incurables, como el cáncer, algunas patologías infecciosas (hepatitis, sida), enfermedades cardiovasculares (hipercolesterolemia y aterosclerosis), enfermedades neurodegenerativas (enfermedades de Parkinson y de Alzheimer) o enfermedades crónicas (artritis reumatoide). Más de 5000 enfermedades humanas se han atribuido a factores genéticos (Patil y col., 2005; Rugo, 2005).

La terapia génica es un tratamiento que puede complementar los tratamientos tradicionales contra el cáncer (Gutiérrez y col., 1992; Moon y col., 2003). La introducción de genes o antígenos se puede efectuar utilizando vehículos que acarreen genes. El sistema ideal de introducción de material genético sería aquel que incluyera DNA (o RNA) insertado de muy diversos tamaños, que pudiera producirse fácilmente de forma concentrada y que se “dirija” de manera específica a algunos tipos particulares de células. Además, con tal sistema se tendría una expresión génica a largo plazo, sería atóxico y no inmunogénico. El sistema en cuestión no existe y todas las técnicas disponibles para la transferencia *in vivo* de genes conllevan notables limitaciones. Están en fase de creación tecnologías virales y no virales, para utilizar en la genoterapia de seres humanos. Los métodos de transferencia de genes más utilizados son vectores como retrovirus, adenovirus, virus adenosvinculados, lentivirus, herpes virus, liposomas y conjugados de DNA. Cada método de transferencia de genes tiene sus ventajas y desventajas, por lo que es importante considerar algunos procesos como: 1) la distribución del vector de DNA después de la administración *in vivo*; 2) la fracción del vector captada por la población de células blanco; 3) el “destino” del material genético dentro de organelos celulares; 4) la rapidez de degradación de DNA (o RNA); 5) la cifra de RNAm producido; 7) la cantidad y estabilidad de la proteína producida, y 8) la compartimentalización de la proteína transcrita, dentro de la célula, o su “destino” secretor (Goodma, 2003).

Considerando que un gen es la unidad funcional del DNA y aquellos que codifican para una proteína tienen funciones específicas, el principio de acción de la terapia génica se basa en la introducción de genes funcionales a las células, o bien de antígenos (genes antisentido) que eliminan la función de un gen celular específico (Moon y col., 2003).

Algunos de los genes de interés para el tratamiento del cáncer serían los oncogenes y genes supresores de tumores, que discutiremos a continuación.

## II.2 ONCOGENES Y GENES SUPRESORES DE TUMORES

Con el nombre de oncogenes se define a un amplio espectro de genes que codifican para proteínas que regulan el crecimiento y la diferenciación celular. Inicialmente estos genes fueron identificados en los retrovirus de la clase I, también conocidos como virus de acción aguda.

A las células que han adquirido características tumorigénicas se las conoce como células transformadas y los genes responsables en esta transformación como v-oncogenes (v, por su origen vírico), mientras que a estos mismos genes en su actividad fisiológica se les denomina c-oncogenes, (c, por su actividad normal en la célula) o también protooncogenes (Monzó, 2000).

De los numerosos oncogenes conocidos, todos excepto unos pocos derivan de genes celulares normales (o sea, protooncogenes) cuyos productos promueven la proliferación celular. Por ejemplo, el gen *ras* es un protooncogen que codifica una proteína Ras de transducción de señales; el gen *ras* derivado mutante de *ras* es un oncogen cuya proteína codificada provee una señal estimulante del crecimiento excesivo o descontrolado. Otros protooncogenes codifican moléculas señales estimulantes del crecimiento y sus receptores, proteínas antiapoptóticas (supervivencia celular) y algunos factores de transcripción.

Para convertirse en oncogenes, los protooncogenes deben ser activados por sustancias químicas, radiaciones, o bien por algún virus (Monzó, 2000). Al menos cuatro mecanismos pueden producir oncogenes de los correspondientes protooncogenes:

*Mutaciones puntuales* (es decir, cambio en un único par de bases) en un protooncogen que deriva en un producto proteico activo en forma constitutiva.

*Translocación cromosómica* que fusiona dos genes juntos para producir un gen híbrido que codifica una proteína quimérica cuya actividad, a diferencia de la de las proteínas progenitoras, a menudo es constitutiva. Ubica un gen regulador del crecimiento bajo el control de un promotor diferente que causa la expresión inadecuada del gen.

*Amplificación* (es decir, la replicación anormal de DNA) de un segmento de DNA que incluye un protooncogen, de manera que existan numerosas copias, lo que conduce a la sobreproducción de la proteína codificada.

Un oncogen formado por los primeros dos mecanismos codifica una “oncoproteína” que difiere de la proteína normal codificada por el protooncogen correspondiente. Por el contrario, los otros dos mecanismos generan oncogenes cuyos productos proteicos son idénticos a las proteínas normales; su efecto oncogénico se debe a la producción en niveles elevados de proteínas.

Las mutaciones con ganancia de función que convierten protooncogenes en oncogenes son genéticamente dominantes; es decir, las mutaciones en sólo uno de los dos alelos son suficientes para la inducción del cáncer (Lodish y col., 2005).

Un oncogen viral se inserta en conexión con un oncogen celular e influye en la expresión de este oncogen, induciendo cáncer. En una célula normal, los oncogenes tienen una localización dentro del cromosoma en proximidad a los puntos frágiles o puntos de ruptura, es decir, en los puntos más propensos a producirse mutaciones y alteraciones cromosómicas (Monzó, 2000).

La malignización celular comienza, seguida de la acción promotora de algún agente que estimula la expresión de uno o varios oncogenes y en consecuencia se liberan factores de crecimiento (Monzó, 2000).

Los genes supresores de tumores codifican proteínas que de una forma u otra inhiben la proliferación celular. Las mutaciones con *pérdida de función* en uno o más de estos “frenos” contribuyen al desarrollo de muchos cánceres. Se reconocen cinco clases amplias de proteínas codificadas por genes supresores de tumores:

- 1- Proteínas intracelulares que regulan o inhiben la progresión a través de un estadio específico del ciclo celular; por ejemplo, p16 y Rb.
- 2- Receptores y transductores de señales para hormonas secretadas o señales de desarrollo que inhiben la proliferación celular; por ejemplo, TGF $\beta$ , el receptor hedgehog.

3- Proteínas de control de puntos clave que detienen el ciclo celular si el DNA está dañado o los cromosomas son anómalos; por ejemplo p53.

4- Proteínas que estimulan la apoptosis p53.

5- Enzimas que participan en la reparación del DNA.

Si bien las enzimas de reparación del DNA no inhiben directamente la proliferación celular, las células que perdieron la capacidad de reparar errores, brechas o extremos quebrados del DNA acumulan mutaciones en muchos genes, incluidos los que son críticos para controlar el crecimiento y la proliferación celular. En consecuencia, las mutaciones con pérdida de función en los genes que codifican enzimas reparadoras del DNA evitan que las células corrijan mutaciones que inactivan genes supresores de tumores o activen oncogenes.

Puesto que suele bastar una copia de un gen supresor de tumor para controlar la proliferación celular, ambos alelos de un gen supresor de tumor deben perderse o inactivarse para estimular el desarrollo tumoral. En consecuencia, las mutaciones oncogénicas con pérdida de función en los genes supresores de tumores son genéticamente recesivas. En muchos cánceres, los genes supresores de tumores tienen eliminaciones o mutaciones puntuales que evitan la producción de cualquier proteína o conducen a la producción de una proteína no funcional. Otro mecanismo para inactivar los genes supresores de tumores es la mutilación de residuos de citosina en el promotor u otros elementos de control. Tal mutilación se encuentra casi siempre en las regiones no transcritas del DNA (Lodish y col., 2005).

El estudio del ciclo celular y su regulación han permitido conocer cómo la fidelidad y la integridad de la replicación del genoma son mantenidas por las funciones coordinadas de los puntos de control y de los sistemas de reparación del DNA. Estos hallazgos sugieren que los mecanismos moleculares de regulación que participan en la transformación celular pueden ser empleados para instrumentar nuevas terapias contra el desarrollo del cáncer, por ejemplo, para oncogenes y genes supresores de tumor (Peralta-Zaragoza y col., 1997).

### **II.3 CICLO CELULAR**

El ciclo celular se define como el proceso mediante el cual una célula da lugar a dos células hijas. Consta de cuatro fases: G1, S, G2 y M. El ciclo completo de células

humanas dura aproximadamente 24 horas aunque hay variaciones (Tarón, 2000). La **fase G1** (del inglés "Gap" o intervalo) es el período de 6-12 h que sigue a una división celular durante la cual se sintetizan RNA y proteínas para prepararse para la síntesis del DNA y durante la **fase S (de síntesis)** la replicación de los cromosomas. Durante este tiempo la célula dobla su tamaño y masa debido a la continua síntesis de todos sus componentes como resultado de la expresión de los genes que codifican las proteínas responsables de su fenotipo particular. Hay células como las nerviosas o del músculo esquelético, que pueden parar su progresión hacia la división en este estadio y permanecer durante días, meses o años en estado de reposo sin aumento de masa, a estas células se les denomina quiescentes y se encuentran en la fase G0. En la fase G1 la célula comprueba que ha generado la masa necesaria para seguir adelante (punto de control R) y así mismo censa las condiciones ambientales favorables (presencia de nutrientes, sales, temperatura adecuada y de factores que induzcan crecimiento) para comenzar la síntesis de DNA. El control se debe a que la proteína (Rb) se une al factor de transcripción E2F. Este complejo se forma después de que las células completan la anafase y entran en G1 temprano o G0, el descenso de los niveles de los complejos ciclina-CDK conduce a la defosforilación de la Rb por fosfatasas sin oposición. Como consecuencia, la Rb hipofosforilada está disponible para inhibir la actividad de E2F durante la fase G1 temprana del próximo ciclo y en las células arrestadas en G0. Esta inhibición desaparece cuando la CDK4 se activa y fosforila a Rb, activándose la capacidad transactivante de E2F. La presencia de mitógenos reduce los niveles de la proteína p16 inhibidora de la CDK4 y a su vez induce la aparición de ciclina D, acciones que aumentan la actividad CDK4. Uno de los sustratos más importantes de esta cinasa es la proteína retinoblastoma (Rb). La CDK4 hiperfosforila a Rb liberando el factor transcripcional E2F, el cual se une a secuencias específicas del DNA para promover la síntesis de enzimas requeridas en la síntesis del DNA (Polimerasas, Dehidrofolato reductasa y ciclinas E y A). La aparición de la ciclina E permite la activación de CDK2 que promueve la desaparición de su inhibidor p27 a través de la fosforilación y activa la maquinaria de replicación (Lodish y col., 2005).

Cuando la célula adquiere el tamaño y la energía (ATP) suficiente y necesaria, comienza la fase **S**, donde el contenido total de DNA aumenta desde  $2n$  a  $4n$  (Lewin, 2001).

El período comprendido entre la finalización de la replicación del DNA y el inicio de la división es la fase **G2** (3-4 h), en donde las células se preparan para la división celular. Al final de G2 existe un segundo punto de control **G2-M**. Su función es comprobar que la célula ha duplicado la masa de modo que puede dar lugar a dos células hijas y que ha completado la replicación del DNA sin errores. Su regulación está controlada por la ciclina B y la cinasa Cdc2/CDK1. Los complejos ciclina B1-Cdc2/CDK1 son activados y translocados desde el citoplasma al núcleo favoreciendo la mitosis. La degradación de la ciclina B en la transición metafase-anafase, provoca la inactivación de Cdc2/CDK1 y la finalización de la mitosis. La transición de la fase G2 a la fase M no es un proceso estrictamente definido, se ha encontrado la presencia de los genes supresores LATS1, que *in vitro*, regulan negativamente la proliferación celular en este punto de control, modulando la actividad de la CDC2/ciclina A, pero el proceso es mucho más complejo y al parecer las cinasas p38 y Chk1 guardan una estrecha relación en el paso de G2 a M. Las células tumorales, suelen tener alterado este punto de control. Finalmente, las células entran a la fase de mitosis M (1 h). Los cromosomas se condensan visiblemente al microscopio óptico como entidades individuales, se distinguen dos cuerpos polares que se sitúan en ambos extremos de la célula y forma el huso acromático (microtúbulos) que va a servir como guía a los cromosomas. Primero, desaparece la membrana nuclear (profase), los cromosomas se unen por los cinetocoros (estructuras asociadas a sus centrosomas) a los microtúbulos en la zona media celular formando la placa ecuatorial (metafase) y sólo se sigue adelante si todos los cromosomas están alineados sobre el huso, ésto es revisado por el tercer punto de control M llamado metafase/anafase. Si es así, las cromátidas hermanas se separan dirigiéndose cada una hacia un polo de la célula (anafase). Cuando llegan a los extremos (telofase), la célula comienza a escindirise (citocinesis) por la zona media dando lugar a dos células hijas. La membrana nuclear vuelve a formarse y los cromosomas a descondensarse, originándose dos células hijas idénticas a la progenitora. (Bonadona, 2000; Tarón, 2000).

Los puntos de control funcionan como un freno durante el ciclo, asegurando que una fase no inicie antes de que la anterior haya finalizado correctamente y permiten el control del ciclo por señales externas (Bonadona, 2000; Tarón, 2000).

## **II.4 CONTROL DEL CICLO CELULAR**

Las cinasas que coordinan los complejos procesos de control del ciclo celular se denominan cinasas dependientes de ciclina (CDKs, del inglés "Cyclin-Dependent Kinases"), porque su actividad de fosforilar proteínas en residuos de serina y treonina es regulada por la asociación reversible de otras proteínas: las ciclinas. Las oscilaciones en la concentración de ciclinas son críticas, existiendo un ciclo de síntesis y degradación durante cada división celular. Durante las distintas fases se forman y destruyen diferentes complejos activos de ciclinas y cinasas (CDKs). El control se ejerce sobre la transcripción de los genes de ciclinas, su degradación y la modulación de la actividad de las CDKs por fosforilación, desfosforilación o inhibición de su actividad (Bonadona, 2000; Peralta-Zaragoza O, 1997; Tarón, 2000).

Existen controles negativos de la proliferación, potencialmente muy importantes para la prevención del cáncer (p53, p21, Rb) que se activan para detener el ciclo cuando se ha dañado la integridad del genoma y evitar así la aparición de células que puedan convertirse fácilmente en cancerosas. Muchos carcinógenos químicos y radiaciones actúan dañando el DNA o el sistema de microtúbulos necesario para la mitosis. Sin embargo, causas internas pueden ocasionar alteraciones en el DNA, como: los procesos de reordenamientos genéticos que tienen lugar durante el desarrollo celular, los procesos de apoptosis o muerte celular programada, cuando las células tienen un DNA parcialmente degradado por acción de nucleasas que producen cortes en la molécula o cuando las células están envejeciendo y se acortan los extremos de sus cromosomas (telómeros) provocando su inestabilidad. Estos controles, que coinciden con los puntos de control G1-S y G2-M del ciclo, son críticos para evitar la inestabilidad genética que pueda llevar a la aparición de cáncer (Bonadona, 2000; Tarón, 2000).

## **II.5 NECROSIS y APOPTOSIS**

Las células no viven indefinidamente. Existen células diferenciadas como las células musculares y las neuronas, que viven períodos prolongados, mientras que otras sólo viven horas, como las células sanguíneas, por ejemplo, los granulocitos (Lodish y

col., 2005). La desregulación de los genes en la célula que codifican las proteínas relacionadas con la muerte celular, son la causa del desarrollo de diversos tumores.

