



**UNIVERSIDAD MICHUACANA
DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO**

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

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

**“CAMBIOS EN LA CONCENTRACIÓN DEL COLESTEROL
EN CÉLULAS HUMANAS TUMORALES A549 y HepG2
DURANTE LA DESREGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE
eIF3f”**

**TESIS
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS DE LA SALUD**

**PRESENTA
BIOL. DULCE ALONDRA BOLAÑOS CORNEJO**

**DIRECTORA DE TESIS
D. en C. ANA EDITH HIGAREDA MENDOZA**

Morelia, Mich., julio del 2011.

RECONOCIMIENTOS

El desarrollo del presente trabajo se realizó bajo la dirección la D. en C. Ana Edith Higareda Mendoza en el Laboratorio de Biología Celular Humana de la Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas “Dr. Ignacio Chávez”, el Laboratorio de Biología Molecular y el Laboratorio de Bioquímica Ecológica del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, con el apoyo del D.en C. Marco Aurelio Pardo Galván y la D. en C. Lourdes I. Macías Rodríguez, respectivamente; gracias al apoyo otorgado al proyecto 08-02/133 en el marco de la Convocatoria COECyT-FIFOECyT 2008 “Investigación para generar conocimiento” y al proyecto de investigación 16.3 por la Coordinación de la Investigación Científica de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

Además, hago el reconocimiento de manera muy atenta a mis sinodales el M. en C. Juan Carlos Cortés García, la D. en C. Ma. Soledad Vázquez Garcidueñas y a la D. en C. Virginia A. Robinson Fuentes por las revisiones y aportaciones realizadas a éste trabajo.

AGRADECIMIENTOS

Comienzo por agradecer a Dios por todas las bendiciones que he recibido. Estas bendiciones las recibo mediante las valiosas personas que han formado parte de mi vida. Mi primer paso en la licenciatura fue apoyado y respetado por mis padres, María y Eusebio, creo que tal vez les costó un poco comprender lo que implicaba que fuera bióloga, pero lo respetaron, lo que sigo agradeciendo hoy, por todo lo demás en lo que me han apoyado.

Para agradecer a mis tutores, la Dra. Edith y el Doc Pardo, no encuentro las palabras que mejor puedan describir todo los sentimientos que me llevo impresos en mi cabeza y en mi corazón, producto de todas sus enseñanzas y de su ejemplar voluntad para compartirlas. Les agradezco enormemente su tiempo, su paciencia y confianza.

Agradezco a mis amigos y colegas de la maestría por compartirme su conocimiento y amistad, en especial a mi “equipo renal”, Yaya Hermosa Fuentes y a Alex con quienes compartí además de veladas relajantes, develadas angustiantes.

Agradezco a la Dra. Vicky y a la Dra. Sol por todas las facilidades que me dieron para el uso de herramientas de trabajo en sus laboratorios, además de su confianza y los momentos amenos que compartimos. Agradezco a la Dra. Lulú por la disponibilidad de su tiempo y de su equipo de trabajo para el desarrollo de este proyecto.

Agradezco a mis compañer@s de laboratorio, en especial a Karina por toda su atención y disposición para ayudar.

Agradezco a mi gran amiga Ate, por todo, todo lo que me ha brindado con su amistad aun con la distancia de por medio. Y finalmente a mi Nacho, mi amor, mi compañero, le doy las gracias por compartirme lo que es y aceptar quien soy.

ÍNDICE GENERAL

I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	3
2.1 Metabolismo de esteroides y su control por SREBPs	3
2.1.1 Diferencias en el procesamiento de SREBP1 y SREBP2	5
2.1.2 Regulación de la actividad de SREBPs	7
2.2 Metabolismo del colesterol en la proliferación celular y el control de la expresión génica.	9
2.3 eIF3f	10
III. JUSTIFICACIÓN	15
IV. HIPÓTESIS	16
V. OBJETIVOS	16
5.1 Objetivo general	16
5.2 Objetivos específicos	16
VI. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	17
VII. MATERIALES Y MÉTODOS	18
7.1 Líneas celulares y cepas bacterianas	18
7.2 Medios de cultivo	18
7.3 Plásmidos	18
7.3.1 PCR de colonia de E. coli	19
7.3.2 Miniprep por lisis alcalina	20
7.3.3 Análisis de restricción enzimática	20
7.3.4 Midiprep y purificación de ADN plasmídico	20
7.3.5 Electroforesis en gel de agarosa	21
7.4 Subcultivos y tratamientos de las líneas celulares	21
7.4.1 Células en crecimiento	21
7.4.2 Células quiescentes o en G0	22

7.4.3 Transfección transitoria de cultivos por el método de los liposomas.	22
7.5 Determinación de la expresión de eIF3f por Western-blot.	22
7.6 Determinación de colesterol	24
7.6.1 Extracción de colesterol.	24
7.6.2 Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas para análisis de colesterol.	25
7.7 Separación por cromatografía en capa fina.	25
7.8 Determinación de apoptosis.	26
VIII. RESULTADOS	27
8.1 Obtención de pMSG, pRCE053 y pRCE054.	27
8.2 Expresión de eIF3f en A549 durante la sobreexpresión y el silenciamiento del gen.	28
8.3 Identificación y cuantificación en GC/MS del colesterol.	29
8.3.1 Curva de concentración de colesterol.	29
8.3.2 Análisis de colesterol de células A549 en crecimiento y G0.	29
8.3.2.1 Identificación de compuestos A y B.	32
8.3.2.2 Separación por TLC	35
8.3.3 Análisis de colesterol de células HepG2 en crecimiento y G0.	37
8.3.3.1 TLC	39
8.4 Evaluación de apoptosis durante la desregulación de la expresión de eIF3f en A549 en G0	40
IX. DISCUSIÓN	42
X. CONCLUSIONES	52
XI. PERSPECTIVAS	53
XII. BIBLIOGRAFÍA	54

RESUMEN

El colesterol es esencial para el crecimiento y la división celular; además puede regular transducción de señales y expresión de genes a través de factores de transcripción activados por éste. Los defectos en su homeostasis provocan alteraciones fisiológicas frecuentemente graves. El factor eucariótico de iniciación 3 (eIF3) desempeña una función importante en la iniciación de la traducción, y estudios en células tumorales sugieren que la subunidad f (eIF3f) de este complejo multiproteico es un regulador negativo de la traducción y del crecimiento celular. La desregulación de su expresión induce apoptosis en cultivos de A549 en crecimiento. Esta subunidad controla a mTOR, cinasa que regula el crecimiento y la proliferación celular a través de la modulación de la síntesis de proteínas mediante la fosforilación de S6K1 y la 4E-BP1. eIF3f además interacciona con TRC8, una ubiquitin ligasa, que al ser inducida obstaculiza el transporte de SREBP2 desde el Retículo Endoplásmico al Golgi por su unión directa con este factor transcripcional y a SCAP, evitando la transcripción de genes para la biosíntesis del colesterol. En rata se ha observado que los niveles de colesterol aumentan considerablemente al silenciar la expresión de eIF3f. El objetivo de este trabajo fue elucidar la incidencia de eIF3f en el metabolismo del colesterol y los lípidos relacionados a éste, en células humanas A549 y HepG2 durante la proliferación celular y el estado quiescente. Los cultivos se transfectaron transitoriamente con vectores de expresión de mamíferos con la secuencia génica de eIF3f para silenciar y sobre-expresar la proteína para la que codifica este gen. Se extrajo el colesterol, se analizaron en GC/MS y se obtuvo la concentración del lípido de cada condición de cultivo. Durante el silenciamiento y la sobreexpresión, tanto en estado quiescente como en estado proliferativo se encontró un aumento en la concentración de colesterol, pero de manera notable e interesante, sólo durante la sobreexpresión de eIF3f en A549, se observó la acumulación de más de 20 veces de compuesto parecido al colesterol (no identificado en el banco), esto con respecto al encontrado en el control. Otro resultado importante que se aporta en este trabajo es que la desregulación de eIF3f durante el estado quiescente de los cultivos de A549 no conduce a apoptosis. Con este trabajo demostramos que la desregulación de la expresión de eIF3f altera el metabolismo del colesterol en células humanas A549 y HepG2.

I. INTRODUCCIÓN

El metabolismo celular “es el conjunto de reacciones bioquímicas que tienen lugar en una célula”, lo que incluye gran diversidad de conversiones moleculares y según la complejidad del organismo se pueden realizar miles de éstas. En forma colectiva, tales reacciones mantienen la viabilidad del organismo. Los lípidos, al igual que los carbohidratos tienen una función muy importante en el metabolismo energético y en otros procesos que incluyen funciones de componentes de membrana, hormonas, vitaminas liposolubles, aislantes térmicos y reguladores biológicos como las prostaglandinas. La cadena transportadora de electrones de la mitocondria y los cloroplastos poseen lípidos complejos en su estructura básica (Melo-Ruiz y Cuamatzi-Tapia, 2004).

Los lípidos constituyen el 50% de la masa de la mayoría de las membranas celulares de animales; los fosfolípidos, el colesterol y los glucolípidos son los tres principales. El colesterol limita el movimiento de los fosfolípidos adyacentes y hace que la membrana sea menos fluida y mecánicamente más estable. En la membrana se pueden formar islotes con alta concentración de esfingolípidos y colesterol que se denominan balsas lipídicas que se comportan como un dominio de membrana especializado (Stevens y Lowe, 2006). Además de ser un componente esencial de las membranas celulares, el colesterol es un precursor de los cinco tipos principales de hormonas esteroideas: progestágenos, estrógenos, andrógenos, glucocorticoides y mineralocorticoides, y también es precursor de los ácidos biliares y la vitamina D (Benyon y Roach, 2003). El colesterol puede obtenerse a partir de la dieta o ser sintetizado en el organismo, pero existe una tendencia a sostener el colesterol corporal a un nivel relativamente constante. En los seres humanos, el hígado y el intestino delgado son los órganos más importantes en la síntesis del colesterol (Laguna, 2007). El colesterol es una molécula esteroidea de 27 carbonos de PM=386. Los 27 átomos de carbono del colesterol provienen de la acetil coenzima A (CoA). Se trata de uno de los grandes grupos de compuestos derivados del grupo isopreno de 5 carbonos. La síntesis de colesterol ocurre principalmente en retículo endoplásmico (RE) teniendo como enzima limitante la 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA) reductasa (Volpe y Hennessy, 1977; Reinhart y col., 1987). En células de mamíferos este esteroide es derivado de lipoproteínas de baja densidad (LDL) seguida de la endocitosis mediada por receptores y la posterior hidrólisis en lisosomas o a través de la biosíntesis de *novo* en el RE. El mecanismo de las vías de transporte intracelular del

colesterol es de importancia fundamental para la biología celular y la medicina. Los defectos en tales mecanismos resultan en estados patológicos como la enfermedad de Niemann-Pick que es caracterizada por el secuestro de colesterol derivado de LDL en lisosomas y está ligado a retrasos en la inducción de respuestas homeostáticas mediadas por colesterol (Pentchev y col., 1987). La homeostasis del colesterol es en parte regulada por una familia de factores de transcripción unidos a membrana llamados proteínas de unión a elementos reguladores de esteroides (SREBPs) los cuales regulan la expresión de múltiples genes involucrados en la biosíntesis y absorción del colesterol (Slotte y col., 2000).

La obesidad se ha convertido en un problema de salud pública en países desarrollados y en vías de desarrollo (Wang y col., 2002). En el 2007 la Secretaría de Salud informó que en México hay tres tipos enfermedades que concentran más de 33% de las muertes en mujeres y más de 26% de las muertes en hombres: la diabetes mellitus, las enfermedades isquémicas del corazón y las enfermedades cerebro-vasculares. Estas enfermedades comparten algunos factores de riesgo que es importante atender. Destaca dentro de ellos el sobrepeso y la obesidad, que afecta a 70% de la población de 20 años o más. El tabaquismo, el colesterol elevado y la hipertensión arterial también influyen en el desarrollo de las enfermedades isquémicas del corazón y las enfermedades cerebro-vasculares. El sobrepeso y la obesidad son dos de los principales factores de riesgo a los que se enfrenta la población mexicana y el sistema de salud. Su prevalencia en adultos se incrementó de 34.5% en 1988 a 69.3% en el 2006. Se calcula que el colesterol elevado es responsable de 18% de las enfermedades cerebro-vasculares y 56% de las cardiopatías isquémicas a nivel mundial (Secretaría de Salud, 2007).

II. ANTECEDENTES

2.1 Metabolismo de esteroides y su control por SREBPs

Las células animales sintetizan colesterol a partir del acetil CoA a través de una serie de más de 20 reacciones enzimáticas. Adicionalmente pueden obtenerlo de la circulación en forma de LDL, la cual es internalizada a través del receptor LDL ubicado sobre la superficie celular e hidrolizado a colesterol libre en los lisosomas. Debido a que el colesterol libre es uno de los mayores componentes de los lípidos de membrana, cada célula debe balancear estas dos fuentes evitando la escasez o la sobreacumulación para mantener la homeostasis. Es sabido que la vía biosintética y de captación es regulada por una retroalimentación negativa, controlada por el producto final. Cuando las células acumulan exceso de esteroides, la actividad de la HMGCoA reductasa disminuye más del 90% y también el número de receptores LDL decrece; por el contrario, al disminuir la concentración celular del colesterol, se mantiene una alta actividad de esta enzima y se expresa un gran número de receptores LDL en la superficie celular. La expresión de estos genes y la de la mayoría de las enzimas requeridas para la biosíntesis del colesterol y de ácidos grasos es regulada por SREBPs (Sterol Regulatory Element Binding Protein) (Sato, 2010). Los SREBPs pertenecen a una familia de proteínas cuyos miembros, SREBP1 y SREBP2, son sintetizados como proteínas de RE en donde permanecen como precursores no activos; los extremos N-terminal y C-terminal son proyectados hacia el citoplasma, ligados por un par de dominios que atraviesan la membrana. El extremo N-terminal contiene un motivo denominado bHLH-zip, el cual funciona como factor transcripcional; el extremo C-terminal forma un estrecho complejo con la proteína SCAP (SREBP cleavage-activating protein) la cual funciona como un sensor de esteroides en este sistema. En células repletas de esteroides, este complejo SREBP/SCAP se une al colesterol y se genera un cambio conformacional en SCAP, lo que promueve su unión con la proteína INSIG (Insulin-induced gene) que entonces lo retiene en el RE. Cuando disminuye la concentración de esteroides, SCAP es liberada de INSIG y escolta al precursor de SREBP, transportado por una vesícula COPII al aparato de Golgi, donde dos proteasas (SP1 y SP2) liberan el dominio N-terminal que funciona como factor transcripcional al ser transportado como un dímero al interior del núcleo por la proteína Importina β . Una vez en el núcleo, los SREBPs se unen a secuencias SRE (Sterol regulatory element) en los promotores de genes blanco. El colesterol acumulado, que resulta de la síntesis y captación, retroalimenta el sistema

para inhibir la activación de los SREBPs (Sato, 2010; Espenshade, 2006; Brown y Goldstein, 1997).

La familia de SREBPs comprende tres subtipos, codificados por dos genes: *Srebf1* y *Srebf2*. Las isoformas SREBP1a y SREBP1c, son generadas por “*splicing* alternativo” del transcrito generado por el gen *Srebf1*. El subtipo “1a” posee un extremo N-terminal de mayor longitud que el subtipo “1c”, siendo “1a” el activador transcripcional de mayor potencia entre estos dos y activa a todos los genes que responden a SREBPs (Brown y Goldstein, 1997). La isoforma “1c” controla preferencialmente la expresión de genes requeridos para la síntesis de ácidos grasos como la sintasa de ácidos grasos (Espenshade, 2006), aunque también puede estimular la expresión de genes requeridos para síntesis de colesterol, como la sintasa de HMGCoA (Laplante y Sabatini, 2010; Brown y Goldstein, 1997). El tercer subtipo, SREBP2, está involucrado en la regulación del metabolismo del colesterol (Sato, 2010; Espenshade, 2006). El análisis de promotores de genes que codifican para la expresión de enzimas biosintéticas del colesterol, en particular la escualeno sintasa, revela que SREBP2 controla en gran medida la expresión de estos genes (Sato, 2010). Debido a que los SREBPs son regulados directamente por el colesterol y están involucrados de manera directa, tanto en el metabolismo del colesterol como de ácidos grasos, se ha estudiado si estos factores de transcripción son regulados también por los ácidos grasos. En cultivos celulares, la adición de ácido oleico y de otros ácidos grasos insaturados de cadena larga disminuye el procesamiento de SREBP1 y SREBP2 (Osborne, 2000). También se ha reportado que en estudios de animales alimentados con una dieta complementada con ácidos grasos insaturados o aceite de pescado, la expresión de RNA mensajero de SREBP1a fue suprimida (Osborne, 2000). En un estudio independiente, el RNA mensajero de SREBP1 fue poco afectado, pero el nivel de proteína SREBP1 procesada fue significativamente reducida (Osborne, 2000). En estos estudios el procesamiento de SREBP2 no fue alterado (Osborne, 2000). La acumulación de colesterol provocó que se suprimieran los SREBPs nucleares y se inhibió la síntesis de este lípido en el hígado, pero en la síntesis de ácidos grasos sólo tuvo pequeños efectos (Osborne, 2000; Brown y Goldstein, 1997). Resultados similares se observaron en fibroblastos humanos (Brown y Goldstein, 1997). Se ha visto que los SREBPs están implicados tanto en la lipogénesis como en la homeostasis del colesterol, pero la isoforma SREBP2 participa de manera más selectiva para genes involucrados en la homeostasis del colesterol. Experimentos en los que se alimenta a animales con una dieta rica en este lípido han

resultado en la inhibición del procesamiento de las formas precursoras de SREBP1 y SREBP2 (Shimomura y col., 1997), también en experimentos en los que se adicionó un exceso de colesterol a cultivos celulares. Sin embargo, cuando los animales han sido desprovistos de colesterol, la expresión y la activación proteolítica de SREBP2 incrementó; en contraste, la expresión de SREBP1 no fue alterada ni se aceleró el procesamiento del precursor unido a membrana (Osborne, 2000). En una gran variedad de cultivos celulares, incluyendo la línea celular humana de hepatocitos HepG2 y la línea 3T3-L1 de preadipocitos de ratón, la expresión de la isoforma “1a” excede a “1c” en una relación de 2:1 (Shimomura y col., 1997). La isoforma SREBP2 también es producida a altos niveles en estas células (Brown y Goldstein, 1997). En el hígado de humanos y ratones, ocurre lo opuesto con respecto a la relación de las isoformas de SREBP1 de las células en cultivo, el transcrito de SREBP1c excede al de SREBP1a (Brown y Goldstein, 1997). En estudios realizados en hámster se ha encontrado que en el hígado la cantidad de SREBP2 aumentó y su procesamiento proteolítico fue mucho más eficiente que el de SREBP1 al serles suprimidos los esteroides (Brown y Goldstein, 1997). Diferentes tejidos expresan diferentes proporciones de los subtipos SREBP1a y SREBP1c, pero el “1c” es la forma predominante en la mayoría de los tejidos, específicamente es la forma predominante del hígado adulto y de adipocitos (Sato, 2010; Osborne, 2000; Brown y Goldstein, 1997), mientras que el subtipo SREBP2 es expresado de forma ubicua (Sato, 2010).

