



UNIVERSIDAD MICHOACANA
DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO
Cuna de héroes, crisol de pensadores

FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS Y BIOLÓGICAS
"DR. IGNACIO CHÁVEZ"
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

Tesis:

**"Perfil de expresión del gen eIF3f en linfocitos
humanos"**

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

PRESENTA:

Médico Cirujano
Alicia Areli Bautista Tejada

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

Co-Dirección de tesis:
Pediatra Hemato Oncólogo
Misael Herrejón Carmona

Morelia, Michoacán,
México
agosto, 2017



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

Médico Cirujano ALICIA ARELI BAUTISTA TEJEDA

Doctora en Ciencias (Biología)

Ma. Soledad Vázquez Garcidueñas

Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

Doctor en Ciencias (Biología Celular)

Carlos Cortés Penagos

Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

Doctor en Investigación Biomédica Básica

Marco Aurelio Pardo Galván

Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

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

La autora de esta tesis, estudiante de la Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas
“Dr. Ignacio Chávez” de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo,
agradece a CONACYT la beca que le fue otorgada para la realización de la Maestría
en Ciencias de la Salud (Registro de becario: 572487).

La presente investigación se realizó en:
Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo
Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas
“Dr. Ignacio Chávez”
División de estudios de Posgrado
Laboratorio de Biología Celular Humana
Morelia, Michoacán, México

Algunas tomas de muestras se llevaron a cabo en:
Hospital Infantil “Eva Sámano de López Mateos”
Área de Hemato – Oncología
Morelia, Michoacán, México

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a mi Directora y Co-Director de Tesis, así como también a todo mi Comité tutorial por el tiempo que me dedicaron, sus consejos y el aporte de su conocimiento a mi trabajo, ha sido invaluable.

A la Dra. Ana Edith Higareda Mendoza, gracias, por su apoyo y disponibilidad, por su paciencia y por el impulso que me brindó para llevar a cabo mi proyecto de investigación; pero sobretodo la confianza a pesar de no tener la experiencia en un laboratorio. Al Dr. Marco Aurelio Pardo Galván por su paciencia y dedicación para la formación de sus alumnos.

Agradecer al Hospital de Infantil de Morelia “Eva Sámano de López Mateos”, por permitirme utilizar su campo clínico, al personal del área de Hemato – Oncología con su cooperación con la toma de muestras, y especialmente, al Dr. Misael Herrejón Carmona y al Dr. José Luis Martínez Toledo, por su interés y disposición que permitieron se concretase este trabajo.

Al Dr. Jesús Campos García que nos permitió utilizar su equipo de Citometría de Flujo y al M. en C. Mauricio Gómez Gallardo por la amabilidad y disponibilidad para usar el Citómetro de Flujo.

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

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

DEDICATORIA

A mi familia:

No existen palabras suficientes para agradecer todo lo que me han brindado en esta vida, pero en especial agradezco el apoyo en cada decisión que he tomado.

ÍNDICE

I. RESUMEN.....	1
II. ABSTRACT.....	2
1. INTRODUCCIÓN.....	3
2. ANTECEDENTES.....	4
2.1 LINFOPOYESIS.....	4
2.2 LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA.....	5
2.2.1 Epidemiología.....	5
2.2.2 Factores de Riesgo.....	6
2.2.3 Clasificación de la Leucemia Linfoblástica Aguda.....	6
2.2.4 Factores pronóstico en Leucemia Linfoblástica Aguda.....	8
2.3 CARCINOGENÉISIS.....	9
2.4 CICLO CELULAR.....	10
2.4.1 Puntos de control del ciclo celular.....	11
2.5 SÍNTESIS DE PROTEÍNAS EN EUCARIOTES.....	14
2.6 COMPLEJO eIF3.....	17
2.7 SUBUNIDAD eIF3f.....	19
3. JUSTIFICACIÓN.....	24
4. HIPÓTESIS.....	24
5. OBJETIVOS.....	25
5.1 Objetivo General.....	25
5.2 Objetivos específicos.....	25
6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	26
7. MATERIALES Y MÉTODOS.....	27
7.1 MATERIALES.....	27
7.1.1 Linfocitos humanos de sangre periférica.....	27
7.1.2 Linfocitos humanos de médula ósea.....	27
7.2 MÉTODOS.....	27
7.2.1 Frotis de sangre.....	27

7.2.2 Tinción de frotis de sangre.....	28
7.2.3 Cultivo celular.....	28
7.2.4 Aislamiento de linfocitos.....	29
7.2.5 Aislamiento de leucocitos.....	29
7.2.6 Determinación de concentración celular y viabilidad.....	30
7.2.7 Citometría de Flujo.....	30
7.2.7.1 Preparación de la muestra.....	30
7.2.7.2 Detección de eIF3f y las fases del ciclo celular.....	31
7.2.8 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	32
7.2.8.1 Elección de oligonucleótidos.....	32
7.2.8.2 Amplificación por PCR.....	32
7.2.8.3 Análisis de productos por PCR.....	33
8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	34
9. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	35
10. CONCLUSIONES.....	56
11. PERSPECTIVAS.....	57
12. REFERENCIAS.....	58
III ANEXOS.....	66

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.- Hematopoyesis.....	5
Figura 2.- Características del cáncer.....	9
Figura 3.- El ciclo celular	11
Figura 4.- Inicio de la traducción en eucariontes.....	16
Figura 5.- Subunidades del complejo eIF3.....	17
Figura 6.- Proteína eIF3f en seres humanos.....	19
Figura 7.- Expresión bifásica de la proteína eIF3f.....	21
Figura 8.- Cromosoma 11 con representación de eIF3f y los microsatélites.....	23
Figura 9.- Frotis de sangre periférica al microscopio con objetivo 10x.....	35
Figura 10.- Frotis de sangre periférica al microscopio con objetivo 40x.....	36
Figura 11.- Frotis de sangre periférica al microscopio con objetivo 100x.....	36
Figura 12.- Frotis de médula ósea de paciente con LLA.....	38
Figura 13.- Ventanas para la selección de linfocitos.....	40
Figura 14.- Linfocitos sanos en quiescencia.....	41
Figura 15.- Linfocitos sanos en proliferación.....	42
Figura 16.- Linfocitos de pacientes con LLA.....	43
Figura 17.- Comparación de la expresión de eIF3f de linfocitos en quiescencia vs. linfocitos en proliferación.....	44
Figura 18.- Diagrama de caja de la intensidad relativa de eIF3f durante el ciclo celular de linfocitos sanos en proliferación.....	45
Figura 19.- Perfil de expresión de eIF3f en linfocitos sanos en proliferación.....	46
Figura 20.- Diagrama de caja de la intensidad relativa de eIF3f durante el ciclo celular de linfocitos de pacientes con LLA.....	47
Figura 21.- Perfil de expresión de eIF3f en linfocitos de pacientes con LLA.....	47
Figura 22.- Comparación de la expresión de eIF3f en linfocitos sanos en proliferación (activados) vs. linfocitos de pacientes con LLA.....	50
Figura 23.- Proteína total de eIF3f en las diferentes muestras de médula ósea de pacientes del Hospital Infantil de Morelia.....	51

Figura 24.- Amplificación del gen eIF3f y los microsatélites 1331, 1338 y 1318 para DNA de la línea celular A549..... 52

Figura 25.- Productos de amplificación del gen de actina para muestras de un sano y 4 pacientes del Hospital Infantil..... 53

Figura 26.- Amplificación del gen eIF3f y los microsatélites 1331, 1338 y 1318 para DNA de voluntarios sanos..... 53

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.- Clasificación inmunológica de LLA de células B..... 7

Tabla 2.- Clasificación de la LLA de acuerdo al tipo de riesgo..... 8

Tabla 3.- Subunidades de eIF3 en diferentes organismos..... 18

Tabla 4.- Subunidades de eIF3 y su expresión alterada en cáncer de humanos..... 18

Tabla 5.- Oligonucleótidos utilizados para la PCR..... 32

Tabla 6.- Pruebas paramétricas utilizadas..... 34

Tabla 7.- Porcentaje leucocitario de individuos sanos..... 37

Tabla 8.- Intensidad neta de los amplicones para el gen eIF3f y los microsatélites 1331, 1338 y 1318 en muestras de voluntarios sanos..... 54

Tabla 9.- Simulación de un modelo para observar si existe pérdida alélica..... 54

I. RESUMEN

Durante el desarrollo de los linfocitos existen etapas de diferenciación y proliferación; este último suele encontrarse alterado en patologías oncológicas. Un factor en el desarrollo del cáncer es la alteración en la expresión de genes involucrados en la proliferación y/o muerte celular. La desregulación de la transcripción o de la traducción causa anomalías en la expresión génica y, por ello, desregulación del crecimiento celular. El factor eucariótico de iniciación 3 (eIF3) es un complejo multiproteico, del cual forma parte la subunidad f (eIF3f), quien tiene una función importante en el inicio de la traducción. Está relacionado con el ciclo celular, mostrando un perfil de expresión bifásico con máximos en las fases S y M en diferentes líneas celulares. Sin embargo, este perfil no se ha demostrado en células no cancerígenas, ni en pacientes con diagnóstico oncológico. **Objetivo General:** Identificar el patrón de expresión del gen eIF3f en linfocitos humanos. **Materiales y métodos:** Las muestras de linfocitos sin diagnóstico oncológico se obtuvieron de individuos entre un rango de edad de 20 a 30 años sin antecedentes patológicos ni alteraciones en el frotis de sangre periférica. Las muestras con diagnóstico oncológico se obtuvieron de pacientes del Hospital Infantil de Morelia, a los que se les realizó aspirado de médula ósea. La identificación de la fase del ciclo celular y la concentración relativa de la proteína de eIF3f se determinaron por Citometría de Flujo. **Resultados:** Se obtuvieron 10 muestras de individuos sanos y 3 de pacientes con diagnóstico de Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA). En los individuos sanos, para la determinación de la intensidad relativa de eIF3f durante las fases del ciclo celular se obtuvo una media de 37236 para G0-G1, 69554 para S y 128008 para G2-M; se realizó una prueba ANOVA con la cual se obtuvo una $p < 0.05$. En el caso de los pacientes con diagnóstico de LLA, la media de la intensidad relativa de eIF3f fue de 24865 para G0-G1, 44772 para S y 60234 para G2-M. **Conclusión:** La intensidad relativa de eIF3f oscila durante el ciclo celular, presentando incrementos en la expresión durante las fases S y G2-M del ciclo celular, lo que nos permite proponer que el perfil de expresión de eIF3f está conservado en linfocitos humanos en proliferación al igual que en las diferentes líneas celulares anteriormente estudiadas (A549, Ramos, HepG2, entre otras).

Palabras clave: eIF3f, ciclo celular, Citometría de Flujo, linfocitos, proliferación.

II. ABSTRACT

During the development of lymphocytes there are stages of differentiation and proliferation; the latter is often altered in oncological pathologies. One factor in the development of cancer is the alteration in the expression of genes involved in cell proliferation and/or cell death. Deregulation of transcription or translation causes abnormalities in gene expression and, therefore, deregulation of cell growth. The subunit f (eIF3f) is part of the eukaryotic initiation factor 3 (eIF3), which is a multiprotein complex. eIF3f has an important function at the beginning of translation. It is related to the cell cycle, showing a biphasic expression profile with maximums in the S and M phases in different cell lines. However, this profile has not been demonstrated in non-cancerous cells, nor in patients with cancer diagnosis. General Objective: To identify the expression pattern of the eIF3f gene in human lymphocytes. Materials and methods: Lymphocyte samples without oncological diagnosis were obtained from individuals ranging from 20 to 30 years old, with no pathological history or alterations in their peripheral blood smear. The samples with oncological diagnosis were obtained from bone marrow aspirate of patients from the Pediatric Hospital of Morelia. Identification of the cell cycle phase and relative concentration of the eIF3f protein were determined by Flow Cytometry. Results: 10 samples from healthy individuals and 3 from patients with Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL) diagnosis were obtained. In healthy individuals, an average of 37236 for G0-G1, 69554 for S, and 128008 for G2-M was obtained for the determination of relative eIF3f intensity during cell cycle phases. An ANOVA test was performed and a $p < 0.05$ was obtained. In the case of patients with cancer diagnosis, the mean relative eIF3f intensity was 24865 for G0-G1, 44772 for S, and 60234 for G2-M. **Conclusion:** The expression of eIF3f oscillates during the course of the cell cycle, there is an increase in the relative intensity of eIF3f during phases S and G2-M, which leads us to propose that the expression profile of eIF3f is conserved in proliferative human lymphocytes as in the different cell lines studied previously (A549, Ramos, HepG2, among others).

Key words: eIF3f, cell cycle, Flow Cytometry, lymphocytes, proliferation.

1. INTRODUCCIÓN

La linfopoyesis es un proceso altamente regulado, en donde se forman los linfocitos a partir de una célula primordial hematopoyética. Las células inmaduras se someten a diferentes pasos de maduración, orquestados por cambios intrínsecos en la expresión génica, así como cambios en las células dirigidos por diferentes moléculas, como las citocinas, permitiendo la diferenciación y proliferación celular; esta última suele encontrarse alterada en diferentes patologías como es el caso de las oncológicas. Un factor en el desarrollo del cáncer es la alteración en la expresión de genes involucrados en la proliferación y/o muerte celular. La desregulación de la transcripción o de la traducción causa anomalías en la expresión génica y, por ello, desregulación del crecimiento celular. El factor eucariótico de iniciación 3 (eIF3) es un complejo multiproteico, del cual forma parte la subunidad f (eIF3f), quien tiene una función importante en el inicio de la traducción. eIF3f es una proteína que se ha propuesto podría servir como marcador pronóstico en diferentes tipos de cáncer. Sin embargo, existe controversia en diferentes grupos de trabajo: en un grupo reportan que la concentración de proteína eIF3f se encuentra elevada en línea celular MDA-MB-435 (Harvey *et al.* 2001) y, en otro, que la expresión de eIF3f está disminuida en cáncer de páncreas y melanoma (Shi *et al.* 2006). Por lo mismo, se vuelve importante conocer la función o funciones de eIF3f, incorporando estudios de células no cancerosas, como lo son los linfocitos en estado de quiescencia y en proliferación, así como también de linfocitos de pacientes con diagnóstico oncológico. Conocer si su patrón de expresión proteico varía entre células cancerígenas y no cancerígenas contribuirá a validar o invalidar la propuesta de eIF3f como marcador pronóstico de cáncer.

2. ANTECEDENTES

2.1 LINFOPOYESIS

La linfopoyesis tiene lugar en tejidos linfoides especializados, los tejidos linfoides centrales son la médula ósea para casi todas las células B, y el timo para casi todas las células T. La diferenciación linfoide (linfocitos B o T) a partir de una célula primordial hematopoyética (HSC, por sus siglas en inglés *hematopoietic stem cells*) ocurre en médula ósea debido a que cuenta con un microambiente especializado que proporciona las señales necesarias. La célula primordial hematopoyética tiene la capacidad de autorrenovación o puede diferenciarse en una célula progenitora pluripotencial que puede producir células mieloides y linfoides; en el caso de las células linfoides, se diferencia en un progenitor linfoide temprano que da lugar a los precursores de células T, que migran desde la médula ósea hacia el timo, y al progenitor linfoide común, que a su vez da origen a las células B y a los linfocitos citolíticos (células NK) (Pieper *et al.* 2013, Adler *et al.* 2014).

Durante el desarrollo de las células linfoides se pueden generar neoplasias malignas que son enfermedades que engloban desde los procesos más insidiosos hasta las neoplasias más agresivas del ser humano. Estos cánceres se originan en las células del sistema inmunitario que se encuentran en las diferentes etapas de diferenciación, lo que da lugar a una gran variedad de datos morfológicos, inmunitarios y de manifestaciones clínicas. En 1999, la Organización Mundial de la Salud creó la clasificación de cánceres linfoides que se divide en neoplasias de células B, células T y enfermedad de Hodgkin; la frecuencia relativa de diversos cánceres linfoides muestra predominio de la leucemia linfoide crónica en adultos de edad avanzada y la leucemia linfoide aguda predomina en los niños y adultos jóvenes (Longo 2010).

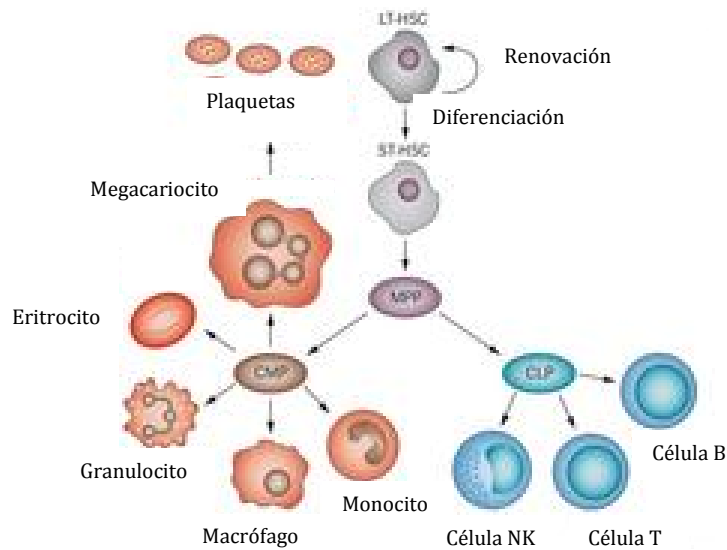


Figura 1.- Hematopoyesis. Una célula primordial hematopoyética pluripotencial genera células del sistema inmunitario (Modificado Adler *et al.* 2014).

2.2 LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA

La Leucemia Aguda es una enfermedad maligna con afección a médula ósea y/o a sangre periférica que se caracteriza por un aumento en la proliferación de células inmaduras llamadas blastos por lo que recibe el nombre de Leucemia linfoblástica Aguda (LLA) (Secretaría de Salud 2008, Secretaria de Salud 2009, Labardini *et al.* 2011). Alrededor del 75% de todas las leucemias linfoides y el 90% de todos los linfomas proceden de las células B (Longo 2010).

2.2.1 Epidemiología

En México, el Registro Nacional de Cáncer en Niños y Adolescentes (RCNA) reporta una población inscrita de 3,569 pacientes menores de 20 años durante el período del 2005 al 2010, con un predominio en el sexo masculino del 59.3%. También reporta un predominio en el grupo de 10 a 14 años de edad, representando el 53.4% de los casos registrados (Secretaría de Salud 2011).

Los tumores más frecuentes de acuerdo al tipo histológico de tumor (sólo se reportaron 2,303 casos, los otros no fueron reportados) son las leucemias con 30%, linfoma y neoplasias reticuloendoteliales con 17.1%, y tumores del SNC con 11.9%. En el subtipo de leucemia más frecuente se encuentran las leucemias linfoides, con un 81.3% del total (562 casos); el grupo etario más afectado es el de 10 a 14 años (Secretaría de Salud 2011).

2.2.2 Factores de Riesgo

Se han identificado diferentes factores relacionados con el desarrollo de Leucemias Agudas en niños y adolescentes, entre los que se encuentra la radiación ionizante; Epstein Barr de la familia Herpesviridae se ha asociado con un forma endémica Africana de leucemia/linfoma de Burkitt's (Belson *et al.* 2007, National Cancer Institute s.f.). En el caso particular de la Leucemia Linfoblástica Aguda, los factores de riesgo hereditarios como la trisomía 21 o el Síndrome de Down aumenta de 10 a 20 veces la incidencia de la enfermedad; otros síndromes con factor de riesgo y que involucran alteraciones genéticas son el síndrome de Bloom, la anemia de Fanconi y el síndrome de Nijmegen (Ward *et al.* 2014). También se ha relacionado el aumento de la incidencia de LLA en niños que al momento de nacer sus padres superaban la edad de 35 años para mujeres y 40 años para hombres (Belson *et al.* 2007).

En el 2010 en México, el RCNA revela que 283 pacientes (de un total de 3,569 casos) tienen reporte de exposición a químicos, de los cuáles el 58% pertenece al grupo de 10 a 14 años, con un predominio a la exposición de plaguicidas y fumigantes (Secretaría de Salud 2011).

2.2.3 Clasificación de la Leucemia Linfoblástica Aguda

Hasta hace unos años, la clasificación FAB (Franco-Americana-Británica) era la más utilizada; ésta clasifica a las Leucemias Linfoides de acuerdo a su morfología en 3 estadios (Secretaría de Salud 2009):

- a) L1: núcleo pequeño, patrón nuclear regular con cromatina homogénea,

- nucléolo poco prominente, citoplasma escaso. Es el estadio más frecuente.
- b) L2: núcleo grande, patrón nuclear irregular con cromatina heterogénea, nucléolo prominente, citoplasma abundante.
- c) L3: núcleo grande, patrón nuclear regular con cromatina homogénea, nucléolo prominente, citoplasma abundante, basofilia, vacuolas grandes. Es el estadio menos frecuente.