Los mecanismos de muerte celular, son la apoptosis y la necrosis. En la necrosis, las células se hinchan y se deterioran en su estructura y organización, cesan progresivamente la síntesis de proteínas y ácidos nucleicos, no hay respiración, se vuelve inviable y conduce a la rotura de la membrana externa y la lisis. Ello ocasiona la liberación de mediadores de la inflamación como histamina, eicosanoides, prostaglandinas, leucotrienos, factor activador de plaquetas (fap), bradicinina (bk), óxido nítrico (no) y citocinas (Lodish y col., 2005).

El proceso de apoptosis se caracteriza por la condensación del citoplasma, la reducción del volumen celular, la condensación de la cromatina con fragmentación del DNA que da lugar a la formación de cuerpos apoptóticos. La apoptosis se presenta durante el desarrollo embrionario y postnatal temprano. El mecanismo molecular que controla la apoptosis es el complejo de cisteinil-aspartato proteasas (caspasas). La activación de pro-caspasas a caspasas se produce por la vía extrínseca o la proteína Fas y el factor de necrosis tumoral (TNF) de los receptores de muerte, establece conexiones con el espacio extracelular, recibiendo señales proapoptóticas desde el exterior y de las células vecinas. Otra vía importante es la vía llamada mitocondrial, antes llamada de la ceramida. La ceramida es un glucolípidio sintetizado en el retículo plasmático y en las mitocondrias, cuya mayor concentración se ubica junto a la porción interna de la membrana plasmática. En el interior de la membrana misma existe otro fosfolípido, la esfingomielina. Se ha podido determinar que agentes externos como la radiación UV, agentes oxidantes y el calor activan la esfingomielinasa ácida que provoca una reacción aún no bien conocida, sobre la esfingomielina, aumentando la concentración de ceramida. Las vías Fas y TNF también tienen una acción activadora sobre la ceramida. La ceramida actúa sobre las mitocondrias que tienen un doble rol en la apoptosis. Las mitocondrias, que son el último organelo que desaparece en el proceso de apoptosis, al ser fagocitado con los restos de la célula, ejercen un rol pro y antiapoptótico fundamental. La ceramida puede ser activada por factores externos a través de receptores de membrana y directamente por glucocorticoides. Además las alteraciones no corregidas del DNA (en especial mutaciones cancerígenas) activan una proteína sintetizada a partir del gen p53, que provoca apoptosis a través de la activación de la ceramida. La ceramida provoca cambios iónicos entre la matriz de la

mitocondria y el citosol del citoplasma, que producen un descenso del potencial transmembrana con aumento de la permeabilidad de su membrana interna, permitiendo el escape de citocromo C y de un factor inductor de apoptosis AIF (cuya estructura no se conoce bien), que estimulan a las caspasas 8 y 10 e indirectamente a la 3 y 9, conduciendo a la apoptosis. La apoptosis termina con la limpieza de los restos celulares por medio de fagocitos que captan la célula en su totalidad impidiendo que los constituyentes celulares no se liberen al medio extracelular donde podrían traer efectos nocivos a las células circundantes. El gen supresor p53 conduce la apoptosis en el punto de control G1/S y G2/M, cuando el DNA está replicado y presenta alteraciones, evitándose así la generación de células anormales. p53 es activado por señales proapoptóticas y se lo denominó “El guardián del Genoma” dado que su función consiste en responder a situaciones en que las condiciones no son adecuadas para el progreso del ciclo en el punto de control G1/S. La activación de p53 se produce por fosforilación y desencadena la síntesis de factores de transcripción (Peralta-Zaragoza, 1997).

Estos factores de transcripción inducen la síntesis de una cinasa llamada p21. La p21 actúa sobre diversos sustratos para arrestar el ciclo en este punto de control. La p21 básicamente inhibe la interacción Ciclina E/cdk2, impidiendo que la cdk2 promueva el progreso a la fase S. También inhibe la actividad de la DNA polimerasa dificultando la replicación. Si bien la actividad p53, a través de p21, permite el arresto del ciclo celular en G1/S, también se conoce que puede ejercer el mismo efecto en G2/M por inhibición de la cdk25, impidiendo la formación del Factor Promotor de la Mitosis (FPM). El arresto del ciclo crea las condiciones adecuadas para la reparación del DNA o, en caso de ser irreparable el daño detectado, la inducción de la apoptosis. Por último la p21 puede unirse al Antígeno Nuclear de Células Proliferantes (PCNA) que forma parte de la maquinaria proteica de la replicación bloqueándola (Peralta-Zaragoza, 1997).

La acción de p53 no se limita a bloquear el ciclo sino que también participa directamente en la inducción de apoptosis ya que a través de la activación de factores de transcripción puede modificar la expresión de proteínas reguladoras de la apoptosis, como los productos de la familia BCL (Lodish y col., 2005).

La mayor parte de los agentes empleados en quimioterapia basan su acción en alteraciones en el DNA de las células. De este modo, inducen el fenómeno de apoptosis y la muerte de las células tumorales. Desgraciadamente, una de las causas de fallo de

los tratamientos quimioterapéuticos es la aparición de resistencia a la muerte apoptótica de las células tumorales como consecuencia de la mutación de genes como p53 (Dlamini y col., 2004; Moon y col., 2003; Okada y Mak, 2004; Peralta-Zaragoza, 1997).

En la actualidad se están empleando técnicas moleculares, las cuales van dirigidas a restaurar o inactivar la función de ciertos genes involucrados en el desarrollo del cáncer y que conlleven a la detención de la transformación celular o, en un mejor caso, a la inducción de la muerte de las células cancerosas ya que la apoptosis no está funcionando normalmente; por mencionar algunos ejemplos, se encuentra la inactivación de genes por generación de RNA antisentido o por RNA de interferencia (RNAi), que desencadene en una muerte celular de estas células malignas.

## **II.6 RNA DE INTERFERENCIA (RNAi)**

Los RNA pequeños (RNAp) emergieron en el escenario de la biología molecular como represores versátiles y ubicuos de la expresión génica en plantas, animales y hongos. Estos RNAp, de aproximadamente 21-26 nucleótidos (nt) de longitud, inducen el silenciamiento genético a través de su interacción con secuencias complementarias, presentes en RNA mensajeros (RNAm), y pueden ser de diferentes tipos: RNAp no codificantes, RNAp temporales, RNAp de interferencia y microRNAs (miRNA).

Un gen de RNA es cualquier gen que codifica RNA y que no funciona como molde para la síntesis de proteínas. Comúnmente se usan sinónimos como RNA no codificante y RNA pequeño. Los ejemplos más significativos de genes de RNA son el RNA de transferencia (tRNA) y el RNA ribosómico (rRNA), ambos implicados en el proceso de traducción. Algunas de estas regiones genómicas son transcritas como RNAs no codificantes. Sus características principales son:

- diversidad estructural
- tamaños entre 19 nt y varias decenas de kilobases
- en su mayor parte tienen funciones regulatorias.

Los RNA pequeño temporales, son pequeñas moléculas de RNA monocatenario (de 21 a 25 nucleótidos) que no se traducen en proteína y que desempeñan una función reguladora al reprimir la traducción de RNAm específicos en determinados momentos del desarrollo de un organismo. Actúan bloqueando la traducción del RNAm al unirse

con secuencias parcialmente complementarias de la secuencia 3'UTR del RNAm, sin afectar a la integridad del mismo. Fueron descubiertos por primera vez en el nematodo *Caenorhabditis elegans*. Constituyen una subclase de microRNA. Los miRNAs se producen constitutivamente o temporalmente, o son expresados sólo en tejidos específicos. En cambio, los RNAp de interferencia (RNAi) son generados por el procesamiento de moléculas grandes de RNA de origen extracelular de doble cadena y están asociados con el silenciamiento activado por transgenes, RNA microinjetados, virus y por transposones; por lo mismo, son considerados como intermediarios de los mecanismos de defensa en contra de ácidos nucleicos extraños. Los RNAp pueden controlar entonces la estabilidad o la traducción del RNAm (García y Castro, 2004).

Los RNAp son capaces de regular procesos celulares como la expresión de proteínas o la inactivación de uno o varios genes (Sioud, 2004). El conocimiento de sus funciones ha abierto un campo nuevo en la comprensión del funcionamiento celular, en la investigación y sobre la terapia genética, ayudando a comprender los procesos que se dan en las células madre o en los errores genéticos que causan un cáncer (Milhavet y col., 2003; Sioud, 2004).

En 1998, Montgomery y colaboradores realizaron experimentos donde inyectaron dos tipos de RNAp: RNA sentido (el resultante de la transcripción) y RNA antisentido (complementario al RNA sentido) en células de gusanos *C. elegans*. Este RNA de doble cadena produjo una inhibición de la expresión de los genes que estudiaban con una efectividad mayor que la conseguida hasta ese momento con otros sistemas, como la adición de una sola cadena de RNA pequeño (Dykxhoorn y col., 2003; Montgomery y col., 1998). Este sistema de inhibición es lo que se conoce como RNA de interferencia (RNAi).

La interferencia de RNA por vía fisiológica comienza cuando se expresa un pre-miRNA (precursor micro-RNA), una cadena sencilla que puede plegarse y formar una horquilla de doble cadena (miRNA), o por la aparición de RNA de doble cadena introducida de forma exógena por medio de manipulación genética o por virus. En ambos casos, estas cadenas de RNA son cortadas por una RNasa (Dicer) generando fragmentos (19 a 24 nt) de RNA doble cadena con extremos 3' salientes (2-3nt) y el 5' fosforilado, denominados siRNAs ("short interfering" RNA). "Dicer" es una RNAasa III que reconoce y corta RNAs de doble cadena, debido a que contiene un dominio de unión a RNA de doble cadena. (Dykxhoorn y col., 2003).

Posteriormente los siRNA se asocian con el complejo multiproteico RISC (“RNA-induced silencing complex”) el cual contiene miembros de la familia de las argonáutas (Ago) que están implicadas en procesos de silenciamiento transcripcional. Una vez activado RISC, manifiesta una actividad de endo y exonucleasa, así como también de helicasa que separa las dos hebras asociándose una sola de ellas al complejo. El complejo ribonucleoproteico resultante se une al RNAm blanco. Si la complementariedad no es perfecta, RISC queda asociado al mensajero y se atenúa la traducción; si la complementariedad es perfecta, RISC actúa como RNAsa, cortando al mensajero y repete el proceso. Este proceso repetitivo explica por qué un número pequeño de moléculas de siRNA sean suficientes para destruir al RNAm. Existen diversos ejemplos reportados de enfermedades relacionadas a un gen que ha sido blanco de siRNA en mamíferos, por ejemplo en cuatro líneas celulares diferentes de leucemia mieloide (HL-60, U937, THP-1 y K562), las cuales fueron transfectadas con RNA de doble cadena dirigido a los genes endógenos c-raf y bcl-2, los niveles de proteínas de Bcl-2 y Raf-1 decrecieron marcadamente en cada una de las líneas celulares transfectadas. (Dykxhoorn y col., 2003; Milhavet y col., 2003).

Los expertos piensan que su poderosa acción de inhibición y la posibilidad de replicarse de una célula a otra, podrán generar nuevas terapias genéticas aún insospechadas, mucho más eficaces que con las técnicas denominadas “knock-out” o eliminación de un gen completo de un organismo. Por su tamaño pequeño, su participación en la expresión o inexpressión de proteínas y sus funciones todavía desconocidas, los RNAs pequeños se han convertido en llaves para conocer procesos completamente nuevos dentro de la célula, que repercutirán en la forma en que nos acercamos a los mecanismos de la vida. Metodológicamente, el RNAi proporciona una herramienta excepcional para analizar sistemática y rápidamente la función de miles de genes, bloqueando específicamente la expresión de cada uno de ellos y estudiando los efectos que dichos silenciamientos específicos provocan (Dykxhoorn y col., 2003; Milhavet y col., 2003).

Es de nuestro interés estudiar con esta potente metodología de inhibición de la expresión de genes (RNAi) a un gen llamado *eIF3f*, que ha demostrado ser esencial para la división y progresión del ciclo celular, según experimentos realizados por Higareda y col., (2003 y 2006) para evaluar su potencial uso en terapia génica, especialmente en células cancerosas.

## II.7 ANTECEDENTES DE *eIF3f*

El gen *eIF3f* codifica para una proteína que se ha encontrado en un complejo multiproteico denominado eIF3. El factor de iniciación 3 de la traducción en mamíferos (eIF3), es un complejo de aproximadamente 600 kDa y consiste de al menos 13 subunidades no idénticas, una de las cuales es la subunidad *eIF3f* y pertenece a la familia de proteínas Mov34, ya que las proteínas de esta familia comparten una serie de motivos entre los cuales encontramos los dominios MPN. Involucrada en la formación de complejos multiproteicos. Entre los miembros de la familia Mov34, se encuentran subunidades de complejos multiproteicos como el eIF3, el proteosoma y el signalosoma. El eIF3 se une a la subunidad ribosomal 40S, manteniéndola dissociada de la subunidad 60S, permite que se una a ella el complejo ternario y facilita su unión al RNA mensajero (Asano y col., 1997; Hershey, 1991).

La fase de iniciación de la síntesis de proteínas dependientes del “cap” en eucariontes es llevada a cabo por al menos 10 proteínas solubles llamadas factores de iniciación eucarióticos (eIFs) en cuatro pasos principales: 1) disociación del ribosoma en las subunidades 40S y 60S; 2) Unión del complejo ternario (eIF2 + GTP + Met-tRNA) al eIF3 en la subunidad 40S para formar el complejo de preiniciación 43S; 3) Unión del RNAm activado (eIF4 unido al cap del RNAm) al eIF3 del complejo de preiniciación 43S; y 4) Unión del complejo de preiniciación 48S con la subunidad 60S para formar el complejo de iniciación 80S, tras la liberación de los eIFs mediada por el eIF5 (Asano y col., 1997; Hershey, 1991; Sachs y col., 1997).

El *eIF3f* de mamíferos es un inhibidor de la síntesis de proteínas ya que su sobre-expresión inhibe en un 80 % la síntesis de proteínas. (Shi y col., 2006; Farías, 2002; Llanderal, 2003). En el genoma humano, *eIF3f* se encuentra codificado en el cromosoma 11, es un gen con 8 exones y codifica una proteína de 357 aminoácidos. Existe una segunda copia del gen en el cromosoma 2, ésta carece de intrones y codifica una proteína de 361 aa. La identidad entre las 2 secuencias de aminoácidos es del 97%. El *eIF3f* del cromosoma 2 es un pseudogen, ya que no es funcional en células humanas tumorales, al menos en las líneas celulares A549 y 293H (Guzmán, 2005). En plantas y animales se ha observado que *eIF3f* es esencial para la progresión del ciclo celular, se expresa en la transición de G2 a mitosis y la eliminación de *eIF3f* por RNA

antisentido conduce a muerte celular (Higareda-Mendoza y col., 2006; Higareda y col., 2003; Llanderal, 2003).

### III. JUSTIFICACIÓN

Debido a la alta incidencia de cáncer a nivel mundial, anualmente se registran en todo el mundo más de 10 millones de nuevos casos de cáncer y más de seis millones de defunciones por esta enfermedad. En la actualidad se han desarrollado terapias adjuntas a las ya conocidas (cirugía, radioterapia, quimioterapia, hormonoterapia, etc.) como tratamiento único o combinado, teniendo como objetivo curar ésta enfermedad.