2.1.1 Diferencias en el procesamiento de SREBP1 y SREBP2

A pesar de las distintas funciones de los SREBPs en el metabolismo lipídico, estas proteínas de membrana del RE se encuentran sujetas a escisiones proteolíticas para generar formas transcripcionales activas, a través de una vía de procesamiento idéntica que es controlada por SCAP, dos tipos de INSIG y las proteasas S1P y S2P. Sin embargo, se observa una diferencia entre el procesamiento de SREBP1 y SREBP2 en el hígado de ratas o ratones realimentados después de un ayuno. La cantidad de la forma activa nuclear de SREBP1c incrementa enormemente ante el consumo de una dieta alta en carbohidratos, mientras que la cantidad de la forma nuclear de SREBP2 no se altera (Osborne, 2000; Sato, 2010). En el hígado, la transcripción de SREBP1c y SREBP2 es estimulada por SREBPs a través de un mecanismo que requiere secuencias SRE en los promotores de estos genes. Una función del hígado es convertir el

exceso de carbohidratos a ácidos grasos para convertirlos a triglicéridos. La insulina estimula esta síntesis de ácidos grasos en respuesta al exceso de carbohidratos mediante la activación de transcritos de SREBP1c (Espenshade, 2006; Osborne, 2000). En hepatocitos recién aislados, el mensajero de la isoforma “1c” fue activada por la insulina; sin embargo, la inducción de RNA mensajero de un gen lipogénico, como la sintasa de ácidos grasos, requiere simultáneamente la adición de insulina y altos niveles de glucosa (Osborne, 2000). La insulina suprime en gran medida la expresión genética de INSIG-2a, la isoforma activa de INSIG-2 que predomina en el hígado, pero recíprocamente aumenta la isoforma INSG-1, una isoforma cuyo gen que lo codifica es rápidamente inducible por insulina; estimulando así el transporte de SREBP1c/SCAP del RE al Golgi para liberar el extremo N-terminal (Sato, 2010; Engelking y col, 2005). La expresión de INSIG-1 depende de la presencia de SREBP1c en el núcleo (Engelking y col, 2005). Durante el ayuno, cuando los niveles de insulina son bajos, este factor transcripcional no se induce y por lo tanto el RNA mensajero de INSIG-1 no aparece (Engelking y col, 2005). Experimentos de unión a esteroides, en los que se usa INSIG-2 purificada, claramente mostraron que se une con alta afinidad a 25-hidroxicolesterol y otros oxisteroides, pero no con colesterol. La unión de INSIGs con oxisteroides induce una alta interacción con SCAP unido a colesterol y previene el movimiento de SREBP/SCAP al Golgi. En lo que a INSIG-1 se refiere, la unión a oxisteroides reduce la degradación de la proteína (Sato, 2010). En una publicación reciente se demostró que el complejo SREBP1/SCAP se asocia selectivamente con INSIG-2a, a diferencia de la interacción encontrada entre SREBP2/SCAP con INSIG-1 (Yellaturu y col., 2009). Esto resulta interesante porque anteriormente se había reportado que la deficiencia de ambos INSIG en ratones provoca un incremento de la forma nuclear de SREBP1c, pero no de SREBP2, además de observar un aumento dramático en los niveles de proteína de la HMGCoA reductasa (Engelking y col, 2005). Tal hallazgo llevó a plantear la existencia de otro regulador aun no identificado y diferente de INSIG que determina el destino del complejo SREBP/SCAP, distinguiendo entre SREBP1c y SREBP2. En el 2009, Irisawa y colaboradores encontraron que TRC8 obstaculiza el transporte de SREBP2 del RE al Golgi, por su unión directa con SREBP2 y a SCAP, formando un complejo que bloquea la interacción entre SCAP y Sec24 (una de las proteínas de COPII que están involucradas en el transporte de SREBP2 al Golgi), reduciendo así su escisión para ser liberado y transportado al núcleo donde activa la transcripción de genes para la biosíntesis del colesterol. El nivel de la proteína TRC8 va aumentando de modo gradual después de que las células son

cultivadas en un medio deficiente de lipoproteínas; en estas condiciones de cultivo se impide la ubiquitinación de TRC8 y se mantiene estable. Los autores proponen que la acción de TRC8 se suma a la de SCAP e INSIG, impidiendo la activación excesiva de SREBP2 (Irisawa y col., 2009).

2.1.2 Regulación de la actividad de SREBPs

En la función central que desempeñan los SREBPs en el control de la síntesis de lípidos se destacan las múltiples influencias de otras vías en la actividad de estos factores transcripcionales, como la de la insulina (Osborne, 2000; Engelking y col., 2005; Yellaturu y col., 2009), la proliferación celular, la diferenciación celular (Shimomura y col., 1997; Osborne, 2000; Lecomte y col., 2009), la muerte apoptótica (Higgins y Ioannou, 2001; Wang y col., 1996) y el estrés del RE (Lee y Ye, 2004; Colgan y col., 2007). Los datos reportados de experimentos que se realizaron en cultivos de células CHO (Chinese hamster ovary), a las que se les indujo apoptosis con estaurosporina, informan que en estas condiciones en las que se produjo la forma activa de la proteasa CPP32 o caspasa 3, los precursores de SREBP1 y SREBP2 fueron escindidos y las formas transcripcionalmente activas fueron encontradas en extractos nucleares. Estos resultados se observaron de manera similar en células U937 (Human leukemic monocyte lymphoma) (Wang y col., 1996). En experimentos posteriores se demostró que bajo estas condiciones, estos factores transcripcionales son capaces de activar genes reporteros dirigidos por promotores SRE, aun con la presencia abundante de esteroides; además, esta activación ocurrió durante apoptosis temprana (Higgins y Ioannou, 2001). A estos hallazgos sobre la activación de SREBPs, se suma el descubrimiento de Lee y colaboradores, reportado en el 2004. Trabajando también con células CHO, encontraron que el estrés del RE inducido por medio hipotónico o taspigargin evita la retención de los precursores SREBPs en RE, lo que permite su activación proteolítica al reducir el nivel de INSIG-1, pero no INSIG-2. La reducción de INSIG-1, una proteína con una alta tasa de recambio, resulta de una inhibición general de la síntesis de proteínas mediada por el estrés hipotónico; pero INSIG-2 no se ve afectada por este estrés debido a que es una proteína mucho más estable que la isoforma 1. Debido a que las condiciones que causan el estrés del RE pueden llevar a la activación de caspasas mitocondriales (Morishima y col., 2002), Colgan y colaboradores (2007) realizaron estudios en células MCF7 (Human breast adenocarcinoma) para

determinar si la activación de SREBPs causada por el estrés del RE, y por consecuencia la acumulación de colesterol, es dependiente o no del mecanismo de caspasas. Los resultados muestran que efectivamente, en células tratadas con taspigargin, el estrés de RE indujo la activación de SREBP2, pero esta activación ocurrió independientemente de la activación de caspasas y fue inhibida por un bloqueador de la proteasa SP1. Con estos hallazgos Colgan y col. (2007) concluyen que la activación de SREBP2 inducida por el estrés de RE es mediada por la convencional vía proteolítica S1P y S2P, que normalmente regula a los SREBPs de acuerdo con la concentración intracelular de los esteroides. Entonces, las caspasas no son las responsables del aumento de colesterol causado por el estrés del RE.

La cinasa Akt tiene una función en la protección de apoptosis, proliferación y crecimiento celular. También está involucrada en mediar los efectos de la insulina, como la lipogénesis, captación de glucosa y la conversión de ésta a ácidos grasos y colesterol. En un estudio realizado en cultivos de células adherentes y en suspensión se analizaron cambios en la expresión de genes en respuesta a la activación de Akt (Porstmann y col., 2005). Se encontró que esto induce el incremento de transcritos de SREBP1a y SREBP1c, mientras que los transcritos de SREBP2 fueron ligeramente modulados. La activación de Akt también indujo la acumulación de transcritos de genes como la sintasa de ácidos grasos, la sintasa de HMGCoA y la HMGCoA reductasa. Además, se observó que lleva a la acumulación de la forma nuclear de SREBP1 pero no de SREBP2; se encontró que para la activación del promotor de la sintasa de ácidos grasos dependiente de Akt se requiere la activación de SREBP1. Finalmente, la activación de Akt provoca un incremento tanto en la concentración de ácidos grasos celulares como de fosfoglicéridos, ambos componentes de membranas celulares (Porstmann y col., 2005). Estos reportes no hablan de la importante influencia de la vía de señalización de la cinasa Akt en el metabolismo de lípidos, un requerimiento importante para la proliferación y el crecimiento celular.

2.2 Metabolismo del colesterol en la proliferación celular y el control de la expresión génica.

La disponibilidad de nutrientes soporta la síntesis de proteínas, lípidos y ácidos nucleicos para el crecimiento y la proliferación celular. Los lípidos tienen una función importante como compuestos estructurales y fuente de alto contenido de energía para las células, por lo que no es de extrañarse que su biosíntesis esté coordinada con la progresión del ciclo celular como ha sido reportado por Kwok y Wong en el 2005. Observando el ciclo celular del dinoflagelado *Cryptothecodinium cohnii*, encontraron que hay un incremento gradual en el contenido de lípidos polares y un aumento continuo de lípidos neutros durante este proceso. El colesterol es uno de los tres principales componentes lipídicos de membrana, por lo tanto, es esencial para el crecimiento y la división celular; pero si esto es sólo una consecuencia de su uso en la formación de membrana o si también realiza acciones regulatorias en la maquinaria del ciclo celular, aun es poco entendido. En un estudio realizado en células humanas (Suárez y col, 2002) en el que se comparó los efectos del colesterol y el ergosterol en la proliferación celular, se observó que al inhibir la síntesis de colesterol, las células cultivadas en un medio libre de éste fueron arrestadas en la transición G2/M del ciclo celular, efecto que pudo ser revertido por la adición del esterol al medio de cultivo. Tal recuperación no ocurrió con el ergosterol, pero se encontró que fue utilizado por las células para regular la transcripción de un gen reportero controlado por un elemento de respuesta a esterol (SRE). Se determinó que en contraste al colesterol, la adición de ergosterol al medio no fue capaz de inducir la expresión de ciclina B1 para la activación de Cdk1 y completar el ciclo celular en células previamente arrestadas en la fase G2 (Suárez y col., 2002). Profundizando en esta investigación, en el 2005, se llevaron a cabo experimentos en los que se utilizaron inhibidores distales de la síntesis del colesterol. Los resultados mostraron que el intermediario 7-dehidrocolesterol puede sustituirse por colesterol, al menos parcialmente durante la proliferación celular, mientras que los esteroides sintetizados en la vía antes de 7-dehidrocolesterol no son efectivos para soportar la proliferación en ausencia del colesterol (Fernández y col., 2005). Esto sugiere que el colesterol desempeña una función importante en la regulación de la división celular, requiriéndose de una disponibilidad inmediata de este lípido.

La relación establecida entre obesidad y diabetes ha conducido a estudios que buscan explicar los efectos y las causas de los niveles plasmáticos e intracelulares de ácidos grasos y

colesterol en la hiperglicemia y la hiperlipidemia. Estos estudios también abordan el nivel de expresión de genes que codifican para enzimas lipogénicas altamente reguladas en las células β pancreáticas, como la sintasa de ácidos grasos y la acetil-CoA carboxilasa. La diabetes tipo 2 es asociada con la secreción insulínica defectuosa, resistencia a la insulina y elevada producción de glucosa hepática. La acumulación de lípidos en exceso en las células β pancreáticas de sujetos obesos (con diabetes tipo 2) ha sido implicada como una de las principales causas de los defectos de secreción de insulina, lo cual finalmente resulta en hiperglicemia, una de las principales características de la diabetes. Además, la masa se reduce a medida que las células β cargadas de lípidos sufren apoptosis (Choe y col., 2007). Una observación interesante en otros estudios es que la hiperlipidemia crónica contribuye a la disfunción en un modo interdependiente con la hiperglicemia (Poitout y Robertson, 2002; Poitout, 2004).

El colesterol puede regular la transducción de señales a través de microdominios de membrana y expresión de genes a través de factores de transcripción activados por colesterol (Piston y col., 2007). Por ejemplo, el colesterol intracelular regula el metabolismo de la glucosa y la expresión de genes en adipocitos (Dugail y col., 2001). Estudios realizados en el 2007 por Piston y colaboradores, señalan el efecto directo de niveles elevados de colesterol en la disfunción de las células β del páncreas.

Las vías metabólicas en células sanas son estrechamente reguladas para permitir la proliferación y el crecimiento celular o la supervivencia, según sean las condiciones. Cuando las señales que disparan o restringen a estos eventos, estas vías se ven afectadas y la célula enferma. Nuevos puntos de vista consideran que la participación de los reguladores del ciclo celular se extienden más allá del control de la proliferación celular, y discuten cómo estas nuevas funciones pueden estar implicadas en alteraciones metabólicas que llevan al desarrollo de diversas patologías como el cáncer, enfermedad en la que las células se mantienen en un estado proliferativo descontrolado (Fritz y Fajas, 2010). La proliferación celular implica el mecanismo de división celular a través del cual se genera una nueva célula hija a partir de una ya existente, este proceso requiere la expresión selectiva de genes que codifican proteínas que lo controlan. Entre las más estudiadas está p53, una de las más importantes defensas ante el desarrollo de tumores, de la que además sabemos por estudios recientes que emerge con una participación importante en la respuesta y en la regulación del estrés metabólico (Vousden y Ryan, 2009). Un

mayor entendimiento de los mecanismos moleculares que controlan la respuesta metabólica ha llevado a retomar la estrecha relación que existe entre ésta y los estímulos proliferativos que controlan este tipo de genes.

A continuación se abordarán los antecedentes de eIF3f, un gen cuya expresión aumenta en el ciclo celular y en estado quiescente se ve abatida, que en este proyecto se propone analizar como un actor importante en el metabolismo de lípidos.

2.3 eIF3f

El monogen eIF3f (factor eucariótico de iniciación 3f) es la subunidad p47 del complejo multiproteico eIF3, que tiene una función importante en la iniciación de la traducción, es decir, es indispensable para que inicie la síntesis de proteínas “cap” dependiente, que corresponde a más del 70% de la síntesis proteica global. eIF3f es miembro de la familia génica Mov34, cuyos miembros están involucrados en diversos procesos como la iniciación de la traducción, la regulación del proteosoma y la transcripción (Aravind y Ponting, 1998). Se ha encontrado que eIF3f interactúa con CDK11^{p46} a través del motivo Mov34/JAB y que dicha interacción es favorecida por la estimulación de eventos apoptóticos en células de melanoma (Shi y col., 2003). CDK11 es una familia de cinasas dependientes de ciclina que son importantes efectores en la señalización de apoptosis. El miembro CDK11^{p110} es procesado por caspasas, generando la isoforma CDK11^{p46} cuyo dominio C-terminal interactúa con eIF3f durante apoptosis. Durante esta interacción, CDK11^{p46} fosforila a eIF3f una vez inducido exógenamente el proceso de apoptosis. Resultados recientes de Shi y colaboradores (2006), en células de melanoma, sugieren que eIF3f es un regulador negativo de la traducción y del crecimiento celular, y que tiene una función importante en la señalización apoptótica. Resultados de nuestro laboratorio (Higareda-Mendoza y Pardo-Galván, 2010) con células humanas tumorales provenientes de un adenocarcinoma de pulmón (línea celular A549), corroboran los resultados de Shi y colaboradores (2006). Adicionalmente, nuestros resultados muestran que tanto la sobre-expresión como el silenciamiento de la expresión de eIF3f conducen a una muerte celular programada independiente de la ruta de las caspasas (Higareda-Mendoza y Pardo-Galván, 2010). Sorprendentemente, hemos descubierto que la expresión de la proteína eIF3f es bifásica y

circunscrita a las fases S y M del ciclo celular y que su expresión en G0 está abatida. Este perfil de expresión fue corroborado mediante estudios en cultivos asincrónicos y sincronizados en G0, M y S transfectados con la región promotora inmediata al gen eIF3f fusionada transcripcionalmente al gen reportero de luciferasa (Higareda-Mendoza y Pardo-Galván, 2010). Por otro lado, también sabemos que la sobre-expresión del gen inhibe la síntesis global de proteínas (Higareda y col., 2003) y si consideramos que la síntesis de proteínas es inhibida en la transición G2/M y en la fase M del ciclo celular en mamíferos (Fan y Penman, 1970), es coherente hacer la relación con su perfil de expresión y sugerir su contribución en este proceso. Es conveniente recordar que además del máximo de expresión en M, está el máximo observado en la fase S del ciclo celular y que durante esta fase no disminuye la síntesis de proteínas, por lo que se plantea una función diferente durante la misma (Higareda-Mendoza y Pardo-Galván, 2010). Aunque la función sugerida de eIF3f es como inhibidor de la síntesis de proteínas (Shi y col., 2006) Higareda-Mendoza y Pardo-Galván (2010) lo proponen como un modulador traduccional de la síntesis de proteínas.

Volviendo a la sugerencia de eIF3f como gen multifuncional debido a su perfil de expresión bifásico, se suma información que recientemente se ha generado sobre la interacción de esta proteína con otras, además del complejo del que forma parte durante el inicio de la traducción (eIF3) y por lo tanto sobre otras funciones que desempeña. Csibi y colaboradores (2010) reportan que en un modelo de diferenciación e hipertrofia de células musculares de ratón, eIF3f interacciona físicamente y controla la actividad de la proteína blanco de rapamicina en mamíferos (mTOR, por sus siglas en inglés), requerida para la diferenciación e hipertrofia del músculo de ratón. mTOR es una cinasa que regula el crecimiento y la proliferación celular (en respuesta a factores de crecimiento, hormonas y aminoácidos) a través de la modulación de la síntesis de proteínas mediante la fosforilación de la cinasa 1 de la proteína ribosomal S6 (S6K1, por sus siglas en inglés) y la proteína 1 de unión al factor eucariótico de iniciación de la traducción 4E (4E-BP1, por sus siglas en inglés). S6K1 y mTOR-raptor (donde raptor es una proteína mediadora que se une a mTOR) interaccionan físicamente con dos dominios de eIF3f, el dominio Mpr1p, Pad1p N-terminal (MPN, por sus siglas) de eIF3f se asocia con la forma hipofosforilada de S6K1 (forma inactiva) y mTOR-raptor se asocia a eIF3f a través del dominio señalizador de TOR (TOS, por sus siglas en inglés), fosforilando y desplazando a S6K1 (forma activa). Es decir, para la activación de S6K1 por mTORC1, se requiere que S6K1 esté asociada a

eIF3f. Durante la atrofia muscular de miotubos de ratón, S6K1 se acumula en forma inactiva, como consecuencia de la degradación proteosómica de eIF3f a través de la E3-ubiquitin ligasa MAFbx, la cual se encuentra altamente expresada (Lagrand-Cantaloube y col., 2008). Como se mencionó anteriormente, mTOR también regula el crecimiento celular y esta acumulación de masa necesita ser coordinada con otros procesos metabólicos que son requeridos para la síntesis de macromoléculas, incluyendo proteínas y lípidos. La ruta de señalización PI3/Akt induce el crecimiento celular a través de la activación del complejo mTORC1 y se ha demostrado que la lipogénesis dependiente de Akt requiere la activación de este complejo. mTOR es un regulador de la actividad de SREBP, porque al bloquear con rapamicina la actividad de mTORC1 se bloquea la acumulación de SREBP1c y la expresión de genes blanco de este SREBP; además, el silenciamiento de mTOR o raptor, pero no de rictor (proteína de unión a mTOR en el complejo mTORC2), logra abolir la inducción de lipogénesis dependiente de Akt. La expresión de SREBP2 no fue afectada al silenciar los componentes de mTORC1 o mTORC2 y esto sugiere la participación de mTOR en una ruta reguladora de la biosíntesis de lípidos, además de la de proteínas, dirigida en conjunto con PI3K y Akt. (Porstmann y col., 2008). Continuando con los hallazgos de proteínas que interactúan con eIF3f, está TRC8, una E3-ubiquitin ligasa transmembranal de RE que sensa niveles de colesterol del medio externo e interactúa físicamente con dos subunidades de eIF3, la “h” y “f”, a través del dominio MPN. Esta interacción fue encontrada por medio de experimentos en cultivos de células humanas embrionarias de riñón y también fue observada en *Drosophila melanogaster* (Lee y col., 2010). Lee y colaboradores (2010) señalan que la inducción de esta proteína desestabiliza las formas precursoras de los factores de transcripción SREBP1 y SREBP2, y además aumenta la ubiquitinación de INSIG-1, proteína que retiene en RE las formas precursoras de los SREBPs. Además, otros reportes (Irisawa y col, 2009) revelan que esta proteína obstaculiza el transporte de SREBP2 desde el RE al Golgi por su unión directa con este factor transcripcional y a SCAP, evitando la transcripción de genes para la biosíntesis del colesterol. Con lo que, se propone que TRC8 provee un vínculo entre la biosíntesis de lípidos y proteínas.

