

00322



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

71

“CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA Y FISIOLÓGICA DE CÉLULAS HL-60 TRANSFECTADAS EN FORMA ESTABLE CON EL cDNA DE LA PROENCEFALINA”

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
B I Ó L O G A
P R E S E N T A :
TANYA MARCELA GONZÁLEZ MARTÍNEZ

DIRECTOR DE TESIS: DR. OSVALDO JORGE VINDROLA ASTI



FACULTAD DE CIENCIAS
U.N.A.M.

2003



FACULTAD DE CIENCIAS
SECCION ESCOLAR

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

A



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

PAGINACIÓN DISCONTINUA



DRA. MARÍA DE LOURDES ESTEVA PERALTA
Jefa de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito:
"Caracterización bioquímica y fisiológica de células HL-60 transfectadas
en forma estable con el cDNA de la proencefalina"

realizado por Tanya Marcela González Martínez

con número de cuenta 09754111-8 , quien cubrió los créditos de la carrera de: Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis
Propietario

Dr. Osvaldo Jorge Vindrola Asti

Propietario

Dra. María Rosa Padrós Semorile

Propietario

Dr. Luis Felipe Jiménez García

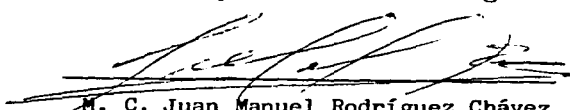
Suplente

Biól. José Aquiles Bernal Moreno

Suplente

Dr. Silvestre de Jesús Alavez Espidio

Consejo Departamental de Biología


M. C. Juan Manuel Rodríguez Chávez

FACULTAD DE CIENCIAS



Where the world ceases to be the scene
of our personal hopes and wishes,
where we enter as free beings,
admiring, asking and observing,
there we enter the real Art and Science.

Albert Einstein

A mi familia: Marcela y Carlos, mis padres, y Karla, mi queridísima hermana,
por lo mucho que me han apoyado, con todo su amor, entrega y cariño,
por estar ahí siempre.

A Esteban,
en honor a tantas y tantas horas que vivimos juntos.
Quiera el tiempo que detrás de cada fábrica de soles estés tú.

A Aquiles,
a salud de las grandes experiencias que hemos pasado,
porque se sumen los años y sigamos reuniéndonos
para mirar a través de un vaso de vino

A mi muy querida UNAM, *abna mater*,
que por medio milenio ha forjado a los hombres y mujeres de nuestro México.

"La adversidad es ocasión de virtud" Séneca

La forma en la que los caminos por los que andamos se entrecruzan y se separan constantemente no deja de sorprenderme. Topamos aquí y allá con los personajes menos esperados y, a veces, tardamos en llegar al encuentro de aquellos que esperamos y en la situación deseada. Muchos años han pasado desde que decidí estudiar esta carrera. Como todo el mundo, he cruzado con un mundo de gente que en mayor o menor grado ha influenciado mi forma de sentir, pensar y percibir esta realidad en la que vivo. Me reconozco incapaz de enumerarlos a todos, por lo que de antemano quiero agradecerles y que me disculpe el tiempo si no les hago la justicia debida.

Para empezar, quiero agradecer a todos los que participaron en la gestación y conclusión de este proyecto. A la Dra. Padrós que con gran paciencia invirtió cerca de nueve meses en el trabajo de clonación de las células y que accedió a dejarme jugar un poco con estas "hijas" suyas. A Dolores Bautista y Lety Terán, quienes iniciaron este trabajo. A Bertha que no sólo me abrió las puertas de su casa, sino las de su amistad. A Silvia, quien con sus agradables pláticas me hizo reflexionar no sobre ciencia, sino sobre las experiencias en la vida. A María (¡mi más sincera felicitación!) e Inés, por dedicar parte de su tiempo a mostrarme las técnicas. A Ariadna y Amparo, por la buena charla. Y, de nuevo, mi más grande agradecimiento a Osvaldo, director del laboratorio y de este proyecto, por abrirme las puertas, por los kilos de paciencia que seguramente tuvo que irse a conseguir conmigo, pero sobre todo, por aquél o aquellos de quienes se haya formado esa concepción de La Ciencia.

Hubo, además de los integrantes del laboratorio, una buena cantidad de gente que me apoyó durante el proceso. Agradezco especialmente a mis revisores de tesis, que, a pesar de la premura revisaron cuidadosamente este trabajo. Al Centro de Informática del Departamento de Biología y al despacho de Caro y Teo por su apoyo técnico, y a las señoritas de la Sección Escolar por agilizar los trámites. A Javier (Chapu) por recibirme en su casa en Puebla los últimos meses, a Ave por esos buenos ánimos y a Salvador.