En los últimos años se han llevado a cabo trabajos de investigación en el área de la terapia génica como una opción viable al arsenal terapéutico contra el cáncer y dentro de esta terapia las técnicas de RNAi antisentido han resultado muy prometedoras.

Dado que la subunidad *eIF3f* juega un papel importante tanto en la síntesis de proteínas como en la división celular, y la eliminación de su función conduce a muerte celular (Higareda-Mendoza y col., 2006; Higareda y col., 2003), es importante conocer si la interferencia en la expresión del gen mediante mecanismos como el RNAi podría conducir a muerte celular programada en la línea celular A549. Lo cual sería promisorio para poder utilizar este gen como un blanco en la lucha contra el cáncer.

## IV. HIPÓTESIS

El uso de RNAs de interferencia específicos para el silenciamiento de la función de *eIF3f* en cultivos celulares humanos (A549), inducirá muerte celular programada con mayor eficiencia que la metodología basada en el uso de mensajeros antisentido.

## V. OBJETIVOS

### V.1 Objetivo general

Implementar la metodología de producción *in vitro* de RNAs de interferencia y optimizar el silenciamiento del gen *eIF3f* para inducir muerte celular en la línea celular humana A549.

### V.2 Objetivos particulares

- I. Diseñar RNAs de interferencia (siRNA) específicos al RNA mensajero de *eIF3f*.
- II. Producir “siRNAs” específicos a *eIF3f*.

Evaluar el efecto de los “siRNAs” sobre la proliferación de células humanas tumorales A549.

## VI. MATERIALES Y MÉTODOS

### VI.1 Cepa Bacteriana y Línea Celular

- A. Se utilizaron las cepas de *Escherichia coli* XL 1 Blue y JM101 sin transformar y transformadas con varias construcciones.
- B. Se utilizó la línea celular A549 (ATCC CCL-185), que provienen de un adenocarcinoma de pulmón de morfología epitelial. Su nivel de bioseguridad es 1 y fue adquirida a través de la ATCC (American Type Culture Collection).

### VI.2 Medios de Cultivo, Reactivos y Soluciones

A.- MEDIO ESENCIAL MÍNIMO (MEM) (SIGMA)	9.6 g
Suplementado con:	
Bicarbonato de sodio	1.5 g
L-glutamina	4 mM
Hepes	10 mM
Suero fetal bovino (SFB)	100 ml
Agua tridestilada c.b.p.	1000 ml

B.- SOLUCIÓN DE TRIPSINA-EDTA (0.1%)	
Trizma base	0.60 g
EDTA-sal sódica	0.04 g
Agua bidestilada	50 ml
Adicionar:	
Fosfato de potasio monobásico (11 mM)	0.26 g
Fosfato de sodio dibásico (120 mM)	2.14 g
Ajustar el pH a 7.2 con HCl	
Agua bidestilada c.b.p.	100 ml

Esterilizar con filtro millipore de diámetro de poro de 0.22  $\mu$ m.

C.- MEDIO LURIA LÍQUIDO (LB)	
Bacto-triptona o peptona de caseína	10 g
Extracto de levadura	5 g
Cloruro de sodio	10 g
Agua bidestilada c.b.p.	1000 ml

Para el medio Luria sólido se adicionan 15g de agar bacteriológico por litro de medio líquido y se esteriliza por autoclave a 15 psi durante 20 minutos. Para el medio

Luria-ampicilina se adicionaron 75 ug concentración final en medio Luria sólido o líquido.

#### D.- REGULADOR DE FOSFATOS-SALINO (PBS)

Cloruro de sodio	138 mM
Cloruro de Potasio	2 mM
Fosfato dibásico de sodio	8 mM
Fosfato monobásico de potasio	1.5 mM
Agua bidestilada c.b.p.	1000 ml

Ajustar el pH a 7.5 con NaOH 1 N y esterilizar por autoclave durante 20 min a 15 psi.

#### E.- REGULADOR TRIS-ACETATO 50 X (TAE)

Tris-base	242 g
Ácido acético glacial	57.1 ml
EDTA 0.5 M (pH8)	100 ml
Agua bidestilada c.b.p.	1000 ml

Para sus uso en la electroforesis, se hace una dilución de 1:50 con agua bidestilada (TAE 1 X).

#### F.- SOLUCIÓN SALINA DE TRIS-EDTA (STE)

Cloruro de sodio	100 mM
Tris-HCl (pH8)	10 mM
EDTA 1	1 mM

#### G. - SOLUCIÓN DE RESUSPENSIÓN

Tris-base (pH8)	50 mM
EDTA (pH 8)	10 mM

#### H.- SOLUCIÓN DE NEUTRALIZACIÓN

Acetato de potasio (5M)	60 ml
Ácido acético glacial	11.5 ml
Agua bidestilada	28.5 ml

#### I.- SOLUCIÓN DE HIDRÓXIDO DE SODIO Y SDS (SOLUCIÓN DE LISIS)

Hidróxido de sodio	0.4 N
Dodecil sulfato de sodio (SDS)	2 %
Agua bidestilada c.b.p.	100 ml

J.-BROMURO DE ETIDIO (10 mg/ml)

Bromuro de etidio	50mg
Agua bidestilada c.b.p.	5 ml

Al usarlo como revelador en la electroforesis de DNA se diluye a 0.5 ug/ml

K.- NARANJA DE ACRIDINA (10 mg/ml)

Naranja de acridina	50 mg
Agua bidestilada c.b.p.	5 ml

Al usarlo en una mezcla con bromuro de etidio se diluyen ambos a 4 ug/ml.

L.- AZUL DE TRIPANO (20 % EN HBSS)

Azul de tripano	20 ml
HBSS (Solución Salina Balanceada de Hank 1X)	80 ml

M.- *BUFFER* DE TRANSCRIPCIÓN (5X)

Tris-HCl (pH 7.9 a 25°C)	200 mM
NaCl	50 mM
MgCl <sub>2</sub>	30 mM
Espermidina	10 mM

N.- *BUFFER* DE REACCIÓN (10 X) PARA RNasa III

NaCl	500 mM
Tris-HCl	100 mM
MgCl <sub>2</sub>	100 mM
DTT (pH 7.9)	10 mM

Ñ.- SOLUCIÓN DE PRECIPITACIÓN PARA RNA

Cloruro de litio	7.5 M
EDTA	50 mM

O.- MOPS 10X

MOPS	2 M
EDTA (pH 8)	0.01 M
Acetato de Sodio	0.05 M
Agua bidestilada c.b.p.	500 ml

P.- *BUFFER* DE EQUILIBRACIÓN (PURIFICACIÓN POR Q-SEFAROSA)

Tris-base (pH 8)	20 mM
EDTA (pH 8)	1 mM
NaCl	300 mM

#### Q.- BUFFER DE LAVADO (PURIFICACIÓN POR Q-SEFAROSA)

Tris-base (pH 8)	20 mM
EDTA (pH 8)	1 mM
NaCl	400 mM

#### R.- BUFFER DE ELUCIÓN (PURIFICACIÓN POR Q-SEFAROSA)

Tris-base (pH 8)	20 mM
EDTA (pH 8)	1 mM
NaCl	520 mM

### VI.3 Preparación de Células Electrocompetentes

Se creció la cepa *Escherichia coli* XL 1 Blue durante toda la noche en 50 ml de medio de cultivo LB a 37° C y 250 rpm. Este preinóculo se transfirió a 450 ml de medio y se incubó a las mismas condiciones hasta tener una OD<sub>600</sub> de 0.6. El cultivo se colocó en hielo por 10 min y después se centrifugó por 10 min a 4000 rpm y 4° C (Beckman J2-MC). Se desechó el sobrenadante y el pellet se lavó 2 veces resuspendiendo en agua tridestilada estéril fría y centrifugando 10 min a 4000 rpm y 4° C. Se desechó el sobrenadante, se resuspendió el pellet en 30 ml de glicerol al 10% frío y se centrifugó por 10 min a 4000 rpm y 4° C. Se resuspendió en 6 ml totales de glicerol al 10% frío y se hicieron alícuotas de 100 µl en tubos *ependorf*. Se almacenaron a -80° C. El proceso se realizó en condiciones de esterilidad.

### VI.4 Electroporación

Se usó un electroporador 2510 de Eppendorf, utilizando células de *E. coli* XL-Blue, JM101, bajo el siguiente protocolo general: Se descongeló en hielo un vial con 100 µl de las células electrocompetentes y se adicionaron 2 µl del DNA (10 ng) de interés. Se dejó en hielo 1 min y se transfirió a una celda de electroporación fría. Esta se colocó en el electroporador y se aplicó 2500 volts por 3 miliseg. Inmediatamente se sacó y se resuspendieron las células en medio LB para dejar incubando 1 hr a 37° C y

250 rpm. Posteriormente se tomó un volumen de las células y se plaquearon en cajas de agar con el antibiótico correspondiente (ampicilina a 75 µg/ml).

### **VI.5 Extracción de DNA Plasmídico por Lisis Alcalina**

Este método se utilizó para la purificación de cantidades pequeñas de DNA plasmídico y se realizó para la obtención de todos los plásmidos hechos en este trabajo bajo el siguiente protocolo: Se tomó una de las colonias obtenidas en la electroporación y se inoculó en 3 ml de medio LB y el antibiótico correspondiente (ampicilina 75 µg/ml) y se dejó incubar de 12-16 hrs a 37° C y 250 rpm. En un eppendorf preenfriado se centrifugó el inóculo a 3600 rpm por 5 min y se desechó el sobrenadante. Se adicionó 1 ml de STE y se vortexeó suavemente. Se centrifugó a 3600 rpm por 5 min, se desechó el sobrenadante y se adicionaron 300 µl del buffer de resuspensión a temperatura ambiente. Se vortexeó suavemente y se adicionaron sin agitar 300 µl del buffer de neutralización y se dejó reposar 10 min en hielo. Se centrifugó 15 min a 4° C y máxima velocidad y se transfirió el sobrenadante a un eppendorf nuevo, se desechó la pastilla.

Se repitió el último paso y después se adicionó 0.7% del volumen de isopropanol frío, agitando por inversión. Se centrifugó 30 min a máxima velocidad a temperatura ambiente, se decantó el sobrenadante y se adicionaron 700 µl de etanol al 70% frío. Se centrifugó 5 min a velocidad máxima, se decantó el sobrenadante y se dejó secar la pastilla. Se resuspendió en H<sub>2</sub>O destilada estéril y se almacenó a -20° C.

### **VI.6 Electroforesis en Geles de Agarosa**

Todos los corrimientos fueron realizados horizontalmente utilizando como marcador de peso molecular 1 escalera de DNA de 1kb (Fermentas) y Buffer de carga 6x (Fermentas). Se utilizaron geles de agarosa al 1% disuelta en TAE 1X y con bromuro de etidio a 0.5 µg/ml. En los casos en que se deseaba cortar y purificar una banda se usó agarosa al 0.8% sin bromuro. La corriente empleada fue de 60-100 volts. Los geles se examinaron en un transiluminador de luz UV de Pharmacia Biotech modelo UV-20

115V; se fotografiaron y analizaron utilizando la cámara y software de Kodak Digital Science ID.

## **VI.7 Electroforesis en Geles de Agarosa Desnaturalizante**

Todos los corrimientos fueron realizados horizontalmente utilizando como marcador de peso molecular una escalera de RNA (Marca Promega) y Buffer de carga para RNA 2x desnaturalizante con bromuro de etidio (Fermentas). Se prepararon los geles de agarosa al 1 %. Se disolvió 1 gr de agarosa en 84.5 ml de agua estéril calentando en el horno de microondas, se dejó enfriar hasta una temperatura en la que se puede manipular y se le añadieron 10 ml de MOPS 10 X y 5.5 ml de formaldehído, se mezcló y se vació a la cámara de electroforesis. La corriente empleada fue de 60 volts se utilizó MOPS 1 X como buffer de corrida. Los geles se examinaron en un transiluminador de luz UV de Pharmacia Biotech modelo UV-20 115V; se fotografiaron y analizaron utilizando la cámara y software de Kodak Digital Science ID.

## **VI.8 Purificación de DNA**

Para la purificación de DNA de soluciones y de geles de agarosa se utilizó el Kit de purificación “UltraClean 15 DNA Purification” (MOBIO Laboratories, Inc) siguiendo las instrucciones del fabricante.

## **VI.9 Síntesis de RNA de Interferencia (RNAi)**

### **VI.9.1 Amplificación de la región seleccionada de *eIF3f***

Con los oligonucleótidos diseñados se amplificó por PCR el fragmento de 492 pb que se seleccionó para silenciar el gen *eIF3f* y se usó como templado la clona pRCE021 que tiene la región codificante completa del gen *eIF3f* (Figura 1) y se hicieron varios minipreps (Figura 2) para tener suficiente cantidad de DNA templado para hacer el PCR.

Las condiciones de amplificación fueron las siguientes:

1 ciclo	94 ° C	5 min.
35 ciclos	94 ° C	25 seg.
	60 ° C	25 seg.
	72 ° C	30 seg.
1 ciclo	72 ° C	10 min.
1 ciclo	4 ° C	Terminación

Después de la amplificación, se aislaron y purificaron los productos de la reacción de PCR (región seleccionada de *eIF3f*), con la finalidad de eliminar posibles contaminantes como son enzima, dNTPs, oligonucleótidos restantes así como bandas inespecíficas de DNA resultado de la amplificación (Figuras 3 y 4).

### VI.9.2 TRANSCRIPCIÓN DE LOS PLÁSMIDOS

La clona pRCE 060 se linearizó con la enzima Pst I y por separado con la enzima Sac II (figura 10), incubándolas durante 4 hs a 37 °C, al terminar se purificaron por columna de silica (Marca Promega) según las especificaciones del proveedor y se verificaron en un gel de agarosa al 1 %.

La restricción con la enzima Pst I se utilizó para hacer la transcripción con la RNA polimerasa T 7 y la restricción con la enzima Sac II se utilizó para hacer la transcripción con la polimerasa T 3. Estas se incubaron durante 2 hs a 37 °C, de acuerdo a la siguiente mezcla de reacción:

#### Reacción de transcripción

Buffer transcripción 5 X	4 uL
DTT (100 mM)	1 uL
rNTPs (5 mM)	2 uL
Inhibidor RNasa (40 U/uL)	1 uL
DNA (140 ug/uL)	11 uL
Enzima (T3 ó T 7 17 U/uL)	<u>1 uL</u>
TOTAL	<b>20 uL</b>

Al terminar la reacción se le adicionó 1 uL de DNasa I (1U/uL) y se incubó durante 15 min a 37 °C. Transcurrido el tiempo se le adicionaron 30 uL de agua libre de RNasas y 25 uL de solución precipitación de cloruro de litio y se incubó 3 hs a - 20 ° C. Se centrifugó a 14 000 x g durante 15 min a 4 ° C, se retiró el sobrenadante, se secó la

pastilla y se resuspendió en 20 uL de agua libre de RNAsas. Las muestras se verificaron por gel de agarosa desnaturalizante al 1 %.

El plásmido pSL301 (que se utilizó como control negativo) se digirió con la enzima EcoR I y por separado con la enzima Hind III, incubándolas durante 4 hs a 37 °C. Al terminar se purificaron por columna de silica (Marca Promega) según las especificaciones del proveedor y se verificaron en un gel de agarosa al 1 %.