Recientemente, se hizo un descubrimiento que genera expectativas biomédicas y científicas en el área de la biología celular: en hepatocitos de ratas hepatectomizadas y tratamiento con la secuencia “antisentido” de eIF3f, se encontró un aumento de colesterol a las 24 horas, con respecto al encontrado en hepatocitos control que fueron tratados con el vehículo (Cortés-García

y col., 2009). Datos preliminares en células humanas cultivadas sugieren que la desregulación de la expresión del gen eIF3f altera el perfil de lípidos (comunicación personal de Higareda-Mendoza). Estos antecedentes nos llevan a preguntarnos si una de las funciones de eIF3f está en la regulación del metabolismo de lípidos; si es así, cómo es que incurre en el proceso y cómo se establece el nexo a través de eIF3f entre la proliferación/crecimiento celular, la síntesis de proteínas y la síntesis de lípidos.

III. JUSTIFICACIÓN

Los defectos en los mecanismos de la homeostasis del colesterol resultan en diversos estados patológicos, por lo que el estudio de este lípido es de importancia fundamental para la biología celular y la medicina.

En el programa de Salud 2007-2012 la Secretaría de Salud indicó que el sobrepeso y la obesidad son dos de los principales factores de riesgo a los que se enfrenta la población mexicana y el sistema de salud. Su prevalencia en adultos se incrementó de 34.5% en 1988 a 69.3% en 2006. El colesterol elevado influye en el desarrollo de las enfermedades isquémicas del corazón y las enfermedades cerebro-vasculares. Se calcula que el colesterol elevado es responsable de 18% de las enfermedades cerebro-vasculares y 56% de las cardiopatías isquémicas a nivel mundial.

Los lípidos tienen una función importante como compuestos estructurales y fuente de alto contenido de energía para las células, por lo que no es de extrañarse que su biosíntesis esté coordinada con la progresión del ciclo celular como ha sido reportado por Kwok y Wong (2005). El colesterol es uno de los tres principales componentes lipídicos de membrana, por lo tanto es esencial para el crecimiento y la división celular. Pero, si esto es sólo una consecuencia de su uso en la formación de membrana o si también realiza acciones regulatorias en la maquinaria del ciclo celular, aun es poco entendido, aunque existe evidencia de la implicación del metabolismo del colesterol en la proliferación celular y el control de la expresión génica. La inhibición de la escualeno sintasa, que impide la formación de cualquier esteroide, provoca que el ciclo celular se detenga en la transición de las fases G2 y M (Juárez y col., 2002).

Además del hallazgo de la acumulación de colesterol como resultado de la alteración en la expresión de eIF3f, realizado por nuestro laboratorio, hay evidencia que relacionan a esta subunidad con otras proteínas implicadas en mecanismos de regulación metabólica de lípidos, además del de proteínas. Tal evidencia que sugiere que eIF3f podría estar involucrado en el metabolismo lipídico, en particular con el metabolismo del colesterol, se perfila como una posibilidad de importancia científica y biomédica, ya que estaríamos descubriendo un nexo que regula al metabolismo de proteínas, de colesterol y al proceso de división celular.

IV. HIPÓTESIS

La desregulación de eIF3f altera el metabolismo de lípidos relacionados al colesterol en células humanas tumorales A549 y HepG2.

V. OBJETIVOS

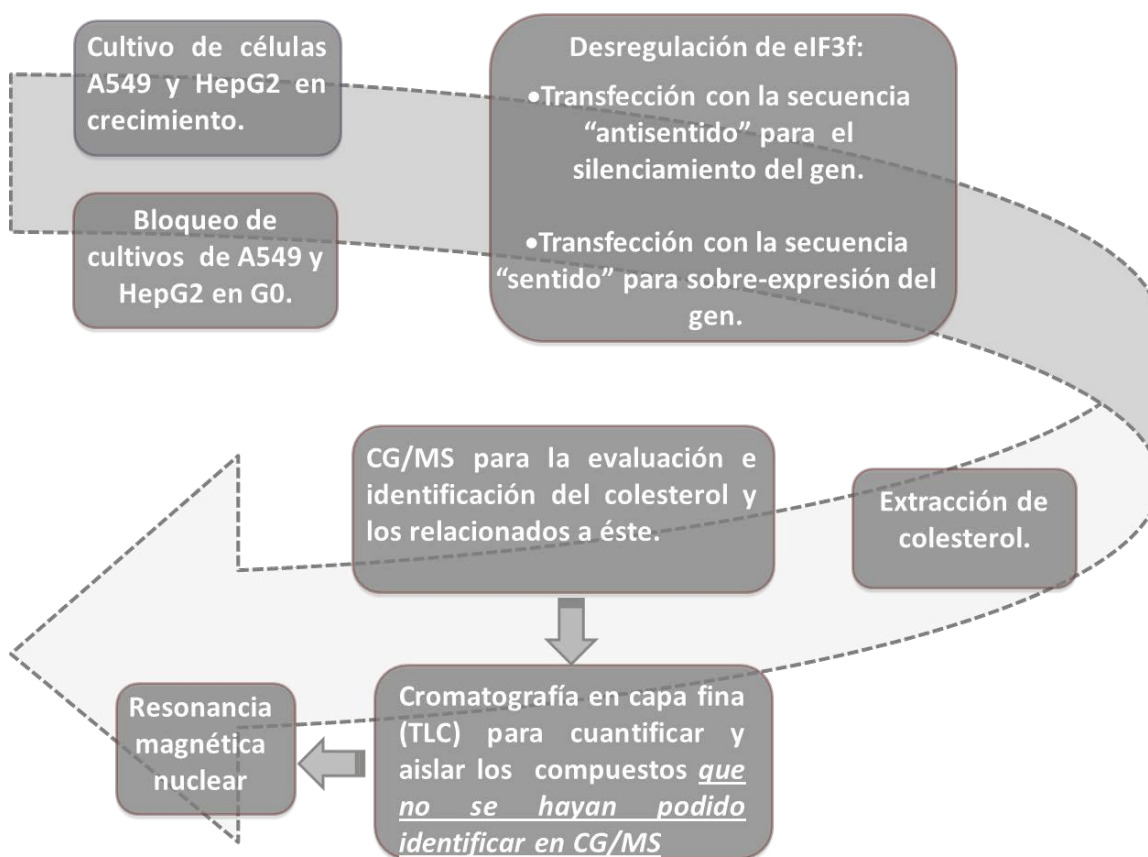
5.1 Objetivo general

Elucidar la incidencia de eIF3f en el metabolismo del colesterol y de lípidos relacionados al mismo, en células humanas A549 y HepG2 durante la proliferación celular y el estado quiescente.

5.2 Objetivos específicos

- Establecer el perfil de concentración del colesterol y de lípidos relacionados al mismo, en A549 y HepG2 durante el crecimiento asincrónico, así como en estado quiescentes (G0), durante la desregulación de la expresión el gen eIF3f, por sobreexpresión y silenciamiento.
- Analizar e identificar elementos de la vía del metabolismo del colesterol de A549 y HepG2 que son influenciados por la desregulación de la expresión de eIF3f.
- Proponer un modelo que vincule los procesos del metabolismo de colesterol, la síntesis de proteínas y la proliferación celular.

VI. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



VII. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Líneas celulares y cepas bacterianas

Se utilizó la cepa JM101 de *E. coli* y dos líneas celulares humanas: A549 (CCL-185) y HepG2 (HB-8065). A549 es una línea celular adherente proveniente de un adenocarcinoma de epitelio pulmonar y HepG2 es de crecimiento adherente proveniente de un carcinoma hepatocelular. El nivel de bioseguridad de ambas es 1 y fueron provistas por ATCC (American Type Cell Collection).

7.2 Medios de cultivo

Para cepas de *E. coli* se utilizó caldo Luria Base (LB) líquido [1% NaCl (w=peso/v=volumen), 1% peptona de caseína (w/v) y 0.5% extracto de levadura (w/v)] y Luria Base (LB) agar cuya composición es la misma que en líquido, agregando 1.5% agar bacteriológico (w/v). Una vez preparados se esterilizaron autoclaveando a 15 psi por 20 min. Para preparar medios selectivos con antibiótico se agregó el correspondiente después de esterilizar y enfriar el medio: LB agar con ampicilina a 75 ug/ml y caldo LB a 50ug/ml.

Para el manejo de las líneas celulares A549 y HepG2 se utilizó Medio Mínimo Esencial (MEM por sus siglas en inglés) de Sigma, suplementado con 18 mM NaHCO₃ (Sigma), 2 mM L-glutamina (Sigma), 10 mM Hepes (Sigma), y 10% de suero fetal bovino (SFB) (Invitrogen). Los cultivos se mantienen en este medio completo con una atmósfera de 5% CO₂ a 37 °C. Para la criopreservación de células se utilizó una mezcla del 80% de medio MEM completo suplementado con otro 10% SFB y 10 % DMSO (Dimetil sulfóxido).

7.3 Plásmidos

La transfección transitoria de cultivos de A549 se realizó con: i) pMSG, vehículo para la expresión en mamíferos que en determinado caso se utilizó para la clonación de la secuencia en “sentido” y “antisentido” de eIF3f (control), además este contiene el promotor *leaky inducible* por dexametasona, MMTV LTR y un gen de beta-lactamasa para su selección en medios de cultivo con ampicilina; ii) pRCE053, el vehículo que contiene la secuencia denominada “sentido”, a partir de la cual se sintetiza el mensajero de eIF3f, que al sumarse a la traducción con

el endógeno se obtiene la sobreexpresión del gen; y iii) pRCE054, el vehículo que contiene la secuencia denominada “antisentido”, a partir de la cual se sintetiza el mensajero complementario al mensajero endógeno de eIF3f para silenciar la expresión del gen.

Para obtener éstos plásmidos se realizó un PCR de colonia a células transformadas de *E. coli*, las colonias seleccionadas se cultivaron y se les realizó extracción de DNA, éste último fue caracterizado por análisis de restricción y secuenciación, posteriormente se realizó un Midiprep de las colonias de *E. coli* con DNA caracterizado positivamente.

Estos plásmidos fueron proporcionados por el laboratorio de Biología Molecular del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas y el laboratorio de Biología Celular Humana de la UMSNH.

7.3.1 PCR de colonia de *E. coli*

Se descongelaron alícuotas de células de *E. coli* transformadas con pRCE053 y pRCE054 y se tomó 10 μ l de volumen celular para plaquear cajas de medio LB agar con ampicilina para aislar colonias.

El protocolo consistió en tomar con un palillo estéril una colonia de las células transformadas y estriarla en una caja de LB agar ampicilina; después ese mismo palillo se enjuagó en un eppendorf con 50 μ l de agua tridestilada estéril mezclando para que se quedaran en ella todas las bacterias posibles. Se descartó el palillo y el tubo se colocó sobre una almohadilla para hervir por 5 min. Se centrifugó 1.5 minutos a máxima velocidad y se tomó 10 μ l del sobrenadante para usarse como templado en la siguiente reacción.

La reacción de amplificación consistió en la siguiente fórmula con un volumen final de 50 μ l: buffer de reacción [1X], dNTPs [0.3mM], oligo 5' [20 pmoles], oligo 3' [20 pmoles], 10 μ l de sobrenadante de colonia, 2 μ l de Taq polimerasa y agua tridestilada estéril cbp 50 μ l. Las condiciones de amplificación en el termociclador fueron: 1 ciclo de 94°C por 3 minutos \rightarrow 94°C por 20 seg; 35 ciclos de 60°C por 30 seg \rightarrow 72°C por 60 seg y finalmente 1 ciclo de 72°C por 10 minutos. Los oligos utilizados fueron: Homo5' (5'-CATGACATCACAGAGCAC-3') y Homo3' (5'-CAGGTAGGTCACCATCAA-3'), con los que se genera un fragmento de 491 pb de la secuencia génica codificante para la producción de la proteína IF3f de humano.

7.3.2 Miniprep por lisis alcalina

Partiendo de cultivos aislados de *E. coli* seleccionados por PCR de colonia se realizó una extracción de ADN plasmídico como sigue: se prepararon inóculos de LB líquido con ampicilina y se crecieron una noche; se colectaron células en microtubo eppendorf de 1.5 ml centrifugando a 8000 rpm por 5 minutos y se descartó sobrenadante. Se resuspendió suavemente la pastilla celular en 1 ml de STE (Sodium Chloride-Tris-EDTA) frío hasta homogenizar y se centrifugó a 8000 rpm por 5 minutos y se descartó sobrenadante. Se adicionó 300 ul de buffer de resuspensión a T.A. (temperatura ambiente) y se resuspendió suavemente hasta homogenizar. Se agregó 300 ul de solución de lisis fresca a T.A., agitando por inversión 3 veces y se dejó reposar por 5 minutos exactos a T.A. Se agregó 300 ul de buffer de neutralización frío, se agitó por inversión 3 veces y se dejó reposar en hielo por 7-10 minutos. Enseguida se centrifugó 15 minutos a 4° C a 13800 rpm y se transfirió el sobrenadante a nuevo vial de 1.5 ml frío, se descartó vial con pastilla de restos celulares. Se centrifugó sobrenadante recuperado 15 min a 4° C a 13800 rpm y se transfirió sobrenadante a un nuevo vial de 1.5 ml frío. Se agregó 0.7 volúmenes de isopropanol a T.A., se agitó suavemente y se centrifugó 30 minutos a 13000 rpm, se descartó sobrenadante. Se lavó pastilla de ADN con 1 ml de etanol al 70% frío, agitando suavemente, se descartó el etanol y se secó pastilla en campana con ventilador. Finalmente se resuspendió la pastilla en agua destilada estéril, se transfirió a nuevo vial y se guardó a -20°C.

7.3.3 Análisis de restricción enzimática

Para caracterizar y así corroborar el ADN plasmídico obtenido de la extracción por lisis alcalina de las células transformadas con pMSG, pRCE053 y pRCE054; una muestra fue digerida en una reacción de volumen final = 20 ul, como se indica a continuación: en un vial de 0.5 ml se mezclaron 2 ul de buffer 10X, un mínimo de 150 ng de ADN en un volumen máximo de 17 ul, 1 ul de enzima BamH1 para pMSG y Nco1 para pRCE053 y pRCE054; se agregó agua destilada estéril cbp 20 ul. La reacción se dejó incubar 4 horas a 37°C.

7.3.4 Midiprep y purificación de ADN plasmídico

Los plásmidos utilizados en las transfecciones fueron extraídos de *E. coli* transformadas preparando inóculos de 30 ml de LB líquido con antibiótico crecidos a 37 °C durante una noche.

Para la extracción se utilizó el Kit de NucleoBond® AX 100 (MACHEREY-NAGEL) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Además se dio un tratamiento al DNA con ARNsa RiboShredder (Epicentre), para obtenerlo libre de ARN, siguiendo las instrucciones del fabricante.

7.3.5 Electroforesis en gel de agarosa.

Todos los corrimientos de ADN fueron realizados horizontalmente utilizando como marcador de peso molecular una escalera de ADN de 1kb (Genecraft) y Buffer de carga 6X (Sambrook y Russell, 1989). Se utilizaron geles de agarosa al 1% disuelta en TAE 1X y con bromuro de etidio a 0.5 µg/ml. La corriente empleada fue de 70-80 volts para detectar bandas específicas y de 100 volts para cuantificar ADN. Los geles se examinaron en un transiluminador de luz UV de Pharmacia Biotech modelo UV-20; fueron fotodocumentados y analizados utilizando el fotodocumentador Chemi-Doc System (Bio-Rad).

7.4 Subcultivos y tratamientos de las líneas celulares

7.4.1 Células en crecimiento

Para mantener en la fase logarítmica de crecimiento los cultivos de A549, se hizo resemebrando de una décima parte cada tercer día en medio MEM suplementado con 10% de suero fetal bovino e incubando a 37°C y 5% de CO₂. Para mantener en la fase logarítmica de crecimiento los cultivos de HepG2 se hizo resemebrando de una quinta parte cada 4 ó 5 días en medio MEM con 10% de suero fetal bovino e incubando a 37°C y 5% de CO₂.

Los subcultivos se realizaron lavando dos veces las células con PBS 1X, desprendiendo las células con tripsina-EDTA 1X a 37°C por 3 minutos y recuperándolas por resuspensión con medio completo.

El porcentaje de viabilidad de los cultivos se determinó por el método de exclusión con azul de tripano, tomando un volumen de las células cosechadas con tripsina y agregando un volumen igual de colorante, con esta mezcla se contaron las células en cámara de Neubauer observando bajo el microscopio (DM IL FLUO, LEICA).

7.4.2 Células quiescentes o en G0.

Para los análisis de cultivos durante G0 a las células se les lavó con PBS 1X y se añadió medio de cultivo MEM con 0.1% de SFB, incubando a 37°C y 5% de CO₂ durante 48 horas para el caso de A549 y para HepG2 por un mínimo de 72 y un máximo de 96 horas .

7.4.3 Transfección transitoria de cultivos por el método de los liposomas.

Los cultivos se prepararon con una población inicial de aproximadamente 7×10^6 células/frasco T-75 y se incubaron 3 horas en el caso de A549 y 6 horas en el caso de HepG2 para su total adhesión al frasco. Antes de transfectar se verificó que los cultivos estuvieran a una confluencia del 90-95%.

Células en crecimiento:

Para A549 se preparó por muestra un vial de complejo OPTI-MEM/ADN y otro vial de LF/OPTI-MEM, ambos con 1.5 ml de medio OPTI-MEM (LF: Lipofectamina2000, Invitrogen). Al vial OPTI-MEM/ADN se le agregó 14 ug de ADN (2 ug/millón de células) y al vial LF/OPTI-MEM se le adicionó 2.5 ul LF/ug ADN incubando 5 min a temperatura ambiente (T.A.). Se mezclaron ambos complejos y se incubaron por 20 min a T.A. El complejo LF/OPTI-MEM/ADN se pasó al cultivo en frasco T-75 cm² con medio completo fresco. Se dejó el frasco incubando en una atmósfera de 37°C y 5 % de CO₂ por 48 horas. La transfección de HepG2 se hizo con 28 ug (4 ug/millón de células) y el tiempo de incubación fue de 96 horas.

Células en G0:

Una vez realizado el protocolo de transfección los cultivos se incubaron por 12 horas en medio completo. Enseguida se hizo el cambio de medio por MEM suplementado con 0.1% SFB, incubando por 48 horas en el caso de A549 y para las HepG2 por mínimo 72 y máximo 96 horas.