En los últimos años, con los avances de las técnicas de diagnóstico, ha sido necesario incluir estudios de inmunotipificación para determinar su origen como B o T y su grado de maduración. También se incorporan estudios de citogenética y biología molecular, que en conjunto con la clínica, complementan el diagnóstico y permiten el decidir sobre el tratamiento óptimo para el paciente. En el caso de la Leucemia Linfoblástica Aguda de origen en las células B, se pueden clasificar de acuerdo a la Tabla 1:

Tabla 1.- Clasificación inmunológica de LLA de células B (Labardini *et al.* 2011).

Subgrupo	HLA - DR	TdT	CD 19	CD 79 ^a	CD 22	CD 10	clg M	mlg M	Citogenética y biología molecular
Pro-B	++	++	++	++	++				t(4;11) AL1-AF4 MLL
Pre-B común (CALLA)	+	++	++	++	++	++			t(9;22) BCR/ABL T(1;19) PBX-E2A
Pre-B	+	++	++	++	++	++	++		t(12;21) TEL/AM L1 (raro adulto) 11q23
B madura	+	++	++	++	++	++	++	++	T(8;14) c-myc-IgH

La LLA de células B precursoras común (positiva para CD10 y sin Ig de superficie o citoplasmática) es el inmunofenotipo más frecuente ya que representa

aproximadamente tres cuartos de los pacientes con LLA de células B precursoras y tienen el mejor pronóstico (National Cancer Institute, s.f.).

2.2.4 Factores pronóstico en Leucemia Linfoblástica Aguda

Ciertos factores pueden afectar el panorama de los pacientes; y pueden ser de ayuda para la toma de decisiones sobre el tratamiento. Al existir un riesgo más alto, más intenso es el tratamiento (National Cancer Institute, s.f.).

A los niños con LLA se les asigna un riesgo de acuerdo a sus características individuales, antes de empezar el tratamiento; la edad de diagnóstico y conteo inicial de linfocitos son considerados como los más relevantes (National Cancer Institute, s.f.). En la siguiente tabla se hace un resumen de los factores que afectan el pronóstico de los pacientes:

Tabla 2.- Clasificación de la LLA de acuerdo al tipo de riesgo (National Cancer Institute, s.f.).

	Bajo riesgo	Alto riesgo
Edad	≥ 1 año - 9 años 11 meses	< 1 año ó ≥ 10 años
Conteo inicial de células blancas	< 50,000 céls/mm ³	> 50,000 céls/mm ³
Subtipo de LLA	Células B inmaduras	Células B maduras y células T
Diseminación a órganos	Ausente	Presente en cualquier órgano
Índice de DNA	> 1.16	< 1
Translocación cromosómica	12:21	9:22, 1:19, 4:11, 8:14, 11:14
Respuesta al tratamiento	Disminución de células cancerígenas dentro de las primeras dos semana	Sin disminución de células cancerígenas dentro de las primeras dos semana

2.3 CARCINOGENÉISIS

Hanahan y colaboradores (2011) reportan que el cáncer presenta seis características (Figura 2) con capacidades distintivas y complementarias que permiten el crecimiento tumoral y la diseminación metastásica.

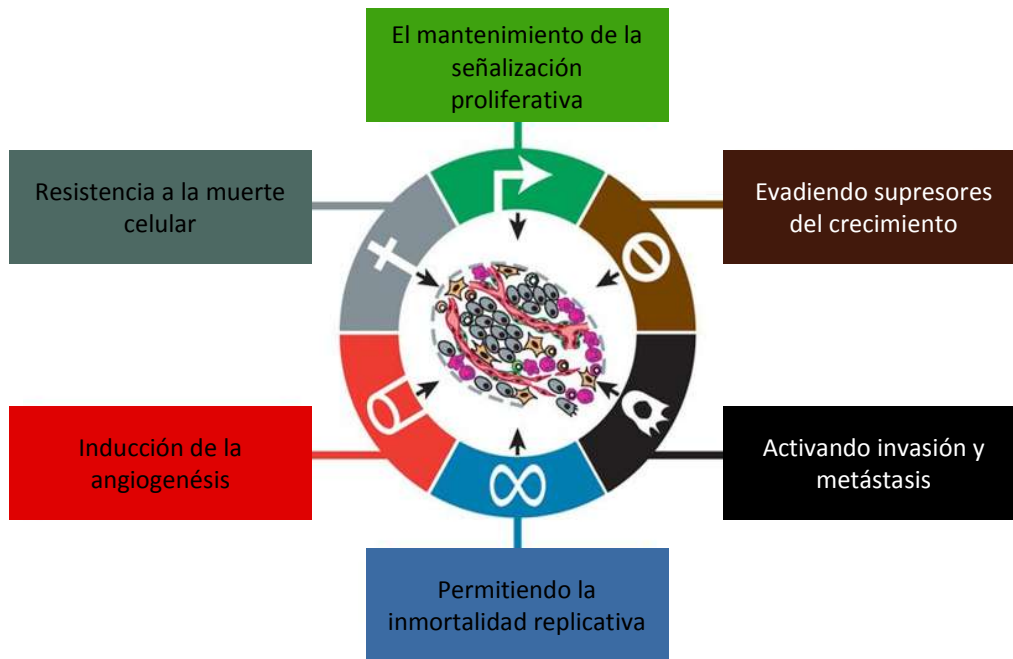


Figura 2.- Características del cáncer (Hanahan *et al.* 2011).

Durante el desarrollo de la célula B existen diferentes puntos de control, los cuales van a coordinar los diferentes procesos entre los que se incluyen selección clonal y subsecuente maduración. En la LLA de células B precursoras, la célula B cancerígena evade los mecanismos de control y pierde la capacidad de autorregularse. Por lo tanto, las células dañadas no son capaces de entrar en apoptosis ni son capaces de detener el ciclo celular, y como consecuencia los blastos se someten a ciclos celulares continuos que conllevan a la proliferación de linfocitos B que no culminan su maduración (Eswaran *et al.* 2015). Por lo mismo, el aumento en la proliferación celular conlleva a un aumento general de la síntesis de proteínas y un aumento en la regulación de las proteínas promotoras del ciclo celular (Rosenwald 2004).

2.4 CICLO CELULAR

El ciclo celular en eucariotes y sus componentes celulares en general, implican una secuencia de eventos a través de la cual una célula duplica su genoma, crece y culmina con la división en dos células hijas (Poon 2016). Clásicamente el ciclo celular consta de cuatro fases:

Fase G1: algunas células comienzan nuevamente el ciclo celular en esta fase después de un periodo de división. Durante la fase G1 la célula sintetiza la mayor cantidad de macromoléculas (Wild *et al.* 2016, Poon 2016).

Fase S: también llamada fase de síntesis, se caracteriza por tener la finalidad de la replicación del DNA (Herráez *et al.* 2012), también ocurre la duplicación del centrosoma (Poon 2016).

Fase G2: durante esta fase la información es integrada para determinar si la célula está lista para entrar a la fase M. Una de sus características principales es la elevada tasa de síntesis de proteínas necesarias para la mitosis.

Fase M: durante esta fase la célula divide el genoma previamente duplicado en dos células hijas idénticas. Esta fase se subdivide en diferentes etapas: 1) PROFASE: la cromatina se condensa hasta formar los cromosomas, dejan de observarse los nucléolos y aparece el huso mitótico; 2) PROMETAFASE: comienza a romperse la membrana nuclear; 3) METAFASE: los cromosomas se alinean en plano ecuatorial; 4) ANAFASE: los cromosomas se dividen por sus centrómeros y son separados en cromátides hacia los polos opuestos de la célula; 5) TELOFASE: comienzan a descondensarse los cromosomas y se forman membranas nucleares para delimitar dos núcleos; estas etapas culminan con la CITOCINESIS, la cual implica la división de la célula en dos células idénticas (Herráez *et al.* 2012).

Fase G0: se considera un estadio modificado de la fase G1, mientras unas células completan el ciclo celular para entrar de nuevo en división, otras pasan a la fase G0 o quiescente, en las que permanecen días o incluso años hasta emprender un nuevo ciclo (Herráez *et al.* 2012).

La progresión secuencial de las fases del ciclo celular está coordinada mediante la

actividad de las proteínas quinasas dependientes de ciclinas (CDKs), que a su vez están reguladas a través de la unión a ciclinas. Las ciclinas son una familia de proteínas cuyos miembros son sintetizados y degradados cada uno de manera específica en cada fase del ciclo celular (Figura 3) (Spoerri *et al.* 2005, Poon 2016).

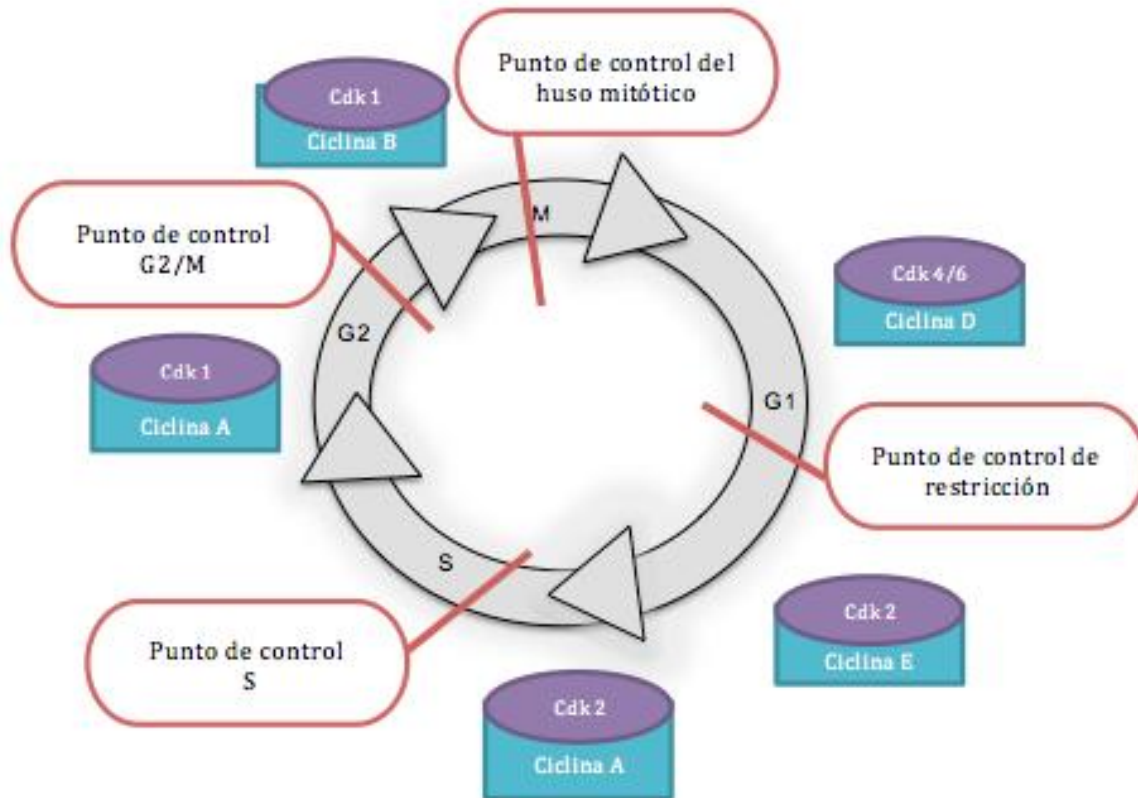


Figura 3.- El ciclo celular. Las CDKs y las ciclinas permiten la progresión del ciclo celular, en conjunto con los cuatro principales puntos de control.

2.4.1 Puntos de control del ciclo celular

El término de “punto de control” se refiere al mecanismo mediante el cual una célula activa detiene la progresión del ciclo celular hasta asegurar que el proceso previo se haya completado de manera adecuada (Kastan *et al.* 2004). Si las células progresan a la próxima fase del ciclo celular, antes de que la fase anterior se complete de manera adecuada, puede producirse daño genético y/o celular. Para reducir al mínimo este tipo de errores durante los acontecimientos del ciclo celular, el progreso de una célula a través del ciclo se supervisa en al menos cuatro puntos de control bien definidos (Figura 3) (Spoerri *et al.* 2015, Poon 2016).

Punto de control G1/S: ocurre cerca del final de G1, antes de entrar a la fase S. También se le conoce como *punto R* o de *restricción* en mamíferos ya que se decide si una célula progresa en el ciclo celular o se detiene en G0, esto depende de la integración de diferentes señales extracelulares provenientes de los receptores de la superficie celular. Si la célula sufre deprivación de factores del crecimiento o se dan señales inhibitorias del ciclo celular y este es el momento en el que se sale del ciclo celular; por el otro lado, si la masa (nutrientes) son suficientes, continúa el ciclo celular. Es decir, las señales mitogénicas activan a los complejos Ciclina-CDK para promover la progresión de la fase G1 a la fase S, esto a través de la fosforilación de varias dianas celulares, incluyendo a la proteína Rb. (Otto *et al.* 2017, Poon 2016, Herráez *et al.* 2012, Kastan *et al.* 2004).

Este punto de control está modulado por la proteína Rb (pRb) y la familia del factor transcripcional E2F. La hiperfosforilación de Rb conlleva a la activación de la transcripción dirigida por E2F. Es decir, el complejo ciclina D-CDK 4/6 libera a pRb de E2F, permitiendo a este factor dar inicio a la transcripción y así continuar la progresión del ciclo celular. El aumento de la transcripción dependiente de E2F permite que las células pasen el *punto de restricción*. En conjunto con otros genes, E2F incrementa la expresión de las ciclina E y ciclina A, que activa a CDK2 y aumenta aún más la fosforilación de pRb (retroalimentación positiva). Por otro lado, la progresión de G1 a S se antagoniza por señales inhibitorias que involucran la expresión de inhibidores CDK que pertenecen a las familias INK4 y CIP/KIP. (Otto *et al.* 2017, Hydrbring *et al.* 2016, Siefert *et al.* 2015, Kastan *et al.* 2004).

Punto de control en S: la progresión de S a G2 es controlada por complejos Ciclina-CDK, junto con otras proteínas como la cinasa tipo Polo 1 (PLK1, por sus siglas en inglés Polo-like kinase 1) y las cinasa Aurora (Aurora A y Aurora B). Adicionalmente, el daño al DNA es percibido por proteínas especializadas que detienen la progresión del ciclo celular en G1, S o G2. Los puntos de control están regulados por la cinasa 2

(CHK2) y p53 en G1 y por CHK1 en S o G2. Existen diferentes tipos de daño al DNA los cuales pueden activar a diferentes puntos de control, afectando la actividad de los complejos CDK. Dependiendo del tipo de daño al DNA, las proteínas quinasas ATR (por sus siglas en inglés, Ataxia Telangiectasia and Rad-3 related) o ATM (por sus siglas en inglés Ataxia Telangiectasia Mutated) fosforilan y activan a CHK1 (por sus siglas en inglés, checkpoint kinase 1). CHK1 es un mediador esencial del daño al DNA, permitiendo la detención del ciclo celular en la fase S y G2 hasta que culmine el proceso de reparación. (Otto *et al.* 2017)

Punto de control G2/M: ocurre al final de G2, antes del inicio de la mitosis. La progresión de G2 a M también es controlada por complejos Ciclina-CDK, junto con otras proteínas como PLK1, Aurora A y Aurora B. En este punto se evita que las células inicien la mitosis si sufren un daño en el DNA durante esta fase o en fases previas (G1 o S) (Kastan *et al.* 2004). Si la célula no supera esta punto, permanece con el complemento doble de dotación cromosómica (Herráez *et al.* 2012).

Este punto está regulado principalmente por CDK1/ciclina B. Después de que la ciclina B es sintetizada y se une a CDK1, el complejo se mantiene en un estado inactivo por la fosforilación de CDK1 dependiente de WEE1/MYT1. La desfosforilación de CDK1 activa a CDC25 e inactiva a WEE1/MYT1 (Otto *et al.* 2017, Poon 2016).

Punto de control del ensamblaje del huso: este punto de control se ejerce durante la mitosis; uno de los principales eventos para ejercer su progresión es el ensamblaje de huso. Se ha demostrado que la ubiquitin ligasa APC/C es indispensable para la transición rápida e irreversible de la metafase a la anafase. La APC/C funciona mediante la degradación de dos proteínas principalmente, securina y ciclina B. La ubiquitinación del inhibidor de la anafase, llamado securina, mediante la actividad de la ubiquitin ligasa de APC tiene como resultado la degradación proteolítica y la activación de la separasa. La separasa, con su actividad proteasa, escinde los anillos

de cohesina para separar las cromátidas hermanas, estableciendo el inicio de la anafase (Wild *et al.* 2016, Liam *et al.* 2016)

2.5 SÍNTESIS DE PROTEÍNAS EN EUCARIOTES

La síntesis de proteínas o "traducción" es un proceso fundamental para todas las formas de vida, y el control de la traducción desempeña un papel crucial en la expresión génica durante muchos procesos celulares y de desarrollo (Hernández *et al.* 2016). La traducción es el proceso mediante el cual la información genética ya transcrita en RNA mensajero (mRNA) se convierte en proteínas específicas en el ribosoma (Meteyac *et al.* 2016), mediante la unión covalente de aminoácidos según el orden establecido por la secuencia de nucleótidos del mRNA y de acuerdo con el código genético, produciendo así los componentes necesarios para realizar los distintos procesos celulares. (Herráez *et al.* 2012, Higareda Mendoza *et al.* 2010)

Dentro del proceso de traducción se pueden distinguir varias etapas o fases, una previa o de activación de los aminoácidos precursores y tres bien diferenciadas, iniciación, elongación y terminación (Herráez *et al.* 2012). En eucariontes, el inicio de la traducción es la fase más regulada (Sonenberg *et al.* 2009), ya que marca la velocidad con la que se va llevar a cabo la síntesis de proteínas (Dong *et al.* 2006).

La iniciación de la traducción (Figura 4) comprende los siguientes pasos subsecuentes: I) formación del complejo ternario que contiene eIF2, GTP y el iniciador metionil-tRNA; II) formación de complejo de preiniciación que incluye el complejo ternario, la subunidad ribosomal pequeña (40S), y los factores de iniciación de la traducción (eIF's) 1, 1A, 2, 3 y 5; III) mientras tanto, el mRNA se une, a través de su extremo poli A, a eIF4y a PABP (por sus siglas en inglés, Poly(A)-binding protein) para formar una ribonucleoproteína mensajera activada (mRNP) que es reclutada al complejo de preiniciación; IV) una vez unido el complejo de preiniciación al extremo 5' del mRNA, inicia el escaneo para localizar el codón de inicio AUG (secuencia Kozak); V) el reconocimiento del codón de inicio desencadena la

liberación de eIF1 y la conversión de eIF2 a su estado unido con GDP para detener el proceso de escaneo; VI) se disocian el eIF2 unido al GDP y eIF5, despejando el camino para la unión de la subunidad ribosomal 60S; VII) finalmente, el complejo formado sufre una hidrólisis de GTP por eIF5B, ocasionando la disociación de los factores del complejo de iniciación, dando paso a la fase de elongación (Aitken *et al.* 2012, Jackson *et al.* 2010).

Los factores de inicio de la traducción (eIF's, por sus siglas en inglés *eukaryotic translation initiation factors*) juegan un papel importante en la maquinaria del inicio de la traducción; comprenden a eIF1, eIF1a, eIF2, eIF2b, eIF3, eIF4a, eIF4e, eIF4g, eIF4b, eIF4h, eIF5, eIF5b y eIF6. Las subunidades eIF4a, eIF4e y eIF4g forman el complejo denominado eIF4F (Sonenberg *et al.* 2003, Hershey 2014).

Alguna alteración durante el inicio de la traducción y, por lo tanto, un cambio en la expresión de genes aumentan el riesgo de desarrollar patologías como el cáncer (Hershey 2014). Se ha demostrado que la desregulación de los eIF's se asocia con una transformación maligna y con la progresión de cáncer (Rosenwald 2004).