La enzima EcoR I se utilizó para hacer la transcripción con la RNA polimerasa T 7 y la restricción con la enzima Hind III se utilizó para hacer la transcripción con la polimerasa T 3. Estas se incubaron durante 2 hs a 37 °C y se añadieron las mismas cantidades que las utilizadas para hacer la transcripción del plásmido pRCE 060. Al terminar la reacción se precipitó con cloruro de litio de acuerdo a lo mencionado para el plásmido pRCE 060 y se verificó por gel de agarosa desnaturalizante al 1 %.

### **VI.9.3 ALINEAMIENTO DE LAS CADENAS SENCILLAS DE RNA**

Las cadenas transcritas con las diferentes RNA polimerasas de cada plásmido (pRCE 060 y pSL301) se mezclaron para obtener los RNAs de cadena doble correspondientes. El volumen total de cada mezcla fue de 120 uL y se incubaron a 80 °C durante 15 min. Al término de la incubación la temperatura se dejó descender gradualmente hasta que llegó a temperatura ambiente (27 °C). El RNA de cadena doble se verificó por gel de agarosa al 1 %.

### **VI.9.4 DIGESTIÓN DEL RNA DE DOBLE CADENA CON LA ENZIMA RNASA III**

Se incubaron los RNAs de cadena doble durante 1 h a 37 °C de acuerdo a la siguiente reacción:

#### Reacción de digestión con RNasa III

Buffer de reacción 10 X	15 uL
Enzima RNasa III (1uL)	<u>15 uL</u>
TOTAL	<b>150 uL</b>

### **VI.9.5 PURIFICACIÓN POR COLUMNA DE Q-SEFAROSA DE LOS RNA PEQUEÑOS DE INTERFERENCIA (siRNA)**

Los productos de la digestión con la enzima RNasa III se purificaron por resina Q-Sefarosa Fast Flow (Marca GE Healthcare). Se añadieron 400 uL de la resina a un tubo con un orificio de salida y previamente empaquetado con un polímero sintético. Se centrifugó durante 1 min a 1000 x g y se añadieron 500 uL de buffer de equilibración, se centrifugó 1 min a 1000 x g y se añadieron otros 500 uL de buffer de equilibración repitiendo el procedimiento anterior. En todos los pasos de centrifugación se desechó el eluido. Se añadieron los 150 uL de la reacción de digestión con la RNasa III, se incubó a temperatura ambiente durante 5 min y al terminar se centrifugó por 1 min a 1000 x g. Se agregaron 500 uL de buffer de lavado y se centrifugó durante 1 min a 1000 x g. Se adicionaron 300 uL de buffer de elución y se pasa a un tubo eppendorf nuevo para recolectar el eluido, el cual se obtuvo al centrifugar durante 1 min a 1000 x g. Se agregaron otros 300 uL del buffer de elución y se repite el procedimiento. Al eluido se le adicionaron 500 uL de isopropanol, se agitó y se incubó a -20 C toda la noche.

Al día siguiente se centrifugó a 4 °C durante 15 min y a 14 000 x g, se desechó el sobrenadante y se lavó la pastilla con 1 ml de etanol al 70 % frío. Se vuelve a centrifugar durante 5 min a 14 000 x g y a 4 °C, se desechó el sobrenadante y se secó la pastilla para resuspenderla en 100 uL de agua estéril. Se verificaron los siRNA en un gel de agarosa al 3 % teñido con bromuro de etidio.

### **VI.10 Cultivo Celular de la Línea A549**

Se decantó el medio de cultivo del frasco T de 75 cm<sup>2</sup> y se lavó 2 veces con PBS 1X estéril frío. Se adicionaron y dispersaron 0.5 ml de una solución tripsina-EDTA 1X (Sigma) por cada 25 cm<sup>2</sup> y se incubó a 37° C por 2 min para desprender las células. Se adicionó MEM con SFB (suero fetal bovino) y sin antibióticos y se homogenizó por pipeteo suave. Se determinó la cantidad de células viables y se sembró en frascos T-25 o 75 cm<sup>2</sup> diluyendo en MEM con SFB y sin antibióticos precalentado para obtener una concentración final de 8 x 10<sup>3</sup> células viables/cm<sup>2</sup>. Se incubó a 37° C y una atmósfera de 5 % de CO<sub>2</sub>, aflojando las tapas de los frascos para permitir la aireación.

### **VI.11 Transfección Mediada por Liposomas**

Para las transfecciones transitorias realizadas en este trabajo, se utilizó el sistema Lipofectamine 2000 (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Que consiste en la formación de liposomas de superficie cargada positivamente, de manera que estos son atraídos al esqueleto de fosfatos de los pequeños RNAs dicatenarios. El complejo liposoma más RNA dicatenario interacciona con la membrana celular.

Para células A549 se utilizan frascos T-25 cm<sup>2</sup>, se quitó el medio un día antes de la transfección y se pusieron las células en 5 ml de MEM con SFB y sin antibióticos y a una concentración adecuada para que estuvieran aproximadamente al 70% de confluencia el día de la transfección. En otro tubo, se diluyeron 25 µl de LF2000 Reagent en 500 µl de Opti-MEM I y se incubaron por 5 min a temperatura ambiente. Esta última mezcla se combinó con 2.5 µg de RNA dicatenario en 500 µl de OptiMEM I por 20 min. Mientras transcurrió ese tiempo, se quitó el medio a las células y se reemplazó por otros 5 ml de MEM con SFB y sin antibióticos. Finalmente se adicionó el complejo RNA-Liposomas directamente al medio de las células, se mezclaron y se dejó incubar a 37 °C y 5 % de CO<sub>2</sub> por 24 y 48 hs y continuar con el ensayo de viabilidad.

### **VI.12 Ensayo de Tinción con Azul de Tripano**

El criterio para determinar las células viables se fundamenta en la exclusión del colorante y su internalización en células muertas. Se toma una muestra del cultivo celular y se prepara una dilución con el azul de tripano, tal que la dilución permita contar entre 200 y 400 células en los diez cuadrantes de la cámara de Neubauer (hemacitómetro). Se determina la concentración de millones de células/ml con el número de células contadas multiplicado por el factor de dilución de 0.001.

### **VI.13 Ensayo de Tinción con Naranja de Acridina / Bromuro de Etidio**

Para determinar muerte celular por apoptosis, se utilizó la tinción con naranja de acridina y bromuro de etidio, que son dos fluorocromos con afinidad por el ADN. Con

esta tinción, en general, pudimos observar células viables las cuales se ven de color verde por el naranja de acridina, extendidas y con núcleos intactos. El criterio de apoptosis en su fase temprana fue células color verde con núcleos condensados y ausencia de estructuras extranucleares. Apoptosis en fase tardía, células rojas (por el bromuro de etidio) nuclear o citoplásmico que aparecen encogidas y las células necróticas son de color rojo también por el bromuro de etidio, extendidas y de mayor tamaño que las células rojas en apoptosis tardía (Wickenden y *col.*, 2003).

A los cultivos celulares transfectados con RNAi se les retiró el medio y se les adicionaron 250  $\mu$ l de la solución de naranja de acridina/bromuro de etidio a 4  $\mu$ g/ml en PBS 1X. Los cultivos se analizaron por microscopía epifluorescente empleando el filtro B/G/R de LEICA con longitud de onda simultáneas de 420/30; 495/15 y 570/20; y objetivos de 10 y 40 X.

## VII. RESULTADOS

### VII.1 DISEÑO DE RNAi

Lo primero para el diseño de siRNA, es conocer la secuencia codificante del gen *eIF3f*, la cual presenta 8 exones, 1274 nt, 33 nt 5'-UTR y 167 nt 3'-UTR que a continuación se muestra. Dicha secuencia se obtuvo de la página de Internet "[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?val=NM\\_003754](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?val=NM_003754)".

```
LOCUS   NM_003754      1274 bp mRNA linear PRI 04-AUG-2007
DEFINITION Homo sapiens eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 5, epsilon,
47kDa (EIF3S5), mRNA.
ACCESSION NM_003754
VERSION   NM_003754.2 GI:83656778
KEYWORDS
SOURCE    Homo sapiens (human)
ORGANISM  Homo sapiens
           Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi;
           Mammalia; Eutheria; Euarchontoglires; Primates; Haplorrhini;
           Catarrhini; Hominidae; Homo.
REFERENCE 1 (bases 1 to 1274)
AUTHORS   Shi,J., Feng,Y., Goulet,A.C., Vaillancourt,R.R., Sachs,N.A.,
           Hershey,J.W. and Nelson,M.A.
TITLE     The p34cdc2-related cyclin-dependent kinase 11 interacts with the
           p47 subunit of eukaryotic initiation factor 3 during apoptosis
JOURNAL   J. Biol. Chem. 278 (7), 5062-5071 (2003)
PUBMED    12446680
1      atttccgctt cgcctcctt ctttctcgac aagatggcca caccggcggg accagtaagt
61     gctcctccgg ccacgccaac ccagtcctcg gcggcggccc cagcctcagt tccagcgcca
121    acgccagcac cggctgcggc tccggtccc gctgcggctc cagcctcctc ctacagacct
181    gcggcagcag cggctgcaac tgcggctcct ggccagaccc cggcctcagc gcaagctcca
241    gcgcagaccc cagcgcctgc tctgctggt cctgctctc cagggccctt cccggcgggc
301    cgcgtggtca ggctgcaccc agtcatttg gctccattg tggacagcta cgagagacgc
361    aacgaggggtg ctgcccagat tatcgggacc ctgttgggaa ctgtcgacaa aactcagtg
421    gagtcacca attgctttc agtgccgcac aatgagtcag aagatgaagt ggctgttgac
481    atggaattg ctaagaatat gtatgaactg cataaaaaag tttctcaaa tgagctcctc
541    ctgggctggt acgtacggg ccatgacatc acagagcact ctgtgctgat ccacgagtac
601    tacagccgag aggccccaa cccatccac ctactgtgg acacaagtct ccagaacggc
661    cgcatgagca tcaaagccta cgtcagcact ttaatgggag tcctggggag gaccatggga
721    gtgatgttca cgctctgac agtgaaatac gcgtactacg aactgaacg catcggagtt
781    gacctgatca tgaagacctg ctttagcccc aacagagtga ttgactctc aagtgacttg
841    cagcaagtag gaggggcctc agctcgcctc caggatgccc tgagtacagt gttgcaatat
901    gcagaggatg tactgtctgg aaaggtgtca gctgacaata ctgtgggccc cttctgatg
961    agcctgggta accaagtacc gaaaatagt cccgatgact ttgagacat gctcaacagc
1021  aacatcaatg acctttgat ggtgacctac ctggccaacc tcacacagtc acagattgca
1081  ctcaatgaaa aacttgtaa cctgtgaatg gacccaagc agtacacttg ctggctagg
1141  tattaacccc aggactcaga agtgaaggag aatggggtt tttgtggtct tgagtcacac
1201  tgagatagtc agttgtgtgt gactctaata aacggagcct acctttgta aattaaaaaa
1261  aaaaaaaaaa aaaa
```

Se identificó por métodos bioinformáticos las regiones de mayor probabilidad de silenciamiento de la expresión del gen *eIF3f*. Se utilizó el servidor web DEQOR que es exclusivo para el diseño de siRNA (Henschel y *col.*, 2004: <http://deqor.mpi-cbg.de>). En la siguiente imagen se muestra un espectro de la probabilidad de cruzamiento con otros genes.

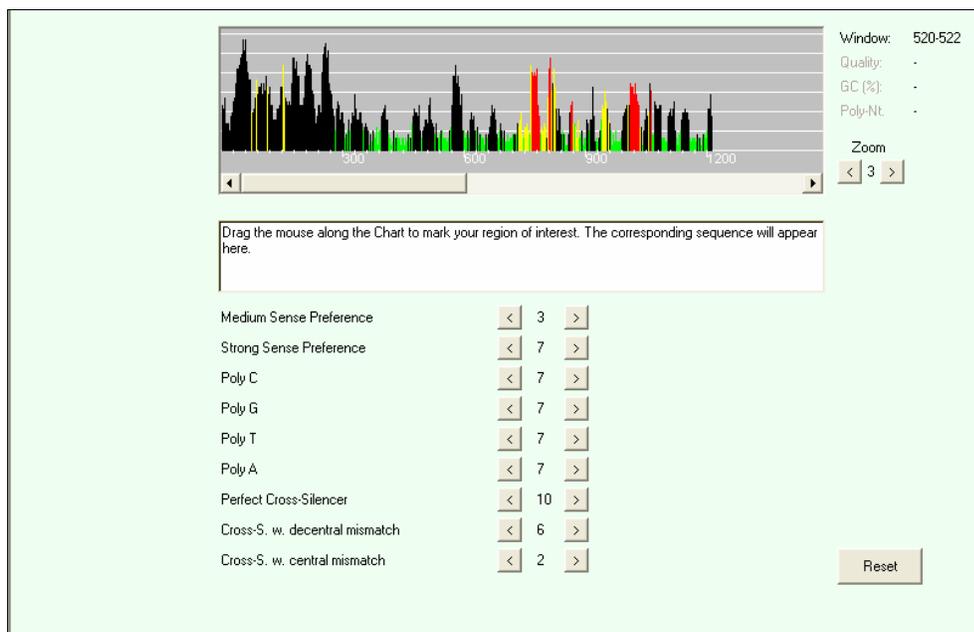


Figura 1. Gráfico que muestra los sitios específicos y no específicos para el diseño de siRNA.

El programa DEQOR genera una gráfica interactiva en donde cada barra representa un siRNA. Las barras verdes codifican para silenciadores de alta calidad (siRNA eficientes) y las barras negras para silenciadores menos eficientes. En cambio, las barras rojas representan siRNAs con una complementariedad perfecta con otro gen y las barras amarillas representan complementariedad imperfecta con otro gen. Los resultados arrojados por DEQOR, muestran pocas barras amarillas (menos de tres) por lo que existe baja probabilidad de generar siRNA con complementariedad imperfecta a otro gen en cambio, como se muestra en la imagen anterior, en el extremo 5' del RNAm existe una región de aproximadamente 380 nt (barras rojas) para la cual si se generan siRNA éstos tendrían una alta probabilidad de cruzamiento con otro gen. El análisis arrojado por esta región indica que el cruzamiento se da con pseudogenes y con miembros de la familia Mov 34, a la cual pertenece *eIF3f*, y que comparten el dominio

MPN (Shi y col., 2006). Por otro lado, después de la zona roja en el extremo 5' se presentan sólo barras verdes y negras intercaladas (aproximadamente del nt 380-1200).en esta zona no se generarían siRNA que complementarían con el mensajero de otros genes, sin embargo, las barras negras son indicativos de siRNA menos eficientes por aumentar la probabilidad de presentar estructuras secundarias de menor afinidad con el complejo RISC.

Dado que la probabilidad de silenciar la expresión de un gen puede verse mejorada si se usa una mezcla de siRNA en la región comprendida eficientes (barras verdes), se decidió generar la mezcla de siRNAs en la región comprendida entre los nucleótidos 529 y 1020. Esto debido a que para producir una mezcla de siRNA los protocolos señalan que es recomendable tomar un tamaño de 400 a 600 pb del gen (Dykxhoorn y col., 2003; Kittler y col., 2005); a demás, esta región corresponde a la parte central del mensajero y los siRNA son más eficientes que los dirigidos a los extremos del RNAm. A continuación se muestra la región codificante del gen *eIF3f* seleccionada para silenciar por RNAi y de la que se produjeron siRNA.