7.5 Determinación de la expresión de eIF3f por Western-blot.

Para confirmar el silenciamiento y la sobreexpresión del gen eIF3f en los cultivos celulares se realizó un análisis tipo Western-blot (WB). Las células fueron cosechadas, se lavaron 2 veces con PBS 1X y se lisaron con ProteoJET™ Mammalian Cell Lysis Reagent (Fermentas) siguiendo las instrucciones del fabricante. La proteína se cuantificó por el método de Bradford (Bio-Rad) siguiendo las instrucciones del fabricante. De cada lisado se cargaron 15 ug de proteína para

separarlas por electroforesis en un gel desnaturalizante (SDS page) de poliacrilamida al 10% en gel separador y 5% en gel concentrador, la corrida se realizó a 100 V, 10-15mA, por 2 horas. Enseguida el gel se colocó en buffer Towbin con agitación recíproca por 20 minutos, mientras que por otro lado una membrana de difluoruro de polivinilideno (PVDF) se hidrató en MetOH con agitación recíproca durante 5 minutos, se lavó dos veces con agua tridestilada y se colocó en buffer Towbin con agitación recíproca por 10 minutos. La proteína fue transferida a membrana de PVDF, colocando el gel en un “emparedado” de papeles humedecidos previamente en buffer Towbin que llevó el siguiente orden ascendente dentro de una cámara de transferencia semiseca (Bio-Rad trans-blot SD semi-dry transfer cell): papel criterion, papel Bio-Rad 920, membrana, gel, papel Bio-Rad 920 y criterion, eliminando las burbujas en cada capa. Se limpió el exceso de buffer de la placa de transferencia, se cerró la cámara y se corrió durante 70 minutos a 20 V, 10-15 mA. La membrana se dejó secar por 30 minutos, se hidrató con MetOH, se lavó dos veces con agua y se colocó en TBS 1X durante 5 minutos; el bloqueo se hizo en una solución de leche en polvo sin grasa al 5% (w/v), 0.05% Tween20, disuelto en TBS 1X, durante 2 horas y media a T. A. con agitación recíproca suave. Se incubó la membrana con el anticuerpo primario de conejo contra eIF3f (1:1000 en solución bloqueadora) durante 1 hr en agitación. Después se hicieron cinco lavados de 7 minutos cada uno con TBS-T (TBS más 0.1% de Tween20), con agitación vigorosa. Se incubó la membrana con anticuerpo secundario contra conejo conjugado a peroxidasa (1:5000 en solución bloqueadora) agitando durante 1 hora y se repitió el lavado. Se realizan cuatro lavados de 6 minutos cada uno con TBS-Tween 20 con agitación vigorosa. Se impregnó la membrana con solución de detección del Kit de revelado ECL Plus Western Blotting System (RPN2132, Amersham) que se preparó siguiendo las instrucciones del fabricante. Se incubó por 5 minutos y se fijó sobre egapack dentro del cassette. En cuarto oscuro se colocó film sobre la membrana, cerrando por 5 minutos el cassette. Finalmente se pasó el film a solución reveladora hasta que aparecieron las bandas, se enjuagó en agua destilada, se colocó en solución fijadora por aproximadamente 1.5 minutos y se volvió a enjuagar. El film se secó agitándolo en el aire.

Por otro lado, la membrana se lavó para realizar la inmunodetección con anti-tubulina como control de carga. El lavado se realizó incubando dos veces la membrana en Mild buffer (Glicina 1.5%-SDS 0.1%-Tween20 1%) por 5-10 minutos, con agitación suave cada vez. Enseguida se lavó dos veces con PBS, por 10 minutos cada vez. Se continuó con dos lavados más con TBST

por 5 minutos cada vez. Se dejó secar la membrana y se hidrató con MetOH por 20 segundos, se lavó dos veces con agua y se colocó en TBS 1X durante 5 minutos. El bloqueo y la inmunodetección se realizó como se describe anteriormente, solo que como anticuerpo primario se utilizó anti-tubulina de ratón, diluido 1:1000 (SIGMA) y como anticuerpo secundario se utilizó anti-ratón conjugado a peroxidasa, diluido 1:4000 (Santa Cruz).

7.6 Determinación de colesterol

7.6.1 Extracción de colesterol.

Se cosecharon las células desprendiéndolas con tripsina y se lavaron tres veces con PBS 1X. Todo el desarrollo del procedimiento se realizó en oscuridad. Por cada muestra se prepararon 2 tubos cónicos de 15 ml libres de contaminantes plásticos mediante su agitación con 3 ml de cloroformo cada uno durante un mínimo de 1 hora y media. Se descartó el cloroformo y se añadieron 3 ml de metanol (MetOH) y se agitaron nuevamente por un mínimo 1 hora y media y se descartó el MetOH. Por otro lado, se pesó la pastilla de células cosechadas y se transfirió a uno de los tubos cónicos recién preparados. Esta se resuspendió, por vortex (4 min), en una relación P:V de 1:20 en una mezcla de hexano:isopropanol (3:2). Se agitó a 25 °C por una noche o un mínimo 2 horas. Después se centrifugó a 3000 rpm durante 10 minutos a 4 °C y se recuperó el sobrenadante en el segundo tubo cónico tratado, que se mantuvo a 4 °C. A la pastilla se le volvió a resuspender con otra mezcla de hexano:isopropanol (3:2) en una relación P:V de 1:20, se agitó por 1 hora a 25 °C, se centrifugó a 3000 rpm por 10 minutos a 4 °C y se colectó sobrenadante. Todo el sobrenadante colectado se filtró pasándolo por una jeringa preparada con tres círculos de papel filtro y colectando el filtrado en vial de vidrio ámbar lavado y etiquetado (esto para evitar partículas que puedan tapan el cromatógrafo). Por último, las muestras se concentraron bajo una corriente de nitrógeno gaseoso hasta sequedad a T.A. Las muestras se mantuvieron a 4 °C si ésta se iba a inyectar al cromatógrafo el mismo día o se almacenó a -20 °C hasta el día de su inyección al cromatógrafo. Para su inyección se resuspendió la muestra en 500 ul de cloroformo.

7.6.2 Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas para análisis de colesterol.

La cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC/MS, por sus siglas en inglés) (Agilent) se realizó para la evaluación e identificación del colesterol y compuestos relacionados a este. El fundamento del espectrómetro de masas es ionización por impacto de electrones.

Las condiciones del cromatógrafo de gases fueron una columna HP5 MS de 30 metros x 0.25 mm de diámetro x 0.25 μ m en fase estacionaria, gas helio como acarreador con un flujo de 1 ml/minuto, una temperatura de inyector a detector de 270 y 300 °C, respectivamente. La temperatura inicial en horno de 150 °C por 3 minutos con incrementos de 5 °C por minuto; temperatura final de 278 °C y se mantuvo así por 12 minutos; el tiempo total de corrida fue de 40 minutos. Las condiciones del espectrómetro de masas fueron una presión en la fuente de iones de 50 millitorr y un voltaje de 70 electrovolts; el tipo de fuente de iones utilizada es de impacto de electrones emitidos por un filamento de tungsteno.

Para saber el tiempo de aparición o de retención del colesterol contenido en nuestras muestras en los cromatogramas, se utilizó como referencia el tiempo de retención de un estándar de colesterol puro (SIGMA) y para cuantificar su concentración se realizó una curva con este a diferentes concentraciones (0.0125, 0.025, 0.05, 0.1, 0.2, 0.3 y 0.4 mg/ 100 μ L), de las cuales se inyectó 1 μ L para cada corrida en el GC/MS bajo las mismas condiciones que las muestras analizadas. El área bajo la curva (AUC, por sus siglas en inglés) del cromatograma se graficó con respecto a la concentración inyectada para cada dilución y se obtuvo la ecuación de la regresión lineal, misma que se utilizó para determinar las concentraciones de colesterol en las extracciones analizadas.

7.7 Separación por cromatografía en capa fina.

Los compuestos que no pudieron ser identificados por GC/MS fueron sometidos a cromatografía en capa fina (TLC por sus siglas en inglés) para cuantificarlos, separarlos y aislarlos. Se probaron dos fases móviles: hexano:acetato de etilo:isopropanol:ácido acético (40:20:5:1) y éter de petróleo:éter etílico:ácido acético (90:90:1).

Se utilizó una fase móvil recién preparada con la que se saturó por aproximadamente una hora la cubeta cromatográfica cerrada. Mientras tanto, en una placa para TLC de 20 x 20 cm de

sílica gel con soporte de vidrio (SIGMA), se depositó sobre la línea de carga trazada 1/15 partes de cada muestra distribuida en forma de línea punteada. Se cargaron, con ayuda de una jeringa para TLC (Agilent), dos grupos de muestra, uno para revelar y otro para raspar. Además, también se corrió una referencia de 0.025 mg del estándar de colesterol. Enseguida se introdujo la placa o cromatofolio a la cubeta y de inmediato se cerró. Una vez que la fase móvil alcanzó la línea de frente del solvente se retiró el cromatofolio y se dejó secar por 10 minutos. Se cortó la placa para separar el grupo de revelado, el cual se roció con ácido sulfúrico al 50% y se secó en un horno a 100°C por 20-30 minutos. Después, este grupo se utilizó como referencia para raspar las diferentes bandas generadas de las muestras en la otra mitad de la placa no revelada.

Las muestras que se obtuvieron de los raspados fueron resuspendidas en 1 mL de hexano:isopropanol (3:2), filtradas y secadas bajo corriente de nitrógeno gaseoso. Para su inyección al cromatógrafo se resuspendieron en 33.33 uL de cloroformo, el equivalente a 1/15 parte de la muestra total de origen. Se inyectó 1 ul de la muestra en el GC/MS para analizar lo recuperado. Se propuso que para su identificación estos aislados fueran sometidos a resonancia magnética nuclear (NMR por sus siglas en ingles).

7.8 Determinación de apoptosis.

El porcentaje de apoptosis en los cultivos en crecimiento y en G0 por efecto del silenciamiento y la sobreexpresión fue determinado por tinción con una mezcla de bromuro de etidio:naranja de acridina y microscopia epifluorescente. En resumen, se prepararon placas de cultivo de 24 pozos con una confluencia de aproximadamente el 50%, se transfectaron las células y se incubaron por 24-48 horas. Después las células se lavaron dos veces con PBS 1X y se tiñeron con la mezcla de bromuro de etidio y naranja de acridina a una concentración final de 4ug/ml de cada colorante en PBS 1X. Se agregó solución fijadora (1% formaldehído, 0.2% glutaraldehído) fría, se dejó por 5 minutos a T.A. y se lavó con PBS. Se agregó nuevamente PBS y se contaron las células apoptóticas, necróticas y viable bajo el microscopio epifluorescente (LEICA DM IL FLUO). Las células vivas son identificadas por la forma normal del núcleo en color verde, las células en apoptosis temprana por su núcleo verde colapsado, las células en apoptosis tardía por el núcleo rojo condensado y las células necróticas por el núcleo normal color rojo. Se contaron al menos 400 células por triplicado de cada muestra.

VIII. RESULTADOS

8.1 Obtención de pMSG, pRCE053 y pRCE054.

Los plásmidos fueron extraídos de cultivos de *E. coli* transformados con estos, seleccionados por PCR de colonia y analizados por restricción enzimática, obteniéndose los productos esperados (Fig. 1).

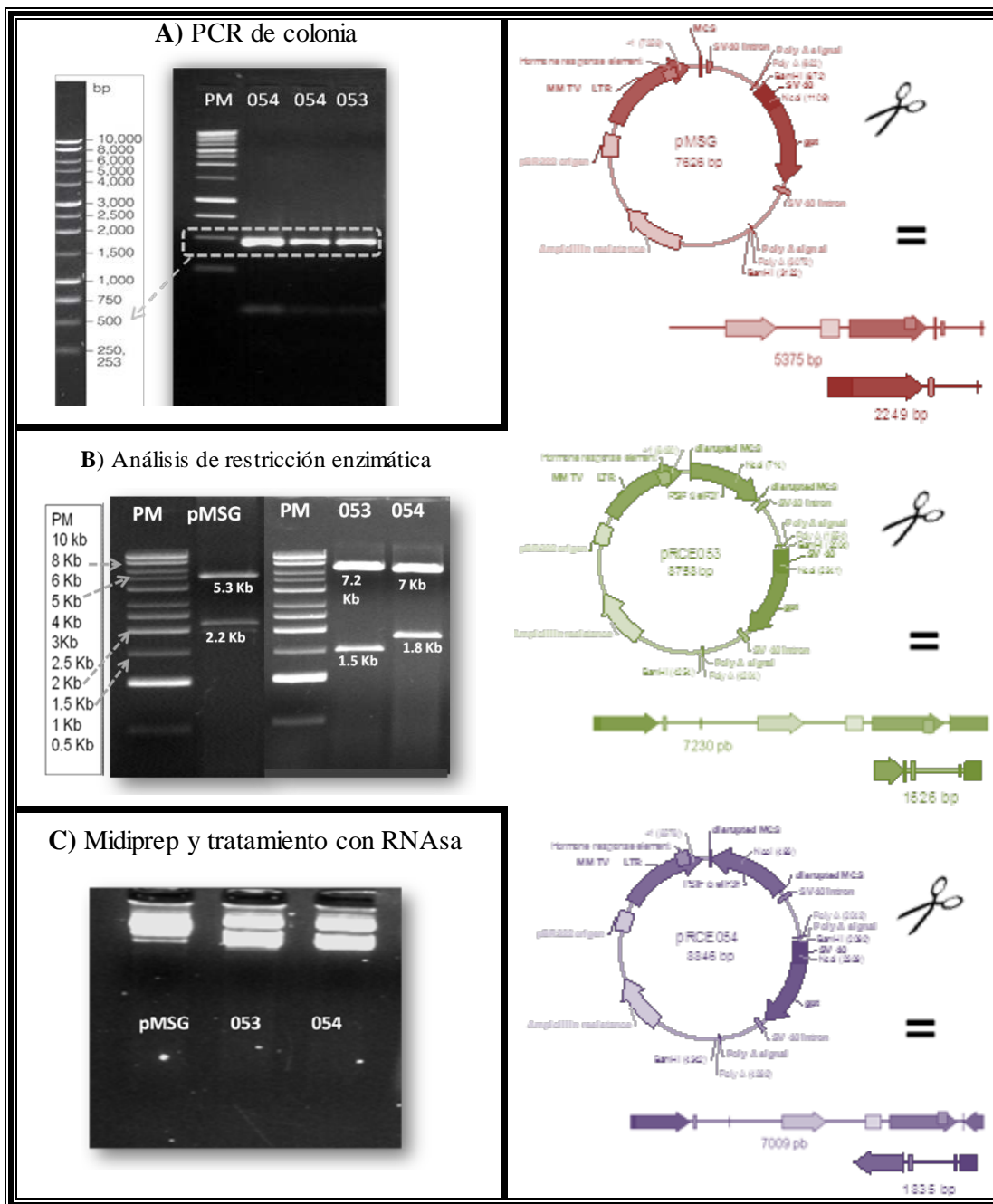


Figura 1. Obtención de pMSG, pRCE053 y pRCE054. A) A células de *E. coli* transformadas con pRCE053 y pRCE054 se les realizó PCR de colonia con los oligos Homo 5' y

Homo 3' cuyo producto de amplificación es un fragmento de 491 pb. B) A las colonias seleccionadas por PCR se les hizo extracción de DNA plasmídico. Se le realizó a cada plásmido un análisis de restricción enzimática: de la digestión de pMSG con BamH1 se obtuvieron los fragmentos de 5.3 Kb y 2.2 Kb; de la digestión con Nco1 se obtuvo para pRCE053 un fragmento de 7.2 Kb y otro de 1.5 Kb; para pRCE054 se generaron también dos fragmentos, uno de 7 Kb y otro de 1.8 Kb. C) Se realizó Midiprep para extraer DNA plasmídico en grandes cantidades, a alta concentración y pureza.

8.2 Expresión de eIF3f en A549 durante la sobreexpresión y el silenciamiento del gen.

Para verificar la sobreexpresión y el silenciamiento de la proteína de eIF3f en los cultivos se realizó un experimento tipo Western Blot. Las células fueron cosechadas, lavadas y resuspendidas en el buffer de lisis ProteoJET™. La proteína recuperada fue cuantificada para cargar en gel de acrilamida 15 ug de proteína de cada muestra para el experimento. Los resultados (Fig. 2) muestran que la expresión de la proteína de la subunidad “P”, comparado con el control pMSG, aumentó en los cultivos transfectados con la secuencia “sentido” del gen (pRCE053) y fue abatida en los cultivos tratados con la secuencia “antisentido” (pRCE054).

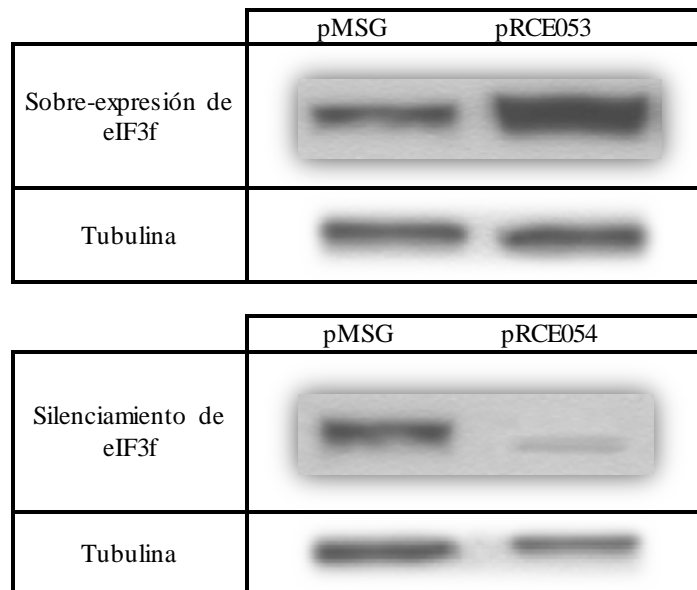


Figura 2. Proteína de eIF3f durante la sobreexpresión y el silenciamiento del gen.

Después de 48 horas de transfección con el vehículo pMSG y los plásmidos con el inserto de la secuencia en “sentido” y “antisentido” de eIF3f para la sobreexpresión y silenciamiento de este, pRCE053 y pRCE054, respectivamente, se cosecharon las células, se lisaron y la misma cantidad de proteína de cada muestra fue cargada a un gel desnaturalizante de poliacrilamida para electroforesis. Para la inmunodetección se utilizó un anticuerpo primario de conejo contra eIF3f y

un anticuerpo secundario contra conejo conjugado a peroxidasa. Para comprobar igual carga de proteína en todos los carriles se utilizó la tubulina como control.

8.3 Identificación y cuantificación en GC/MS del colesterol

8.3.1 Curva de concentración de colesterol.

Como referencia en la cromatografía se utilizó un estándar de colesterol puro, que fue sometido a las mismas condiciones en el GC/MS que las muestras a evaluar. A partir de estos experimentos con el estándar de colesterol se determinó el tiempo de retención a los 32.05 minutos para este lípido, por lo tanto, en ese mismo tiempo se esperó la aparición del colesterol de los extractos de las células con los diferentes tratamientos. Para cuantificar el colesterol recuperado en los extractos celulares, se realizó una curva de concentración utilizando el mismo estándar de colesterol, con el que se prepararon las siguientes diluciones: 0.0125, 0.025, 0.05, 0.1, 0.2, 0.3 y 0.4 mg/ 100 uL, de las cuales se inyectó 1ul para su corrida en el cromatógrafo. La ecuación que se obtuvo fue $y = 8E-09x + 0.0229$ (Fig. 3).