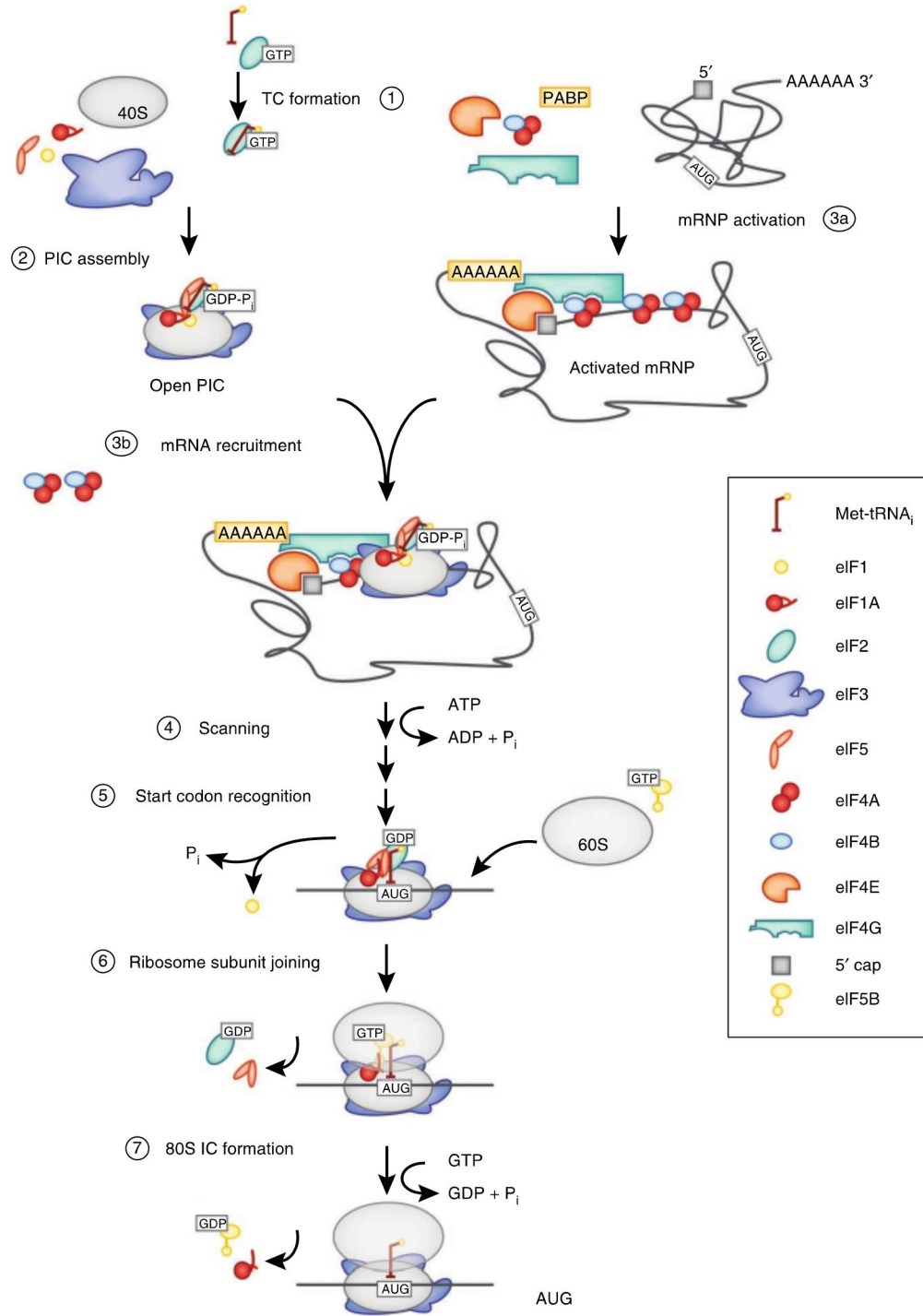


Figura 4.- Inicio de la traducción en eucariotes (Aitken *et al.* 2012).

2.6 COMPLEJO eIF3

El factor de inicio de la traducción 3, eIF3, es un complejo proteico con un peso molecular de aproximadamente 800 kDa y es considerado como el factor de inicio de la traducción eucariótica más grande (Sun *et al.* 2011, Querol-Audi *et al.* 2013). En humanos está formado por hasta 13 subunidades no idénticas que varían de tamaño y peso molecular y han sido denominadas a partir de eIF3a hasta eIF3m, en orden descendente a su peso molecular (Marchione *et al.* 2013, Hershey 2014, Simonetti *et al.* 2016).

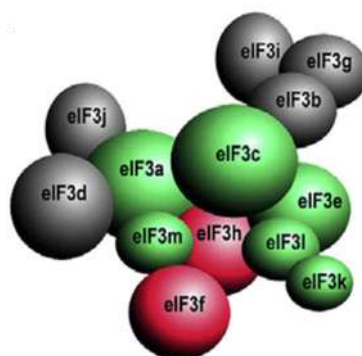


Figura 5.- Subunidades del complejo eIF3 (Querol-Audi *et al.* 2013).

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

El factor eIF3 ha sido purificado en diversas especies eucariotas (Tabla 3), de los cuales se han obtenido distintos números de subunidades dependiendo del organismo de donde se extrajo. Se ha reportado que en *S. cerevisiae* eIF3 consta de 6 subunidades; sin embargo, sólo 5 subunidades eIF3a, eIF3b, eIF3c, eIF3g, eIF3i

presentan proteínas homólogas en especies tan diversas como *H. sapiens*, *S. pombe* y *A. thaliana*. Se propone que estas cinco subunidades, conservadas en todos los organismos, forman el corazón catalítico y las subunidades restantes, que parecen ser evolutivamente divergentes, tienen funciones moduladoras en el proceso de síntesis de proteínas (Marchione *et al.* 2013).

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

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

Recientemente se ha reportado que varias subunidades de eIF3 (Tabla 4) desempeñan un papel importante en la regulación de la traducción de mRNAs específicos que codifican proteínas importantes para el control de crecimiento celular. La expresión de las subunidades de eIF3 se ha encontrado alterada en diversos tumores humanos y se ha relacionado a que puede afectar el pronóstico de éste. (Dong *et al.* 2006)

Tabla 4.- Subunidades de eIF3 y su expresión alterada en cáncer de humanos (Dong *et al.* 2006).

Subunidad	Expresión en cáncer humano
eIF3a	Aumentada (cáncer esófago, cérvix, pulmón, estómago y colón).
eIF3b	Aumentada (cáncer de mama)
eIF3c	Aumentada (cáncer de testículo)
eIF3e	Disminuida (cáncer de mama y pulmón)
eIF3h	Aumentada (cáncer de mama, hígado y próstata)
eIF3i	Aumentada (cáncer de mama)

2.7 SUBUNIDAD eIF3f

El gen eIF3f es un gen antiguo y monogénico, en humanos está organizado en 8 exones y se encuentra en el cromosoma 11p15.4. Existe una segunda copia del gen en el cromosoma 2 que sólo presenta la secuencia codificante (sin intrones). La identidad entre las 2 secuencias de aminoácidos es del 97%. En las líneas celulares humanas A549 y 293H se ha demostrado que la copia en el cromosoma 2 no es funcional, tratándose de un retropseudogen (Higareda-Mendoza *et al.* 2010).

El gen eIF3f codifica a una proteína de 357 aa (Querol-Audi *et al.* 2013). En condiciones electroforéticas desnaturalizantes la proteína de eIF3f en mamíferos tiene una movilidad electroforética de 47 kDa. Sin embargo su masa molecular es de 37.5 kDa. La proteína de eIF3f migra anómalamente en SDS-PAGE posiblemente por su alto contenido de prolina, que junto con la alanina abarcan aproximadamente el 63% de los aminoácidos (aa) en la región N-terminal (del 1 al 91) (Gutiérrez-Fernández *et al.* 2015). En la parte intermedia de la proteína se encuentra el dominio Mpr1p, Pad1p N-terminal (MPN, por sus siglas en inglés) que abarca del aa 92 al 195 y por contener este dominio pertenece a la familia génica Mov34. Se sugiere que este dominio está relacionado a la capacidad de la proteína de asociarse a complejos multiproteicos involucrados en procesos tan diversos como la iniciación de la traducción, la regulación del proteosoma y la transcripción (Sanches *et al.* 2007). En el extremo C-terminal se encuentra un motivo denominado TOS que interactúa con mTOR/Raptor (Csibi *et al.* 2010).

Región N-terminal						
1	MATPAVPVSA	PPATPTVPA	AAPASVPAPT	PAPAAAFVPA	AAPASSSDPA	AAAAATAAPG
61	QTPASAQAPA	QTPAPALPGP	ALPGFFPGGR	VVRLHPMLA	SIVDSYERRN	EGAARVIGTL
121	LGTVDKHSVE	VTNCFVPHN	ESEDEVAVDM	EFAKNMYELH	KKVSPNELL	GWYATGHDIT
181	EHSVLEHEY	SREAPNPIHL	TVDTSLQNGR	MSIKAYVSTL	MGVPGRTMGV	MFTPLTVKYA
241	YYDTERIGVD	LIMKTCFSPN	RVGLSSDLQ	QVGGASARIQ	DALSTVLQYA	EDVLSGKVSA
301	DNTVGRFLMS	LVNQVPKIVP	DDFETMLNSN	INDLLMVTYL	ANLTQSQIAL	NEKLVNL
Región C-terminal						

Figura 6.- Proteína eIF3f en seres humanos. VERDE: aa de alanina y prolina. ROJO: dominio MPN. AZUL: motivo TOS (del aa 323 al 327). (Secuencia obtenida del NCBI).

Con respecto al proceso de síntesis de proteínas, experimentos *in vivo* e *in vitro* muestran que la sobreexpresión del gen de eIF3f disminuye la velocidad de síntesis proteica (Higareda-Mendoza *et al.* 2010, Shi *et al.* 2006), por lo que se considera un modulador del proceso. Sin embargo, eIF3f es considerada como una proteína ubicua, ya que presenta características de unión proteína-proteína excepcionales, siendo capaz de interactuar con proteínas diferentes a las del complejo eIF3. Se ha reportado que la región amino terminal de eIF3f (1-91 aa) y eIF3f en su longitud completa inhiben la replicación del VIH-1 al interferir con la edición de la región 3' del mRNA del virus y consecuentemente disminuir los niveles de mensajero (Valente *et al.* 2009). Por otra parte, se ha demostrado que eIF3f interactúa y estabiliza a la proteína hMSH4 que participa en la reparación del DNA, esta interacción es mediada por la región amino terminal de ambas proteínas (Chu *et al.* 2013). En un modelo muscular se ha encontrado que la ubiquitin-E3 ligasa llamada MAFbx (Atrogin1/MAFbx) tiene como blanco a eIF3f; ubiquitina a eIF3f y lo degrada en el proteosoma, ocasionando una disminución global de la síntesis de proteínas que conlleva a la atrofia muscular (Lagrand-Cantaloube *et al.* 2008). En otro escenario, el mismo grupo de trabajo reportó que eIF3f sirve como andamio entre mTORC1 y S6K1 en la vía de síntesis de proteínas. Si se incrementa la expresión de eIF3f, se incrementa la actividad de mTORC1, lo que conlleva a la fosforilación de S6K1 y 4E-BP1 (inhibidor del proceso de activación de los RNAm) y como resultado se tiene el aumento en la síntesis de proteínas en un modelo muscular (Csibi *et al.* 2010). Recientemente se describió la interacción de eIF3f con el receptor adrenérgico alfa 1B y que esto estimula la actividad adrenérgica (Gutiérrez-Fernández *et al.* 2015). Por lo tanto, eIF3f es considerada como una proteína ubicua.

Estudios del grupo de trabajo han demostrado la estrecha relación entre eIF3f y el ciclo celular, en donde se cree en la posibilidad de que la función o funciones del gen eIF3f estén relacionadas al crecimiento y la división celular debido a que en células de tabaco TBY-2 la expresión transcripcional del gen eIF3f está circunscrita a la transición G2/M del ciclo celular (Higareda-Mendoza *et al.* 2010). Asimismo, se reportó que la expresión de la proteína eIF3f es bifásica y circunscrita a las fases S y M del ciclo celular (Figura 7) y que su expresión en G0 está disminuida en línea celular A-549, a nivel de mRNA y de proteína; es decir, la expresión de eIF3f está altamente regulada (Higareda-Mendoza *et al.* 2010) y al sufrir alguna alteración en su expresión se tendrá una repercusión en la proliferación celular, existiendo evidencia de que al sobreexpresar o silenciar al gen eIF3f se afecta al crecimiento celular y se induce apoptosis (Higareda-Mendoza *et al.* 2010).

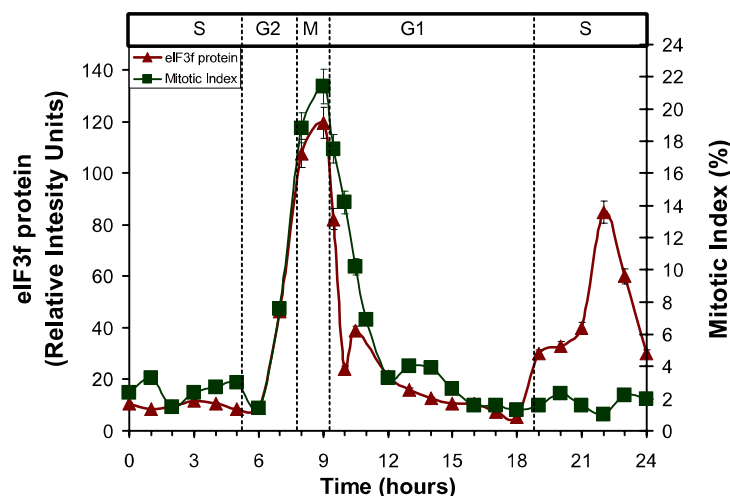


Figura 7.- Expresión bifásica de la proteína eIF3f (Higareda-Mendoza *et al.* 2010).

Este comportamiento bifásico sugiere dos posibilidades: que tiene la misma función en ambas fases del ciclo celular o que su función es diferente a lo largo de cada fase del ciclo celular, y particularmente en S y M. El grupo de trabajo reportó que la proteína eIF3f es fosforilada en la serina 258 por el complejo CDK1/Ciclina B, componentes principales para la transición de la fase G2 a M del ciclo celular (Gómez-Correa *et al.* 2013). Así mismo, se sugirió que el complejo multiproteico formado por eIF3f y el receptor adrenérgico alfa 1B modula la degradación de la

proteína p27, marcada con ubiquitina, con la participación río arriba de Akt; se propone que la disminución en la expresión de eIF3f se debe a que la activación del receptor adrenérgico alfa 1D detiene el ciclo celular antes de la entrada a la fase S, momento en el que encontramos uno de los dos picos máximos de expresión de eIF3f (Jiménez-Alcántar 2014).

En relación al papel de eIF3f con cáncer, Harvey y colaboradores (2001) proponen que eIF3f podría participar en la progresión tumoral; encontraron una elevación en la concentración de la proteína eIF3f en la línea celular MDA-MB-435, en comparación con otros tipos de cáncer menos agresivos. En cambio, Shi y colaboradores (2006) reportaron una expresión disminuida de eIF3f en distintas muestras tumorales, en comparación con su correspondiente tejido sano; por ejemplo, del 100% en tumores de páncreas y vulva, 90% en tumores mamarios, y 70% en tumores de ovario e intestino delgado. Cheng y colaboradores (2014), y Li y colaboradores (2014), encontraron una correlación directa entre la disminución de la expresión de eIF3f y el avance en el estadio de cáncer gástrico; proponen que la disminución en eIF3f puede participar en la progresión y la recurrencia del mismo. Doldan y colaboradores (2008), y Hershey (2014), estudiaron muestras de células tumorales de páncreas y melanoma en donde encontraron una alta frecuencia de pérdida alélica del gen de eIF3f, lo que probablemente explica la disminución de la expresión de eIF3f a nivel de mRNA y de proteína; esto fue evaluado a través de la pérdida de microsatélites en el brazo corto del cromosoma 11. Los microsatélites que evaluaron fueron D11S1318, D11S1338 y D11S1331; sin embargo, en la figura 8 se observa que el microsatélite más cercano a eIF3f se encuentra a miles de pares de bases.

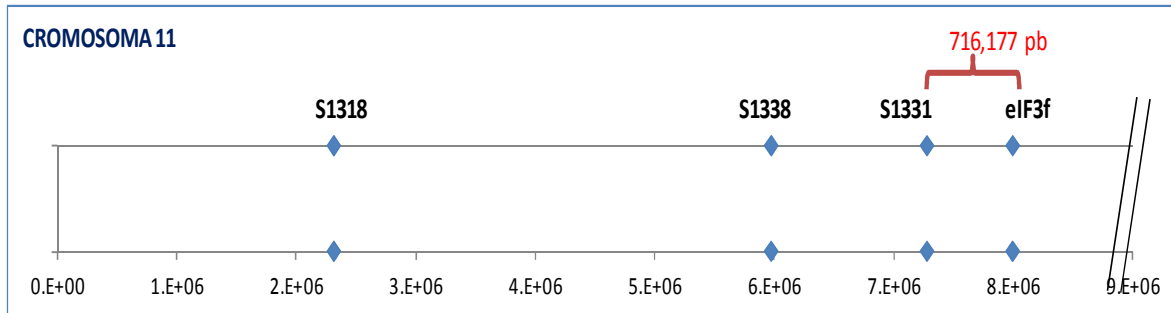


Figura 8.- Cromosoma 11 con representación de eIF3f y los microsatélites.

En células hemáticas, Miyamoto y colaboradores (2004) demostraron que el complejo formado por eIF3 y su asociación con los ribosomas pudiera contribuir en la velocidad del inicio de la traducción durante la activación de los linfocitos T; con respecto a eIF3f, reportan que no hay diferencias en la expresión del mensajero de un linfocito T activado (proliferación *in vitro*) y un linfocito T inactivo (estado quiescente natural).

Por lo anteriormente expuesto, es importante determinar si el patrón de expresión proteico de eIF3f varía entre células cancerígenas y no cancerígenas, lo que nos permitirá contribuir en validar o invalidar la propuesta de eIF3f como marcador pronóstico de cáncer

3. JUSTIFICACIÓN

Los antecedentes de eIF3f han demostrado su participación en procesos de síntesis de proteínas, señalización y proliferación celular; procesos que al ser alterados conllevan a la oncogénesis.

Es de nuestro interés el estudio del gen eIF3f a nivel molecular para comprender su función en relación al ciclo celular, así como el determinar si su patrón de expresión proteico varía entre células cancerígenas y no cancerígenas.

4. HIPÓTESIS

No existe diferencia en el patrón de expresión del gen eIF3f durante el ciclo celular, entre linfocitos no cancerígenos y cancerígenos.

5. OBJETIVOS

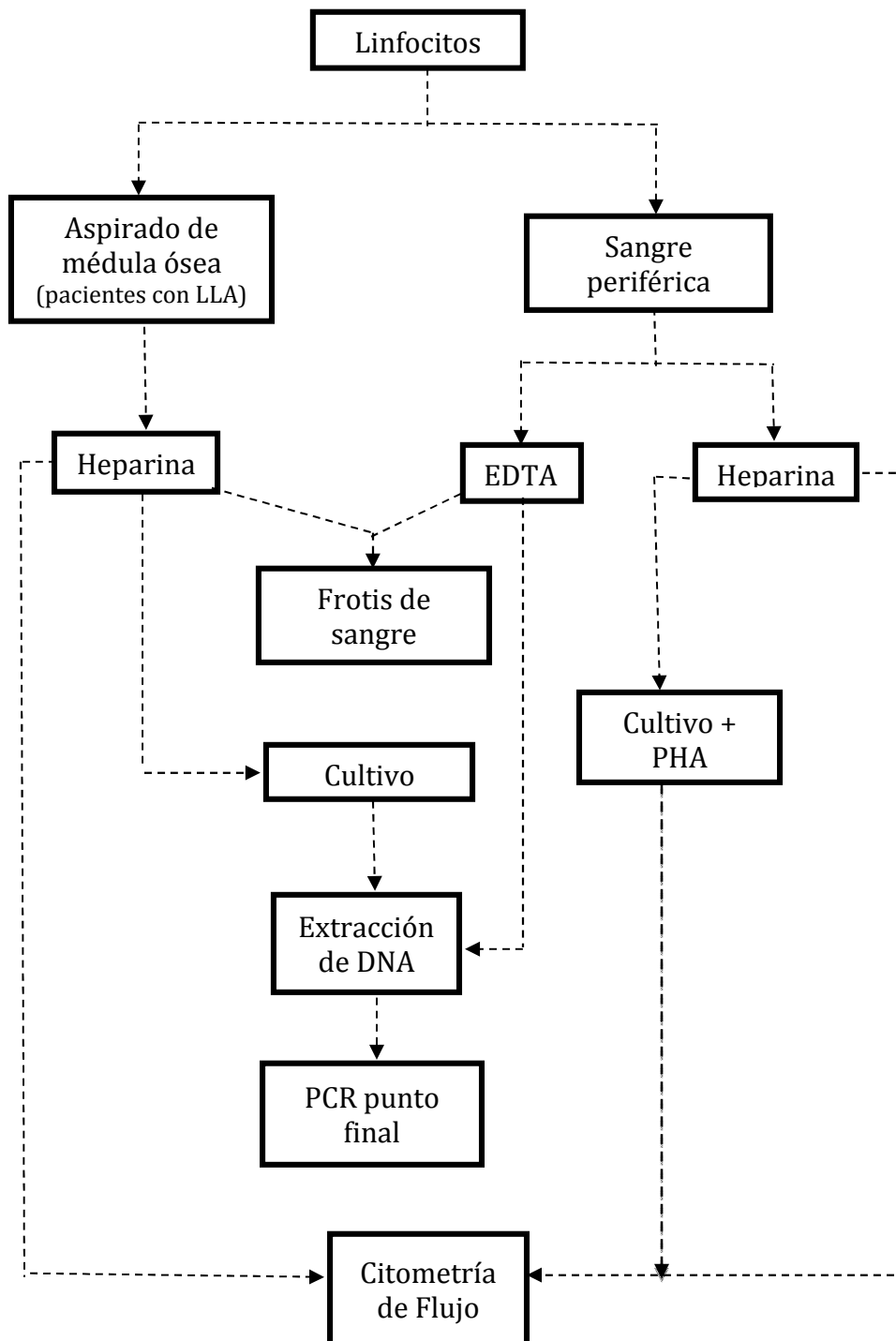
5.1 OBJETIVO GENERAL

Establecer el patrón de expresión de eIF3f en linfocitos humanos para las distintas fases del ciclo celular.