(\*C).- Primer base de la región a silenciar 529.

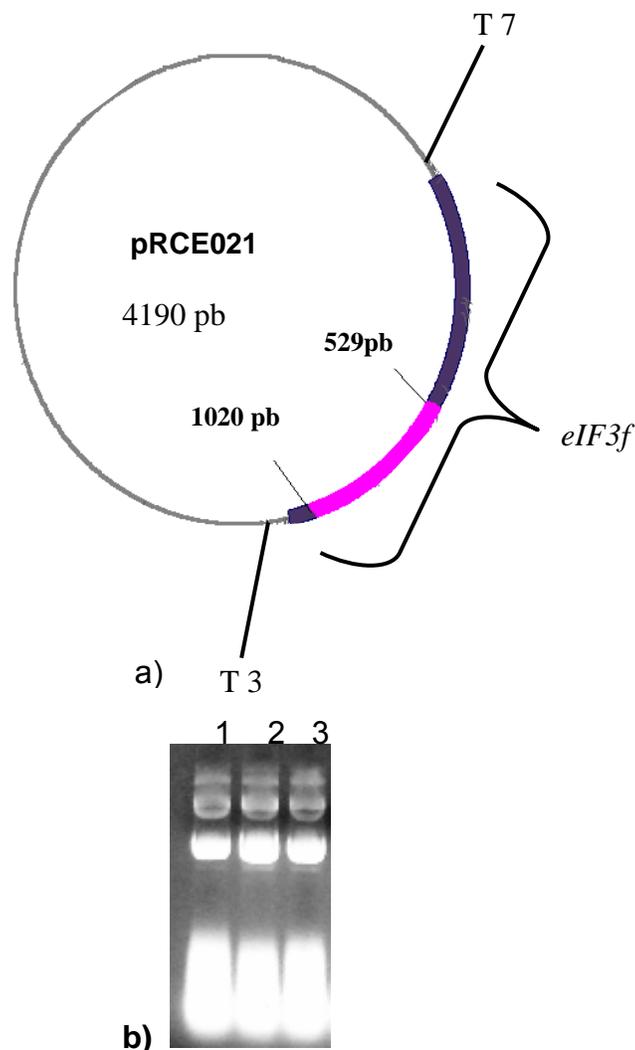
(\*\*G).- Última base de la región a silenciar 1020.

```
5' *CATGACATCACAGAGCACTCTGTGCTGATCCATGAGTACTACAGCC
GAGAGGCCCCCAACCCCATCCACCTCACTGTGGACACAAGTCTCCAGAACGG
CCGCATGAGCATCAAAGCCTACGTCAGCACTTTAATGGGAGTCCCTGGGAGG
ACCATGGGAGTGATGTTACGCCTCTGACAGTGAAATACGCGTACTACGACA
CTGAACGCATCGGAGTTGACCTGATCATGAAGACCTGCTTTAGCCCAACAG
AGTGATTGGACTCTCAAGTGACTTGCAGCAAGTAGGAGGGGCATCAGCTCGC
ATCCAGGATGCCCTGAGTACAGTGTTGCAATATGCAGAGGATGTACTGTCTG
GAAAGGTGTCAGCTGACAATACTGTGGGCCGCTTCCTGATGAGCCTGGTTAA
CCAAGTACCGAAAATAGTTCCCGATGACTTTGAGACCATGCTCAACAGCAACA
TCAATGACCTTTTGATGGTGACCTACCTG**-3'.
```

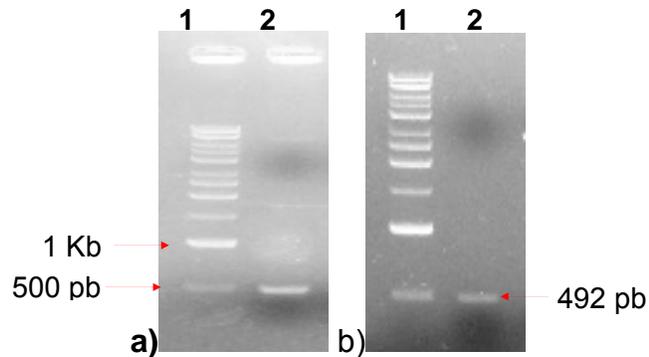
## DISEÑO DE OLIGONUCLEÓTIDOS

Uno de los parámetros más importantes para tener éxito en la amplificación por PCR es el diseño de los oligonucleótidos cebadores (oligos o *primers*). Basándonos en la región anterior, se procedió a diseñar oligonucleótidos para producir el DNA de esta región de *eIF3f*. Se diseñaron los oligonucleótidos Homo 5 (5'-CATGACATCACAGAGCAC-3') con una T<sub>m</sub> de 62°C y Homo 3 (5'-CAGGTAGGTCACCATCAA-3') con una T<sub>m</sub> de 62°C.

## VII.2 PRODUCCIÓN DE RNAi



**Figura 2. a) Esquema del plásmido pRCE021.** Plásmido que contiene la secuencia codificante completa del gen *eIF3f*, así como los promotores T7 y T3. **b) DNA del plásmido pRCE021.** Gel de agarosa al 1% donde se muestran tres mipreparaciones del plásmido pRCE021. El RNA que se observa en la parte de abajo se digirió con RNasa (20 ug/ul).



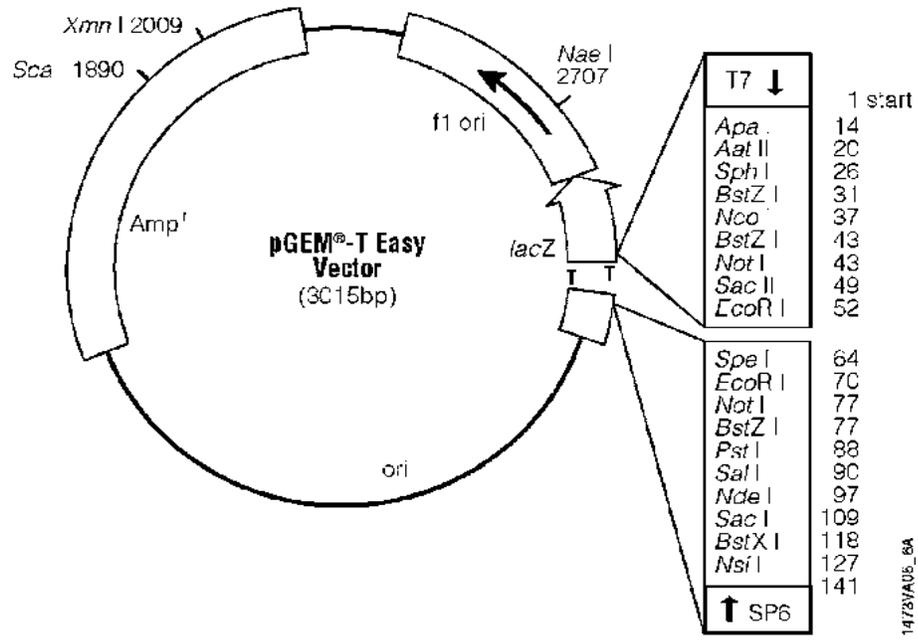
**Figura 3. Producto de PCR de la región del gen *eIF3f* a silenciar.** Gel de agarosa al 1%. a) Carril 1, escalera de DNA de 1kb (Chimerex), Carril 2, fragmento de 492 pb esperado. b) Purificación del producto de PCR obtenido. Gel de agarosa al 1% mostrando el producto de PCR purificado. Carril 1, escalera de DNA de 1kb (Chimerex), Carril 2, fragmento de 492 pb purificado a partir de gel.

## VII.2.2 CONSTRUCCIÓN DEL PLÁSMIDO UTILIZADO

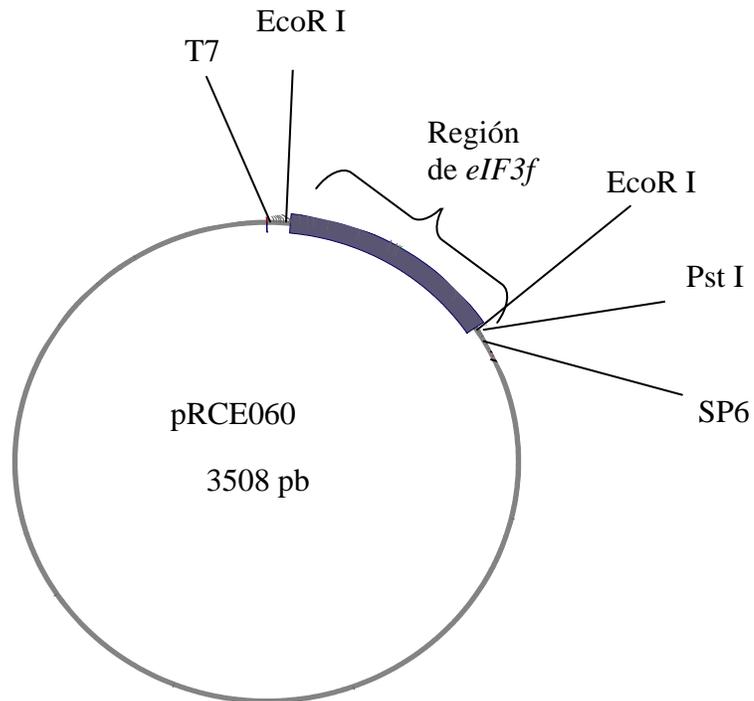
Se clonó el producto de PCR que corresponde a un fragmento de 492 pb de *eIF3f* en el vector pGEM-T Easy (figura 5) por ser un vector que permite ligar fácilmente productos de PCR.

## VII.2.3 Obtención del plásmido pGEM-T Easy antisentido (pRCE060)

La región de 492 pb que se amplificó y purificó se ligó al vector pGEM-T Easy (PROMEGA) para clonación de productos de PCR (Figura 5), incubando toda la noche a 4 ° C con una relación de 2:1 (Inserto:vector). Se hizo una transformación por electroporación con esta ligación utilizando como cepa *E. coli* JM101. Se extrajo y purificó el DNA plasmídico de las colonias obtenidas, generando así el plásmido pGEM-T Easy antisentido (Figura 6).

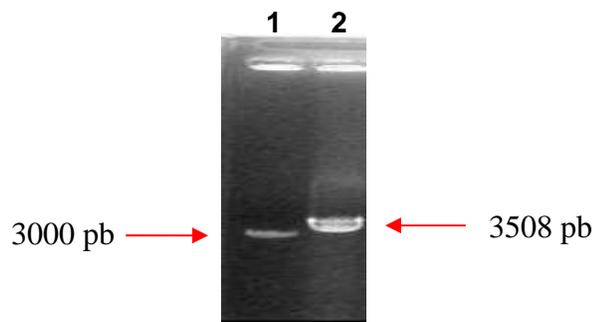


**Figura 6. Esquema del vector para clonación de productos de PCR pGEM-T Easy.** El vector contiene un sitio de resistencia al antibiótico ampicilina, un sitio múltiple de clonación con 2 timinas sobresalientes que se unen a las adeninas de los productos de PCR, un origen de replicación, promotor T7, promotor SP6 y el gen *lacZ*.

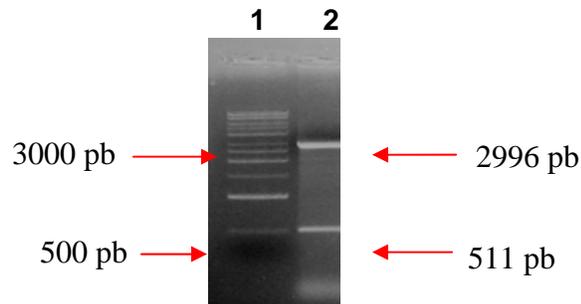


**Figura 7. Esquema de la construcción del plásmido pRCE060.** El fragmento de 492 pb amplificado se ligó al vector para clonación de productos de PCR pGEM-T Easy, obteniéndose el plásmido pRCE060.

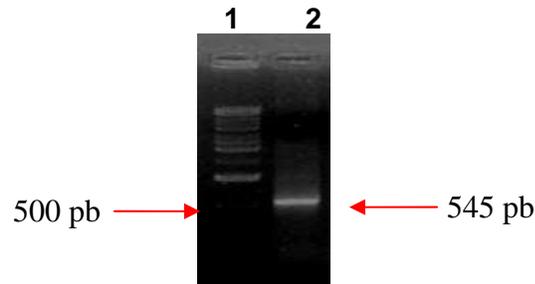
Para comprobar la inserción correcta del fragmento amplificado, se cortó con la enzima *pst* I, la cual tiene un sitio único en el vector para linearizarlo esperando un tamaño de 3508 pb (Figura 7). También el plásmido se digirió con la enzima *EcoR* I, que se encuentra en el vehículo flanqueando al inserto, esperando dos bandas de 511 pb y 2996 pb. Se observaron las digestiones en geles de agarosa al 1 % comprobando la inserción correcta (Figura 8). Para saber la orientación, se amplificó el inserto por PCR usando el oligonucleótido del promotor T7 que se encuentra en el vector pGEM-T Easy y el oligonucleótido Homo 3' del fragmento del gen *eIF3f*. Se obtuvo una banda de 545 pb, lo cual nos indica que el inserto está en dirección 3'-5' con respecto al promotor T7 del vector (Figura 9).



**Figura 8. DNA plasmídico pRCE060 linearizado con la enzima *Pst* I.** Gel de agarosa al 1 % en donde se observa el plásmido pRCE060 digerido con la enzima *Pst* I para linearizarlo y comprobar que se ligó el fragmento de 492 pb al vector pGEM-T Easy.



**Figura 9. DNA plasmídico pRCE060 digerido con la enzima EcoR I.** Gel de agarosa al 1 % donde se muestra el plásmido pRCE060 digerido con la enzima EcoR I que tiene 2 sitios de corte flanqueando al inserto. Se observó un fragmento de 511 pb y otro de 2996 pb.

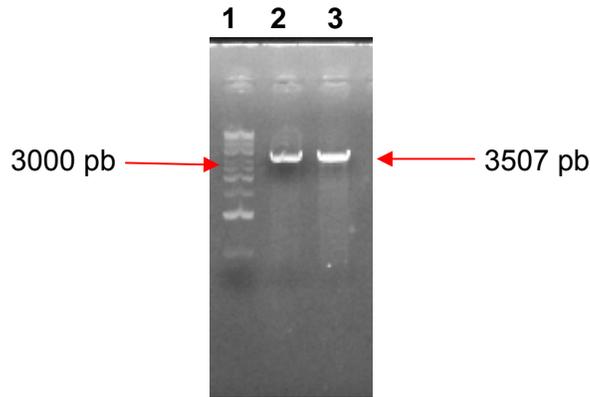


**Figura 10. Producto de PCR para verificar la orientación del fragmento de 492 pb en el plásmido pRCE060.** Se realizó un PCR para conocer la orientación del fragmento de 492 pb ligado en el vector pGEM-T Easy. Se observa una banda de 545 pb, lo que indica que esta en dirección 3'-5' con respecto al promotor T7 del vector.