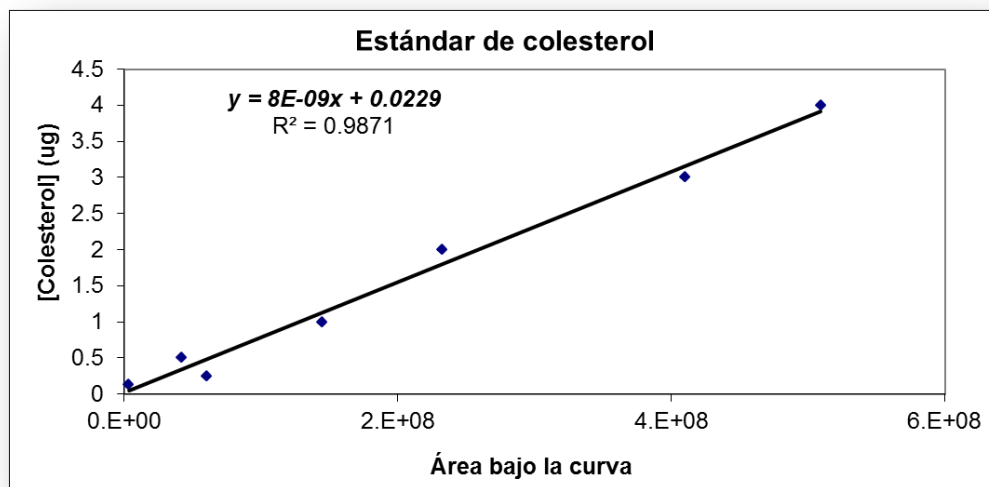


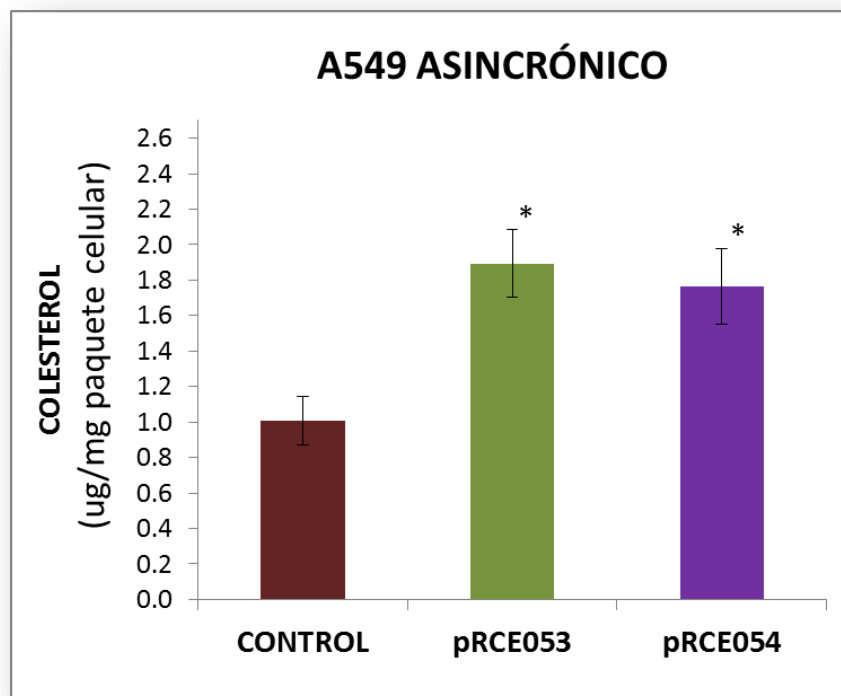
Figura 3. Curva de referencia para cuantificar colesterol. Se prepararon diluciones de colesterol estándar a 0.0125, 0.025, 0.05, 0.1, 0.2, 0.3 y 0.4 mg/100 uL de cloroformo; se corrió 1 uL de cada una en el GC/MS; el área bajo la curva de cada muestra se graficó con respecto a su respectiva concentración y se obtuvo la ecuación con la que se determinó la concentración de las muestras problema.

8.3.2 Análisis de colesterol de células A549 en crecimiento y G0.

Las células en estado proliferativo y en G0, transfectadas con pMSG, pRCE053 y pRCE054, fueron cosechadas. Cada pastilla celular fue resuspendida en una mezcla de

hexano:isopropanol (3:2), realizando una triple extracción a cada muestra. Cada extracto de colesterol obtenido fue secado con nitrógeno gaseoso y resuspendido en 500 uL de cloroformo, de éste volumen se tomó 1 uL para inyectar en GC/MS. De cada condición se realizaron tres experimentos independientes, con el área bajo la curva del pico correspondiente al colesterol se calculó la concentración de este lípido con la ecuación obtenida a partir del estándar de colesterol (Fig. 3), se promediaron los resultados y con fines comparativos se muestran resumidos en la figura 4 y tabla 1. Encontramos que, tanto en el estado proliferativo o crecimiento asincrónico, como en el estado quiescente, la concentración de colesterol incrementó durante la desregulación de eIF3f, sobre todo durante la expresión ectópica o sobre-expresión del gen, con respecto a lo observado en el cultivo control transfectado con sólo el vehículo pMSG (Fig. 4). En los cultivos en crecimiento asincrónico fue donde resultó un mayor aumento con respecto al control con poco más del 87% (Tabla 1); mientras que en el estado quiescente o G0, también durante la expresión ectópica del gen, obtuvimos un aumento de aproximadamente el 72%, con respecto al control (Tabla 1). Sin embargo, independientemente de la desregulación de la expresión de eIF3f, en el estado quiescente la concentración de colesterol por mg de pastilla es mayor que la obtenida en los cultivos en crecimiento asincrónico (Fig. 4). Además fue muy notable la acumulación en más de 20 veces de dos compuestos no identificados, a los que se denominaron A y B (Tabla 1 y Fig. 5), lo cual resultó interesante para nosotros y buscamos identificarlo por otros medios que más adelante se detallan.

a)



b)

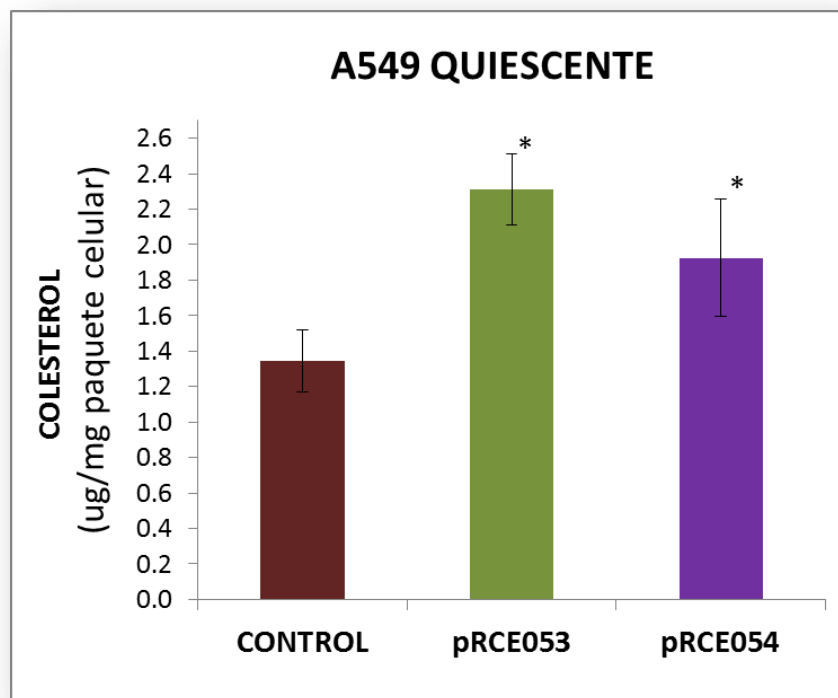


Figura 4. Concentración de colesterol de los cultivos de la línea A549 durante la desregulación de la expresión de eIF3f. Los extractos de colesterol de los cultivos transfectados en crecimiento asincrónico (a) y estado quiescente (b) fueron analizados en el GC/MS. Se determinó la concentración de colesterol con el área bajo la curva de cada muestra de tres experimentos independientes, se promedió y fue expresada como ug de colesterol por cada mg de pastilla celular, comparado con el control. El análisis estadístico de significancia resultó en un valor de $p < 0.05$.

Variación en la concentración de colesterol respecto al control (factor de aumento) en A549						
	Asincrónico			Quiescente		
	Control	pRCE 053	pRCE 054	Control	pRCE 053	pRCE 054
Colesterol	1	1.876	1.75	1	1.720	1.433
Compuesto A	1	1	2.4	1	1	1
Compuesto B	1	1	24.1	1	1	1

Control= pMSG, pRCE053= sobre-expresión, pRCE054= silenciamiento.

Tabla 1. Comparación de los cambios en concentración de colesterol de los cultivos de la línea A549. La variación de los resultados promedio de concentración de colesterol obtenida

por cada mg de pastilla celular, comparado con el control, en estado proliferativo o asincrónico, se muestran ahora resumidos en esta tabla comparativa, expresados en factor de aumento con respecto al control, para lo cual se le asignó el valor de 1 a éste último. Además se muestra el aumento de un par de compuestos no identificados por el banco de datos del CG/MS, a los que se les denominó A y B.

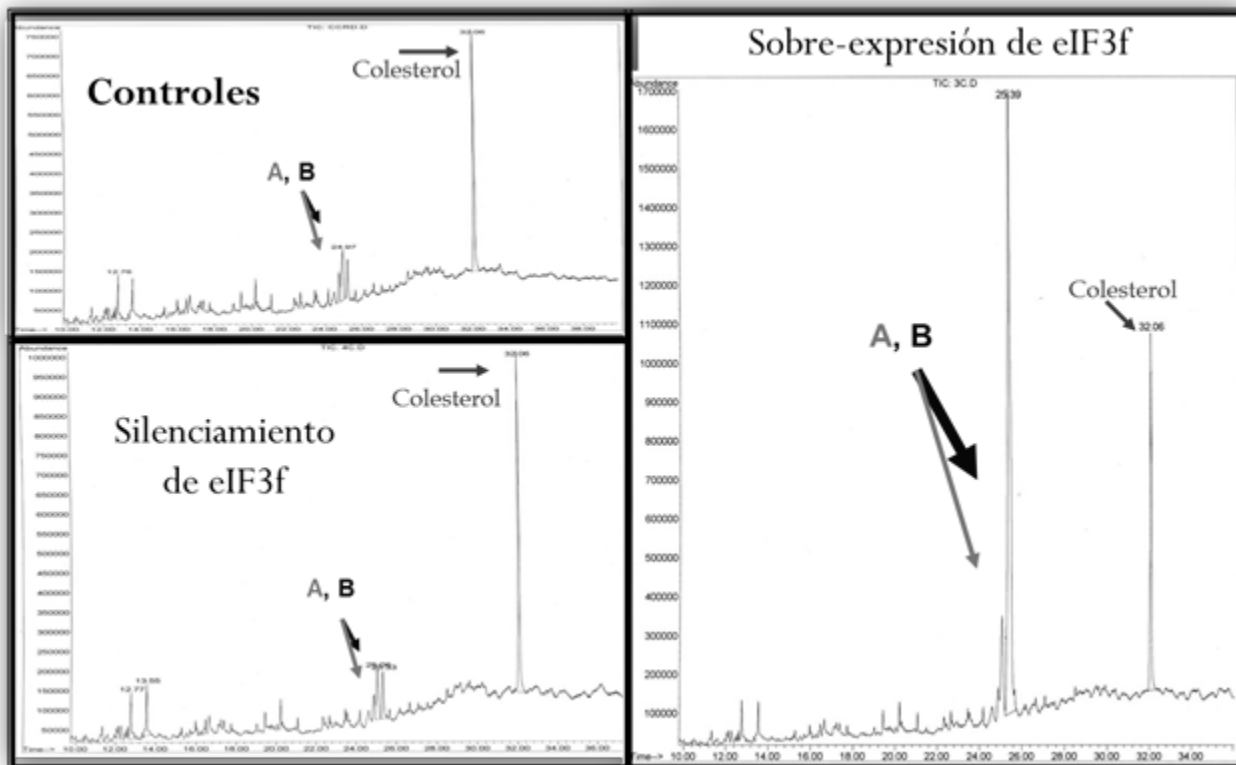


Figura 5. Cromatograma de colesterol extraído de células A549 en crecimiento. Se observó un aumento en la concentración de colesterol de los cultivos en los que se desreguló la expresión de eIF3f comparado con el control, y se hizo muy notable el aumento de otros dos compuestos que no se pudieron identificar en la biblioteca del CG/MS, por lo que se les designó A y B.

8.3.2.1 Identificación de compuestos A y B

Búsqueda con herramientas bioinformáticas.

El patrón de iones de los compuestos A y B generado en el espectro de masas indica que son isómeros entre sí de 27 C, con $PM = 367 \pm 2$. Además, estos patrones de iones de A y B también son muy parecidos al patrón de iones del colesterol cuyo $PM = 386.6$ (Fig. 6), sugiriendo

que son compuestos relacionados al mismo. Esta información se utilizó como parámetro de búsqueda en bases de datos de metabolitos publicadas en la web como “Kegg pathway” (<http://www.genome.jp/kegg/pathway.html#metabolism>), “Pubchem” (<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>), “Reactome” (<http://www.reactome.org/ReactomeGWT/entrypoint.html>), “Lipidomics” (<http://www.lipidmaps.org/>) y “Human metabolome project” (<http://www.hmdb.ca/>). Esta última cuenta con una herramienta útil para identificar compuestos buscando en resultados reportados de GC/MS que se realizaron bajo condiciones específicas, por medio del “índice de retención de Kovats” (IK) y la masa del compuesto a identificar.

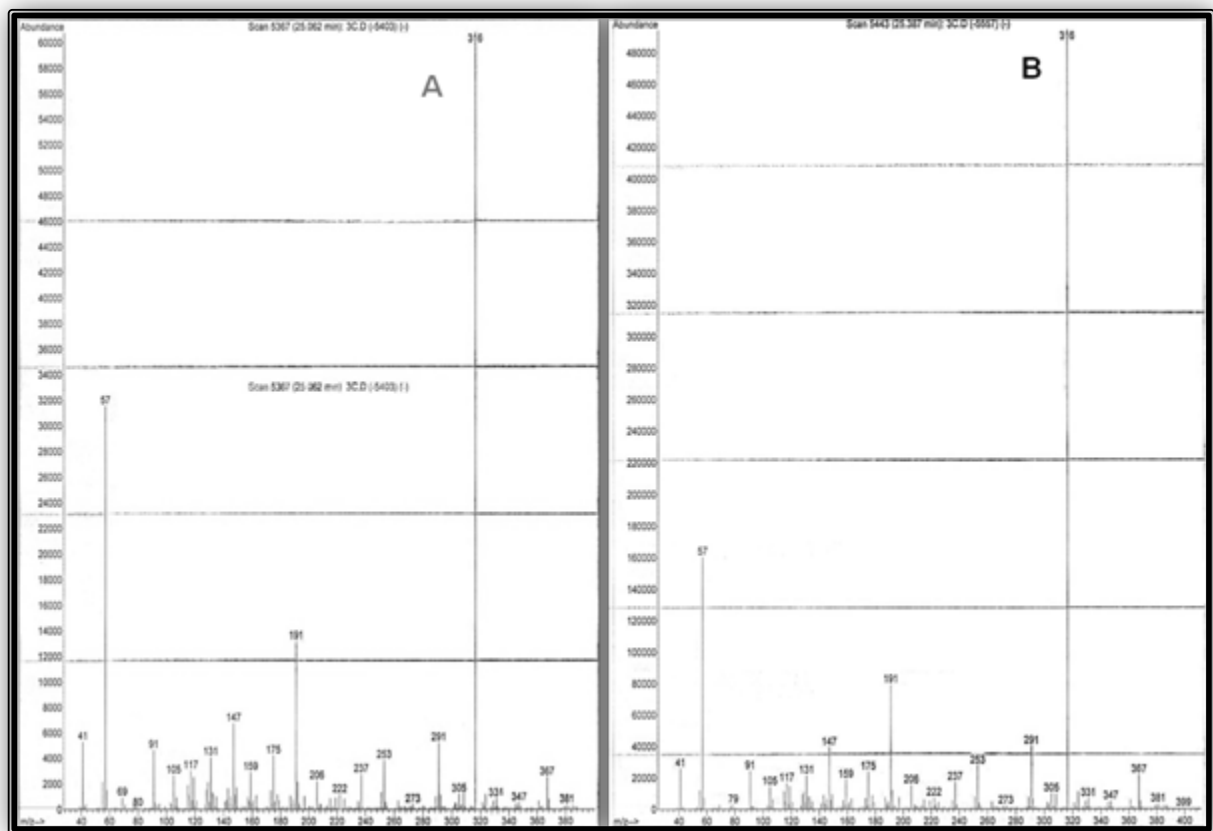


Figura 6. Espectro de masas de A y B. Al comparar los MS de los compuestos A y B nos damos cuenta de que se trata de dos compuestos casi iguales por lo que se plantean como isómeros entre sí.

El IK es un método con el que se relaciona el tiempo de retención en GC y el número de átomos de carbono de una molécula, lo que ayuda a identificar los componentes de una mezcla. Para calcular el IK se corrió una mezcla de hidrocarburos conocida en las mismas condiciones que el de las muestras analizadas; con los valores obtenidos en la columna HP5-M5 se estimó un valor usando como referencia un IK para colesterol obtenido en una columna similar, la DB-5.

Finalmente, con esta herramienta no se pudo identificar a los compuestos A y B, los productos de la búsqueda son de mayor masa, pero se volvió a encontrar una relación con el colesterol (Fig. 7), además es importante recordar que la información obtenida del MS indica que es un compuesto relacionado a este, que pudo perder un grupo funcional.

GC/MS Search

[\[Help\]](#)

Search By	GC/MS Peaklist Data ▾
Retention Index	<input type="text" value="3372"/>
Tolerance for Retention Index (±)	<input type="text" value="200"/>
GC/MS Peaklist (May enter multiple peaks, one on each line) Retention Index + Peak Search example Retention Index + Peak + Parent Mass Search example Range of Retention Index Search example Strict Retention Index Search example Peak Search example	
Tolerance for Peaks (±)	<input type="text" value="1"/>
Parent Mass of Derivatized Compound	<input type="text"/> (Da) [OPTIONAL]

[\[Help\]](#)

GC/MS Search Result

8 results found, displaying 1 to 8

HMDB ID	Common Name	Derivatized Name	Retention Index	P
HMDB00852	Sitosterol	Sitosterol trimethylsilyl ether	3353	4
HMDB00937	Stigmasterol	Stigmasterol (1TMS)	3307	4
HMDB02869	Campesterol	Silane, [[(3á,24R)-ergost-5-en-3-yl]oxy] trimethyl-	3261	4
HMDB00761	Lithocholic acid	2 TMS	3207	5
HMDB02348	Octacosanoic acid	1 TMS	3204	4
HMDB00871	Coprostanone	methyloxime	3204	4
HMDB00032	7-dehydrocholesterol	Silane, [(3á)-cholesta-5,7-dien-3-yloxy] trimethyl-	3202	4
HMDB00067	→ Cholesterol	Cholesterol trimethylsilyl ether	3175	4

Figura 7. Búsqueda en base de datos de “Human metabolome project”. No se pudo identificar a los compuestos A y B, pero se vuelve a encontrar una relación con el colesterol.

8.3.2.2 Separación por TLC

Con el fin de cuantificar, separar y aislar para su identificación los lípidos no identificados con GC/MS, los extractos de colesterol fueron sometidos a TLC. Se cargó en placa para TLC 1/10 ó 1/15 partes del extracto de células en crecimiento para separar la mezcla de lípidos probando dos fases móviles, obteniendo con ambas los mismos resultados (Figura 8). Los compuestos recuperados de las diferentes bandas generadas fueron analizados en GC/MS para evaluar el aislado de los compuestos A y B, lo que no fue posible lograr finalmente porque se presentaron problemas de contaminación con los materiales utilizados para la técnica, que no permitieron detectar claramente si se lograron separar los compuestos A y B. Los resultados obtenidos sólo nos permitieron corroborar el aumento de colesterol durante la desregulación de la expresión de eIF3f.

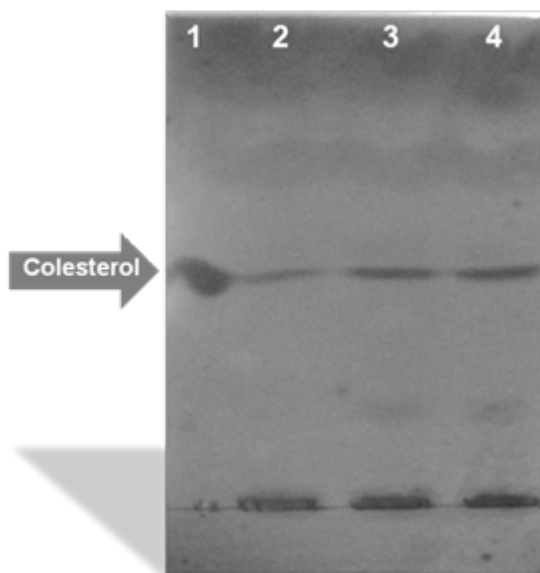


Figura 8. TLC de extractos de colesterol de A549 en crecimiento. La mezcla de lípidos de cada extracto fue separada con dos fases móviles con las que se obtuvieron los mismos resultados. Vemos en los carriles de las muestras problema, que las bandas que migraron a la misma distancia que el estándar de colesterol aumentan su intensidad con respecto al control. En carril 1= 0.025 mg estándar de colesterol como referencia, en los demás carriles se cargó 1/10 parte de cada muestra problema: 2= células control, 3= transfectadas con pRCE053 y 4= transfectadas con pRCE054. Se muestra sólo una de las placas obtenidas de este experimento que se realizó por triplicado.