5.2 OBJETIVO ESPECÍFICOS

- 1) Determinar el patrón de expresión del gen eIF3f en linfocitos sanos en estado de quiescencia y en proliferación.
- 2) Identificar las fases del ciclo celular y su relación con la expresión del gen eIF3f de linfocitos de voluntarios sanos y de pacientes con LLA.
- 3) Identificar si existe pérdida alélica de eIF3f en las muestras.
- 4) Identificar si existe pérdida de microsatélites cercanos al locus de eIF3f en las muestras.

6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 MATERIALES

Este proyecto se llevó a cabo bajo los lineamientos de la norma oficial mexicana NOM-012-SSA3-2012, la Declaración de Helsinki y el Código de Núremberg. Cuenta con la aprobación de los comités de bioética e investigación de la Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas “Dr. Ignacio Chávez” y del Hospital Infantil “Eva Sámano de López Mateos” de Morelia, Michoacán (Anexo 1 y 2).

7.1.1 Linfocitos humanos de sangre periférica

Muestras obtenidos de voluntarios sanos.

INCLUSIÓN: voluntarios con un rango de edad entre 20 y 30 años.

EXCLUSIÓN: voluntarios que refirieran antecedentes patológicos en un lapso aproximado de 2 meses previos a la toma de muestra.

ELIMINACIÓN: muestras cuyo frotis de sangre periférica haya presentado datos anormales en cuanto a la morfología de linfocitos.

7.1.2 Linfocitos humanos de médula ósea

Muestras obtenidas de pacientes del Hospital Infantil de Morelia.

INCLUSIÓN: paciente menor de 15 años de edad, con autorización por parte del padre o tutor, con indicación de aspirado de médula ósea.

EXCLUSIÓN: no aplica.

ELIMINACIÓN: muestras de material biológico insuficiente.

7.2 MÉTODOS

7.2.1 Frotis de sangre

Se utilizó la técnica del portaobjetos en cuña. En esta técnica se utilizan dos portaobjetos: el primero se utiliza como soporte del extendido sanguíneo y el otro como portaobjetos extensor. Una gota de sangre se coloca en un extremo del portaobjetos; el portaobjetos extensor debe de ser sostenido de manera segura por

delante de la gota de sangre en un ángulo de 35 a 45° con respecto al otro portaobjetos. El portaobjetos extensor se desliza hacia atrás hasta que toma contacto con la gota de sangre y se sostiene en esa posición hasta que la sangre se esparce por todo el ancho del portaobjetos. A continuación, el extensor se desliza con rapidez y suavidad hacia el otro extremo del portaobjetos que sirve de soporte del extendido, con lo que se crea un frotis en cuña.

7.2.2 Tinción del frotis de sangre

Se realizó mediante la técnica de Wright, ya que puede ser utilizada para sangre periférica y médula ósea (reactivos se obtuvieron de Hycel de México). Las células fueron previamente fijadas con metanol. Ya secó, se agregó 1 mL de colorante en toda la extensión del frotis, se dejó por 3 minutos en el caso de la sangre periférica y 7 en el de médula ósea; después, se agregó buffer de fosfatos en la misma cantidad del colorante y se mezcló sobre la superficie; se dejó actuar por 5 minutos en el caso de sangre periférica y 7 para médula ósea. Se quitó el buffer con agua destilada hasta aclarar. Se dejó secar al aire y, posteriormente, se procedió al análisis en el microscopio.

7.2.3 Cultivo celular

El cultivo de linfocitos se realizó en tubos cónicos estériles de 15 mL que contenían 10 mL de Medio Mínimo Escencial de Eagle (MEM, por sus siglas en inglés *Minimum Essential Medium*) de la marca Sigma-Aldrich®, suplementado con 18 mM de NaHCO₃ (Sigma-Aldrich®), 2 mM de L-glutamina (Sigma-Aldrich®), 10 mM de HEPES (Sigma-Aldrich®) y suero fetal bovino (SFB) al 10%. (Invitrogen). El mitógeno utilizado fue 1.5% v/v de fitohemaglutinina (PHA) de Gibco; por último, se le agregaron dos antibióticos: penicilina 100 µL/mL y estreptomina 0.1 mg/mL. En una cabina de seguridad biológica Clase II A2 (ThermoForma), se agregaron 8 gotas de sangre total con una pipeta Pasteur estéril al tubo con medio de cultivo; los cultivos se mantuvieron sellados en una incubadora (ThermoForma) a 37 °C por 72 horas.

7.2.4 Aislamiento de linfocitos

Se colecta la muestra que contiene el anticoagulante (tubos de Heparina BD Vacutainer®), después se diluye la sangre con un volumen igual de PBS. Usando una pipeta Pasteur, cuidadosamente se coloca la mezcla de sangre con PBS sobre los 3 mL de Lympholyte®-H (Cedarlane Canadá), que previamente ha sido colocado en un tubo cónico de 15 mL, tratando de mezclar lo menos posible. Se centrifuga a 800 g por 20 minutos a temperatura ambiente. Se forma una capa visible intermedia de linfocitos. Usando una pipeta Pasteur se colectan los linfocitos y se colocan en un nuevo tubo cónico de 15 mL. Se diluyen los linfocitos con PBS para reducir la densidad de la solución. Se centrifuga a 800 g por 10 minutos para sedimentar a los linfocitos y se desecha el sobrenadante. Por último, se resuspende en PBS y la muestra se prepara para Citometría de Flujo.

7.2.5 Aislamiento de leucocitos

Este método se utilizó para la extracción de DNA de las muestras de los voluntarios sanos, para las muestras de los cultivos con PHA y su posterior preparación para Citometría de Flujo, y para la extracción de DNA a partir de los cultivos de las muestras provenientes de los pacientes.

La técnica consiste en usar un buffer de lisis eritrocitaria (NH₄Cl 0.17 M, KHCO₃ 10 mM y EDTA 0.1 mM) donde se agregan 14 mL de buffer por cada mL de sangre total y se incuba por 10 minutos a 4 °C con agitación continua. Terminado el periodo de incubación, se procede a centrifugar las muestras a 300 g por 5 minutos a 4 °C, se aspira el sobrenadante y se resuspende el aglomerado de células en PBS frío (4 °C); se centrifuga a 150 g por 10 minutos a temperatura ambiente y se desecha el sobrenadante. Por último, se resuspende en PBS para continuar con el procedimiento de extracción de DNA o Citometría de Flujo.

7.2.6 Determinación de concentración celular y viabilidad

Esta técnica es utilizada para conocer la cantidad y calidad de los linfocitos obtenidos después de su aislamiento. De las células resuspendidas en PBS se toma una porción y se realiza una dilución 1:4 con azul de tripano (Sigma-Aldrich®). Las células viables no permitirán el paso del colorante a través de la membrana celular, mientras que las células no viables se tiñen de azul. Se transfiere una pequeña cantidad de la mezcla a una cámara de Neubauer, dejando que la cámara se llene por capilaridad. La cámara de Neubauer se coloca en un microscopio óptico invertido (LEICA) a 40X y se cuentan las células vivas y muertas encontradas en el cuadro del centro y en los cuatro cuadrados de las esquinas de ambos lados de la cámara. La concentración celular y el índice de viabilidad (porcentaje de células viables) se determinaron de la siguiente forma:

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

Donde:

Factor de conversión de la cámara = 0.001

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

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

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

7.2.7 Citometría de Flujo

7.2.7.1 Preparación de la muestra

Se determina el volumen a tomar para aproximadamente 500,000 células y se pasan a un tubo Eppendorf de 1.5 mL. Se centrifuga a 250 g por 6 minutos, se retira el

sobrenadante y se agrega 1 mL de solución de lavado (PBS 1X, EDTA 5 mM, BSA 0.2%). Después, se centrifuga a 150 g por 6 minutos, se decanta el sobrenadante y se resuspende en 1 mL de solución de lavado; nuevamente se centrifuga a 250 g por 6 minutos y se retira el sobrenadante. Se agregan 500 μ L de solución fijadora (2% v/v formaldehído, 0.2% v/v glutaraldehído, en PBS 1X), y se incuba por 10 minutos a temperatura ambiente con agitación. Se agregan 500 μ L de solución de lavado y se almacena a 4 °C hasta que se vaya a utilizar en el citómetro.

7.2.7.2 Detección de eIF3f y las fases del ciclo celular

Para la determinación de la expresión de eIF3f se centrifugan las muestras a 250 g a 4 °C por 10 minutos y se resuspende en 100 μ L de solución de lavado (PBS 1X, EDTA 5 mM, BSA 0.2%), se le agrega el anticuerpo primario (conejo anti eIF3f 1:50, (Biolegend) y se deja incubar 1 hora a temperatura ambiente con agitación suave. Se centrifuga a 250 g por 10 minutos y se lava con 1 mL de solución de lavado. Se resuspende en 100 μ L de solución de lavado. Se añade el anticuerpo secundario (ratón anti conejo IgG - FICT 1:25, Santa Cruz Biotechnology) y se incuba en oscuridad por 30 minutos a temperatura ambiente con agitación suave. Se centrifuga a 250 g por 10 minutos y se lava con 1 mL de solución de lavado. Se resuspende en 500 μ L de solución de lavado con 2.5 μ g/mL de RNAsa y 50 μ g/mL de yoduro de propidio (PI). Se homogeniza y se incuba por 30 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Posteriormente, se procede a leer en el Citómetro de Flujo. Se utilizó un citómetro CytoFLEX (Beckman Coulter) y los resultados fueron analizados con el software CytExpert versión 1.2.11.0. Las condiciones en las que se empleó el citómetro fueron: para FICT un láser de excitación de 488 nm y un detector 520/40 BP, y para PI se usó un láser de 561 nm y un detector 585/42 BP. Se utilizó un flujo de 10 μ L/minuto para adquirir un total de 10,000 eventos, siendo el vehículo de la suspensión celular el PBS. Previo al análisis de las muestras se realizó un procedimiento denominado compensación; esto debido a que puede existir el solapamiento entre los espectros de emisión cuando se usan dos o más fluorocromos. El proceso de compensación permite corregir el solapamiento.

7.2.8 Reacción en Cadena de la polimerasa (PCR)

7.2.8.1 Elección de oligonucleótidos

Para el análisis de DNA, la selección de los microsátelites y la secuencia de los oligonucleótidos iniciadores, se realizó de acuerdo a lo reportado por Shi y colaboradores (2008): 3 microsátelites del brazo corto del cromosoma 11. Las secuencias de los iniciadores para dichos microsátelites y para eIF3f (Higareda-Mendoza *et al.* 2010) se muestra en la Tabla 5.

Tabla 5.- Oligonucleótidos utilizados para la PCR.

REGIÓN	NOMBRE	SECUENCIA	Posición 5'	Tm (°C)	Amplificación (pb)
Cromosoma 11					
Promotor+Exon1 eIF3f	Forward	GCTCCTCGGGCCAAAAGC	7987156	61.44	203
	Reverse	GGCCATCTTGTGAGAAAGAAGG	7987358	61.48	
Microsatélite 1 S1318	Forward	TGTGCATGTGCATGAGTG	2305993	56.00	123
	Reverse	CCCGTATGGCAACAGG	2306115	54.10	
Microsatélite 2 S1338	Forward	GACGGTTAACTGTATATCTAAGAC	5966746	55.14	257
	Reverse	TAATGCTACTTATTTGGAGTGTG	5967002	54.46	
Microsatélite 3 S1331	Forward	GCTGCTCCATGAGAGGATACTG	7270781	60.80	199
	Reverse	GCAGAGCCCTTTGCACTCTT	7270979	60.89	

7.2.8.2 Amplificación por PCR

La extracción de DNA se realizó con el kit DNAzol® (Invitrogen) de acuerdo a las instrucciones del manual. Se purificó el DNA con el kit MinElute® (Qiagen®). Posteriormente se cuantificó el DNA mediante el espectrofotómetro (Jenway 6405) a una longitud de onda de 260 nm. El DNA se amplificó mediante la PCR utilizando los oligonucleótidos específicos previamente mencionados. La mezcla para la PCR se preparó en un volumen final de 50 µL, conteniendo 500 ng de DNA templado y una mezcla de dNTP (0.3 mM de cada uno), MgSO₄ (1 mM), par de oligonucleótidos iniciadores (25 pM cada uno), 0.2 µL de DNA polimerasa de alta fidelidad (PlatinumR Pfx DNA Polymerase, Invitrogen), buffer de amplificación 1X y agua de calidad ultrapura para completar el volumen final de 50 µL. La amplificación fue realizada en el termociclador Mastercycler Gradient Eppendorf, empleando las siguientes condiciones: 2 minutos de desnaturalización inicial a 95 °C; 30 ciclos de

amplificación a 94 °C durante 30 segundos, a 50 °C durante 30 segundos y a 68 °C durante 30 segundos; y un ciclo de elongación final a 68°C por 4 minutos.

7.2.8.3 Análisis de productos de PCR

El tamaño de los fragmentos obtenidos por PCR fue evaluado por electroforesis en geles agarosa al 1.5% en buffer TAE 1X (Tris-acetato 40 mM y EDTA 1 mM, pH 6.8) con 2 µL de bromuro de etidio (5 mg/mL). La escalera de peso molecular fue 1 kb Plus DNA Ladder (ThermoFisher). Las muestras fueron corridas a 80 mV (fuente de poder de BIO-RAD powerPac Basic™) durante 90 minutos y las bandas fueron visualizadas en un transiluminador UV (Koefer). Se adquirieron las imágenes de los geles con un sistema fotodocumentador (KODAK). El programa Kodak Digital Science 1D del ordenador permite determinar el peso molecular, medir la densidad óptica y, por lo tanto, la concentración (intensidad) de cada banda.

8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se calcularon las medias referentes a la intensidad relativa del fluorocromo utilizado para identificar la proteína de eIF3f.

Para determinar la normalidad de los datos, se aplicó la prueba de normalidad de Shapiro - Wilk. También se verificó la homogeneidad de las varianzas mediante la prueba de Levene. Se trabajó con un nivel de significancia de $< 5\%$. Las pruebas paramétricas utilizadas se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6.- Pruebas paramétricas utilizadas.

PRUEBA	DESCRIPCIÓN
ANOVA una vía	Calcula la media de 3 o más grupos (G0-G1, S, G2-M).
t de Student apareada	Calcula la media de un grupo antes y después del tratamiento. (Linfocitos en quiescencia vs. linfocitos en proliferación de los sanos).
t de Student independiente	Calcula la media de dos grupos (Linfocitos en proliferación de sanos vs. linfocitos de pacientes).

9. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El objetivo principal de este trabajo fue identificar el perfil de expresión del gen eIF3f en linfocitos humanos; para poder sustentar nuestra hipótesis utilizamos linfocitos de individuos sanos y linfocitos de pacientes con LLA.

Frotis de sangre periférica de voluntarios sanos

A los individuos sanos se les realizó un frotis de sangre periférica. Cada frotis fue observado al microscopio con la finalidad de identificar una anomalía que pudiera interferir con el estudio. Los frotis se observaron con diferentes objetivos (10x, 40x y 100x) como se muestra en las siguientes figuras (9, 10 y 11, respectivamente):

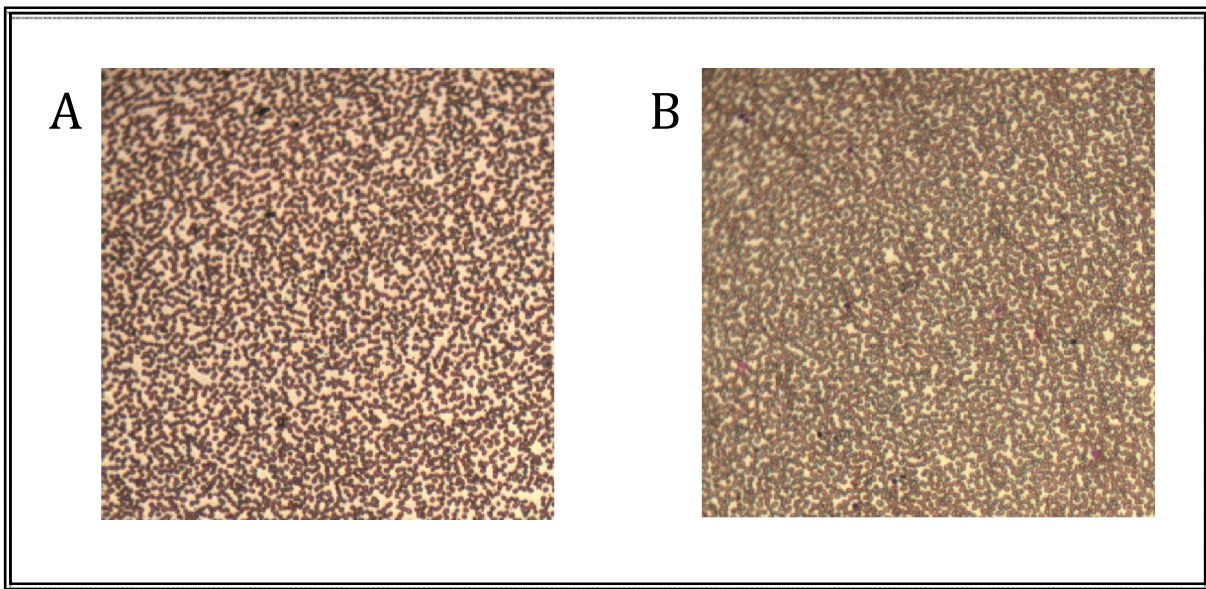


Figura 9.- Frotis de sangre al microscopio con objetivo 10x. **A:** Se observa aglutinación de eritrocitos. **B:** Se observa una distribución normal de eritrocitos sin la presencia de células grandes anormales como los blastos.

Los frotis de sangre no deben ser demasiado gruesos porque las células se amontonan y no pueden ser reconocidas, ni diferenciarse; ni demasiado delgados porque las células se deforman, distorsionan y destruyen.