### VII.3 SÍNTESIS DEL RNA DE INTERFERENCIA (RNAi)

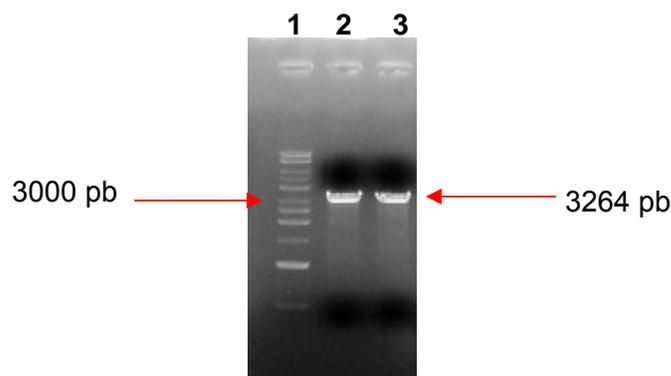
#### VII.3.1 Digestión y purificación del plásmido pRCE 060 y del pSL301

Como templado se utilizó el plásmido pRCE060 que contiene los sitios de unión de las polimerasas T7 y Sp6. Se digirió con la enzima Pst I para hacer la transcripción con la polimerasa T7 y se purificó por columna de sílica (Marca PROMEGA) según especificaciones del proveedor y con la enzima Sac II para hacer la transcripción con la enzima Sp6, purificando el fragmento como se mencionó anteriormente (Figura 10). Esto se realizó para crear sitios de terminación y que las polimerasas sólo transcriban la región blanco. Se obtuvieron 2 fragmentos de 3507 pb al ser digeridas con las enzimas mencionadas y los cuales corresponden al peso esperado de la construcción linearizada.

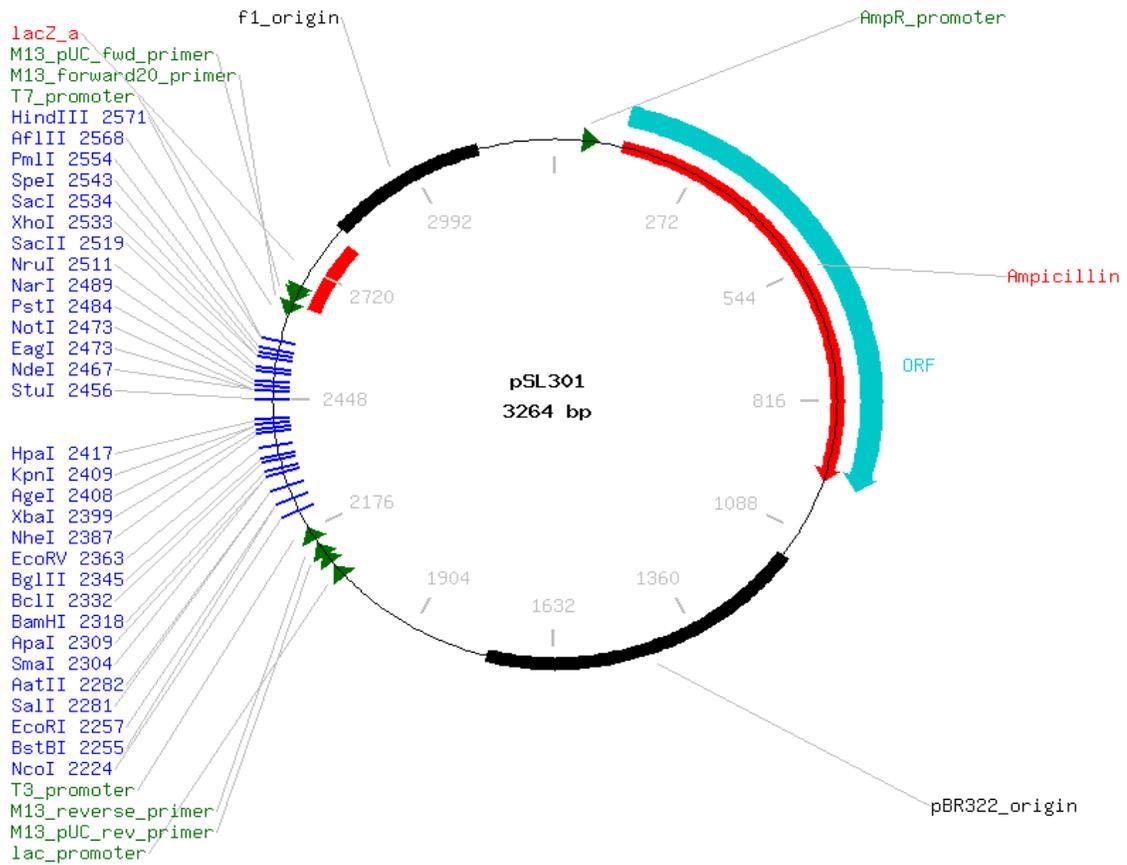


**Figura 11. Producto de la digestión del DNA plasmídico pRCE 060 con la enzima Pst I y Sac II.** Gel de agarosa al 1%. Carril 1 escalera de DNA de 1kb (Chimerex), carril 2 DNA digerido con la enzima Pst I y carril 3 DNA digerido con Sac II.

Como control negativo se utilizó el plásmido pSL301, el cual es un vector con un sitio múltiple de clonación de 471 pb, flanqueado por los promotores para las RNA polimerasas T3 y T7 (Figura 12). Esta región se utilizó para tener RNAi azarosos. Se digirió con la enzima EcoR I para hacer la transcripción con la polimerasa T7 y el fragmento se purificó por columna de silica (Marca PROMEGA) según especificaciones del proveedor. Para realizar la transcripción con la RNA polimerasa T3 se digirió con la enzima Hind III y se purificó como se mencionó anteriormente (Figura 11). Se obtuvieron 2 fragmentos de 3264 pb, los cuales corresponden al peso esperado del vector linearizado.



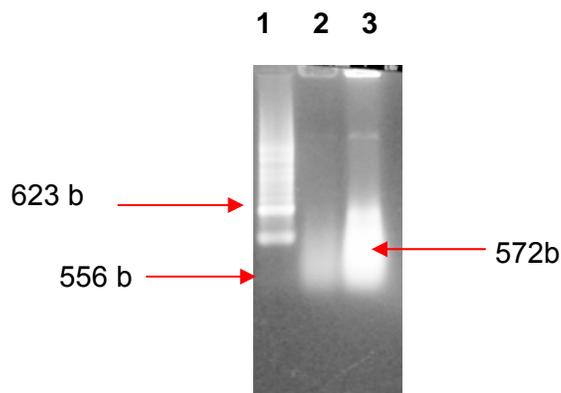
**Figura 12. Producto de la digestión del DNA plasmídico pSL301 con la enzima EcoR I y Hind III.** Gel de agarosa al 1 %. En el carril 1, escalera de 1kb (Chimerex), en el carril 2 DNA producto de la digestión con Eco R I de 3264 pb y en el carril 3 el DNA digerido con Hind III.



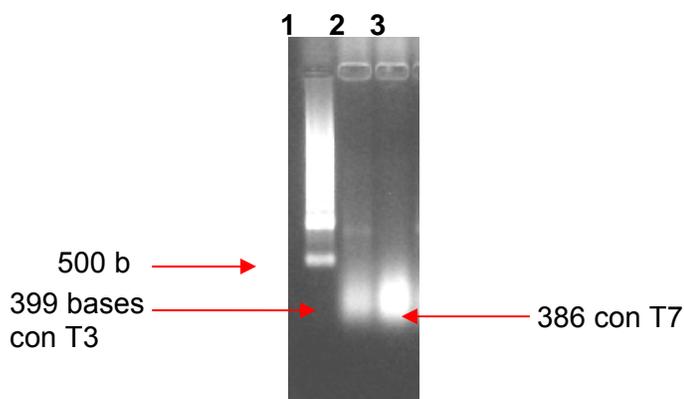
**Figura 13. Esquema del vector de clonación pSL 301.** El vector contiene un sitio múltiple de clonación flanqueado por los sitios de unión a las polimerasas T3 y T7. El gen de resistencia a ampicilina y el gen de *lacZ*.

### VII.3.2 Transcripción de la clona pRCE 060 y del plásmido pSL301

Se utilizó la clona pRCE 060 digerida con la enzima de restricción Pst I para hacer la transcripción con la RNA polimerasa T7. Para realizar la transcripción con la polimerasa Sp6 se utilizó la clona digerida con la enzima Sac II (Figura 13). Se observa un barrido en el peso esperado de 556 bases para la transcripción con la polimerasa T7 y una barrido de aproximadamente 572 bases para la transcripción con Sp6.



**Figura 14. Producto de la reacción de transcripción de la clona pRCE060.** Gel de agarosa desnaturalizante al 1 %. En el carril 1, marcador de peso molecular para RNA (Promega), en el carril 2 pRCE060 transcrito con T7 y en el carril 3 pRCE060 transcrito con Sp6.

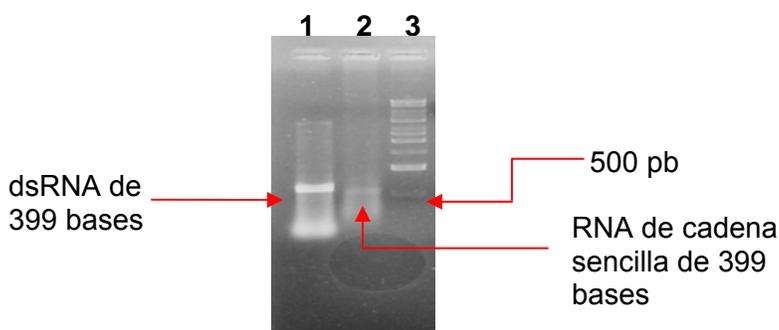


**Figura 15. Producto de la reacción de transcripción del plásmido pSL301 digerido con las enzimas EcoR I y Hind III.** Gel de agarosa desnaturalizante al 1 %. En el carril 1 marcador de peso molecular de RNA, carril 2 RNA de 399 bases transcrito con la polimerasa T3 y en el carril 3 RNA de 386 bases transcrito con la polimerasa T7.

Se realizó la transcripción del plásmido pSL301, el cual servirá como control negativo. Se utilizó el plásmido digerido con la enzima EcoR I para transcribir con la polimerasa T7 y el plásmido digerido con la enzima Hind III para transcribir con la polimerasa T3 (Figura 14). Se obtuvo la reacción de transcripción en el peso esperado de 399 bases para la transcripción con la polimerasa T 3 y un peso de 386 bases para la transcripción con la enzima T 7.

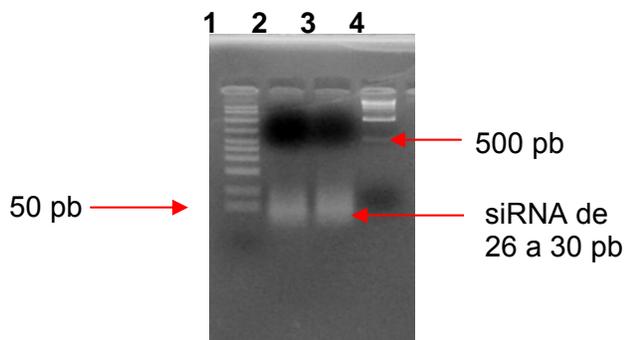
### VII.3.3 Alineamiento de RNA de cadena sencilla, digestión de RNA de cadena doble y purificación de RNAs pequeños de interferencia

Con la transcripción de los plásmidos (pRCE060 y pSL301) se obtuvieron transcritos de cadena sencilla, sentido y antisentido, los cuales se hibridaron entre sí para obtener los RNAs de cadena doble (dsRNA). Se observó una diferencia en el corrimiento entre el RNA de cadena doble y el RNA de cadena sencilla, donde este último corre mas abajo que el de cadena doble, con lo que se corrobora que efectivamente hubo un alineamiento entre los RNAs complementarios de cada plásmido (Figura 15).



**Figura 16. Producto de la reacción de transcripción de RNA de cadena sencilla y cadena doble.** Gel de agarosa al 1 %no desnaturante. Carril 3, marcador de peso molecular para DNA, carril 2 RNA de cadena sencilla y carril 1 RNA de cadena doble.

Los RNA de doble cadena se digirieron con la enzima RNasa III, con lo cual se obtuvieron los siRNA esperados de aproximadamente de 26 a 30 pb, como se observa en la (Figura 16).



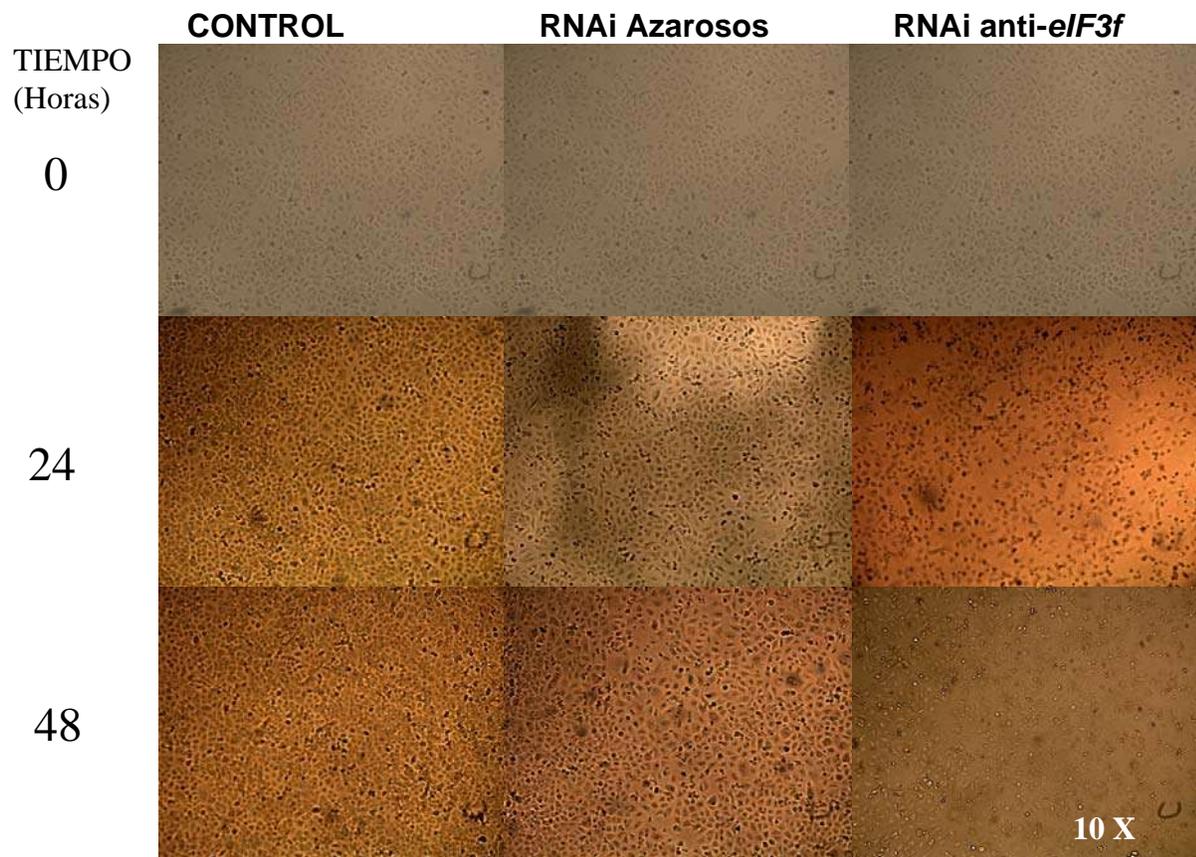
**Figura17. Purificación con Q-Sefarosa del producto de la reacción de digestión con RNasa III.** Gel de agarosa 1 % no desnaturizante. Carril1 y 4 marcador de peso molecular para DNA, carril 2, RNAi control negativo de 26 a 30 pb, carril 3, RNAi de 26 a 30 pb para el silenciamiento de *eIF3f*.