El análisis de los compuestos A y B nos sugieren la posibilidad de que se trate del colesterol con la pérdida de un grupo funcional. Además, se debe considerar que la línea celular A549 es de origen pulmonar, un órgano que aunque es capaz de sintetizar este lípido, no es el órgano principal en realizar esta función, como lo hace el hígado. Por estas razones, decidimos

trabajar con una línea celular cuyo origen es hepático, la línea celular humana HepG2, estos experimentos se muestran más adelante.

Por otro lado, aprovechando la utilidad del TLC para corroborar de manera cualitativa los cambios en la concentración de colesterol, decidimos hacer el mismo experimento con los cultivos en estado quiescente. Como en el análisis de GC/MS, con los resultados obtenidos en el TLC, de nuevo se hace evidente el aumento en la concentración de colesterol durante la desregulación de la expresión de eIF3f (Fig. 9).

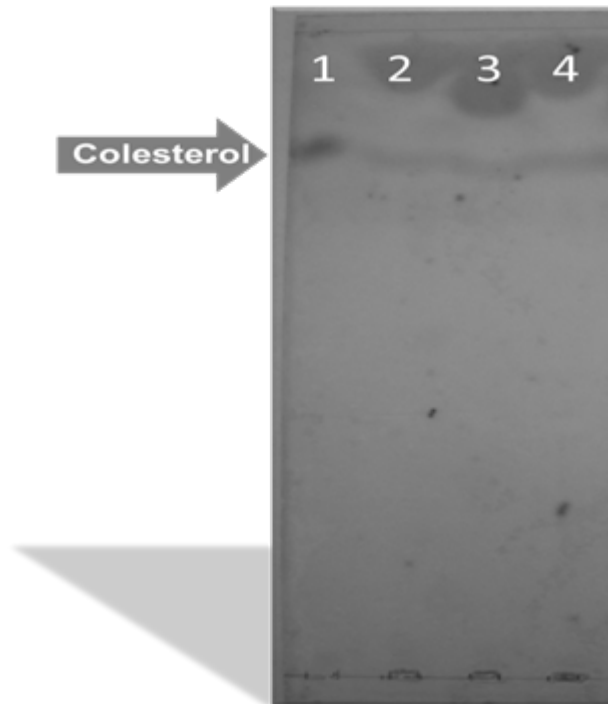
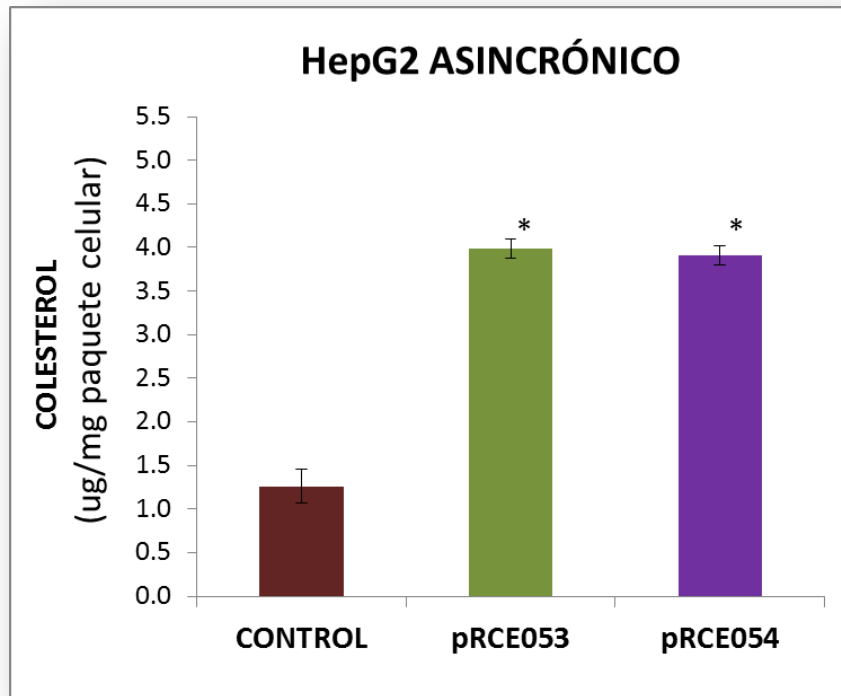


Figura 9. TLC de extractos de colesterol de A549 en G0. Se corrobora el aumento en la concentración de colesterol durante la desregulación de la expresión de eIF3f. Vemos en los carriles de las muestras problema, que las bandas que migraron a la misma distancia que el estándar de colesterol aumentan su intensidad con respecto al control. En carril 1= 0.025 mg estándar de colesterol como referencia, en los demás carriles se cargó 1/10 parte de cada muestra problema: 2= células control, 3= tranfectadas con pRCE053 y 4= tranfectadas con pRCE054. Se muestra sólo una de las placas obtenidas de este experimento que se realizó por triplicado.

8.3.3 Análisis de colesterol de células HepG2 en crecimiento y G0.

Se transfectaron células en estado proliferativo y estado quiescente con pMSG, pRCE053 y pRCE054, después fueron cosechadas y lavadas. Las pastillas celulares recuperadas se resuspendieron en una mezcla de hexano:isopropanol (3:2), realizando una triple extracción a cada muestra. Cada extracto de colesterol obtenido fue secado con nitrógeno gaseoso y resuspendido en 500 uL de cloroformo, de éste volumen se tomó 1 uL para inyectar en GC/MS. De cada condición se realizaron tres experimentos independientes, con el área bajo la curva del pico correspondiente al colesterol se calculó la concentración de este lípido con la ecuación obtenida a partir del estándar de colesterol (Fig. 3), se promediaron los resultados y con fines comparativos se muestran resumidos en la figura 10 y tabla 2. De nuevo, como se observó como en los cultivos de A549 en proliferación y G0, la concentración de colesterol incrementó durante la desregulación de eIF3f en cultivos de células HepG2, sobre todo durante la expresión ectópica o sobre-expresión del gen, con respecto a lo observado en el cultivo control transfectado con sólo el vehículo pMSG (Tabla 2); sin embargo, en los cultivos de HepG2 se obtuvo más colesterol que en A549 (Tabla 1 y 2). La mayor acumulación que observamos en los cultivos de HepG2 nos parece lógico debido a su origen de tejido del hígado, el principal órgano que sintetiza colesterol, esto comparado con A549, cuyo origen es pulmonar. Otro aspecto que fue común en ambas líneas celulares es que la concentración de colesterol es mayor en el estado quiescente que en el crecimiento asincrónico (Tabla 1 y 2). Nuevamente, en los cultivos en crecimiento asincrónico fue donde resultó un mayor aumento de colesterol con respecto al control, triplicándose la concentración de colesterol (Tabla 2); mientras que en el estado quiescente o G0, durante la expresión ectópica del gen se duplicó la concentración y durante el silenciamiento obtuvimos un aumento de aproximadamente el 67%, con respecto al control (Tabla 2). A diferencia de A549, en HepG2 no se observó la acumulación de los dos compuestos anteriormente denominados A y B (Tabla 2); esto junto con los resultados de los TLCs (Fig.11) nos sugiere que estos compuestos son el propio colesterol con la pérdida de un grupo funcional debido a procesos no descritos dentro de las vías metabólicas. Por ejemplo, se sabe que, adicionalmente a los procesos de oxidación del colesterol controlados por sistemas enzimáticos, un organismo recibe del exterior o de forma *in vivo* numerosos productos relacionados con la oxidación no enzimática del colesterol (Antonchick y col., 2007)

a)



c)

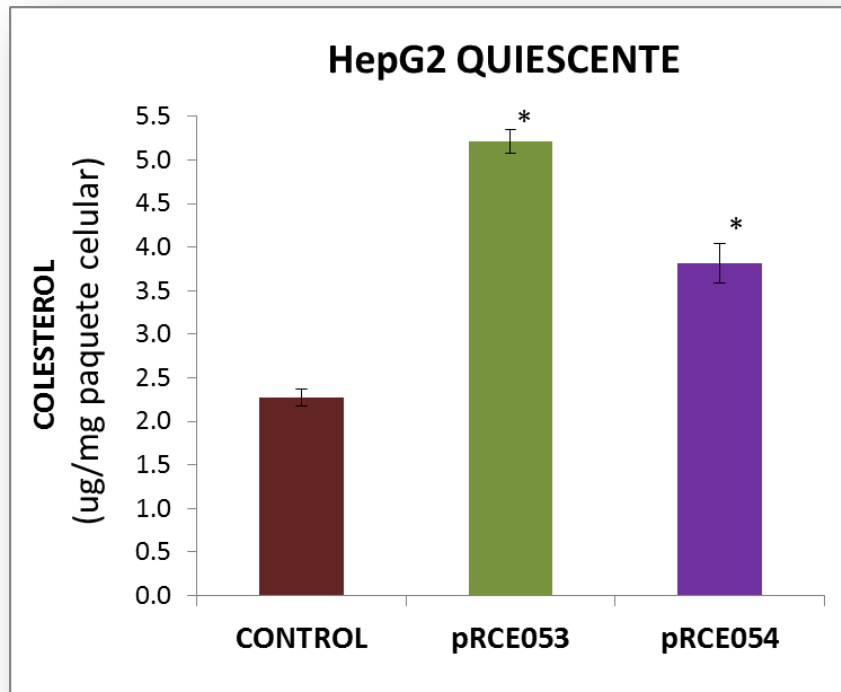


Figura 10. Concentración de colesterol de los cultivos de la línea HepG2 durante la desregulación de la expresión de eIF3f. Los extractos de colesterol de los cultivos transfectados

en crecimiento asincrónico (a) y estado quiescente (b) fueron analizados en el GC/MS. Se determinó la concentración de colesterol con el área bajo la curva de cada muestra de tres experimentos independientes, se promedió y fue expresada como ug de colesterol por cada mg de pastilla celular, comparado con el control. El análisis estadístico de significancia resultó en un valor de $p < 0.05$.

Variación en la concentración de colesterol respecto al control (factor de aumento) en HepG2						
	Asincrónico			Quiescente		
	Control	pRCE 053	pRCE 054	Control	pRCE 053	pRCE 054
Colesterol	1	3.163	3.098	1	2.294	1.679
Compuesto A	1	1	1	1	1	1
Compuesto B	1	1	1	1	1	1

Control= pMSG, pRCE053= sobre-expresión, pRCE054= silenciamiento.

Tabla 2. Comparación de los cambios en concentración de colesterol de los cultivos de la línea HepG2. La variación de los resultados promedio de concentración de colesterol obtenida por cada mg de pastilla celular, comparado con el control, en estado proliferativo o asincrónico, se muestran ahora resumidos en esta tabla comparativa, expresados en factor de aumento con respecto al control, donde el valor del control se designa como 1.

8.3.3.1 TLC

Nuevamente utilizamos la técnica de TLC para verificar por otro método, el cambio de concentración del colesterol en los cultivos tratados. Se cargaron 1/10 parte de cada uno de los extractos de colesterol de HepG2 en crecimiento y en G0, en placa para TLC y se realizó corrida con fase móvil hexano:acetato de etilo:isopropanol:ácido acético (40:20:5:1). Este experimento se hizo por triplicado y se muestra la imagen (Fig.11) de una de las placas obtenidas. Estos resultados corroboran el aumento de colesterol durante la desregulación de la expresión del gen eIF3f, tanto en estado proliferativo como en estado quiescente o G0.

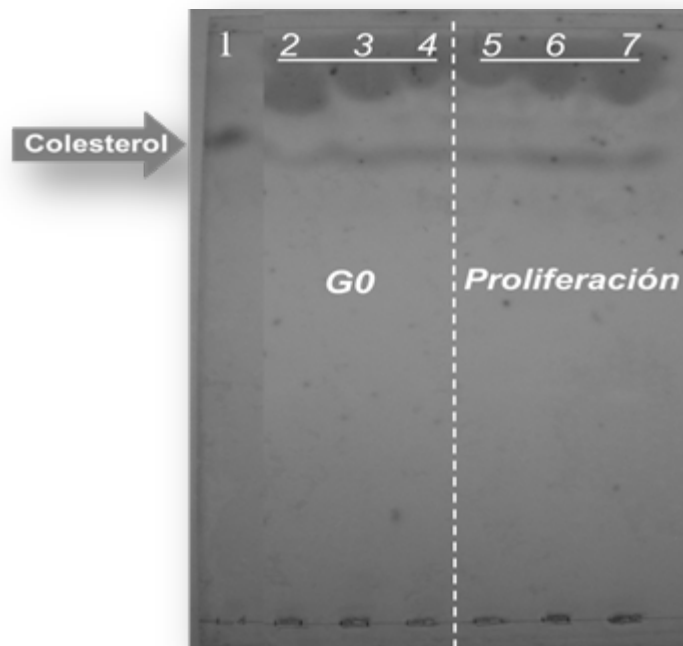


Figura 11 TLC de extractos de colesterol de HepG2 en estado proliferativo y G0. Se corrobora el aumento en la concentración de colesterol durante la desregulación de la expresión de eIF3f. La mezcla de lípidos de cada extracto fue separada con fase móvil Hexano:acetato de etilo:isopropanol:ácido acético (40:20:5:1). Observamos en los carriles de las muestras problema, que las bandas que migraron a la misma distancia que el estándar de colesterol aumentan su intensidad con respecto al control. En carril 1= 0.025 mg estándar de colesterol como referencia, en los demás carriles se cargó 1/10 parte de cada muestra problema: *en G0*, 2= células control transfectadas con pMSG, 3= células transfectadas con pRCE053 y 4= células transfectadas con pRCE054; *en proliferación*, 5= células control transfectadas con pMSG, 6= células transfectadas con pRCE053 y 7= células transfectadas con pRCE054. Se muestra sólo una de las placas obtenidas de este experimento que se realizó por triplicado.

8.4 Evaluación de apoptosis durante la desregulación de la expresión de eIF3f en A549 en G0.

La apoptosis es uno de los efectos reportados de la desregulación de eIF3f durante el estado proliferativo de los cultivos de A549, por lo que se evaluó si sucedía lo mismo durante el estado quiescente. Para este fin, se prepararon cultivos de células transfectadas con pMSG, pRCE053 y pRCE054, en las mismas condiciones de quiescencia que los cultivos utilizados para la extracción de colesterol. Como se puede ver en las microfotografías (Fig.12), no se aprecian de

manera significativa células con una morfología apoptótica o necrótica en los cultivos en los que fue desregulada la expresión de eIF3f ni en el control (pMSG). Por lo que la desregulación de eIF3f no afecta la viabilidad de células en estado quiescente (viabilidad >95%).

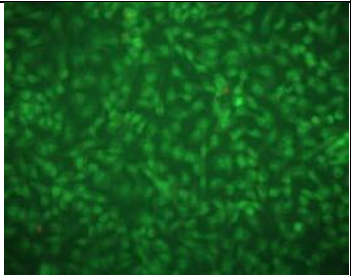
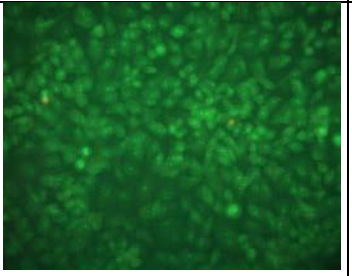
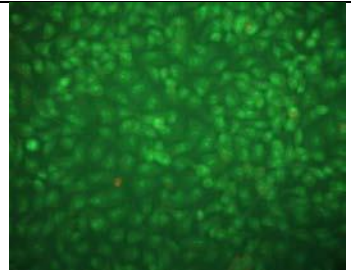
<i>Efecto de la desregulación de la expresión de eIF3f en células A549 quiescente</i>			
G0	pMSG	053 (sobre-expresión)	054 (silenciamiento)
40X			

Figura 12. Determinación de apoptosis en cultivos en estado quiescente o G0. Los cultivos transfectados con la secuencia “sentido” (pRCE053) para la expresión ectópica de eIF3f y “antisentido” (pRCE054) para silenciar la expresión del mismo gen, se incubaron por 48 horas en medio limitado con SFB al 0.1%. Enseguida fueron lavados, teñidos con una mezcla de naranja de acridina y bromuro de etidio, fijados y observados en un microscopio epifluorescente. Las células vivas son identificadas por la forma normal del núcleo en color verde, las células en apoptosis temprana por su núcleo verde colapsado, las células en apoptosis tardía por el núcleo rojo condensado y las células necróticas por la forma del núcleo normal en color rojo. Se contaron al menos 400 células por triplicado de cada muestra.

IX. DISCUSIÓN

Debido a todos los antecedentes que sugerían a eIF3f con implicaciones dentro del metabolismo de lípidos, el objetivo de nuestro trabajo fue aclarar si este gen participa específicamente en la respuesta metabólica del colesterol y plantear cómo es que lo afecta, utilizando como modelo de estudio dos líneas celulares humanas que difieren en la capacidad de síntesis de este compuesto, A549 y HepG2, durante dos momentos fisiológicos en los que la expresión de eIF3f está marcadamente regulada, la proliferación celular donde es altamente inducida y el estado quiescente, donde es abatida. Además, se consideró necesario hacerlo durante dos condiciones en las que se ha comprobado representan un insulto tal que se conduce a las células a apoptosis, el silenciamiento y la expresión ectópica de eIF3f (Higareda-Mendoza y Pardo-Galván, 2010).

Una parte de nuestro primer objetivo fue identificar si en cultivos en estado proliferativo de las células de origen pulmonar A549 había un cambio en la concentración de colesterol como respuesta al silenciamiento del gen eIF3f, como el que se observó en el modelo de regeneración hepática en rata (Cortés-García y col., 2008), y además si sucedía lo mismo durante la sobre-expresión del gen. Los resultados de cuantificar el colesterol extraído de los cultivos usando el área bajo la curva de los cromatogramas obtenidos, nos permitieron determinar que este lípido aumentó en las células tratadas para silenciar y sobre-expresar a la proteína codificada por el gen eIF3f, lo que no sucedió con el control. Lo mismo sucedió en el estado quiescente, pero el aumento en proporción con respecto al control fue menor; lo que sí fue igual en ambos estados fisiológicos es que la mayor acumulación sucedió al sobre-expresar a eIF3f.