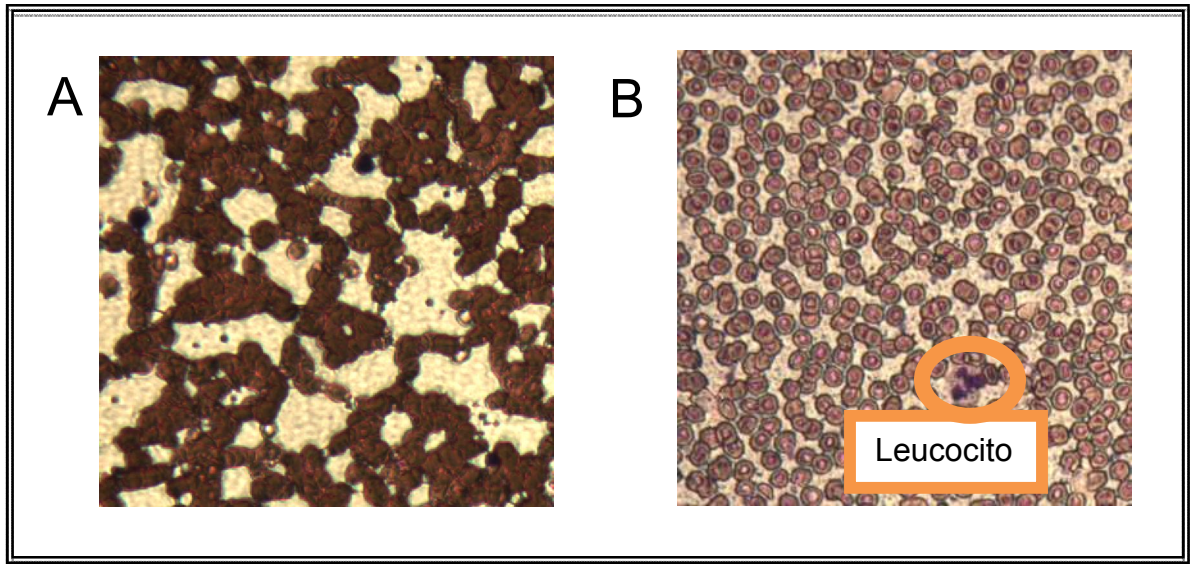


Figura 10.- Frotis de sangre al microscopio con objetivo 40x. **A:** La aglutinación de eritrocitos no permite distinguir los leucocitos. **B:** Relación eritrocito/leucocito de aproximadamente 200/1.

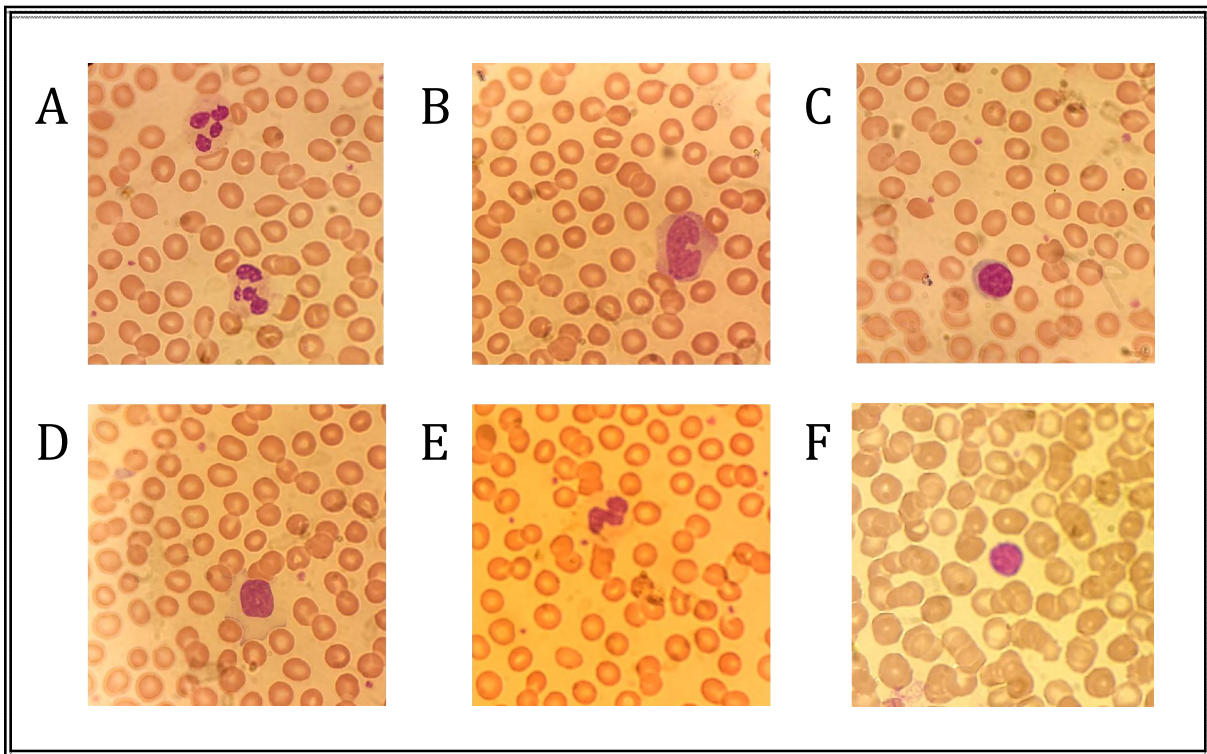


Figura 11.- Frotis de sangre periférica al microscopio con objetivo 100x. Permite identificar a los leucocitos. **A:** Neutrófilos segmentados. **B:** Neutrófilos en banda. **C:** Linfocitos. **D:** Monocito. **E:** Eosinófilo. **F:** Basófilo.

Utilizando el objetivo 100x del microscopio se realizó el recuento diferencial de leucocitos. En la Tabla 7 se muestran los resultados del recuento diferencial; del lado izquierdo se observa los porcentajes esperados y del lado derecho el promedio de los individuos.

Tabla 7.- Porcentaje leucocitario de individuos sanos.

Leucocitos	Rango de referencia en el adulto (sangre periférica) (%)	Media obtenida a partir de los individuos sanos (%)
Neutrófilos segmentados	50-70	59.8
Neutrófilos en banda	0-5	4.2
Linfocitos	20-40	28.6
Monocitos	3-11	5.3
Eosinófilos	0-5	1.9
Basófilos	0-1	0.2

Se obtuvieron 10 muestras, de las cuales una mostró ligera linfocitosis; en el resto de las muestras se obtuvieron linfocitos dentro de los valores esperados. No se observaron alteraciones morfológicas en ninguna de las muestras. Por lo tanto, se consideraron todas las muestras para el análisis del perfil de expresión de eIF3f por Citometría de Flujo y se les realizó extracción de DNA para su posterior análisis por PCR.

Frotis de médula ósea de pacientes

El frotis de los pacientes nos permitió identificar la morfología y realizar un conteo rápido de los blastos presentes en médula ósea. Se obtuvieron un total de 6 muestras de aspirado de médula ósea provenientes del Hospital infantil; se descartaron 3 muestras de pacientes, dos porque el estudio de inmunotipificación reportó ausencia de células sugestivas de malignidad y la tercera fue diagnosticada

como Leucemia Mielocítica Aguda. Las tres muestras restantes presentaron un diagnóstico de LLA con inmunofenotipo de Pre-B común (Figura 12), que es el inmunofenotipo más frecuente, lo que concuerda con las estadísticas previamente mencionadas. Dos de ellos presentan recaída y uno es un caso nuevo. La citogenética se reportó en dos casos: **1)** de 14 células analizadas: 1 célula con 48x t:(1:5)(p36:q36)+9+22, 1 célula con 45 XY -12 y 13 XY; **2)** 56, XXY, +4, +6, +8, +10, +17, +18, +19, +21, +mar (2)/ 57<2 n+>XXYY, +4,+5, +6, +10, +16, +17, +19, +21, +22(4)/ 46 XY [14].

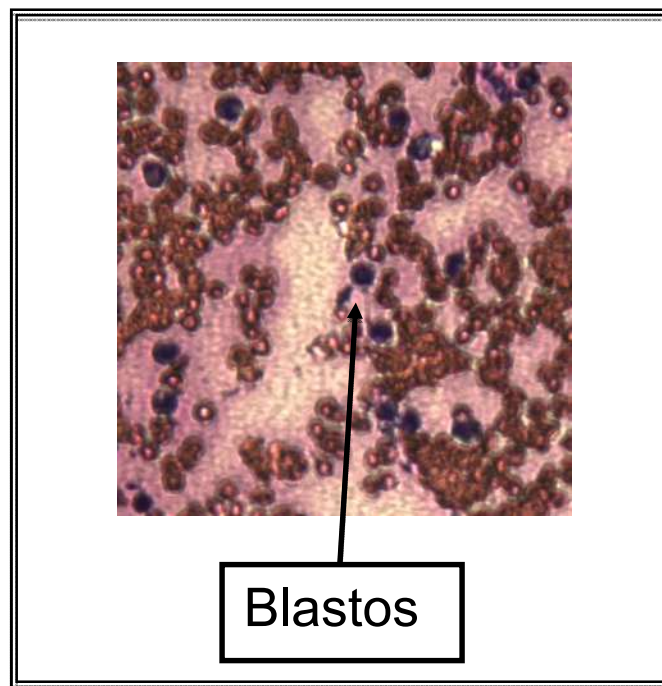


Figura 12.- Frotis de médula ósea al microscopio con objetivo de 40x.

Citometría de Flujo

El término “crear ventana” se refiere a la habilidad de aislar poblaciones específicas dentro de una muestra heterogénea, permitiendo que el análisis se limite a una subpoblación. El gráfico de puntos de acuerdo a la dispersión de luz FSC vs. SSC es el método más simple de depuración; tiene la ventaja de que las células muertas o

detritus (desechos celulares) pueden excluirse del análisis. Por lo tanto, lo primero que se realizó fue un análisis de los leucocitos para crear una ventana que nos permitiera reconocer sólo a los linfocitos. Para esto, se prepararon 2 muestras de sangre periférica de un mismo individuo: en la primer muestra (Figura 13.A) no se le adicionó ningún fluorocromo, se creó un gráfico de puntos donde se seleccionaron diferentes subpoblaciones de acuerdo a su tamaño y complejidad celular; por el otro lado, a la segunda muestra se le agregó anticuerpo FICT anti-human CD19 (BD Biosciences) que es específico para los linfocitos B. Como se observa en la figura 13.B, se tiñe de morado el centro de la subpoblación de rojo, por lo que se considera que ahí se encuentra la ventana que selecciona a los linfocitos y se toma como referencia para los análisis posteriores.

Los datos previos nos ayudaron a la creación de nuestro templado, el cual se utilizó en las tres diferentes muestras: linfocitos sanos en quiescencia, linfocitos sanos en proliferación y linfocitos provenientes de pacientes. Después de la elección de la ventana de los linfocitos (opción **A** de las figuras 14, 15 y 16), fue necesaria la creación de una nueva ventana con la finalidad de excluir los “dupletes” (células dobles), y así evitar la sobreestimación de la intensidad de los fluorocromos que pudiera interferir con nuestros resultados. Como se observa en la opción **B** de las figuras 14, 15 y 16, se realizó un gráfico de puntos que mide la intensidad del yoduro de propidio (PI), área vs. Altura, de acuerdo a lo establecido por Wersto y colaboradores (2001). Posteriormente, para distinguir las fases del ciclo celular (G0 – G1, S y G2 – M), se creó un histograma en donde el eje de la X muestra la intensidad del PI (en escala lineal) y sobre el eje de la Y el número de células, como se muestra en la opción **C** de las figuras 14, 15 y 16. La fase G0 – G1 tiene una media aproximada de 100,000 unidades de intensidad relativa del PI y, por lo tanto, esto corresponde a 2N (diploide); la fase G2 – M tiene una media aproximada de 200,000 unidades de intensidad relativa del PI, que corresponde a 4N (tetraploide); en la fase intermedia entre G0 – G1 y G2 – M se ubica la fase S. Es importante mencionar que

por cada ventana creada, el software del equipo nos proporciona la media y la mediana de las intensidades de los fluorocromos, en este caso de FICT y PI.

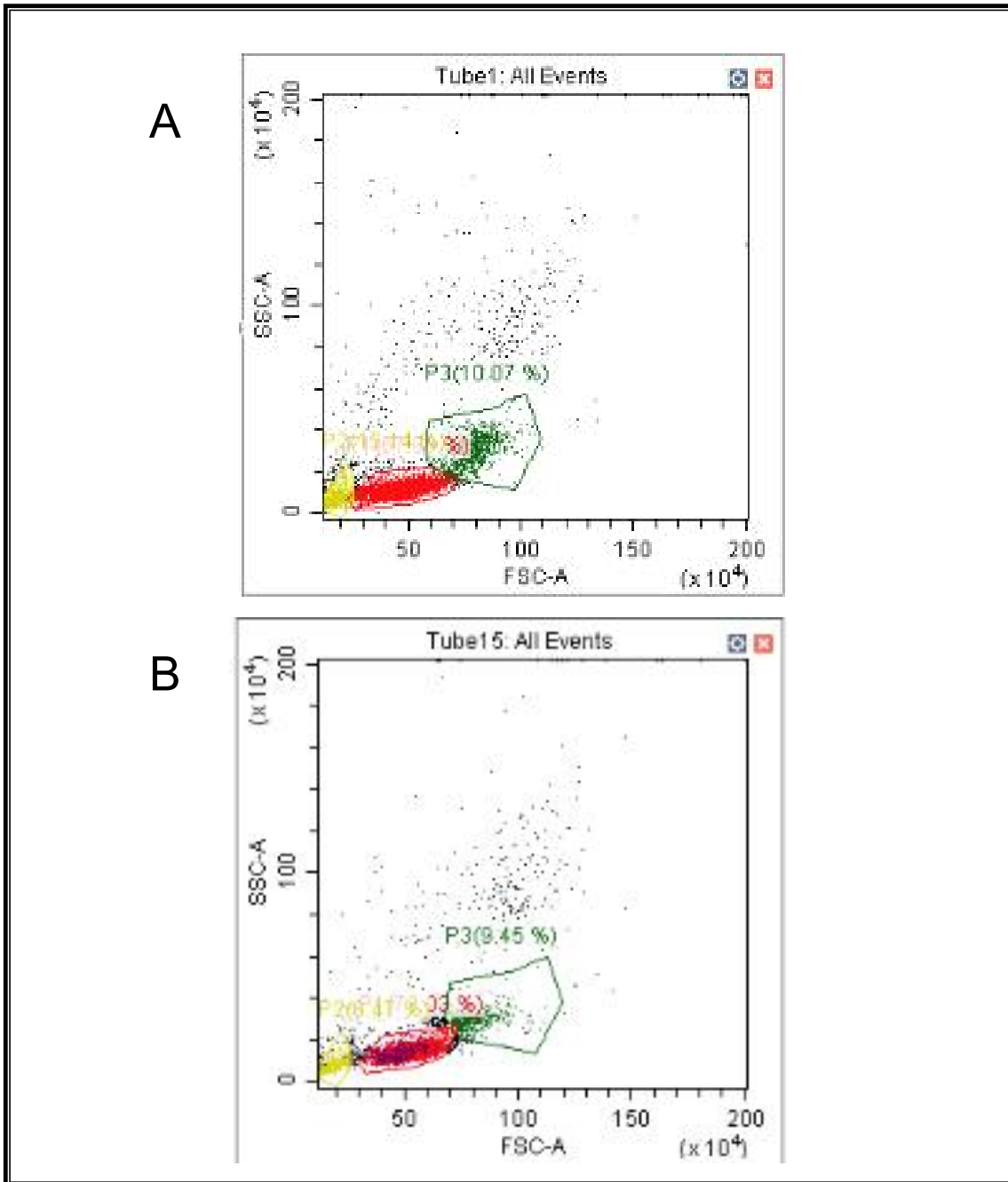


Figura 13.- Ventanas para la selección de linfocitos. **A:** Subpoblaciones de leucocitos. **B:** Selección de la ventana de la subpoblación de linfocitos.

A continuación se muestran los cambios que existen con las tres muestras de linfocitos humanos (Figuras 14, 15 y 16).

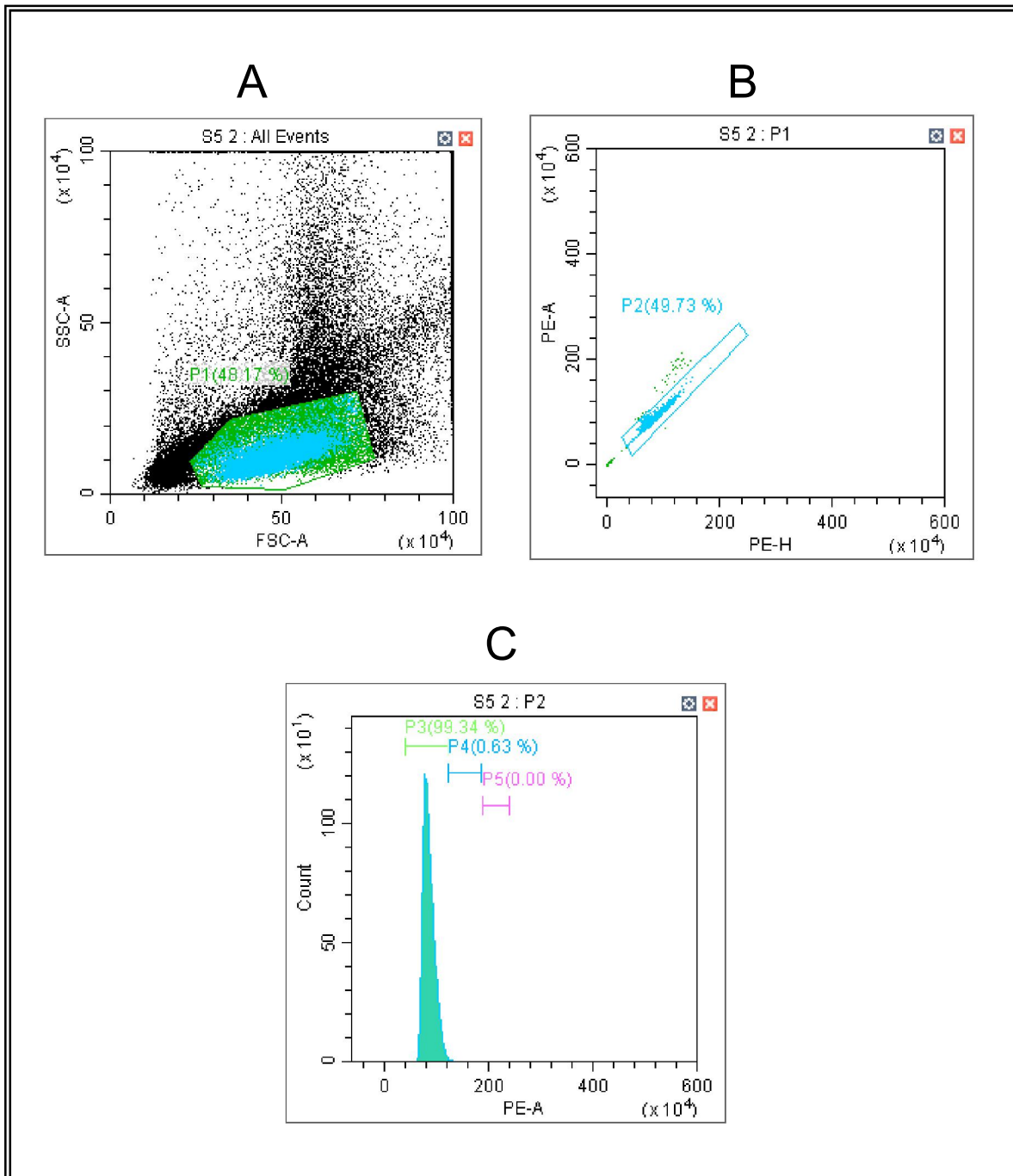


Figura 14.- Linfocitos sanos en quiescencia. **A:** Selección de la ventana de linfocitos. **B:** Eliminación de dupletes. **C:** Se observa a los linfocitos en la fase equivalente a G0-G1.