## VII.4 DETERMINACIÓN DE MUERTE CELULAR

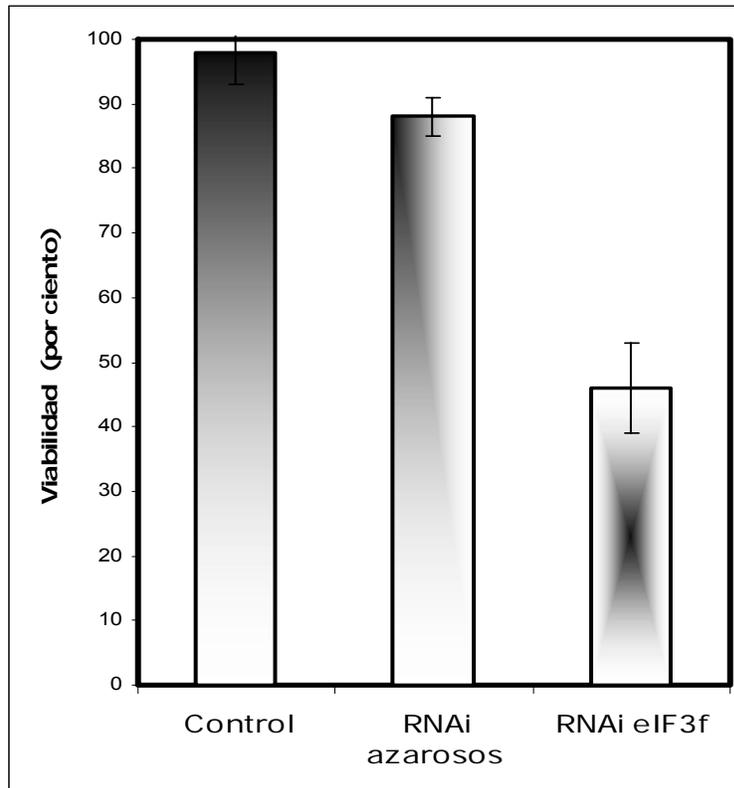
### VII.4.1 Efecto de los RNAi de *eIF3f* sobre la proliferación celular de cultivos en la línea celular A549.

Los RNAi producidos se usaron para transfectar las células tumorales de la línea A549 de tejido de pulmón, usando lipofectamina-2000 para determinar el posible efecto de inhibición dirigida por siRNA anti-*eIF3f*. Se observó un marcado efecto negativo en la viabilidad de las células A549 transfectadas con los siRNA anti-*eIF3f*, con respecto a los controles de los siRNA azarosos y el del vehículo de la transfección (Lipofectamina2000). Este efecto de inhibición, se observó desde las 24 horas y a las 48 horas fue muy pronunciado, observándose una gran cantidad de células desprendidas a este tiempo de postranfección (Figura 17).

Se determinó el porcentaje de viabilidad por el método de azul de tripano en las células transfectadas. En el control negativo utilizando sólo Lipofectamina2000 se obtuvo un 98 % de células vivas y en el control utilizando los siRNA azarosos generados a partir del vector pSL301 se obtuvo un 89 %, como era de esperarse. Mientras que el porcentaje de células vivas en los cultivos transfectados con siRNA anti-*eIF3f* se obtuvo solo un 46 % de células vivas (Figura 18).

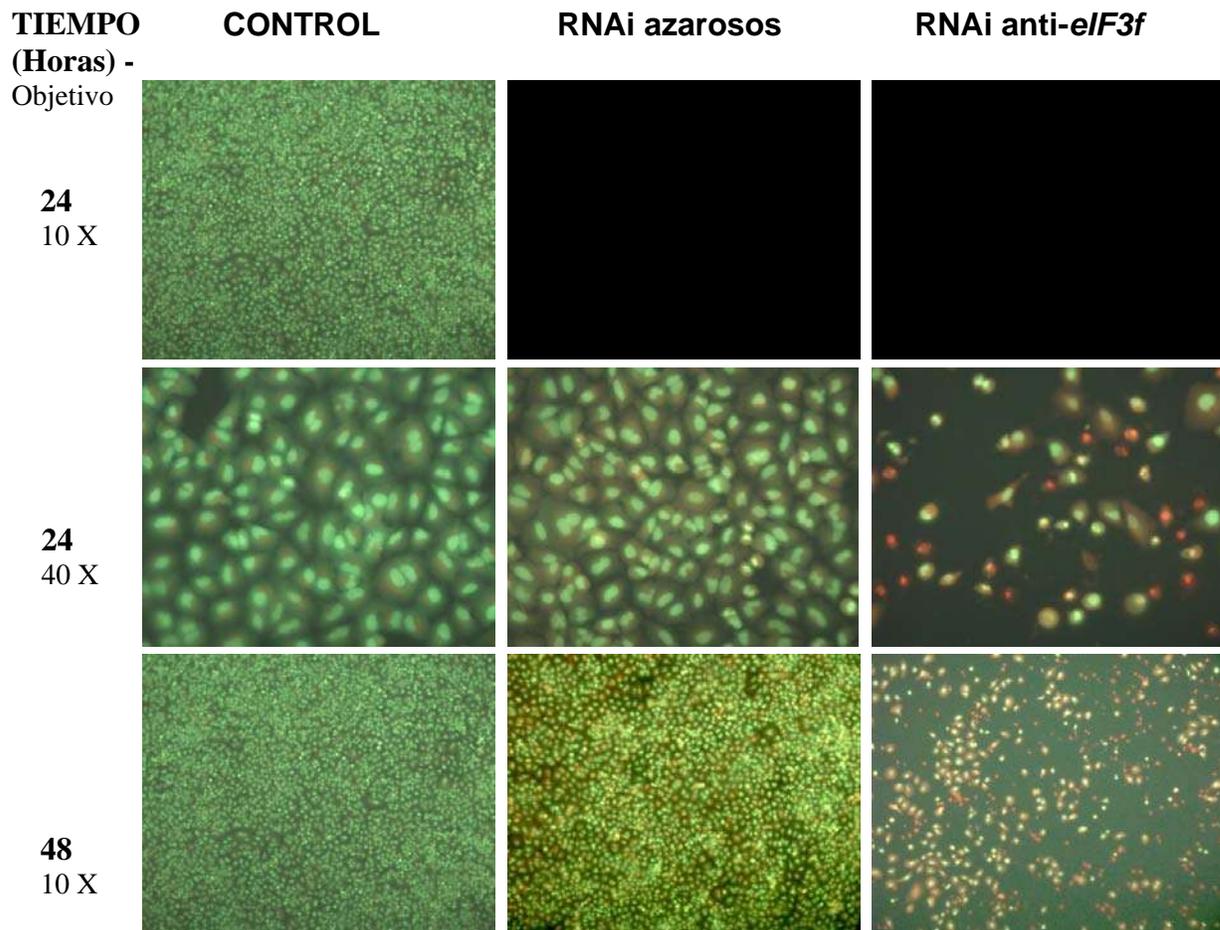


**Figura 18. Fotografía de células tumorales A549 transfectadas con los RNAi.** Se observaron en el microscopio invertido con un objetivo de 10 X a 0, 24 y 48 horas pos-transfección. Los controles fueron aquellos cultivos tratados con el vehículo de transfección “Lipofectamina2000”, denominados CONTROL, y aquellos transfectados con RNAi azarosos (RNAi azarosos). Después de 48 horas se observó un mayor grado de muerte celular en las células transfectadas con RNAi contra *eIF3f*.



**Figura 19. Porcentaje de viabilidad de los cultivos A549 24 horas posteriores a la transfección.** Se observó un menor porcentaje de células no viables en los cultivos transfectadas con RNAi específicos a *eIF3f* comparado contra un control positivo (100 % vivas) y un control de células transfectadas con RNAi inespecíficos (90 %).

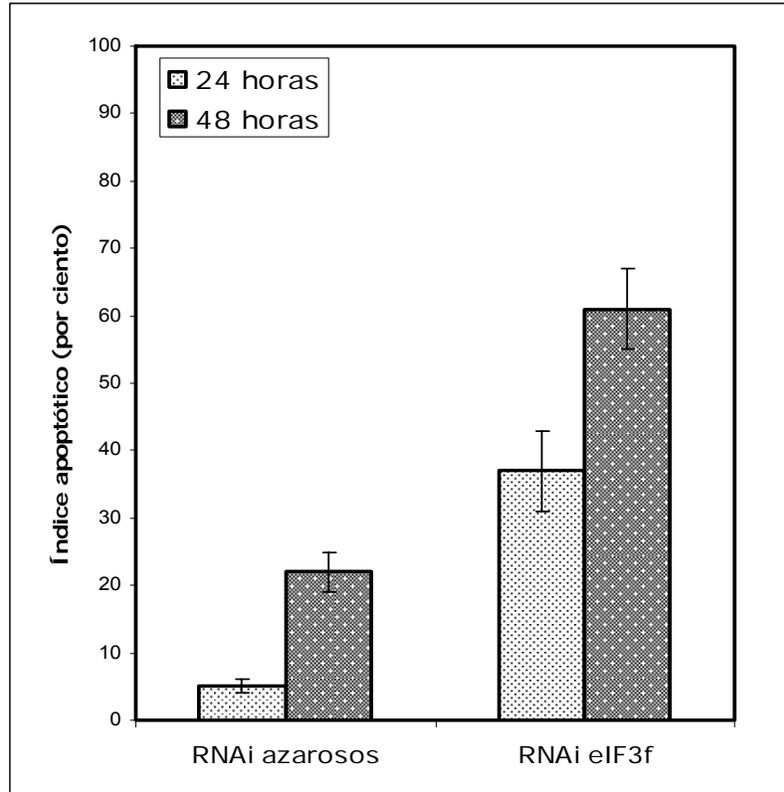
Para determinar el tipo de muerte celular, las células transfectadas fueron teñidas con una mezcla de naranja de acridina y bromuro de etidio. En los controles transfectados con el vehículo y los siRNA azarosos del plásmido pSL301, se observaron tanto a las 24 horas como a las 48 horas una gran cantidad de células viables de color verde, extendidas y con núcleos intactos. En cambio en las transfectadas con los siRNA anti-*eIF3f* se observaron a las 24 y 48 hs células apoptóticas, que cumplen los criterios de núcleos condensados y ausencia de estructuras extranucleares lo que indica apoptosis en su fase temprana; las células rojas que aparecen encogidas indican apoptosis en fase tardía y también se observaron algunas células necróticas de color rojo, extendidas y de mayor tamaño que las células rojas en apoptosis tardía (Figura 19).



**Figura 20. Micrografía de células tumorales A549 transfectadas con RNAi y teñidas con una mezcla de naranja de acridina y bromuro de etidio.** Se observaron en el microscopio de fluorescencia con objetivos de 10 y 40 X. Después de 48 h se observó mayor cantidad de células apoptóticas en los cultivos transfectados con RNAi anti-*eIF3f*. Las células de color verde o rojo redondas y de menor tamaño que las células viables (color verde extendido de núcleo a citoplasma), son células que han abierto programas de muerte celular por apoptosis.

Se determinó el porcentaje de células apoptóticas entre el control del siRNA azaroso y el siRNA anti-*eIF3f*. Se observó una gran diferencia significativa en el porcentaje de células apoptóticas desde las 24 horas entre el control con un 5 % y el problema con un 37 %. Siendo esta diferencia muy marcada a las 48 horas postransfección, en donde el control presentó un porcentaje del 22 %, mientras que el problema fue de un 61 % (Figura 20).

Se hizo una comparación entre tratamientos con siRNA anti-*eIF3f* RNA antisentido de *eIF3f*. Estos datos se muestran en la Tabla 1 y nos permiten comparar los dos métodos con los cuales se puede interferir la expresión del gen de *eIF3f*. Se observó que utilizando construcciones de DNA hay efecto inespecífico (con pMSG un 41 %) que si se utilizan siRNAs (con siRNA azarosos sólo un 22%), ya que la diferencia es de aproximadamente el 20 %. Eliminando el ruido, observamos un porcentaje del índice apoptótico muy similar, mayor del 40 % en los dos casos, siendo ligeramente mayor en el método en donde se utilizó la construcción de DNA que codifica para el RNA antisentido.



**Figura 21. Índice apoptótico de cultivos celulares transfectados con siRNA-*eIF3f*.** Se observó mayor porcentaje de muerte celular (apoptosis) en las células transfectadas con RNAi específicos a *eIF3f* a las 24 y 48 horas, con respecto a los RNAi azaroso.

**Tabla 1. Comparación de índice de apoptosis de células transfectadas con RNA antisentido y el RNAi 24 y 48 horas.**

Comparación: **RNAi vs. RNA antisentido** (Higareda et al. 2007)

<b>ÍNDICE APOPTÓTICO (%)</b>				
	<b>RNA antisentido</b>		<b>RNAi</b>	
	Control	anti-eIF3f	Control	contra eIF3f
24 horas	<b>13 ± 1</b>	<b>36 ± 2</b>	<b>5 ± 1</b>	<b>37 ± 3</b>
48 horas	<b>41 ± 4</b>	<b>79 ± 5</b>	<b>22 ± 6</b>	<b>61 ± 6</b>

## VIII. DISCUSIÓN

### VIII.1 Diseño de RNAi

En el presente trabajo de investigación, se demostró *in vitro* la inducción de muerte celular programada de células tumorales de la línea celular A549 por medio del silenciamiento de la expresión del gen *eIF3f* con la metodología de RNAi. Para poder producir RNAs pequeños de interferencia (siRNA) específicos y con alto grado de efectividad de silenciamiento, es de suma importancia realizar un diseño previo a la producción de los mismos. Por tal motivo, se analizaron diversos programas computacionales para elegir el más apropiado según el propósito este trabajo. Entre los métodos más representativos se encuentran los siguientes: siRNA Selection Demo, Block-iT RNAi Designer, DEQOR, siRNA selector, siRNA at Whitehead, IDT SciTools RNAi Design, siRNA Target Finder, siRNA Target Finder, TROD (T7 RNAi Oligo Designer). Después de revisar el fundamento de cada programa para el diseño de siRNA, se eligió el programa DEQOR, ya que éste reporta varias regiones del gen que son potencialmente específicas para su silenciamiento (Henschel y col., 2004). Los otros métodos para el diseño de siRNA no se eligieron porque no se ajustaban a las necesidades de diseño, como por ejemplo algunos de ellos trabajan sólo con secuencias de ratón o reportan oligonucleótidos para el diseño de un solo siRNA, otros no reportan la cantidad de GC, por mencionar algunos aspectos.

El programa DEQOR es uno de los métodos más completos de análisis, debido a que hace un alineamiento con los genes reportados en los bancos de genes y bancos genómicos, así como un análisis de las regiones con alto contenido en GC y que potencialmente forman estructuras secundarias. Es importante que los siRNA diseñados no complementen a regiones del RNAm con estructuras secundarias ya que la eficacia del mismo se ve notablemente disminuida. La interpretación de los resultados arrojados por el programa DEQOR es fácil y rápida porque se muestra la probabilidad de un efecto de cruzamiento, (complementariedad con otros RNAm), la probabilidad de complementariedad imperfecta, la combinación de ambas probabilidades y la probabilidad de no cruzamiento y perfecta complementariedad, que es la que a nosotros

nos interesa. Una ventaja adicional del programa DEQOR es que permite el diseño de una mezcla de siRNAs que complementan de manera específica a distintas regiones adyacentes del RNAm, aumentando así la probabilidad de complementar con el blanco de silenciamiento.