La mayor acumulación de colesterol durante la sobre-expresión de eIF3f resultó muy interesante, porque en publicaciones recientes se ha demostrado que eIF3f controla la actividad de la cinasa mTOR por su unión directa a mTOR-raptor (donde raptor es una proteína mediadora que se une a mTOR) y a S6K1 (Csibi y col., 2010). Esta cinasa activa a S6K1 e inhibe a 4E-BP1, lo que lleva a la síntesis de proteínas para que la célula incremente su masa (Csibi y col., 2010). Pero mTORC1, además de regular el crecimiento celular a través de la síntesis de proteínas, regula el crecimiento modulando la síntesis de lípidos dependiente de Akt, ruta de señalización que induce el crecimiento celular a través de la activación del complejo mTORC1 (Porstman y

col., 2008). En células no hepáticas que están bajo la expresión constitutiva de Akt, mTORC1 conduce a la acumulación de las formas nucleares de SREBP1c al promover la escisión de sus precursores. En cultivos primarios de hepatocitos de rata se ha visto que la expresión de RNA mensajeros de SREBP1c es altamente regulada por mTORC1 y además la expresión de muchos genes blanco de SREBP1c, como la acetil CoA carboxilasa y la sintasa de ácidos grasos, son bloqueados por la acción del inhibidor de mTORC1, la rapamicina (Laplante y Sabatini 2010). Con esto se puede sugerir que la proteína eIF3f al estar controlando la actividad de mTORC1 puede intervenir en el mecanismo de la activación de lipogénesis como consecuencia de la activación de mTORC1. SREBP1c activa principalmente la biosíntesis de ácidos grasos, pero se ha demostrado que la acumulación de esta isoforma también es capaz de aumentar los niveles de la HMGCoA reductasa, enzima clave para la síntesis de colesterol (Engelking y col., 2005). Si la sobre-expresión de eIF3f inducida en los cultivos de A549 mantiene la actividad de mTORC1, se mantiene la activación de SREBP1c y sus genes blanco para la síntesis de ácidos grasos y el colesterol, lo que concuerda con el aumento en la concentración de éste último lípido en nuestros resultados, aunque los ácidos grasos no fueron medidos en este trabajo. Adicionalmente al aumento del colesterol encontramos el incremento notable de otros dos compuestos isómeros entre sí, A y B, de los cuales se sugiere la posibilidad de que se trate del colesterol con la pérdida de un grupo funcional debido a procesos no descritos dentro de las vías metabólicas, además se debe tomar en cuenta que la línea celular A549 por su origen de epitelio pulmonar no cuenta con las mismas características que poseen las células especializadas en sintetizar colesterol. Dado que el hígado es el principal órgano de síntesis del colesterol, se consideró necesario e importante el incluir como modelo de estudio a la línea celular humana HepG2, cuyo origen es hepático, para corroborar en un modelo *in vitro* los resultados obtenidos previamente por Cortés-García y colaboradores (2008) *in vivo*, en hígado de rata. La activación sostenida de mTORC1 durante la sobre-expresión de eIF3f, que da como resultado la sobre-expresión de SREBP1c y la activación de la lipogénesis, incluido la síntesis de colesterol, parece explicar satisfactoriamente el aumento de este último compuesto en A549 y en HepG2. Sin embargo, no es así para el efecto del silenciamiento, dado que al suprimirse la expresión de eIF3f no se activa a mTORC1 y por lo tanto a los SREBPs que inducen la lipogénesis, tanto *in vivo* como *in vitro*. El porqué de estos resultados se discuten a continuación.

Se ha reportado que existe una acumulación de grasa en el hígado, principalmente en forma de triglicéridos (TG) y ésteres de colesterol (CE), después de una hepatectomía parcial en rata o ratón (Delgado-Coello y col., 2011), resultados similares fueron los que encontraron Cortés-García y colaboradores (2008) en los hepatocitos de las ratas control después de la hepatectomía parcial. Sin embargo en los animales tratados con la secuencia “antisentido” de eIF3f para el silenciamiento del gen, el lípido que tuvo el mayor aumento fue el colesterol. Además, a diferencia del presente trabajo, Cortés-García y colaboradores (2008) hicieron una evaluación general de ácidos grasos a los hepatocitos de rata, sin observar un cambio en la concentración de estos lípidos durante el silenciamiento de eIF3f. Los resultados que obtuvimos con cultivos de HepG2 en proliferación durante el silenciamiento de eIF3f correspondieron a la acumulación del doble de colesterol como lo observado en los hepatocitos de rata en estado proliferativo al realizar una hepatectomía parcial, y que después fueron tratados para el silenciamiento de eIF3f. En ambos experimentos este aumento fue con respecto a los controles en los que fue utilizado sólo el vehículo. Para explicarlo es necesario recurrir a los resultados reportados por Shimano y colaboradores en 1997, en los que encontraron elevados niveles de expresión de RNA mensajero de SREBP2 y un aumento de dos a tres veces en la cantidad de formas maduras nucleares de SREBP2 en los hígados de ratones jóvenes sobrevivientes que expresaban formas no funcionales de SREBP1. Este aumento de la isoforma SREBP2 correspondió con una alta expresión de RNA mensajero de la HMGCoA sintasa y reductasa, además del nivel elevado en la concentración de colesterol, mientras que la síntesis de ácidos grasos se vio disminuida, por lo que los autores concluyen que la isoforma SREBP2, que preferentemente induce la síntesis de colesterol, es capaz de sustituir a la isoforma SREBP1, que preferentemente induce la síntesis de ácidos grasos, provocando con este reemplazo el aumento del colesterol. Para comprender mejor este resultado es necesario recordar que estudios previos han demostrado que SREBP2, además de esta activación preferencial sobre los genes requeridos para la síntesis de colesterol, resulta ser un activador transcripcional más potente que SREBP1c (Shimomura y col, 1997; Osborne, 2000), por lo que es comprensible que resulte una síntesis excesiva de colesterol en el hígado de estos animales en crecimiento ante la supresión de SREBP1c. Los resultados a los que se llegaron en este trabajo y en el de Cortés-García y colaboradores puede ser explicado bajo esta perspectiva. Tomando en cuenta que durante la regeneración hepática, los hepatocitos y los cultivos de HepG2 en estado proliferativo, se encuentran en un estado fisiológico celular que implica una

mayor demanda de componentes estructurales de membrana, como son los lípidos, aumentará la síntesis de estos compuestos. Si las células se encuentran con una escasez de los componentes estructurales por la falta de activación de SREBP1c debido a silenciamiento de eIF3f, la función de SREBP1c será sustituida por SREBP2, el cual es un activador transcripcional mucho más potente que la isoforma SREBP1c; reflejándose en un aumento del nivel de colesterol.

Tanto el efecto del silenciamiento como el de la expresión de eIF3f nos llevó a un incremento del colesterol, pero el aumento durante el silenciamiento fue ligeramente menor que el que se presentó durante la sobre-expresión del gen. Esta diferencia pudiera ser explicada a través de otra proteína con la que se sabe eIF3f interacciona físicamente, la ubiquitin ligasa TRC8. La posibilidad de que existiera otro factor regulador diferente a INSIG que determina el destino del complejo SREBP/SCAP, distinguiendo entre SREBP1c y SREBP2, llevó a descubrir que TRC8 modula negativamente la activación de SREBP2, disminuyendo el transporte de SREBP2/SCAP por su unión directa a ambas proteínas (Irisawa y col., 2009). En células HepG2 (Irisawa y col., 2009), no se observó la acumulación de las formas nucleares de SREBP1 y de los niveles de RNA mensajero de sus genes blancos como la acetilCoA carboxilasa, pero sí un incremento de la forma nuclear de SREBP2 en respuesta a la privación de esteroides, en células que fueron transfectadas con el vehículo de expresión de TRC8 y en comparación con cultivos control (aun ante la privación de esteroides); durante esta sobre-expresión de TRC8 es donde se ha observado la interacción del mismo con eIF3f, sin saber cuál es la consecuencia de esta interacción (Lee y col., 2010). Estos antecedentes de TRC8 junto con nuestros resultados sugieren que al sobre-expresar a eIF3f se podría estar suprimiendo la actividad moduladora de TRC8 sobre SREBP2, permitiendo una mayor activación proteolítica de este factor transcripcional y por lo tanto aumentando la activación de genes para la síntesis de colesterol, que ya está siendo estimulada por la activación sostenida de SREBP1c mediante mTORC1, que se encuentra en activación constante debido a la expresión ectópica de eIF3f. Entonces, con el silenciamiento de la expresión de eIF3f, se podría estar facilitando la activación moduladora de TRC8, disminuyendo de manera moderada la activación proteolítica de SREBP2, activación se encuentra disparada como consecuencia de la ausencia de SREBP1c, y por lo tanto activando genes para la síntesis de colesterol. Aunque esta explicación parece coincidir con nuestros resultados, se hace hincapié que esto es sólo una sugerencia.

A pesar de que se reconocen funciones diferentes de los SREBPs en el metabolismo lipídico, estas proteínas son procesadas para ser activas por medio de un mecanismo idéntico que involucra a otras proteínas, como INSIG, cuyas isoformas tienen una interacción selectiva con entre SREBP1 y SREBP2 (Yellaturu y col., 2009); con respecto a estos mecanismos selectivos entre un factor transcripcional y otro, para SREBP2 es todavía menos claro de lo que es para SREBP1, el cómo es que otras rutas de señalización pueden intervenir para su activación. La activación de SREBPs con un mecanismo independiente de la concentración celular de esteroides ha sido reportado por diversos grupos de investigación: la apoptosis y el estrés de RE (Colgan y col., 2007; Lee y Ye, 2004; Higgins y Ioannou, 2001; Wang y col., 1996). En células HeLa conducidas a apoptosis con camptotecina, inhibidor de topoisomerasa I, la expresión de la caspasa 3 fue altamente inducida, y en estas condiciones se observó que además de la liberación de los SREBPs del RE estos fueron capaces de activar genes reporteros dirigidos por promotores SRE (Higgins y Ioannou, 2001). Un inductor de la apoptosis en los macrófagos es la acumulación de grandes cantidades de colesterol intracelular libre o no esterificado. Una porción del colesterol libre se acumula en la membrana del RE, la cual es comúnmente pobre en colesterol y muy fluida. Este evento, probablemente por alterar la función de las proteínas integrales de membrana del RE, induce una respuesta de estrés de RE, conocida como respuesta de proteínas no plegadas (UPR, por siglas en inglés). Una parte de la vía UPR, eventualmente lleva a una respuesta apoptótica en los macrófagos (Tabas, 2004). El estrés de RE también ha demostrado ser una circunstancia de activación de SREBPs, esto es a causa de la eliminación de INSIG1 (Lee y Ye, 2004), represor que ha sido encontrado en asociación preferente con SREBP2/SCAP (Yellaturu y col., 2005). A diferencia de la condición apoptótica, durante el estrés de RE la activación proteolítica de SREBP2 y el consecuente aumento de colesterol, no es mediada por el mecanismo de las caspasas (Colgan y col., 2009). Esto es importante porque la desregulación de eIF3f, tanto el silenciamiento como la expresión ectópica del gen, genera tal insulto a las células que conduce a la muerte apoptótica independiente de la vía de las caspasas mitocondriales (Higareda-Mendoza y Pardo-Galván, 2010) y el presente trabajo indican que esta desregulación además es capaz de inducir la acumulación de colesterol. Entonces podemos inferir que durante la expresión ectópica de eIF3f la acumulación de colesterol observada es debido principalmente a la activación sostenida de mTOR que estimula la activación de SREBP1c, sumándose el efecto del estrés de RE que activa proteolíticamente a SREBP2 y la inhibición de TRC8 que permite aumente la

escisión de este factor transcripcional con el correspondiente aumento de colesterol intracelular. Durante el silenciamiento, ante una demanda de lípidos de los cultivos en proliferación y la falta de SREBP1c por la ausencia del activador de mTORC1 (eIF3f), SREBP2 es capaz de sustituir esta carencia aunque con una producción excesiva de colesterol, como resultó en A549 y HepG2, sin que la síntesis de ácidos grasos se vea afectada como se observó en hepatocitos de rata al as 24 horas de la hepatectomía parcial (Cortés-García y col., 2008).

Hasta ahora hemos discutido el aumento del colesterol durante la desregulación de la expresión de eIF3f en los cultivos de A549 y HepG2 durante el estado proliferativo, estado en el que se encontró un factor de aumento del colesterol mayor para el silenciamiento y la expresión ectópica, con respecto a su control. Sin embargo, durante el estado quiescente, la concentración del colesterol extraído de las células fue mayor que la del recuperado en cultivos en proliferación.

La función vital e irremplazable, además de la expresión medida de la subunidad “f” en el estado proliferativo, nos puede llevar a pensar que al interferirlo es comprensible encontrar un desorden de magnitud tal como la que observamos en el aumento del colesterol. Sin embargo, es interesante encontrarlo en el estado quiescente, donde se abate la expresión de la proteína de eIF3. Es importante señalar que se ha indicado que independientemente del estado de crecimiento, el exceso de colesterol debe ser evitado debido a que la formación de cristales con este lípido puede matar a las células (Brown y Goldstein, 1997), pero en nuestros cultivos en G0, esto representó un riesgo vital, ni para A549, ni para HepG2. Con respecto a HepG2, una mayor recuperación de colesterol durante la quiescencia que la proliferación celular, coincide con los datos reportados en hígado de rata y ratón, donde se compara la composición lipídica de este órgano, antes y después de la hepatoctomía parcial (Delgado-Coello y col., 2011). Las células del hígado están normalmente arrestadas en fase G0, fuera del ciclo celular. Sin embargo un diverso rango de estímulos es capaz de inducir aproximadamente al 95% de las células hepáticas a entrar en estado de replicación (G1/S del ciclo celular) en un proceso conocido como regeneración hepática. En rata, durante el estado quiescente del hígado normal la concentración de colesterol en membrana es mayor que el contenido a las 24 horas de la hepatectomía, volviendo a alcanzar casi el mismo nivel una vez que el hígado es restaurado, a las 168 horas (Delgado-Coello y col., 2011). Para evitar el riesgo de la sobreproducción y acumular un exceso de colesterol, las células animales cuentan con mecanismo de regulación homeostática en los pasos de la biosíntesis y

captación del colesterol (Brown y Goldstein, 1997). Además, las células evolucionaron múltiples vías para prevenir la acumulación excesiva de colesterol no esterificado o libre; uno de los mecanismos es la esterificación del colesterol el cual es mediado por la enzima microsomal ACAT (acyl-coenzyme A:cholesterol acyltransferase) y otro es el eflujo del colesterol. La evolución en estos mecanismos refleja los efectos citotóxicos del colesterol en forma libre (Tabas, 2002). Para mantener un apropiado rango de la fluidez de la membrana, es necesario mantener un cociente fisiológico de colesterol libre/fosfolípidos (Tabas, 2002). Debido a la habilidad del colesterol para empaquetarse estrechamente con los ácidos grasos saturados de los fosfolípidos de membrana, su participación es crítica para la formación de las “balsas lipídicas” en la fase ordenada de la membrana (zonas con alto contenido en colesterol y esfingolípidos). Cuando el cociente de colesterol libre/fosfolípidos se eleva por encima del nivel fisiológico las balsas lipídicas pueden ser muy rígidas y los dominios de fase fluida pueden perder su fluidez. Estos eventos afectan adversamente ciertas proteínas integrales de membrana que requieren una libertad conformacional para una apropiada función, la cual puede ser inhibida por un alto cociente de colesterol libre/fosfolípidos. Tales proteínas incluyen constituyentes de la membrana plasmática como la Na^+ - K^+ ATPasa, la adenilato ciclasa, la fosfatasa alcalina, rodopsina y transportadores para glucosa, iones orgánicos y timidina. Se han hecho observaciones similares con proteínas residentes de membranas internas como el transportador de Na^+ - Ca^{2+} en el retículo sarcoplásmico del músculo cardiaco y el transportador de ATP-ADP de la membrana interna mitocondrial (Tabas, 2002). Se ha demostrado que un inductor de la apoptosis en macrófagos es la acumulación de grandes cantidades de colesterol intracelular libre o no esterificado (Tabas, 2004). Por otro lado, en las células claras de cáncer renal se ha encontrado que contienen 8 veces más colesterol total y 35 veces más colesterol esterificado que las que se encuentran en el riñón normal, sin embargo a estas no se les conduce a apoptosis, aun con el aumento del colesterol libre (Gebhard y col 1987). El aumento de colesterol ocurrido en nuestros resultados del estado quiescente, donde no se condujo a las células a apoptosis al desregular la expresión de eIF3f, por un lado nos lleva a preguntarnos si resulta más eficiente la esterificación del colesterol durante esta condición fisiológica que en el estado proliferativo; por otro lado, nos planteamos que el efecto apoptótico que observamos durante el estado proliferativo, ocurre debido a una pérdida de fluidez y de dominios de membrana a causa de la acumulación de un exceso de colesterol en estas estructuras, lo que resulta de mayor riesgo durante el desarrollo del ciclo celular que llevan a

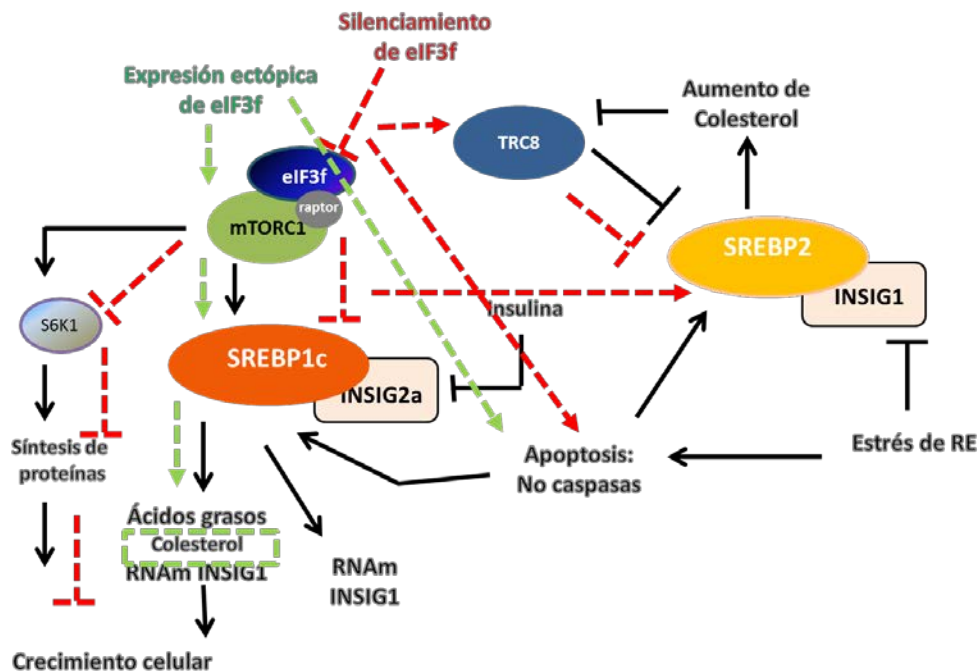
cabo las células en estado proliferativo, un proceso delicado que depende de una estricta coordinación de señales externas (como factores de crecimiento, disponibilidad de nutrientes, etc.) e internas, que se realiza con la participación de diversas proteínas mediadoras, cuya disponibilidad y correcto funcionamiento es imprescindible ocurra en lugar y tiempo debidos. Como se ha referido anteriormente, un exceso de colesterol de membrana puede interrumpir la función de proteínas de señalización que residen en dominios de membrana, como la bomba de sodio y potasio (Tabas, 2002), que además de establecer un gradiente de iones, ha sido reportada como receptor y mediador de señales de transducción (Xie y Cai, 2003) y también ha sido reportado como mediador de señales en el crecimiento dendrítico (Desfrere y col., 2009).

Durante el estado de quiescencia, aparte de que la concentración de colesterol por mg de pastilla celular es mayor que la obtenida en los cultivos en crecimiento asincrónico, las células no fueron conducidas a apoptosis, como efecto de la desregulación de la expresión de eIF3f. En el estado quiescente en el que se reprime la expresión de algunos genes sin que signifique un estado de inactividad de la célula, la represión moderada o estricta de genes como los que son exclusivamente requeridos para el ciclo celular es necesaria puesto que esta condición fisiológica requiere funciones diferentes. Durante este estado fisiológico la expresión de eIF3f es abatida y la desregulación de este gen no es de importancia para la viabilidad celular de A549, como lo es para el estado proliferativo. Sin embargo, como ya se mencionó en los antecedentes, la expresión de este gen en el estado quiescente, inducido por limitación de nutrientes, no desaparece totalmente (Higareda-Mendoza y Pardo-Galván, 2010); lo que sugiere una función diferente pero no menos importante. Con al estado quiescente de células no hepáticas, ya hay un antecedente notable de la función que desempeña e If3f en tal condición fisiológica. El reporte de un estudio realizado en el modelo de diferenciación de células musculares de ratón nos muestra que su participación es imprescindible para que se active a mTORC1 y este a su vez active la síntesis de proteínas para que se lleve a cabo este proceso (Csibi y col., 2010). La sobre-expresión de eIF3f en miotubos diferenciados aumentó las formas hiperfosforilada de S6K1 y de 4E-BP1, blancos de activación y represión, respectivamente, de mTORC1, llevando a la hipertrofia. Mientras que el fenotipo contrario, la atrofia, fue manifestado en los miotubos al silenciarse la expresión de eIF3f. En este modelo de estudio la inducción de la diferenciación utilizado es por una limitación de nutrientes en los cultivos (Csibi y col., 2010), lo cual es relevante señalar, porque en nuestro modelo de estudio, esta limitación de nutrientes es útil para conducir al estado quiescente o G0.