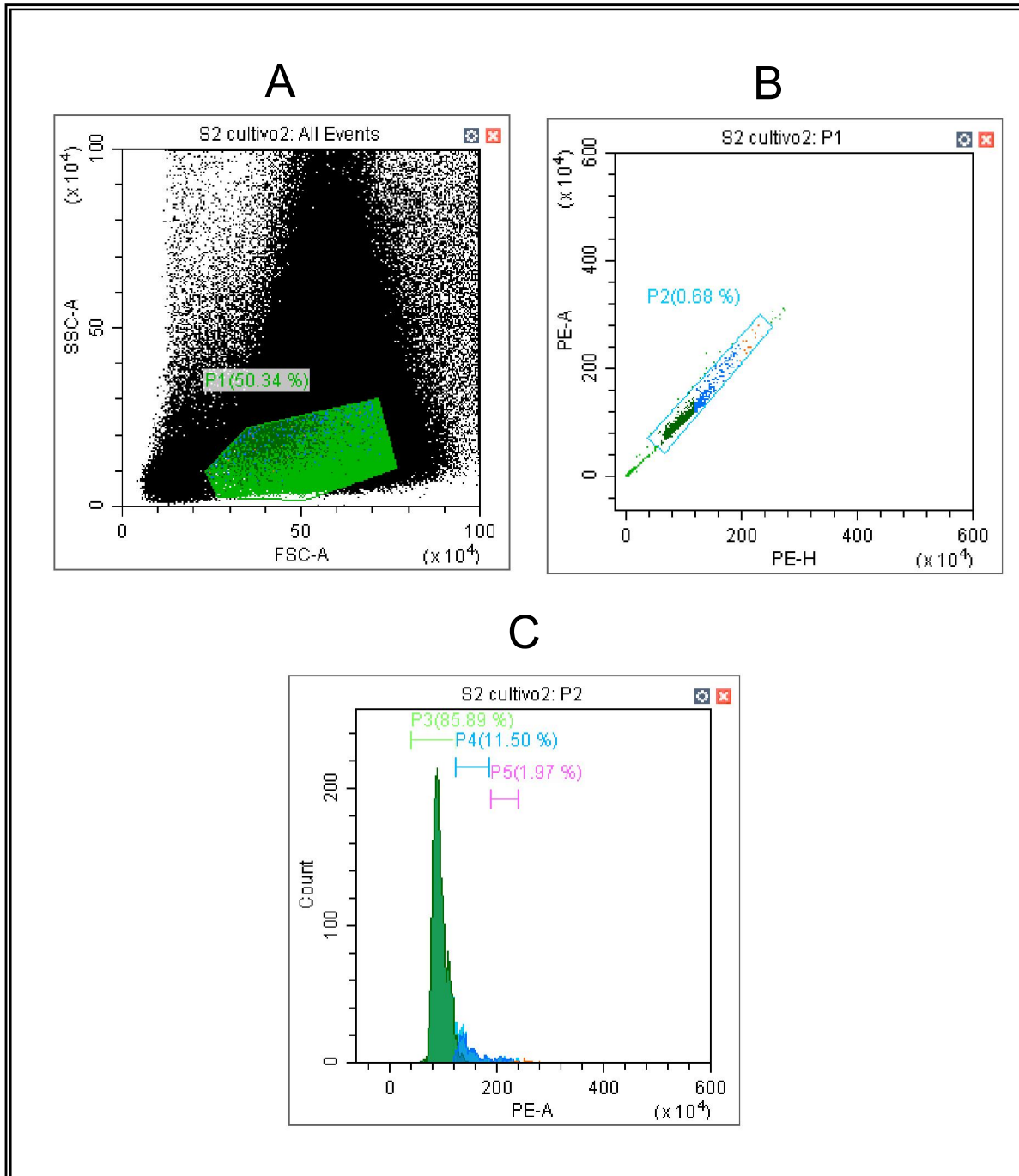


Figura 15.- Linfocitos sanos en proliferación. **A:** Selección de la ventana de linfocitos. **B:** Eliminación de dupletes. **C:** Se observan los linfocitos en todas las fases del ciclo celular.

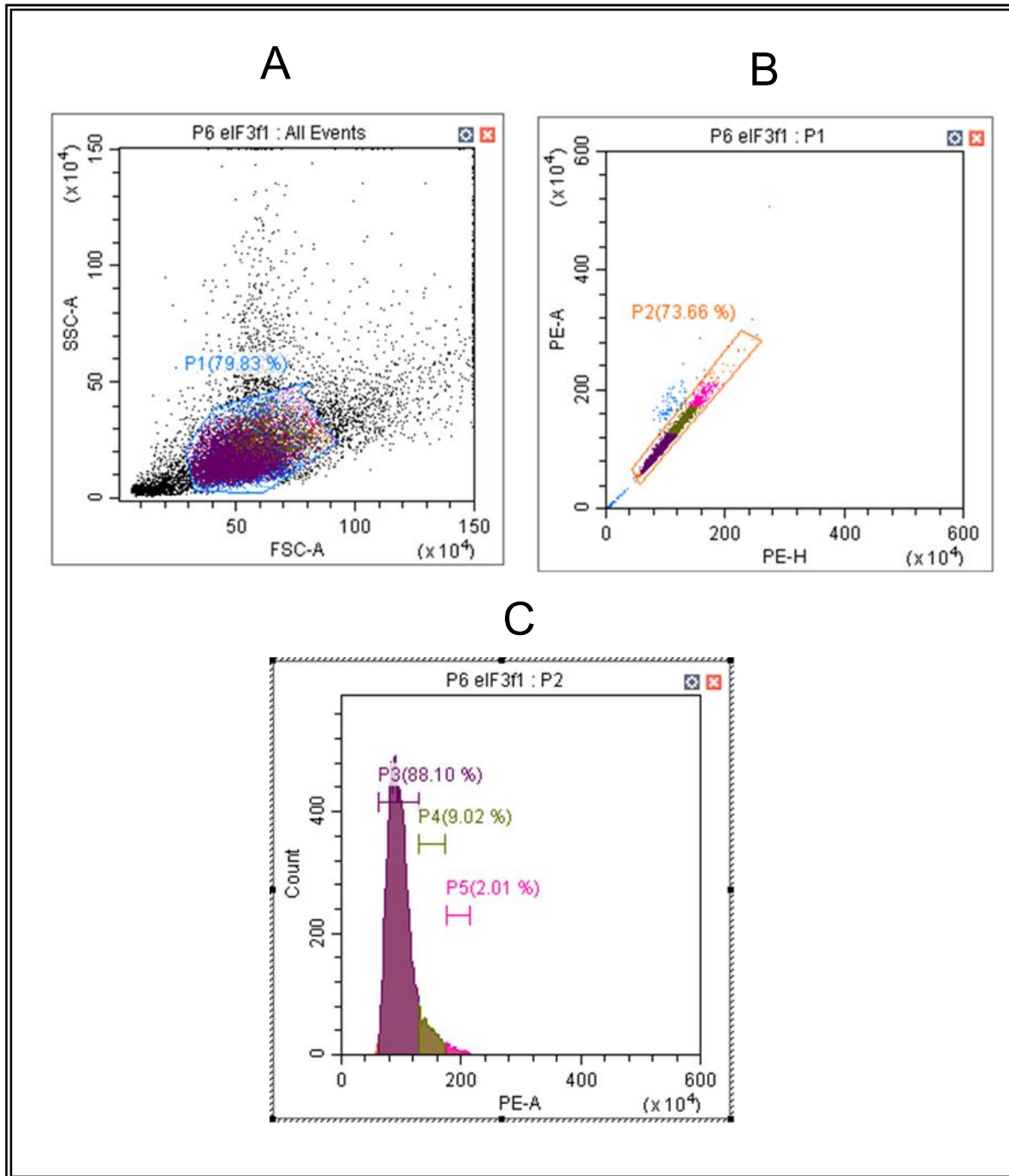


Figura 16.- Linfocitos de pacientes con LLA. **A:** Selección de la ventana de linfocitos. **B:** Eliminación de dupletes. **C:** Se observan los linfocitos en todas las fases del ciclo celular.

Esta investigación tuvo como objetivo determinar por Citometría de Flujo el patrón de expresión de la proteína eIF3f en linfocitos humanos. Para corroborar nuestro primer objetivo específico, que consistió en determinar el patrón de expresión de eIF3f de linfocitos sanos en estado de quiescencia y en proliferación, se realizó una comparación de las medias de la intensidad relativa de FICT (equivalente a la concentración relativa de eIF3f) que se obtuvieron a partir de las ventanas creadas en la opción B de las figuras 14 y 15; esto nos proporciona la intensidad relativa de eIF3f, sin diferenciar las fases del ciclo celular en la que se encuentran distribuidas las células.

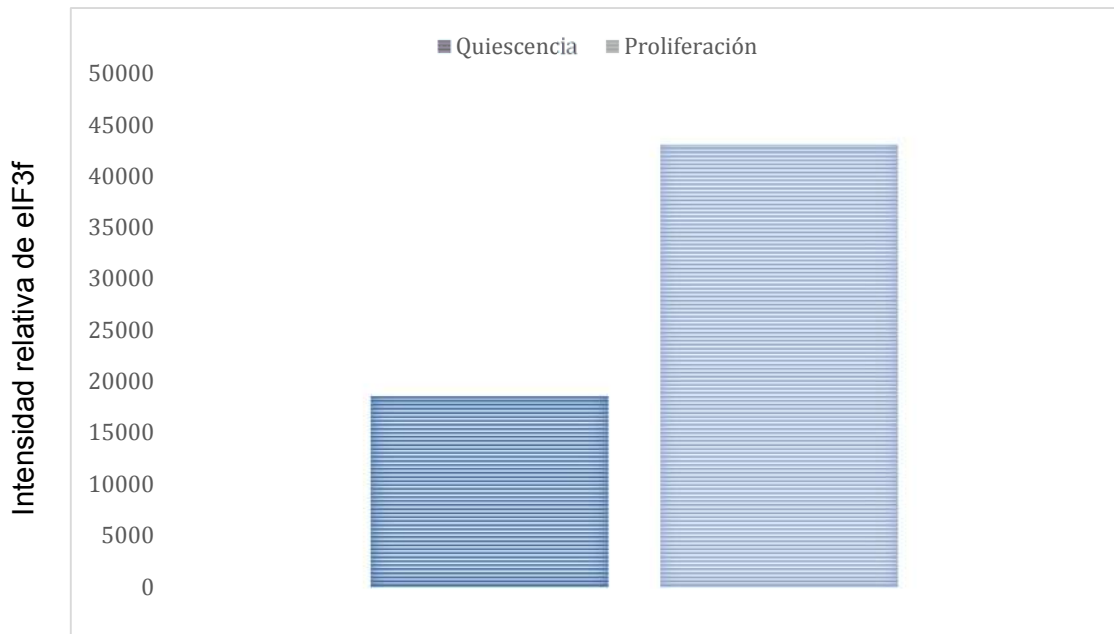


Figura 17.- Comparación de la expresión de eIF3f de linfocitos en quiescencia vs. linfocitos en proliferación. Se realizó una prueba t de Student de muestras apareadas. Se obtuvo una $p < 0.05$.

Estos resultados muestran que los linfocitos en estado de quiescencia expresan menos proteína de eIF3f que los linfocitos estimulados con un mitógeno, donde se pone en marcha el ciclo celular y, por lo consiguiente, se activa la maquinaria de traducción que proporcionará las proteínas necesarias para que se lleve a cabo la progresión del ciclo celular. El incremento en la expresión de eIF3f en los linfocitos en proliferación corrobora con lo reportado en la línea celular A549 en proliferación

vs. quiescencia (Higareda-Mendoza *et al.* 2010). Estos resultados contradicen lo publicado por Miyamoto y *colaboradores* (2005) quienes reportan que los niveles del mRNA y la proteína de las subunidades “f” y “j” del complejo eIF3 no se modifican en linfocitos T de cerdo al ser activados con un mitógeno y en comparación con los linfocitos en estado quiescente; sin embargo, también reportan que la presencia de estas subunidades en el complejo de eIF3 unido a los ribosomas sólo se aprecia en los linfocitos activados y es casi imperceptible en aquellos en estado quiescente. No tienen una explicación a su aparente contradicción, pero al revisar sus datos, es posible que estén subestimando la concentración de estas subunidades en la primera parte de sus resultados, principalmente por la diferencia en la especificidad de los anticuerpos utilizados.

Para cumplir con el segundo objetivo, se identificaron las fases del ciclo celular y su relación con la expresión del gen eIF3f en linfocitos de voluntarios sanos y de pacientes con LLA. En la figura 18 se observa la distribución de un conjunto de datos en las diferentes fases del ciclo celular de los linfocitos sanos en proliferación (linfocitos activados).

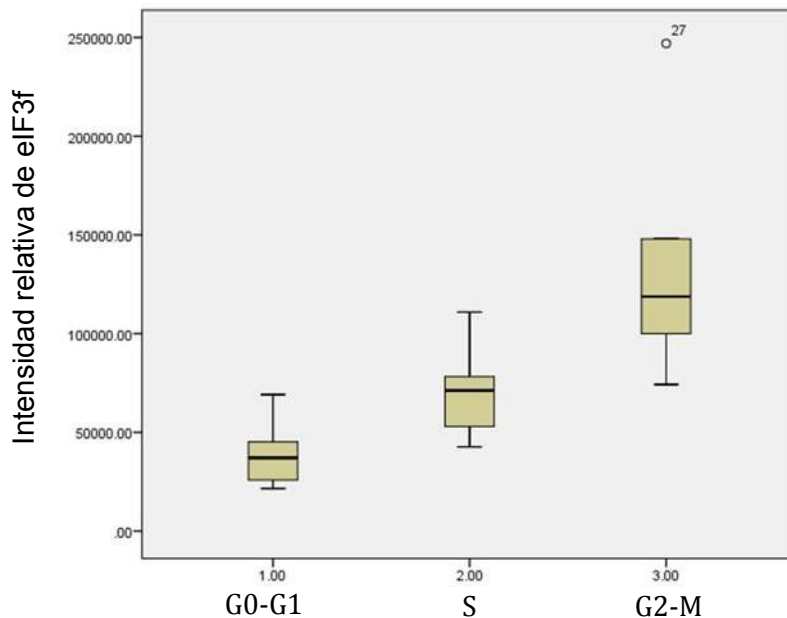


Figura 18.- Diagrama de caja de la intensidad relativa de eIF3f durante el ciclo celular de linfocitos sanos en proliferación.

Se realizó una comparación intergrupar de la intensidad relativa de eIF3f mediante un análisis ANOVA de una vía, obteniendo una diferencia significativa ($p < 0.05$); cada grupo corresponde a una fase del ciclo celular (G0 – G1, S y G2 – M). En la figura 19 se observan los cambios en las unidades de intensidad relativa de eIF3f durante las diferentes fases del ciclo celular.

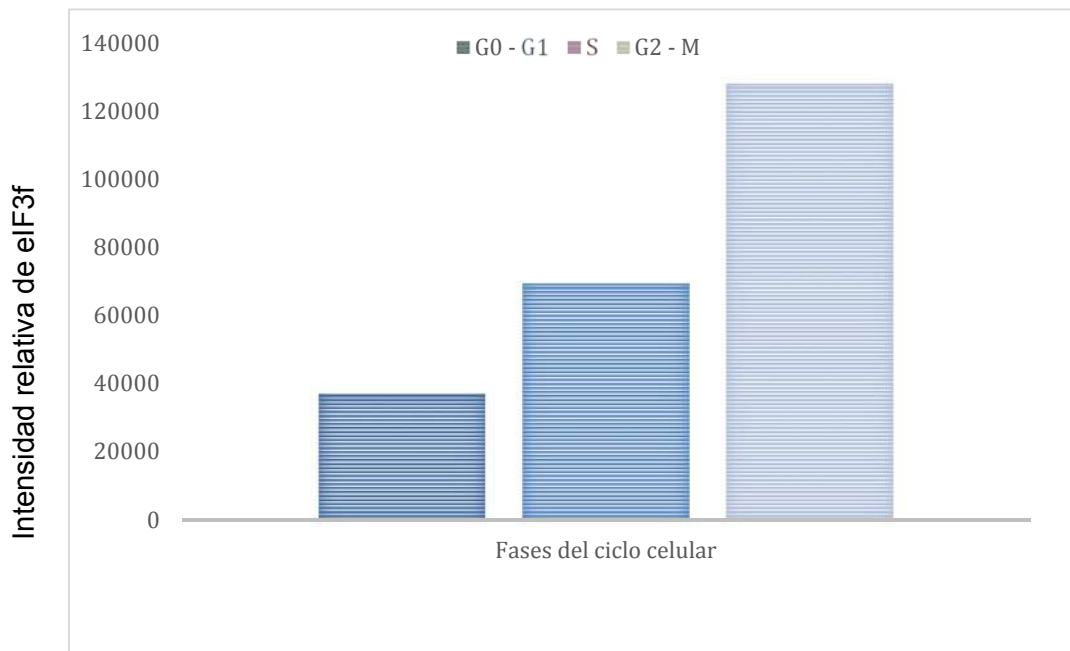


Figura 19.- Perfil de expresión de eIF3f en linfocitos sanos en proliferación. Se realizó una prueba de ANOVA, se obtuvo una $p < 0.05$.

En la figura 20 se muestra la distribución de datos que presentaron los linfocitos de pacientes con LLA; como se observa, existen rangos muy variables. En la figura 21 se observa que el perfil de expresión de los linfocitos de pacientes con LLA es muy similar al encontrado en los linfocitos sanos en proliferación; sin embargo, al realizar el análisis estadístico, no existe diferencia significativa entre las fases del ciclo celular, esto puede ser porque el número de pacientes no es lo suficientemente amplio.

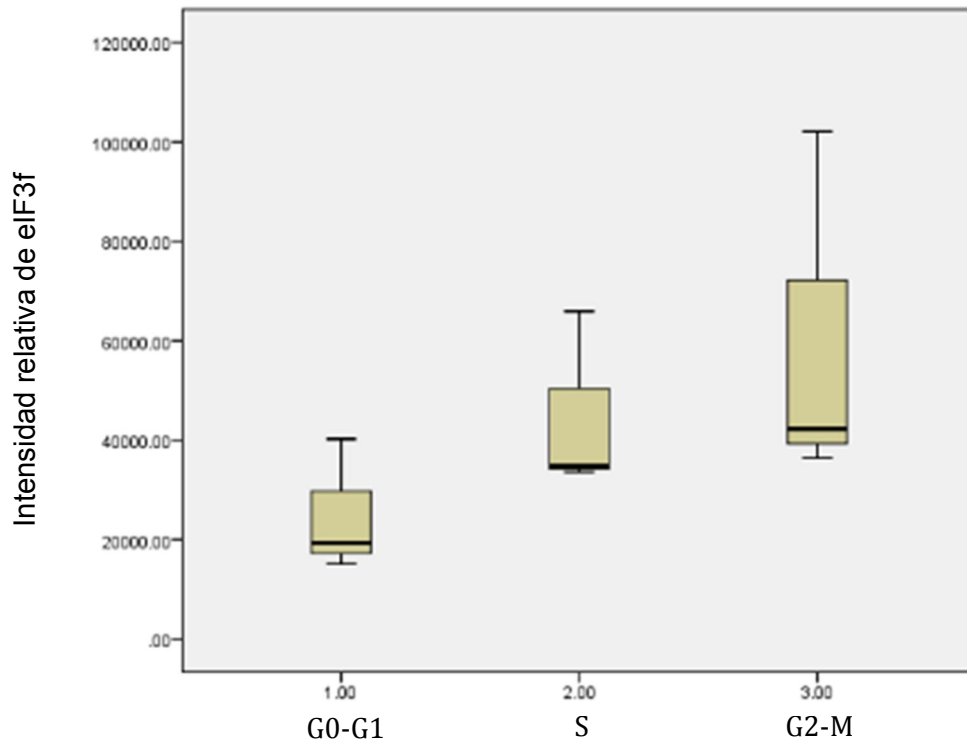


Figura 20.- Diagrama de caja de la intensidad relativa de eIF3f durante el ciclo celular de linfocitos de pacientes con LLA.

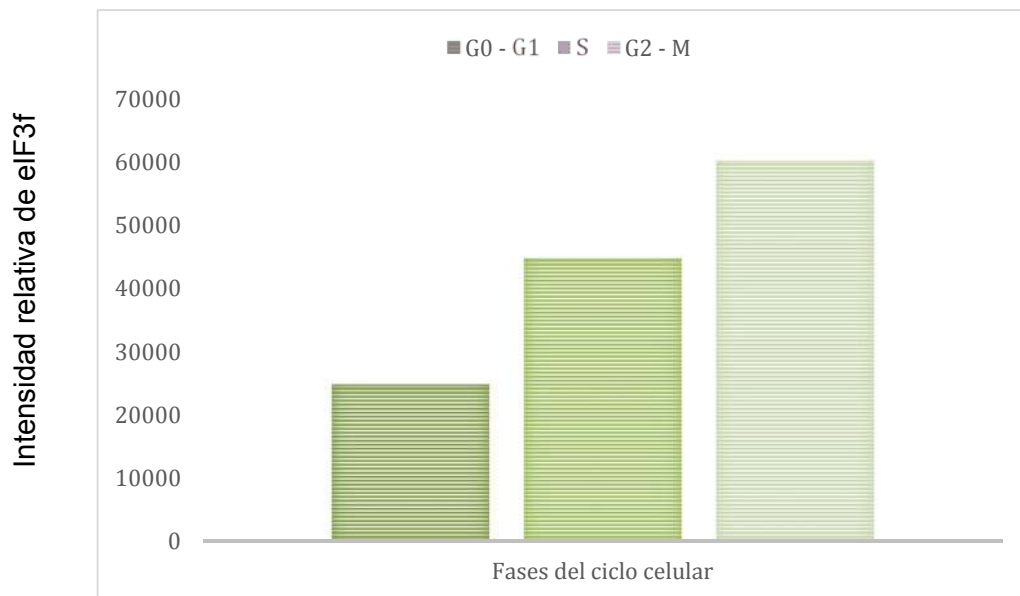


Figura 21.- Perfil de expresión de eIF3f en linfocitos de pacientes con LLA. Se realiza prueba ANOVA en donde se obtiene una $p > 0.05$.