Con todo mi cariño agradezco profundamente a mi familia. A Marcela y Carlos, mis padres, por su cariño y amor incondicional, simplemente gracias por TODO lo que me han dado y lo mucho que siempre me han apoyado. A Karla (Keh), mi queridísima hermana, por un millón de cosas, pero en especial por soportarme tantos años. Al resto de mi familia: mi abuela Charis, mis abuelos Yeny y Meme, los Trejo, los Vaca, y todos los del lado de los Martínez: en especial los Espinosa y los Mora.

Enumerar a toda aquel con quien me he topado sería imposible, sin embargo hay algunos que sería difícil no mencionar: A Esteban. Gracias por todo tu cariño y comprensión, por estar siempre ahí y en honor a tantas y tantas horas que vivimos juntos. Y a todos tus amigos, porque son grandes. A todos mis grandes amigos de escuela y de la vida: A Aquiles, por que has sido como mi hermano mayor y el mejor amigo. A Norma, por esos innumerables cafés (y compras), plática tras plática. A los buceitos, mis siempre amigos, estemos donde estemos: Candela, Julio y Jonathan; y a Mariana, Ramón, Angel y Alex R. A Arturo, Héctor, Manuel, Emmanuel, Paola, y Rodrigo. A mis amigas de la Facultad, Nidia y Reyna. A los de la Universidad: Sergio, Erick L, Luis S, Alex F, Enrique P, Laura W, Érik, Odette, Jéssica, Jethro y Emilio. A Nadinne, mi amigocha tras del charco y a Luis Lorea y amigos, por supuesto. A los logoítas: Carlos O., Carlos Romo, Mónica, Paola, Myriam y Nayeli. A mis amigos de campamento. Los de antes: Gaby, Paola, Giselle, Nimena, Yari, Iliana, Haydeé, Olivia, Chus y todos aquellos que se me puedan olvidar ahora, después de tantos años. Y los de después: Gaby, Radoni, Juan, Gisela, y a Rubén, Fernanda, Karly y los del 88 (aunque algunos no lo crean). Tampoco olvido a todos los de las reuniones del G-H-M, que han formado parte de mi vida. A todos mis amigos e instructores de los cursos de buceo, inglés, francés y fotografía, que harían una larga lista. Muchos de ellos saben lo que representó hacer esta tesis.

Agradezco las horas de trabajo a los compañeros de clases con quienes me formé y especialmente a mis maestros por esa bendita vocación de enseñar. En orden de aparición: De La Activa: a las Patys, Pily, Violeta y Enrique. De Logos: a Oscar Pineda (quien es, en buena parte, responsable de mi decisión de estudiar Biología), a Sergio, Ángel, Oscar Chávez, Marcela, Imelda, Zoila, Pily, Salvador, Gabriel Robert, Sara e incluso a Martín. De La Universidad: Armando Gómez, Arturo Becerra, Ceci V., Irene Pissanty, Jaime Jiménez, Ken Oyama, Leo G., Lidia León, Luis Medrano, MA Meneses, MA Palomino, Margarita Villegas, Memo Salgado, Octavio Rojas, Oscar Flores, Rita Arenas, Toño Lazcano; así como a Román V. y los integrantes del laboratorio BL-102 del IFC. A Pedro García y Rodolfo Dirzo por su consejo y su tiempo. A Rose Mary Smith y Rick Williams, Kelly Agnew, Billy Barr, Andrea Encalada, Neo, Brett Woods, Dirk Van V., Tammy Filiater, Chessie Tacher, Trebesh, Olivia LeDee, Érika Alfaro, Elizabeth Deliso, Érika Mudrak, Maria Piantek, Kirsten Bovee, Jenny, Lucero Sevillano y Mathew Danielczyk, del RMBL, Col. Y a quien se me pudiera estar olvidando en este momento.

Finalmente, agradezco a mi Facultad, Ciencias, y a la UNAM, mi *alma mater*, y a mi querido México, país de gran riqueza y diversidad, con gran potencial y con la esperanza de materializar lo mucho que queda por hacer.