Hasta ahora estos antecedentes nos demuestran que la desregulación de eIF3f genera defectos en los procesos que se llevan a cabo durante el estado quiescente o de diferenciación, efectos que a pesar de la severidad que representan, no conducen a apoptosis.

Con respecto al aumento de los compuestos denominados A y B, que no se pudieron identificar, será interesante determinar su identidad para inferir sobre su origen y que esto nos pueda aportar información que contribuya a un mejor entendimiento de los resultados. Hasta ahora podemos sugerir que se puede tratar del mismo colesterol, pero que perdió un grupo funcional por condiciones que tal vez no implican un proceso celular metabólico definido.

Uno de los objetivos de este trabajo fue proponer un modelo que vincule a eIF3f con la vía de biosíntesis de colesterol que explique los resultados obtenidos. Se propone el siguiente (Fig. 13):



(Csibi y col., 2010; Higareda-Mendoza y Pardo-Galván, 2010; Sato, 2010; Laplante y Sabatini 2010; Lee y col., 2010; Irisawa y col., 2009; Lecomte y col., 2009); Porstman y col., 2008;; Colgan y col., 2007; Engelking y col., 2005; Lee y Ye, 2004; Higgins y Ioannou, 2001; Osborne, 2000; Shimomura y col, 1997; Wang y col., 1996).

Figura 13. Modelo de vinculación de eIF3f en la ruta de biosíntesis del colesterol. La presencia de la proteína eIF3f es necesaria para activar a la cinasa mTORC1 (línea negra) que

regula el crecimiento celular mediante la activación de S6K1 y represión de 4E-BP1, y además la activación a SREBP1c. La expresión ectópica (línea verde punteada) de la proteína eleva la expresión de SREBP1c conduciendo a la acumulación de colesterol y ácidos grasos preferentemente induciendo la expresión de este último. Esta activación es posible mediante mTOR y mediante la represión de un modulador negativo de SREBP2, la ligasa TRC8, que se supone reprimida por eIF3f. Durante el silenciamiento (línea roja punteada), TRC8 es activo para disminuir la activación de SREBP2, pero este mecanismo no es total, además de que se priva de la formas SREBP1c, la cual puede ser demandada por la célula en estado proliferativo o quiescente, llevando a sustituir la función de la isoforma 1c por la forma SREBP2, lo que resulta en una activación preferente de genes para la biosíntesis de colesterol. A ambas vías de desregulación de eIF3f se suma el efecto de activación proteolítica por eventos como el estrés de RE, la apoptosis desencadenada por este estrés y la propia apoptosis inducida por la desregulación de la expresión de eIF3f.

Este trabajo refuerza la teoría de eIF3f como un gen multifuncional y nos vuelve a poner frente a una red de procesos metabólicos que se encuentran estrechamente relacionados, donde el momento fisiológico de la célula es clave para poder estudiarlo y comprenderlo.

X. CONCLUSIONES

- La desregulación de la expresión de eIF3f altera el metabolismo del colesterol en células humanas A549 y HepG2.
- La desregulación de eIF3f en estado quiescente no induce apoptosis en A549. Su función no es vital durante G0.

XI. PERSPECTIVAS

Por las características especiales que posee eIF3f en su patrón de expresión y su clara incidencia en diferentes procesos metabólicos, que tal vez parecieran estar delimitados en rutas estrechas e independientes como la síntesis de proteínas, la síntesis de lípidos y la homeostasis de colesterol, es necesario continuar con un estudio más profundo en el que cada pregunta realizada sea siempre en un contexto fisiológico específico del modelo de estudio, y que además pueda ser controlado. Con respecto a lípidos y para comprender mejor el mecanismo de regulación de su síntesis, sería de mucha utilidad realizar un análisis de los tipos de SREBPs que son expresados en el modelo de estudio en función del estado proliferativo o quiescente durante la desregulación de la expresión del gen eIF3f, y si estas isoformas son funcionales como activadores transcripcionales. Finalmente, confirmar si la mayor acumulación de colesterol observada durante la expresión ectópica se debe a la activación sostenida de mTORC1 y de su blanco SREBP1c, si esta sobre-expresión de SREBP1c corresponde también con un aumento en la síntesis de ácidos grasos, que precisamente por no ser observada durante el silenciamiento de eIF3f en hígado de rata parece ser el mecanismo que lo explique.

XII. BIBLIOGRAFÍA

1. Aravind L, y Ponting CP. 1998. **Homologues of 26S proteasome subunits are regulators of transcription and translation.** *Protein Science* 7: 1250-1254.
2. Antonchik AV, Zhabinskii VN y Khrpach VA. 2007. **Oxysterols: genesis and basic functions.** *Bioorg Khim.* 33(3):297-309.
3. Benyon S y Roach JO. **Lo esencial en metabolismo y nutrición.** Madrid, España.: Elsevier España, 2ª edición, 2003. [Disponible en: http://books.google.com/books?id=2_2REiPzCF0C&printsec=frontcover&dq=Lo+esencial+en+metabolismo+y&hl=es&ei=Bo3LTfejFoPqgQeI18TjBQ&sa=X&oi=book_result&ct=result&resnum=1&sqi=2&ved=0CCkQ6AEwAA#v=onepage&q&f=false]
4. Brown y Goldstein. 1997. **The SREBP Pathway: Regulation of Cholesterol Metabolism by Proteolysis of a Membrane-Bound Transcription Factor.** *Cell* 89, 331–340.
5. Choe SS, Choi AH, Lee J-W, Kim KH, Chung J-J, Park J, Kyeong-Min Lee,2 Keun-Gyu Park, Lee I-K y Kim JB. 2007. **Chronic Activation of Liver X Receptor Induces β -Cell Apoptosis Through Hyperactivation of Lipogenesis.** *Diabetes* 26: 1534-1543.
6. Colgan SM, Tang D, Werstuck GH, Austin RC. 2007. **Endoplasmic reticulum stress causes the activation of sterol regulatory element binding protein-2.** *Int J Biochem Cell Biol.* 39 (10):1843-51.
7. Cortés-García JC, Higareda-Mendoza AE y Pardo-Galván MA Efecto de una secuencia antisentido de eIF3f en la regeneración hepática de la rata (*Rattus norvegicus*). XXVII Congreso Nacional de Bioquímica. 16 – 21 de Noviembre de 2008. Mérida, Yucatán, México.
8. Csibi A, Cornille K, Leibovitch MP, Poupon A, Tintignac LA, Sanchez AM, Leibovitch SA. 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.
9. Delgado-Coello B, Briones-Orta MA, Macías-Silva M y Mas-Oliva J. 2011. **Cholesterol: recapitulation of its active role during liver regeneration.** *Liver International*, 31: no. doi: 10.1111/j.14783231.2011.02542.x

10. Desfrere L, Karlsson M, Hiyoshi H, Malmersjö S, Nanou E, Estrada M, Miyakawa A, Lagercrantz H, El Manira A, Lal M y Uhlén P. 2009. **Na,K-ATPase signal transduction triggers CREB activation and dendritic growth.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 17;106(7):2212-7
11. Dugail I, Le Lay S, Krief S, Farnier C, Lefrere I, Le Liepvre X, Bazin R, Ferre P. 2001. **Cholesterol, a cell size-dependent signal that regulates glucose metabolism and gene expression in adipocytes.** *J Biol Chem* 276:16904 –16910.
12. Engelking LJ, Liang G, Hammer RE, Takaishi K, Kuriyama H, Evers BM, Li WP, Horton JD, Goldstein JL, Brown MS, 2005. **Schoenheimer effect explained-feedback regulation of cholesterol synthesis in mice mediated by Insig proteins.** *J Clin Invest*, 115(9):2489-98.
13. Espenshade PJ. **SREBPs: sterol-regulated transcription factors.** 2006. *Journal of Cell Science* 119, 973-976.
14. Fan H y Penman S. 1970. **Mitochondrial RNA synthesis during mitosis.** *Science* 168 (927):135-8.
15. Fernández C, Martín M, Gómez-Coronado D, Lasunción MA. **Effects of distal cholesterol biosynthesis inhibitors on cell proliferation and cell cycle progression.** *J Lipid Res.* 2005 46(5):920-9.
16. Fritz V y Fajas L. 2010. **Metabolism and proliferation share common regulatory pathways in cancer cells.** *Oncogene* 29 (31): 4369–4377
17. Higareda-Mendoza AE, Farias A, Llanderal J, Méndez A y Pardo-Galván MA. 2003. **A cell cycle and protein synthesis-related factor required for G2/M transition.** *Miami Nature Biotechnology Short Reports* 14: 111.
18. Higareda-Mendoza AE y Pardo-Galván MA. 2010. **Human eukaryotic initiation factor 3f expression oscillates with cell cycle in A549 cells and is essential for cell viability.** *Cell division* 5:10. [Disponible en URL: <http://www.celldiv.com/content/5/1/10>]
19. Higgings ME y Ioannou YA. 2001. **Apoptosis-induced release of mature sterol regulatory element-binding proteins activates sterol-responsive genes.** *Journal of Lipid Research* 42:1939-1946.
20. Irisawa M, Inoue J, Ozawa N, Mori K y Sato R. 2009. **The Sterol-sensing Endoplasmic Reticulum (ER) Membrane Protein TRC8 Hampers ER to Golgi Transport of Sterol**

- Regulatory Element-binding Protein-2 (SREBP-2)/SREBP Cleavage-activated Protein and Reduces SREBP-2 Cleavage.** *The Journal of Biological Chemistry* 284 (42): 28995–29004.
21. Kwok ACM y Wong JTY. 2005. **Lipid Biosynthesis and its Coordination with Cell Cycle Progression.** *Plant and Cell Physiology* 46 (12):1973-1986.
22. Lagirand-Cantaloube J, Offner N, Csibi A, Leibovitch MP, Batonnet-Pichon S, Tintignac LA, Segura CT, Leibovitch SA. 2008. **The initiation factor eIF3-f is a major target for atrogin1/MAFbx function in skeletal muscle atrophy.** *EMBO J* 27 (8):1266-76.
23. Laguna J y Piña-Garza E. *Bioquímica de Laguna*. D.F, México: Editorial El Manual Moderno, UNAM, Facultad de Medicina, 6ª edición, 2007.
24. Laplante M y Sabatini DM. 2010. **mTORC1 activates SREBP-1c and uncouples lipogenesis from gluconeogenesis.** *PNAS* 107 (8): 3281–3282.
25. Lee JP, Brauweiler A, Rudolph M, Hooper JE, Drabkin HA, Gemmill RM. 2010. **The TRC8 ubiquitin ligase is sterol regulated and interacts with lipid and protein biosynthetic pathways.** *Mol Cancer Res* 8 (1):93-106.
26. Fernández C, Lasunción MA, Martín M y Gómez-Coronado D. 2005. **Effects of distal cholesterol biosynthesis inhibitors on cell proliferation and cell cycle progression.** *Journal of Lipid Research* 46 (5): 920-929. DOI 10.1194/jlr.M400407-JLR20.
27. Suárez Y, Lasunción MA, Fernández C, Ledo B, Ferruelo AJ, Martín M, Vega MA y Gómez-Coronado D. 2002. **Differential effects of ergosterol and cholesterol on Cdk1 activation and SRE-driven transcription. Sterol stringency for cell cycle progression in human cells.** *Eur. J. Biochem.* 269 (6), 1761-1771.
28. Lecomte V, Meugnier E, Euthine V, Durand C, Freyssenet D, Nemoz G, Rome S, Vidal H, Lefai E. 2010. **A New Role for Sterol Regulatory Element Binding Protein 1 Transcription Factors in the Regulation of Muscle Mass and Muscle Cell Differentiation.** *Mol Cell Biol* 30(5): 1182–1198.
29. Lee JN y Ye J. 2004. **Proteolytic activation of sterol regulatory element-binding protein induced by cellular stress through depletion of Insig-1.** *J Biol Chem.* 279 (43):45257-65.
30. Melo-Ruiz, V y Cuamatzi-Tapia, O. **Bioquímica de los procesos metabólicos.** Barcelona, España: Reverte ediciones, 1ª edición, 2004. [Disponible en URL:

- http://books.google.com/books?id=2Zy1GulZcScC&printsec=frontcover&dq=Bioqu%C3%ADmica+de+los&hl=es&ei=IYfLTendKsfTgAfMybyABg&sa=X&oi=book_result&ct=result&resnum=3&sqi=2&ved=0CDYQ6AEwAg#v=onepage&q&f=false
31. Morishima N, Nakanishi K, Takenouchi H, Shibata T y Yasuhiko Y. 2002. **An endoplasmic reticulum stress-specific caspase cascade in apoptosis. Cytochrome c-independent activation of caspase-9 by caspase-12.** *J Biol Chem.* 13;277(37):34287-94.
 32. Osborne TF. 2000. Minireview. **Sterol Regulatory Element-binding Proteins (SREBPs): Key Regulators of Nutritional Homeostasis and Insulin Action.** *The Journal of Biological Chemistry* 275 (42): 32379–32382.
 33. Pentchev PG, Comly ME, Kruth HS, Tokoro T, Butler J, Sokol J, Filling-Katz M, Quirk JM, Marshall DC, Patel S, y col. 1987. **Group C Niemann-Pick disease: faulty regulation of low-density lipoprotein uptake and cholesterol storage in cultured fibroblasts.** *FASEB* 1(1):40-45.
 34. Piston DW, Hao M, Head WS, Gunawardana SC y Hasty AH. 2007. **Direct Effect of Cholesterol on Insulin Secretion. A Novel Mechanism for Pancreatic B-Cell Dysfunction.** *Diabetes* 56, 2328-2338.
 35. Poitout V. 2004. **Beta-cell lipotoxicity: burning fat into heat?** *Endocrinology* 145:3563–3565.
 36. Poitout V y Robertson. 2002. **Minireview: secondary beta-cell failure in type 2 diabetes—a convergence of glucotoxicity and lipotoxicity.** *Endocrinology* 143:339 –342.
 37. Porstmann T, Santos CR, Griffiths B, Cully M, Wu M, Leever S, Griffiths JR, Chung YL, Schulze A. 2008. **SREBP activity is regulated by mTORC1 and contributes to Akt-dependent cell growth.** *Cell metab.* 8 (3):224-36.
 38. Porstmann T, Griffiths B, Chung YL, Delpuech O, Griffiths JR, Downward J, Schulze A. 2005. **PKB/Akt induces transcription of enzymes involved in cholesterol and fatty acid biosynthesis via activation of SREBP.** *Oncogene* 24 (43):6465-81.
 39. Sato R. 2010. **Review. Sterol metabolism and SREBP activation.** *Arch Biochem Biophys* 501(2):177-81.
 40. Secretaría de Salud. **Programa Nacional de Salud 2007-2012.** Consulta en línea, 17/07/09. [Disponible en URL: <http://portal.salud.gob.mx/sites/salud/descargas/pdf/pnscap1.pdf>]

41. Shi J, Feng Y, Goulet AC, Vaillancourt RR, Sachs NA, Hershey JWB y Nelson MA. 2003. **The p34^{cdc2}-related Cyclin-dependent kinase 11 Interacts with the p47 Subunit of Eukaryotic Factor 3 during Apoptosis.** *The Journal of Biological Chemistry* 278: 5062-5071.
42. Shi J, Kahle A, Hershey JWB, Honchak BM, Warneke JA, Leona SPL y Nelson MA. 2006. **Decreased expression of eukaryotic initiation factor 3f deregulates translation and apoptosis in tumor cells.** *Oncogene* 25: 4923-4936.
43. Shimano H, Shimomura I, Hammer RE, Herz J, Goldstein JL, Brown MS y Horton JD 1997. **Elevated levels of SREBP-2 and cholesterol synthesis in livers of mice homozygous for a targeted disruption of the SREBP-1 gene.** *J Clin Invest.* 100 (8): 2115–2124.
44. Shimomura I, Bashmakov Y, Shimano H, Horton JD, Goldstein JL y Brown MS. 1997. **Cholesterol feeding reduces nuclear forms of sterol regulatory element binding proteins in hamster liver.** *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94: 12354–12359.
45. Shimomura I, Shimano H, Horton JD, Goldstein JL y Brown MS. 1997. **Differential Expression of Exons 1a and 1c in mRNAs for Sterol Regulatory Element Binding Protein-1 in Human and Mouse Organs and Cultured Cells.** *J. Clin. Invest.* 99 (5): 838–845.
46. Slotte JP, Leppimäki y P, Mattinen J. 2000. **Sterol-induced upregulation of phosphatidylcholine synthesis in cultured fibroblasts is affected by the double-bond position in the sterol tetracyclic ring structure.** *Eur. J. Biochem.* 267: 6385-6394.
47. Stevens A y Lowe JS. **Histología Humana.** Madrid, España: Elsevier España, 3^a edición. 2006. [Disponible en URL: http://books.google.com/books?id=S_NHxeSLJoAC&printsec=frontcover&dq=Histolog%C3%ADa+Humana%2B2006%2Belsevier&hl=es&ei=n4vLTZ_kFonogQf81aDvBQ&sa=X&oi=book_result&ct=result&resnum=1&ved=0CCkQ6AEwAA#v=onepage&q&f=false]
48. Suárez Y, Fernández C, Ledo B, Ferruelo AJ, Martín M, Vega MA, Gómez-Coronado D, Lasunción MA. 2002. Differential effects of ergosterol and cholesterol on Cdk1 activation and SRE-driven transcription. *Eur J Biochem.* 269(6):1761-71.

49. Tabas I. 2004. Apoptosis and plaque destabilization in atherosclerosis: the role of macrophage apoptosis induced by cholesterol. *Cell Death Differ.* 11,Suppl 1:S12-6.
50. Tabas I. 2002. **Consequences of cellular cholesterol accumulation: basic concepts and physiological implications.** *J Clin Invest.* 110(7):905-911.
51. Volpe JJ y Hennessy SW. 1977. **Cholesterol biosynthesis and 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase in cultured glial and neuronal cells. Regulation by lipoprotein and by certain free sterols.** *Biochim. Biophys. Acta* 486: 408-420.
52. Vousden KH y Ryan KM. 2009. **Reviews. p53 and metabolism.** *Nature reviews. Cancer. Macmillan Publishers Limited* 9: 691-700.
53. Reinhart MP, Billheimer JT, Faust JR y Gaylor JL. Subcellular Localization of the Enzymes of Cholesterol Biosynthesis and Metabolism in Rat Liver. 1987. *The Journal of Biological Chemistry* 262 (20): 9649-9655.
54. Wang Y, Monteiro C y Popkin BM. 2002. **Trends of obesity and underweight in older children and adolescents in the United States, Brazil, China, and Russia.** *Am J Clin Nutr* 75: 971-977.
55. Wang X, Zelenski NG, Yang J, Sakai J, Brown MS, Goldstein JL. 1996. **Cleavage of sterol regulatory element binding proteins (SREBPs) by CPP32 during apoptosis.** *EMBO J*, 1;15(5):1012-20.
56. Xie Z y Cai T. 2003. **Na⁺-K⁺--ATPase-mediated signal transduction: from protein interaction to cellular function.** *Mol Interv.* 3(3):157-68.
57. Yellaturu CR, Deng X, Park EA, Raghov R, Elam MB. 2009. **Insulin enhances the biogenesis of nuclear sterol regulatory element-binding protein (SREBP)-1c by posttranscriptional down-regulation of Insig-2A and its dissociation from SREBP cleavage-activating protein (SCAP).SREBP-1c complex.** *J Biol Chem* 284 (46):31726-34.