El estudio de proteínas nucleares y de superficie en cantidades variables en las diferentes fases del ciclo celular puede permitir una mejor comprensión de los mecanismos que regulan la proliferación celular, proporcionando parámetros adicionales para describir el ciclo celular. La Citometría de Flujo nos permite una correlación directa de la expresión de la proteína y la distribución del DNA. Para comprender más el patrón de expresión de eIF3f se realizó una búsqueda en la literatura de proteínas cuantificadas en las diferentes fases del ciclo celular. Giordano y colaboradores (1991) realizaron un análisis mediante Citometría de Flujo sobre la proliferación celular asociada con una proteína nuclear denominada antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA, por sus siglas en inglés *proliferating cell nuclear antigen*), utilizaron linfocitos humanos obtenidos de sangre periférica en estado de quiescencia, linfocitos estimulados con un mitógeno (PHA) y linfocitos provenientes de aspirados de médula ósea de pacientes que no habían recibido tratamiento al momento de la toma de muestra y con diagnóstico de leucemia aguda no linfoblástica. Encontraron que el patrón de expresión de PCNA en linfocitos en proliferación y en linfocitos provenientes de pacientes con leucemia aguda presenta cantidades no significativas en la mayoría de las células durante las fases de G0/G1, existiendo un aumento en la inmunofluorescencia de PCNA en las células que se encuentran al final de la fase G1, con un incremento máximo durante la fase S y un posterior decremento en las fases G2 – M. Es importante recordar que la proteína PCNA es un cofactor de la DNA polimerasa y favorece a la síntesis de DNA; por lo tanto, su función se relaciona con el perfil de expresión de PCNA donde existe un aumento al final de la fase G1 teniendo un pico máximo en la fase S, que es la fase donde se lleva a cabo la síntesis de DNA. El perfil de expresión de PCNA difiere del encontrado en eIF3f, ya que en eIF3f se observa la menor cantidad de intensidad relativa de eIF3f durante la fase G0 – G1, un nivel intermedio en la fase S y su pico máximo de expresión en G2 – M; estos resultados son similares a los encontrados en estudios previos realizados por el grupo de trabajo, donde se ha observado a través de Western Blot que la expresión de eIF3f en varias líneas celulares oscila en las distintas fases del ciclo celular, presentando dos máximos de intensidad relativa de

eIF3f, el primero durante el inicio de la fase S y el segundo durante la transición G2 – M; en este último es donde se da la mayor expresión de eIF3f. Entonces, podemos proponer que los linfocitos humanos, sanos y cancerígenos, conservan el mismo perfil de expresión encontrado en las líneas celulares A549 (Higareda-Mendoza *et al.* 2010), Ramos y HepG2 (Carreón-Garcidueñas 2012).

Otra proteína ligada al ciclo celular es la ornitina descarboxilasa (ODC) ya que se han realizado diferentes observaciones; la primera es que presenta una actividad extremadamente baja en células en G0-G1 y que al ser estimuladas para dividirse existe un aumento en la actividad de la proteína; la segunda es que en células sincronizadas se observa un aumento significativo de expresión durante la fase G1, antes de la síntesis de DNA, y otra en la transición G2-M (Pyronnet *et al.* 2000, Key *et al.* 1980). Hasta el momento, eIF3f y ODC son las únicas proteínas en las que se ha reportado una expresión bifásica durante el ciclo celular a nivel traduccional.

La expresión diferencial (no constitutiva) de un gen durante el ciclo celular es un indicativo de los eventos a los que pudiera estar adscrito durante la división. En estudios realizados por el grupo de trabajo se ha demostrado la estrecha relación entre eIF3f y el ciclo celular; Gómez–Correa (2013) reportó que la actividad de eIF3f es modulada por el complejo CDK1/Ciclina B (por medio de una fosforilación) durante la transición G2-M. Pero su participación en la fase S del ciclo celular continua incierta. Jiménez-Alcántar (2014) reportó la participación de eIF3f en la vía de degradación por ubiquitina de la proteína p27, un importante inhibidor quinasa dependiente de ciclina para la transición G1-S.

Por lo anterior, eIF3f es considerada una proteína aún con muchas interrogantes por resolver acerca de su función o funciones. Por un lado, se sabe que es un gen conservado en eucariotes, esencial para la viabilidad celular, cuya expresión y, por ende, concentración, es dependiente de las distintas fases del ciclo celular. Sin embargo, algunos investigadores le adscriben una función de supresor de tumor,

pudiendo ser utilizado como marcador pronóstico ya que encontraron que la expresión del gen de eIF3f se encuentra disminuida en diferentes tipos de cáncer (Shi *et al.* 2006); que la disminución en la expresión de eIF3f se relaciona con el estadios de avance tumoral (Cheng *et al.* 2014, Li *et al.* 2014). Para corroborar si existe diferencia en la expresión de eIF3f entre los linfocitos sanos en proliferación vs. linfocitos de pacientes con LLA (figura 20), se realizó una comparación de las medias de la intensidad relativa de FICT (eIF3f) que se obtuvieron a partir de las ventanas creadas en la opción B de las figuras 15 y 16. Asimismo se realizó una comparación entre las muestras obtenidas de médula ósea de pacientes sin y con diagnóstico de LLA (Figura 22).

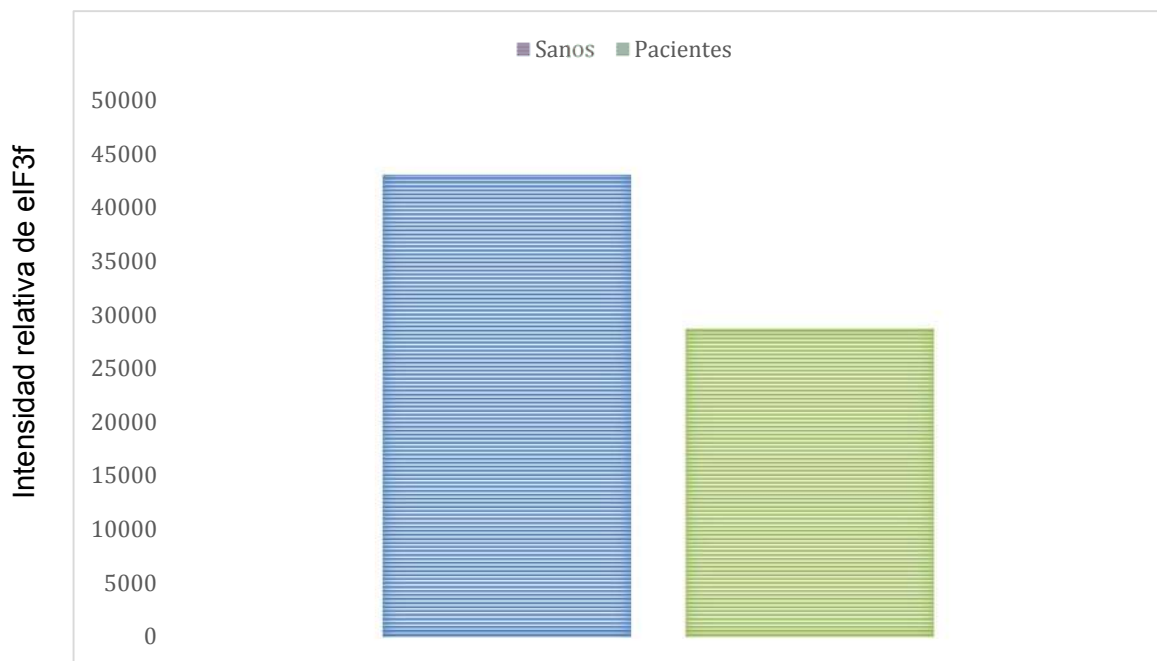


Figura 22.- Comparación de la expresión de eIF3f en linfocitos sanos en proliferación (activados) vs. linfocitos de pacientes con LLA. No se encontró una diferencia significativa entre los grupos.

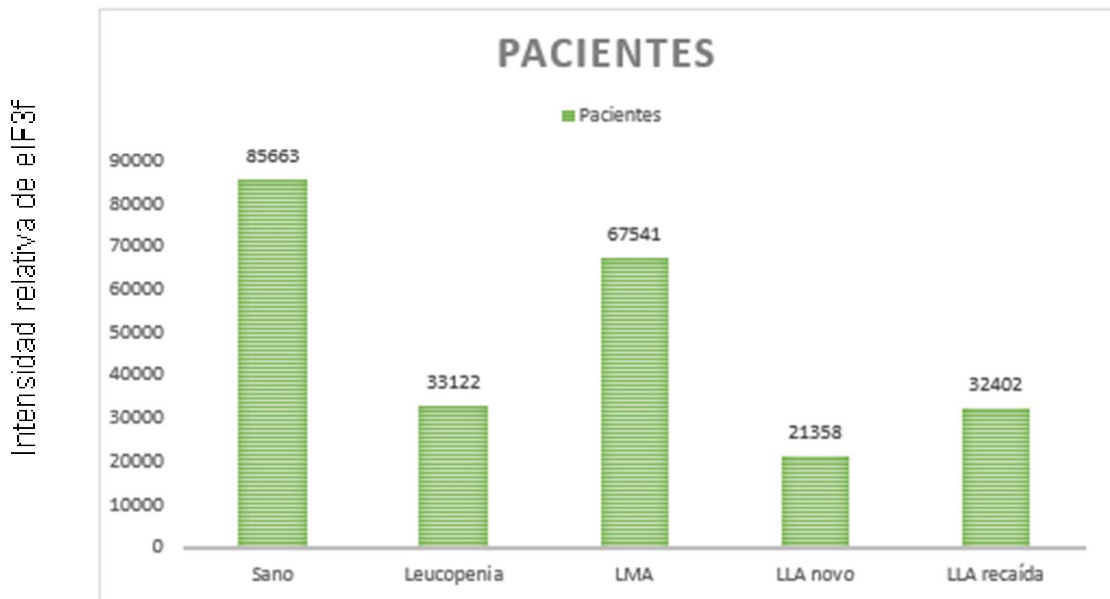


Figura 23.- Proteína total de eIF3f en las diferentes muestras de médula ósea de pacientes del Hospital Infantil de Morelia.

En ambos gráficos se observa una disminución en la expresión de eIF3f en los pacientes con LLA, comparados con linfocitos activados de voluntarios sanos y con la muestra de médula ósea de un paciente que resultó ser sano. Si la comparación se hace entre los linfocitos sin activar de los voluntarios sanos (Figura 17) y los de pacientes con LLA, entonces la relación es inversa; mostrando que es importante el estado proliferativo de la muestra, es decir, el origen de la muestra así como la distribución celular en las distintas fases del ciclo. Macleod (2000) propone que no sólo se debe considerar si un gen está encendido o apagado, o cuáles son los niveles de un regulador de crecimiento en particular, sino que es crítico el entendimiento de las señales producidas por las diferentes moléculas en las muchas vías reguladoras del crecimiento a las que pertenecen los supresores de tumor como lo son RB1 y p53, entre otros. Por los datos obtenidos en este trabajo y del grupo de trabajo, aún existen muchas interrogantes acerca del gen de eIF3f y su expresión antes de que se pueda considerar un supresor de tumor.

Para cumplir con los dos últimos objetivos (demostrar si existe pérdida alélica de eIF3f o de algún microsatélite cercano), se realizaron ampliificaciones por PCR utilizando los oligonucleótidos descritos en la sección de métodos. Con todos los pares de oligonucleótidos se realizaron las pruebas necesarias para la que los amplificados de DNA se mantuvieran en fase exponencial, y así evitar la saturación de los productos; se determinó que en todos los casos la amplificación debía ser de 30 ciclos como máximo. También se utilizaron dos concentraciones de templado para corroborar lo anterior. Primero se estandarizaron las condiciones del PCR utilizando DNA genómico de la línea celular A549; los amplicones esperados se muestran en la figura 24.

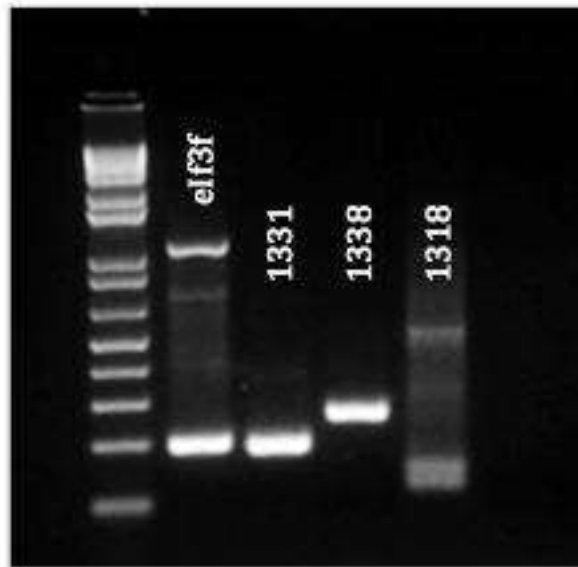


Figura 24.- Amplificación del gen eIF3f y los microsatélites 1331, 1338 y 1318 para DNA de la línea celular A549. Gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio que muestra el marcador de peso molecular en el primer carril y los amplicones de eIF3f, 1331, 1338 y 1318 en los carriles subsiguientes.

Se realizaron ampliificaciones con un gen control de actina, debido a que es considerado un gen constitutivo. En la figura 26 se observan los amplicones de actina obtenidos para algunas muestras de sanos y pacientes, utilizando 1000 ng (banda izquierda) y 500 ng (banda derecha) de templado.

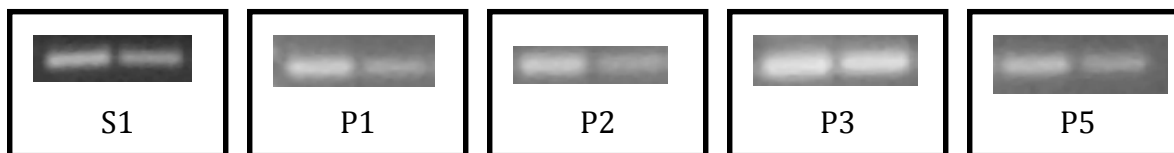


Figura 25.- Productos de amplificación del gen de actina para muestras de un sano (S) y 4 pacientes (P) del Hospital Infantil.

Posteriormente se realizó la amplificación del gen eIF3f y de los microsatélites 1331, 1338 y 1318 en las muestras obtenidas de voluntarios sanos y pacientes. En la figura 26 se muestran ejemplos de estas amplificaciones. Sólo hubo ausencia del microsatélite 1338 para un voluntario sano (S8); sin embargo, no se vio diferencia significativa en la expresión de eIF3f (detectada por Citometría de Flujo) con respecto a los otros voluntarios sanos, sugiriendo que este microsatélite no está involucrado en la pérdida alélica de eIF3f.

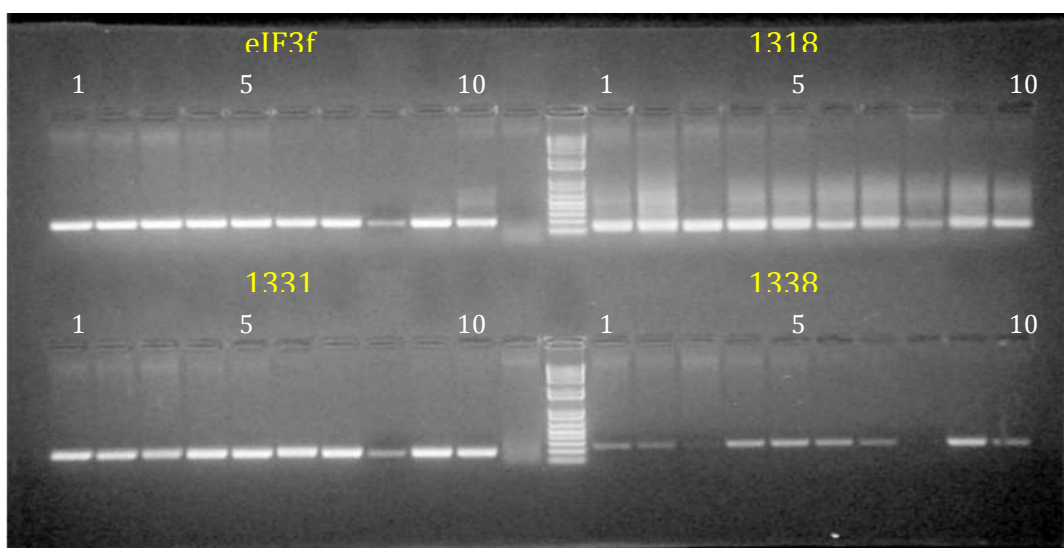


Figura 26.- Amplificación del gen eIF3f y los microsatélites 1331, 1338 y 1318 para DNA de voluntarios sanos. Gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio que muestra al centro de la figura el marcador de peso molecular y los amplicones de las muestras de estudio en el resto de los carriles.

Los resultados preliminares obtenidos por densitometría, en donde se consideró la intensidad neta de cada muestra se muestran en la Tabla 8.

Tabla 8.- Intensidad neta de los amplicones para el gen eIF3f y los microsatélites 1331, 1338 y 1318 en muestras de voluntarios sanos.

	eIF3f	1318	1331	1338
S1	61559.03	35855.06	59459.68	7216.04
S2	65025.51	45930.61	52105.82	8498.00
S3	59913.00	60670.78	53176.29	1595.78
S4	52278.53	66590.51	64627.29	26890.51
S5	57800.06	50399.85	71848.23	28114.86
S6	56109.00	32330.79	71905.16	20235.87
S7	63211.16	44947.32	78169.20	11405.54
S8	15158.96	15859.97	14857.87	-3094.27
S9	65612.49	45184.68	72685.88	42657.71
S10	51720.11	52606.61	65031.88	13288.16

En la Tabla 9 se muestra un ejemplo que se utilizó para observar si existe pérdida alélica en muestras de sanos y pacientes. Se utilizaron 500 ng de DNA templado y se amplificaron los genes de actina y eIF3f. Se normalizaron los productos de eIF3f con el amplicón de actina, en donde 1 corresponde a que no existe pérdida alélica y 0.5 corresponde a que existe pérdida alélica.

Tabla 9.- Simulación de un modelo para observar si existe pérdida alélica.

	Actina	eIF3f	*
S1	19660	16772	0.85
S4	4099	5522	1.35
P1	8805	1065	0.12
P2	7827	8307	1.06
P3	15075	16341	1.08
P4	6408	8979	1.40
P5	6701	6486	0.97
P6	5034	16613	3.30
*eIF3f normalizado con actina.			

Con los resultados obtenidos se observó una gran variabilidad en la intensidad neta de cada producto, lo cual complica el realizar un análisis adecuado. Newton et al. 1998, reporta que a medida que el genoma se mapea con una alta densidad de marcadores de microsatélites, existe un amplio espectro de pérdidas genéticas,

ganancias y otros cambios en las células cancerosas. Pero un problema básico, que es en gran medida estadístico, es distinguir los cambios esporádicos de aquellos que no son esporádicos y que de verdad tengan significan biológica. Esta variabilidad encontrada en nuestros datos, también se encontró en lo reportado por Doldan et al. 2008; por lo tanto, lo consideramos como un método poco preciso para la evaluación de pérdida alélica, haciendo imprescindible el uso de PCR tiempo real u otro método menos subjetivo.

10. CONCLUSIONES

- ❖ No existe diferencia en el patrón de expresión del gen eIF3f durante el ciclo celular, entre linfocitos en proliferación no cancerígenos y cancerígenos.
- ❖ La expresión de eIF3f oscila durante el ciclo celular, con expresión máxima en la fase G2-M, intermedia en S y mínima en G0-G1, lo que nos permite proponer que el perfil de expresión de eIF3f está conservado entre linfocitos sanos en proliferación y linfocitos cancerígenos.
- ❖ La expresión de eIF3f se encuentra incrementada en linfocitos sanos en proliferación (cultivo estimulado con mitógeno) en comparación con los linfocitos en quiescencia.