Gracias a todos por demostrarme que tomar las riendas del propio destino es una buena filosofía de vida. ☺

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ÍNDICE

Contenido	Pag.
RESÚMEN	1
ABREVIATURAS	2
INTRODUCCIÓN	
Opioides y opiáceos, antecedentes históricos	3
Biosíntesis de neuropéptidos	7
Identificación de péptidos opioides	11
La proencefalina (PENK)	12
Regulación de la expresión del gen de PENK	13
Distribución tisular de la proencefalina	16
Participación de la proencefalina v/o sus péptidos derivados en el proceso de proliferación celular	17
Péptidos opioides del sistema inmune	17
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	19
HIPÓTESIS	21
OBJETIVOS General y Particulares	22
METODOLOGÍA	
• Diagrama de trabajo	23
• Expansión y mantenimiento de los clones transfectados y de las células HL-60 silvestres	23
• Diferenciación a neutrófilo de las células HL-60 silvestres	24
• Diferenciación a macrófago de las células HL-60 silvestres	24
• Selección de HL-60 para los estudios bioquímicos y de inmunocitoquímica	25
• Aislamiento del RNA total	25
• Transcripción inversa (RT)	26
• Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	27
• Preparación de extractos celulares	29
• Determinación de la concentración de proteínas	29
• Electroforesis en gel de poliacrilamida e inmunoelectrotransferencia	29
• Cuantificación de los péptidos derivados de la proencefalina por radioinmunoensayo (RIA)	31
• Inmunocitoquímica	35
RESULTADOS	
1. Cultivo y expansión de los clones de células HL-60 transfectadas en forma estable con el cDNA de la proencefalina	36
2. Expresión del gen de la proencefalina en la línea celular HL-60, efecto de la diferenciación celular	37
3. Determinación de la presencia del RNAm de la proencefalina proveniente de la transcripción del cDNA transfectado en forma estable en los clones de células HL-60	39
4. Caracterización de los péptidos derivados de la proencefalina en los clones de HL-60 por inmunoelectrotransferencia	40
5. Cuantificación de los péptidos derivados de la proencefalina por radioinmunoensayo	43
6. Localización subcelular y subnuclear de la proencefalina por inmunocitoquímica	43
DISCUSIÓN DE RESULTADOS	46
CONCLUSIONES	48
BIBLIOGRAFÍA	49

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

RESUMEN

Desde el descubrimiento de las encefalinas en el año 1975, se han dedicado largos años de investigación al estudio de los péptidos opioides. En un principio se analizó su papel en el sistema nervioso como neurotransmisores, neuromoduladores y factores tróficos. Posteriormente, al ser encontradas en células del sistema inmune al igual que en tejidos en desarrollo, se sugirió su intervención tanto en la inmunoregulación como en los procesos de proliferación y diferenciación de algunos tipos celulares. La proencefalina (PENK), proteína precursora de las encefalinas, es una molécula de 27 kDa cuya secuencia está altamente conservada entre especies animales muy distintas. Un dato importante, es que en todos los tejidos embrionarios, a pesar de que los altos niveles del mRNA de la PENK, y de su producto de traducción, no se producen las encefalinas. Las investigaciones realizadas sobre los péptidos opioides y el desarrollo tisular durante los últimos diez años consideraron siempre a la PENK como un mero precursor proteico, siendo las encefalinas liberadas al medio extracelular las responsables de los efectos sobre los procesos de proliferación y diferenciación.

Sin embargo, existen estudios recientes que sugieren que la molécula de la PENK *per se* participa en la regulación del ciclo celular. Entre las evidencias que sustentan esta idea están: 1) se observó a la PENK intacta en el núcleo de células mesenquimáticas, y su localización intranuclear difirió dependiendo de la etapa del ciclo celular en que se encontraban dichas células; 2) en fibroblastos embrionarios de ratón, se comprobó la presencia de un mRNA de PENK que no contiene la secuencia que codifica para el péptido señal y las proteínas que produjo este mensajero, específicamente aquellas de 34-32 kDa, se localizaron en el nucleoplasma y los nucleolos; 3) la molécula de la PENK posee dominios de unión al DNA y una secuencia rica en aminoácidos ácidos que recuerda a la de ciertas proteínas nucleares relacionadas con la transcripción de genes; y 4) la transfección permanente y transitoria de un cDNA de la PENK que no contiene la secuencia que codifica para el péptido señal produjo un aumento significativo en los niveles de PENK citoplásmica y nuclear e indujo un incremento en la proliferación celular. 5) fibroblastos de ratón transfectados en forma estable con un cDNA antisentido de la PENK (knockout) mostraron una reducción en la proliferación en cultivo y su ciclo celular se detuvo en la transición entre las fases G1/S. A pesar de todos estos hallazgos, el papel que juega la PENK en el núcleo no ha sido completamente esclarecido.