De acuerdo al resultado reportado por el programa bioinformático DEQOR, en la secuencia de *eIF3f* (de 1264 pb) se deben descartar los primeros 500 pb y de la base 1020 en adelante. Con fundamento en el conocimiento de la estructura proteica de *eIF3f*, el resultado dado por el programa DEQOR se consideró un resultado adecuado, debido a que los primeros 450 nucleótidos de este gen codifican para un dominio MPN que es compartido por proteínas de la familia Mov34, a la cual pertenece *eIF3f* (Shi y col., 2006). Con respecto a las últimas 264 bases, no se consideraron debido a que esta región se encuentra en el extremo.

## VIII.2 Producción de dsRNA y RNAi

Se demostró la producción de RNA de cadena doble (dsRNA) porque la RNasa III reconoció al mismo. La RNasa III corta exclusivamente RNA de doble cadena cada 26-30 pares de nucleótidos, para generar siRNA. De no existir RNA de doble cadena, la enzima no ejerce acción catalítica. Como los resultados presentan RNA por debajo de 30 pb, se aseguró un resultado positivo, tanto para el dsRNA como para la generación de siRNA.

Existen varios mecanismos para silenciar genes por RNAi, entre ellos podemos destacar la formación de un dsRNA de aproximadamente 80 nucleótidos en forma de horquilla (shRNA de “short hairpin” RNA), que induce la expresión de *DICER* (una enzima tipo RNasa III) quien corta este tipo de RNAs. Se simula un proceso nato a la célula que consiste en la detección de microRNAs (o shRNAs) que son digeridas por *DICER* para formar siRNAs y activar al complejo RISC que silenciará al gen hacia el cual va dirigido (García y Castro, 2004). Una desventaja que se ha reportado con este procedimiento en células no tumorales, y que sería un problema a considerar en aplicaciones terapéuticas, es que induce una respuesta inmune al activar la expresión

de interferón (activación de la vía IFN) que enmascara los efectos de los RNAi sobre la viabilidad celular ya que estos presentan toxicidad (shRNAs o siRNAs mayores a 30 nt) (Bridge y col., 2003; Reynolds y col., 2006). Por otro lado, el proceso requiere una alta eficiencia de *DICER*, paso que se puede obviar si se introducen directamente los siRNAs.

Uno de los objetivos más importantes del presente trabajo, fue la estandarización de un protocolo que permita el diseño y producción de siRNAs, ya que éstos son costosos si se diseñan y adquieren a través de un proveedor (Ambion, Sigma, etc).

### **VIII.3 Determinación de muerte celular**

El tratamiento con siRNAs diseñados para el silenciamiento de *eIF3f* presentó una drástica disminución de la viabilidad celular a las 24 horas de más del 50 %, y se indujo muerte celular programada en el 66 % de la población celular 48 horas después. Hasta el momento y fuera de nuestro grupo de trabajo, no se ha reportado el efecto de silenciar la expresión de *eIF3f* sobre la muerte celular en cultivos tumorales humanos, sólo se ha reportado este efecto cuando se sobre-expresa al gen *eIF3f* (Shi y col., 2006).

Dado que se ha reportado que el silenciamiento de genes es más efectivo mediante el uso de siRNAs que mediante RNA antisentido, los resultados obtenidos en este trabajo se compararon con un estudio realizado con anterioridad en nuestro grupo de trabajo (Higareda-Mendoza y col., 2006; Higareda y col., 2003). Higareda y colaboradores silenciaron al mismo gen a través de un RNA antisentido y observaron que la muerte celular por apoptosis es muy similar a la aquí reportada (mayor del 50 %). Sin embargo, la muerte celular causada por el estrés de transfección fue mayor con el método de inhibición por antisentido que el causado con siRNA. Esto es debido a que se ha reportado (Gharthey-Tagoe y col., 2006) que existe menor grado de citotoxicidad por pequeños RNAs que el mayor grado de citotoxicidad que representa la introducción de un plásmido (fragmento de DNA mayor a 8500 pb).

## IX. CONCLUSIONES

La mezcla de siRNA diseñada y producida para el silenciamiento de la expresión del gen *eIF3f* en cultivos celulares humanos (A549) induce muerte celular programada con mayor eficiencia que la metodología basada en el uso de RNA antisentido.

- Se implementó la de producción *in vitro* de RNAs de interferencia.
- Se optimizó el silenciamiento del gen *eIF3f* para inducir muerte celular en la línea celular humana A549.

## X. PERSPECTIVAS

Se utilizó una mezcla de siRNAs, por lo que es posible obtener una mayor eficiencia de silenciamiento e inducción de muerte celular programada si se determina cuál es el siRNA de la mezcla con mayor efectividad.

Los resultados de inducción de apoptosis son muy prometedores, por lo que es recomendable seguir con el estudio en un organismo multicelular, pudiendo ser el inyectar siRNA contra *eIF3f* en ratas y/o ratones con tumores cancerosos para evaluar el efecto apoptótico.

## XI. BIBLIOGRAFÍA

1. Asano K, Vornlocher HP, Richter-Cook NJ, Merrick WC, Hinnebusch AG y Hershey JWB. (1997). Structures of cDNAs encoding human eukaryotic initiation factor 3 subunits. *J. Biol. Chem.* 272:27042-27052.
2. Berd D, Sato T, Maguire HC Jr, Kairys J y Mastrangelo MJ. (2004). Immunopharmacologic Analysis of an Autologous, Hapten-Modified Human Melanoma Vaccine. *Journal of Clinical Oncology* 22:403-414.
3. Bonadonna G. (1983). Principios de proliferación celular. En: Manual de Oncología Médica. Bonadonna G y Robustelli-della-Cuna G. editores. Editorial Masson. Barcelona, España 11-18.
4. Bridge AJ, Pebernard S, Ducraux A, Nicoulaz AL y Iggo R. (2003). Induction of an interferon response by RNAi vectors in mammalian cells. *Nature Genet.* 34(3):263-264.
5. Cappelli C, Grill J, Raquin M, Pierre-Kahn A, Lellouch-Tubiana A, Terrier-Lacombe MJ, Habrand JL, Couanet D, Brauner R, Rodriguez D, Hartmann O y Kalifa C. (1998). Long term follow up of 69 patients treated for optic pathway tumours before the chemotherapy era. *Arch Dis Child.* 79:334-338.
6. Cotran RS, Kumar V y Tucker C. (2000). Neoplasias. En: Robbins. Patología Estructural y Funcional. Editorial McGraw-Hill-Interamericana, sexta edición. Madrid, España. pp. 277-296.
7. Cuevas JJ y Santos JA. (1985). Oncología Básica. Vector Ediciones, quinta edición. Madrid, España. pp. 1-19.
8. Dlamini Z, Mbita Z y Zungu M. (2004). Genealogy, expression, and molecular mechanisms in apoptosis. *Pharmacology and Therapeutics* 101:1-15.
9. Dykxhoorn MD, Novina CD y Sharp PA. (2003). Killing the Messenger: Short RNAs That Silence Gene Expression. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 4:457-467.
10. Farias AE. (2002). Estudios *in vitro* acerca de la función molecular de la proteína caf1. Tesis de licenciatura. Facultad de Biología. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.
11. Frey AB y Monu N. (2006). Effector-phase tolerance: another mechanism of how cancer escapes antitumor immune response. *Journal of Leukocyte Biology* 79:1-12.
12. García EP y Castro EM. (2004). MicroARN: Nuevos reguladores de la expresión genética. *Ciencia Nicolaita* 38:145-156.

13. García AC. (2003). La célula cancerosa. En: García AC, Jiménez LF y Merchant H. *Biología Molecular y Celular*. Editorial Pearson Educación. México. pp 663-675.
14. Gharthey-Tagoe EB, Babbin BA, Nusrat A, Neish AS y Prausnitz MR. (2006). Plasmid DNA and siRNA transfection of intestinal epithelial monolayers by electroporation. *Int. J. Pharm.* 315:122-133.
15. Goodman GA. (2003). *Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica*. Editorial Mc Graw Hill, Décima Edición. México D.F. pp87-89.
16. Gutiérrez AA, Lemoine NR y Sikora K. (1992). Gene Therapy for Cancer. *The Lancet*. 339: 715-721.
17. Guyton AC y Hall JE (2001). *Tratado de Fisiología Médica*. Editorial McGraw-Hill Interamericana, décima edición. México D.F. pp. 43-44.
18. Guzmán-Infante YE. (2005). Análisis de la región reguladora del gen psif humano. Tesis de maestría en: Ciencias en Biología Experimental. Instituto de Investigaciones Químico Biológicas. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.
19. Henschel A, Buchholz F y Habermann B. (2004). DEQOR: a web-based tool for the design and quality control of siRNAs. *Nucleic Acids Res.* 1 (32):W113-20.
20. Hershey JWB. (1991). Translational control in mammalian cells. *Annu Rev Biochem.* 60:717-755.
21. Higareda-Mendoza AE, Aguilera-Méndez A, Llanderal-Mendoza J. y Pardo-Galván MA. (2006). Muerte celular programada por la sobre expresión o silenciamiento de eIF3f en células de adenocarcinoma pulmonar humano (A549). Memoria en extenso del 3er Foro de Investigación de la UMSNH.
22. Higareda AE, Farias A, Llanderal J, Méndez A y Pardo MA. (2003). A cell cycle and protein synthesis-related factor required for G<sub>2</sub>/M transition. *Miami Nature Biotechnology Short Reports* 14:111.
23. INEGI. (2005). Estadísticas vitales 2002, Base de datos y Estadísticas Demográficas 2003. [www.inegi.gob.mx](http://www.inegi.gob.mx). 3 de febrero de 2005.
24. Kittler R, Heninger AK, Franke K, Habermann B y Buchholz F. (2005). Production of endoribonuclease-prepared short interfering RNAs for gene silencing in mammalian cells. *Nat Methods* 2(10):779-84.
25. Lewin B. (2001). *Genes VII*. Editorial Marbán Libros, S.L. Madrid España. pp 875-911

26. Llanderal-Mendoza J. (2003). Estudios in vivo sobre la función de la proteína psif en la división celular de *Nicotiana tabacum*. Tesis de licenciatura. Facultad de Biología. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.
27. Lodish H, Berk A, Matsudaira P, Kaiser AC, Krieger M, Scott MP, Sipursky SL y Darnell J. (2005). *Biología Celular y Molecular*. Editorial Médica Panamericana, 5a Edición. Buenos Aires, Argentina. pp. 853-973.
28. Milhavet O, Gary DS y Mattson MP. (2003). RNA Interference in Biology and Medicine. *Pharmacological Reviews* 55:629-648.
29. Montgomery MK, Xu S y Fire A. (1998). RNA as a target of double-stranded RNA-mediated genetic interference in *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:15502-15507.
30. Monzó MP. (2000). *Oncogenes*. En: *Manual de Oncología Clínica y Molecular*. Rosell RC editor. Arán Ediciones. Madrid, España. pp. 39-48.
31. Moon C, Oh Y y Roth JA. (2003). Current Status of Gene Therapy for Lung Cancer and Head and Neck Cancer. *Clinical Cancer Research*. 9:5055-5067.
32. Mostafa MH, Sheweita SA y O'connor PJ. (1999). Relationship Between *Schistosomiasis* and Bladder Cancer. *Clinical Microbiology Reviews*, Jan. 12:97-111.
33. Okada H y Mak TW. (2004). Pathways of apoptotic and non-apoptotic death in tumor cells. *Nature Reviews in Cancer* 4:592-603.
34. Patil SD, Rhodes DG y Burgess DJ. (2005). DNA-based Therapeutics and DNA delivery Systems: A comprehensive Review. *The AAPS Journal* 7:E61-77.
35. Peralta-Zaragoza O, Bahena-Román M, Díaz-Benítez CE y Madrid-Marina V. (1997). Regulación del ciclo celular y desarrollo de cáncer: perspectivas terapéuticas. *Salud Pública Méx.* 39:451-462.
36. Reynolds A, Anderson EM, Vermeulen A, Fedorov Y, Robinson K, Leake D, Karpilow J, Marshall WS y Khvorova A. (2006). Induction of the interferon response by siRNA is cell type- and duplex length-dependent. *RNA* 12(6):988-993.
37. Rochlitz CF. (2001). Gene therapy of cancer. *Swiss Med Wkly.* 1131:4-9.
38. Rugo HS. (2005). *Cáncer*. En: *Diagnóstico Clínico y Tratamiento: Manual de Oncología Médica*. Tierney ML, McPhee JS y Papadakis AM editores. Editorial Manual Moderno, 40a Edición. Bogotá, Colombia. pp. 1563-1586.
39. Sachs AB, Sarnow P y Hentze MW. (1997). Starting at the beginning, middle and end, translation initiation in eukaryotes. *Cell* 89:831-838.

40. Sánchez AMA, Uribe SF y Conde GCJ. (2002). La infección por el virus del papiloma humano, un posible marcador biológico de comportamiento sexual en estudiantes universitarios. *Salud Publica Mex.* 44:442-447.
41. Shi, J, Kahle A, Hershey JWB, Honchak BM, Warneke JA, Leona SPL y Nelson MA. (2006). Decreased expression of eukaryotic initiation factor 3f deregulates translation and apoptosis in tumor cells. *Oncogene* 25: 4923-4936.
42. Shin HR, Lee CU, Park HJ, Seol SY, Chung JM, Choi HC, Ahn YO y Shigemastu T. (1996). Hepatitis B and C Virus, *Clonorchis sinensis* for the Risk of Liver Cancer: A Case-Control Study in Pusan, Korea. *International Journal of Epidemiology* 25: 933-940.
43. Sioud M. (2004). Therapeutic siRNAs. *Trends in Pharmacological Sciences* 25:22-28.
44. Smalley RV y Oldham RK. (1984). Biological response modifiers: preclinical evaluation and clinical activity. *Crit Rev Oncol Hematol.* 1:259-294.
45. Tarón RM. (2000). Ciclo celular. En: Rosell RC. *Manual de Oncología Clínica y Molecular* Editorial Arán. Madrid, España. pp. 49-58.
46. Toselli JA. (2003). Trabajo práctico de genética. [www.revistaciencias.com](http://www.revistaciencias.com) (Código ISPN de la Publicación: EPVAZVUAUESAHLEXRK)
47. [http://www.ambion.com/techlib/misc/siRNA\\_finder.html](http://www.ambion.com/techlib/misc/siRNA_finder.html)
48. <http://cluster-1.mpi-cbg.de/Deqor/deqor.html>
49. <https://demo1.interagon.com/sirna/>
50. <http://hydra1.wistar.upenn.edu/Projects/siRNA/siRNAindex.htm>
51. <http://www.idtdna.com/Scitools/Applications/RNAi/RNAi.aspx/>
52. <http://jura.wi.mit.edu/bioc/siRNAext/>
53. <https://rnaidesigner.invitrogen.com/sirna/>
54. <http://www.unige.ch/sciences/biologie/bicel/websoft/RNAi.html>