11. PERSPECTIVAS

- ❖ Agregar un marcador que nos permita diferenciar a las células que se encuentran en la fase G2; y así poder corroborar el descenso que ocurre en esta mediante Citometría de Flujo.
- ❖ Aumentar el número de pacientes con LLA que nos permita comprobar que existe una diferencia estadísticamente significativa durante las diferentes fases del ciclo celular; así como también ver si la disminución de la expresión de eIF3f puede considerarse como valor pronóstico.

12. REFERENCIAS

1. Aitken, C. E., & Lorsch, J. R. (2012). A mechanistic overview of translation initiation in eukaryotes. *Nature structural & molecular biology*, 19(6), 568-576.
2. Adler, B. J., Kaushansky, K., & Rubin, C. T. (2014). Obesity-driven disruption of haematopoiesis and the bone marrow niche. *Nature Reviews Endocrinology*, 10(12), 737-748.
3. Belson, M., Kingsley, B., & Holmes, A. (2007). Risk factors for acute leukemia in children: a review. *Environmental health perspectives*, 115(1), 138.
4. Carreón Garcidueñas, M. G., (2012). Perfil de expresión del gen eIF3f en las líneas celulares humanas HepG2 y Ramos. Trabajo para optar por el título de Maestro en Ciencias de la Salud. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas "Dr. Ignacio Chávez".
1. Cheng, Y., Jia, C., Li, G., & Li, H. (2014). Expression of eukaryotic initiation factor 3f is associated with prognosis in gastric carcinomas. *Oncology research and treatment*, 37(4), 198-202.
2. Chu, Y. L., Wu, X., Xu, Y., & Her, C. (2013). MutS homologue hMSH4: interaction with eIF3f and a role in NHEJ-mediated DSB repair. *Molecular cancer*, 12(1), 1.
3. Csibi, A., Cornille, K., Leibovitch, M. P., Poupon, A., Tintignac, L. A., Sanchez, A. M., & Leibovitch, S. A. (2010). The translation regulatory subunit eIF3f controls the kinase-dependent mTOR signaling required for muscle differentiation and hypertrophy in mouse. *PLoS One*, 5(2), e8994.

4. Doldan, A., Chandramouli, A., Shanas, R., Bhattacharyya, A., Leong, S. P., Nelson, M. A., & Shi, J. (2008). Loss of the eukaryotic initiation factor 3f in melanoma. *Molecular carcinogenesis*, 47(10), 806-813.
5. Doldan, A., Chandramouli, A., Shanas, R., Bhattacharyya, A., Cunningham, J. T., Nelson, M. A., & Shi, J. (2008). Loss of the eukaryotic initiation factor 3f in pancreatic cancer. *Molecular carcinogenesis*, 47(3), 235-244.
6. Dong, Z., & Zhang, J. T. (2006). Initiation factor eIF3 and regulation of mRNA translation, cell growth, and cancer. *Critical reviews in oncology/hematology*, 59(3), 169-180.
7. Eswaran, J., Sinclair, P., Heidenreich, O., Irving, J., Russell, L. J., Hall, A., ... & Vormoor, J. (2015). The pre-B-cell receptor checkpoint in acute lymphoblastic leukaemia. *Leukemia*, 29(8), 1623-1631.
8. Giordano, M., Danova, M., Pellicciari, C., Wilson, G. D., Mazzini, G., Conti, A. M. F., ... & Romanini, M. G. M. (1991). Proliferating cell nuclear antigen (PCNA)/cyclin expression during the cell cycle in normal and leukemic cells. *Leukemia research*, 15(11), 965-974.
9. Gómez-Correa, C. A., (2013). Análisis de fosforilación en eIF3f humano por CDK1/Ciclina B. Trabajo para optar por el título de Maestro en Ciencias de la Salud. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas "Dr. Ignacio Chávez".
10. Gutiérrez-Fernández, M. J., Higareda-Mendoza, A. E., Gómez-Correa, C. A., & Pardo-Galván, M. A. (2015). The eukaryotic translation initiation factor 3f (eIF3f) interacts physically with the alpha 1B-adrenergic receptor and stimulates adrenoceptor activity. *BMC biochemistry*, 16(1), 25.

11. Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *cell*, 144(5), 646-674.
12. Harvey, S., Zhang, Y., Landry, F., Miller, C., & Smith, J. W. (2001). Insights into a plasma membrane signature. *Physiological genomics*, 5(3), 129-136.
13. Hernández, G., Osnaya, V. G., García, A., & Velasco, M. X. (2016). On the Origin and Early Evolution of Translation in Eukaryotes. In *Evolution of the Protein Synthesis Machinery and Its Regulation* (pp. 81-107). Springer International Publishing.
14. Herráez, Á., & Sánchez, Á. H. (2012). *Biología Molecular e ingeniería genética*. Elsevier Health Sciences.
15. Hershey, J. W. (2014). The role of eIF3 and its individual subunits in cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms*, 1849(7), 792-800.
16. Higareda-Mendoza, A. E., & Pardo-Galván, M. A. (2010). Expression of human eukaryotic initiation factor 3f oscillates with cell cycle in A549 cells and is essential for cell viability. *Cell division*, 5(1), 1.
17. Hydbring, P., Malumbres, M., & Sicinski, P. (2016). Non-canonical functions of cell cycle cyclins and cyclin-dependent kinases. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 17, 280–292.
18. Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI). (2014). Recuperada de: <http://www.inegi.org.mx/inegi/contenidos/espanol/prensa/default.asp?c=269&e=>

19. Jackson, R. J., Hellen, C. U., & Pestova, T. V. (2010). The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. *Nature reviews Molecular cell biology*, 11(2), 113-127.
20. Jiménez-Alcántar, P. (2014). Identificación de la vía de transducción de señales modulada por la interacción eIF3f/Receptor adrenérgico- α 1B en células humanas. Trabajo para optar por el título de Maestro en Ciencias de la Salud. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas "Dr. Ignacio Chávez".
21. Kastan, M. B., & Bartek, J. (2004). Cell-cycle checkpoints and cancer. *Nature*, 432(7015), 316-323.
22. Kay, D. G., Singer, R. A., & Johnston, G. C. (1980). Ornithine decarboxylase activity and cell cycle regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of bacteriology*, 141(3), 1041-1046.
23. Lagirand-Cantaloube, J., Offner, N., Csibi, A., Leibovitch, M. P., Batonnet-Pichon, S., Tintignac, L. A., ... & Leibovitch, S. A. (2008). The initiation factor eIF3-f is a major target for Atrogin1/MAFbx function in skeletal muscle atrophy. *The EMBO journal*, 27(8), 1266-1276.
24. Labardini, J. R., Cervera E., López, O. G., Corrales C., Balbuena M., Barbosa A. A.,...Córtes-Franco J. (2011). Oncoguía: leucemia linfoblástica aguda. *Cancerología*, 6, 111-115.
25. Li, G., Wang, N., Sun, C., & Li, B. (2014). Decreased expression of eukaryotic initiation factor 3f is an adverse prognostic factor for stage I–III gastric cancer. *World journal of surgical oncology*, 12(1), 1.

26. Lim, K. H., Song, M. H., & Baek, K. H. (2016). Decision for cell fate: deubiquitinating enzymes in cell cycle checkpoint. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 73(7), 1439-1455.
27. Longo, D. L. (2010). Neoplasias malignas de las células linfoides. En D. L. Longo. (Ed.), Harrison: *Hematología y oncología* (pp. 182 – 204). EUA: Mc Graw Hill.
28. Macleod, K. (2000). Tumor suppressor genes. *Current opinion in genetics & development*, 10(1), 81-93.
29. Marchione, R., Leibovitch, S. A., & Lenormand, J. L. (2013). The translational factor eIF3f: the ambivalent eIF3 subunit. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 70(19), 3603-3616.
30. Mateyak, M., Sasikumar, A. N., Dunaway, S., & Kinzy, T. G. (2016). The Unique Evolutionary Distribution of Eukaryotic Elongation Factor 3. In *Evolution of the Protein Synthesis Machinery and Its Regulation* (pp. 313-326). Springer International Publishing.
31. Miyamoto, S., Patel, P., & Hershey, J. W. (2005). Changes in ribosomal binding activity of eIF3 correlate with increased translation rates during activation of T lymphocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 280(31), 28251-28264.
32. Moretti, J., Chastagner, P., Gastaldello, S., Heuss, S. F., Dirac, A. M., Bernards, R., ... & Brou, C. (2010). The translation initiation factor 3f (eIF3f) exhibits a deubiquitinase activity regulating Notch activation. *PLoS Biol*, 8(11), e1000545.

33. National Cancer Institute. (s.f.). Recuperado de: <https://www.cancer.gov/types/leukemia/hp/child-all-treatment-pdq>
34. Neganova, I., & Lako, M. (2008). G1 to S phase cell cycle transition in somatic and embryonic stem cells. *Journal of anatomy*, 213(1), 30-44.
35. Pieper, K., Grimbacher, B., & Eibel, H. (2013). B-cell biology and development. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 131(4), 959-971.
36. Poon, R. Y. (2016). Cell Cycle Control: A System of Interlinking Oscillators. *Cell Cycle Oscillators: Methods and Protocols*, 3-19.
37. Pyronnet, S., Pradayrol, L., & Sonenberg, N. (2000). A cell cycle-dependent internal ribosome entry site. *Molecular cell*, 5(4), 607-616.
38. Querol-Audi, J., Sun, C., Vogan, J. M., Smith, M. D., Gu, Y., Cate, J. H., & Nogales, E. (2013). Architecture of human translation initiation factor 3. *Structure*, 21(6), 920-928.
39. Rhind, N., & Russell, P. (2012). Signaling pathways that regulate cell division. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 4(10), a005942.
40. Rosenwald, I. B. (2004). The role of translation in neoplastic transformation from a pathologist's point of view. *Oncogene*, 23(18), 3230-3247.
41. Sanches, M., Alves, B. S., Zanchin, N. I., & Guimarães, B. G. (2007). The crystal structure of the human Mov34 MPN domain reveals a metal-free dimer. *Journal of molecular biology*, 370(5), 846-855.


42. Secretaría de Salud. (2008). Diagnóstico temprano y oportuno de la leucemia aguda en la infancia y en la adolescencia en el primer nivel de atención. México.
43. Secretaría de Salud. (2009). Diagnóstico de Leucemia Linfoblástica Aguda. México.
44. Secretaría de Salud. (2011). SINAVE/DGE/SALUD/Perfil epidemiológico de cáncer en niños y adolescentes en México. México.
45. Shi, J., Kahle, A., Hershey, J. W. B., Honchak, B. M., Warneke, J. A., Leong, S. P. L., & Nelson, M. A. (2006). Decreased expression of eukaryotic initiation factor 3f deregulates translation and apoptosis in tumor cells. *Oncogene*, 25(35), 4923-4936.
46. Siefert, J. C., Clowdus, E. A., & Sansam, C. L. (2015). Cell cycle control in the early embryonic development of aquatic animal species. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 178, 8-15.
47. Simonetti, A., Querido, J. B., Myasnikov, A. G., Mancera-Martinez, E., Renaud, A., Kuhn, L., & Hashem, Y. (2016). eIF3 Peripheral Subunits Rearrangement after mRNA Binding and Start-Codon Recognition. *Molecular cell*, 63(2), 206-217.
48. Sonenberg, N., & Hinnebusch, A. G. (2009). Regulation of translation initiation in eukaryotes: mechanisms and biological targets. *Cell*, 136(4), 731-745.
49. Spoerri, L., Oo, Z. Y., Larsen, J. E., Haass, N. K., Gabrielli, B., & Pavey, S. (2015). Cell Cycle Checkpoint and DNA Damage Response Defects as

Anticancer Targets: From Molecular Mechanisms to Therapeutic Opportunities.
In *Stress Response Pathways in Cancer* (pp. 29-49). Springer Netherlands.

50. Otto, T., & Sicinski, P. (2017). Cell cycle proteins as promising targets in cancer therapy. *Nature Reviews Cancer*, 17(2), 93-115.
51. Valente, S. T., Gilmartin, G. M., Mott, C., Falkard, B., & Goff, S. P. (2009). Inhibition of HIV-1 replication by eIF3f. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(11), 4071-4078.
52. Ward, E., DeSantis, C., Robbins, A., Kohler, B., & Jemal, A. (2014). Childhood and adolescent cancer statistics, 2014. *CA: a cancer journal for clinicians*, 64(2), 83-103.
53. Wild, P., & Matos, J. (2016). Cell cycle control of DNA joint molecule resolution. *Current opinion in cell biology*, 40, 74-80.

III. ANEXOS

ANEXO 1. Carta de aprobación por parte del comité de investigación y ética en investigación de la Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas "Dr. Ignacio Chávez".



Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas
"Dr. Ignacio Chávez"

SECRETARÍA ACADÉMICA
A S U N T O: INFORMACIÓN
Morelia, Mich., 30 de Junio de 2016.

C. ALICIA ARELI BAUTISTA TEJEDA
ALUMNA PROGRAMA DE POSGRADO DE MAESTRÍA
EN CIENCIAS DE LA SALUD DE LA FACULTAD
DE CIENCIAS MÉDICAS Y BIOLÓGICAS
"DR. IGNACIO CHÁVEZ"
P R E S E N T E


Le notifico que el protocolo de investigación que Usted presentó ante esta Secretaría Académica a mi cargo, y cuyo título es "*Perfiles de Expresión del Gen eIF3f en Pacientes de Novo con Leucemia Linfoblástica Aguda y su Asociación con el índice de Proliferación de Blastos*" y que fue sometido a la evaluación del Comité de Investigación y Ética en Investigación de esta Dependencia Universitaria, quien (es) de acuerdo con las recomendaciones de sus integrantes y de los revisores consideraron que cumple con la calidad metodológica y los requerimientos de ética y de investigación vigentes, por lo que el protocolo fue **AUTORIZADO**, habiéndose asignado el número de registro de la dependencia siguiente:

COMITÉ DE INVESTIGACIÓN Y ETICA EN INVESTIGACIÓN	ÁREA	Nº DE REGISTRO
FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS Y BIOLÓGICAS "DR. IGNACIO CHÁVEZ"	POSGRADO	004/P/6/2016

Se le solicita informar del grado de avance del mismo acorde al cronograma de actividades así como el título de la revista, volumen, año y páginas una vez que el mismo sea publicado. Como el presente protocolo contempla la graduación de un alumno indicar fecha y grado académico obtenido.

Atentamente:



DR. ARTURO VALENCIA ORTIZ
SECRETARIO ACADÉMICO



FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS Y BIOLÓGICAS
"DR. IGNACIO CHÁVEZ"
SECRETARÍA ACADÉMICA

c.c.p. Coordinador de la Investigación Científica. UMSNH
c.c.p. Archivo y Correspondencia de la Facultad.
c.c.p. Archivo de la Secretaría Académica.
c.c.p. Jefatura de Investigación Fac Cs Med y Biol "Dr. Ignacio Chávez"
DR. AVO/sgg*

ANEXO 2. Aprobación de Protocolo de investigación por parte del Hospital Infantil "Eva Sámano de López Mateos".



Secretaría de Salud
Gobierno del Estado de Michoacán

Hospital Infantil de Morelia
"Eva Sámano de López Mateos"
ENSEÑANZA E INVESTIGACION

ASUNTO: Aprobación de Protocolo de Investigación

Morelia, Mich., a 09 de Mayo del 2016.

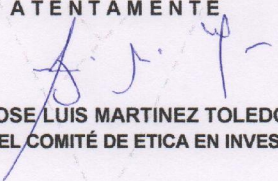
C. QFB. ALICIA ARELI BAUTISTA TEJEDA
PRESENTE.-

Por medio del presente informo a usted que su Proyecto de Investigación titulado **"PERFILES DE EXPRESION DEL GEN eIF3f EN PACIENTES DE NOVO CON LEUCEMIA LINFOBLASTICA AGUDA Y SU ASOCIACION CON EL INDICE DE PROLIFERACION DE BLASTOS"** ha sido *Aprobado* por el comité de Ética en Investigación de este *Hospital Infantil "Eva Sámano de López Mateos"*.


El número de registro asignado al protocolo es: HIM/OH/01/2016. Se le recuerda que deberá enviar a este comité informes de avances e informe final de este proyecto de Investigación, con el cual obtendrá el grado de maestría, teniendo como investigadores al Dr. Misael Herrejón Carmona y a la D.C.B. Ana Edith Higuareda Mendoza.

Sin otro particular, reciba un cordial saludo.

ATENTAMENTE




DR. JOSE LUIS MARTINEZ TOLEDO
PRESIDENTE DEL COMITÉ DE ETICA EN INVESTIGACION



JEFATURA DE ENSEÑANZA
E INVESTIGACIÓN

Cc.p. Archivo.-
mpr*



MICHOACÁN
— Está en ti —

Int. Bosque Cuauhtémoc S/N Col. Centro
58000, Morelia, Michoacán
Tel. (443) 312-25-20 / 302-25-21
hospitalinfantilmorelia@yahoo.com.mx
www.michoacan.gob.mx

ANEXO 3. Carta de consentimiento informado (para pacientes del hospital infantil).

HOSPITAL INFANTIL DE MORELIA “EVA SÁMANO DE LÓPEZ MATEOS”
CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPACIÓN
VOLUNTARIA EN PROTOCOLOS DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA

Morelia, Mich., a _____ del mes de _____ del año _____.

Autorizo que mi hijo (a) _____ a participar en el protocolo de investigación titulado:

PERFILES DE EXPRESIÓN DEL GEN eIF3f EN LINFOCITOS HUMANOS

Estoy enterado que se obtendrán las muestras de los mismos procedimientos diagnósticos y tratamiento habituales, no generará costos adicionales al seguimiento normal. Esto permitirá ampliar los conocimientos respecto a las diversas alteraciones que se pueden presentar en patologías oncológicas. Teniendo en cuenta los siguientes riesgos relacionados a la aspiración de médula ósea y/ó a la toma de sangre de muestra periférica: como infección, hemorragia y dolor en el sitio de punción. Así mismo, se me ha explicado que la participación en este estudio no pone en riesgo la salud de mi hijo, ni condiciona la atención dentro del Hospital.

Se me ha informado que puedo retirar a mi hijo del protocolo en cualquier momento que considere conveniente sin que ello afecte la atención recibida en el Hospital.

Firmo la presente carta de consentimiento bajo la información voluntaria y estando enterado ampliamente de los beneficios y riesgos del acto autorizado.

Nombre y firma del familiar o tutor legalmente responsable

Nombre y firma del testigo

Nombre y firma del testigo

Nombre y firma de investigador responsable
Dr. Misael Herrejón Carmona

ANEXO 4. Carta de consentimiento informado para los voluntarios del proyecto

FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS Y BIOLÓGICAS “DR. IGNACIO CHÁVEZ”
CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPACIÓN
VOLUNTARIA EN PROTOCOLOS DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA

Morelia, Mich., a _____ del mes de _____ del año _____.

Yo _____ acepto participar en el protocolo de investigación titulado:

PERFILES DE EXPRESIÓN DEL GEN eIF3f EN LINFOCITOS HUMANOS

Estoy enterado que se obtendrán las muestras de los mismos procedimientos diagnósticos y tratamiento habituales, no generará costos adicionales al seguimiento normal. Esto permitirá ampliar los conocimientos respecto a las diversas alteraciones que pudieran estar alteradas en patologías oncológicas. Teniendo en cuenta los siguientes riesgos relacionados a la toma de sangre de muestra periférica: como infección, hemorragia y dolor en el sitio de punción.

Firmo la presente carta de consentimiento bajo la información voluntaria y estando enterado ampliamente de los beneficios y riesgos del acto autorizado.

Nombre y firma del voluntario

Nombre y firma del testigo

Nombre y firma del testigo

ANEXO 5. Formato de recopilación de datos

Nombre:

Fecha:

	Datos del paciente
Edad	
Leucocitos	
Inmunofenotipo	
Clasificación morfológica	
Translocación cromosómica	

Conteo leucocitario:

Leucocitos		Totales/Porcentaje	Valores Absolutos
Neutrófilo Banda Segmentados			
Linfocitos			
Basófilo			
Eosinófilo			
Monocitos			
Totales			

Citometría de flujo

Fase del ciclo celular	Porcentaje de células	Cantidad absoluta de células	Intensidad expresión de eIF3f (Unidad de intensidad relativa)
Fase G0/G1			
Fase S			
Fase G2/M			

--	--	--	--

Reacción en cadena de polimerasa

Microsatélite	Presencia/Cuantificación	
	Si/Intensidad neta	No
D11S1318		
D11S1338		
D11S1331		

	Presencia	
	Si/intensidad neta	No
eIF3f		