Por otro lado, el RNAm de la proencefalina se ha encontrado en células tumorales y además ciertos tipos de tumores poseen la proencefalina nuclear. Las leucemias, son las células tumorales sobre las que más se ha trabajado en el laboratorio, analizando el papel de la proencefalina en los procesos de proliferación y diferenciación celular. La línea celular HL-60, proviene de una leucemia promielocítica humana y presenta altas concentraciones de PENK en los nucleolos. Contrario a los resultados obtenidos en fibroblastos de ratón, en estas células, la transfección transitoria del segmento denominado PLBC-1 (un cDNA construido en el laboratorio que contiene solamente el exón III de la PENK de ratón, y por tanto carece de la secuencia para el péptido señal) no tuvo efecto sobre la proliferación. Sin embargo, esta ausencia de respuesta podría deberse a que se necesitaban altos niveles de expresión de la PENK nuclear en forma constante. Por esta razón en el laboratorio se generaron clones de células HL-60 transfectadas en forma estable con el cDNA antes mencionado. Este trabajo de tesis forma parte de un proyecto global del laboratorio y tuvo por objeto establecer algunas de las características bioquímicas de estos clones. Se realizó además un estudio comparativo con células HL-60 silvestres diferenciadas a neutrófilo o macrófago, en las cuales se analizó el mRNA de la PENK, por una reacción en cadena de la polimerasa acoplada a transcripción inversa (RT-PCR), y los péptidos derivados de la PENK (PDPs) por inmuno-elektrotransferencia (Western-Blot).

Los datos mostraron que la diferenciación celular aumentó los niveles del mRNA de la PENK y de los PDPs. Como ha sido ampliamente reportado, la diferenciación celular inhibe la proliferación, el mismo resultado se había encontrado en el laboratorio en los clones de las células que contenían en forma estable el construido PLBC-1; lo que sugirió que se deberían producir cambios bioquímicos similares. Para comprobar esta hipótesis, se caracterizaron cinco clones que habían presentado diferentes porcentajes de inhibición de la proliferación celular. La transcripción del cDNA transfectado se comprobó mediante RT-PCR, se cuantificaron los péptidos derivados de la PENK (PDPs) por radioinmunoensayo (RIA) y electroforesis en gel seguida de inmuno-elektrotransferencia, y se estudió la localización subcelular y subnuclear de la PENK y los PDPs por medio de inmunocitoquímica. Estos resultados mostraron que la disminución en la proliferación celular inducida por la diferenciación a neutrófilo, o por la transfección en forma estable del PLBC-1 produce un aumento en los niveles de la PENK nuclear de 34-32kD. Además, comprobamos que la inmunoreactividad del núcleo se localiza fundamentalmente en los nucleolos. Estos resultados son opuestos a los observados en células no transformadas en cultivo, como las de origen mesenquimático, lo que sugiere un efecto inhibitorio específico, al menos en este tipo de células tumorales, donde podría actuar como un supresor de esta actividad.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ABREVIATURAS

cAMP	Monofosfato cíclico de adenosina
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementario
DMSO	Dimetil sulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DTT	Ditionitrotol
H ₂ O-DEPC	Agua tratada con dietilpirocarbonato al 0.1%
kDa	Kilodaltones
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
pb	Pares de bases
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos salinos
PC	Proteínas convertasas
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDPs	Péptidos derivados de la proencefalina
PDP-As	Péptidos derivados de la proencefalina A
PENK	Proencefalina
PENK-A	Proencefalina A
RIA	Radioinmunoensayo
RNA	Ácido ribonucleico
RT	Reacción de transcripción inversa o Enzima reverso transcriptasa
SBF	Suero bovino fetal
SYN	Sinencefalina
TPA	Acetato de 12-O-13 tetradecanoilforbol
TRIZOL	TRIZOL® Reagent (contiene fenol)

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

INTRODUCCIÓN

Los opiáceos son alcaloides de origen vegetal caracterizados por su efecto narcótico, cuya actividad se puede inhibir e incluso revertir por un antagonista de la morfina. Trabajos realizados al inicio de la década de 1970 demostraron la existencia de compuestos similares a la morfina, opioides de naturaleza proteica, en el cerebro de los mamíferos. Desde entonces se han identificado 25 péptidos opioides diferentes en el sistema nervioso de mamíferos, todos ellos derivados de tres genes distintos que codifican para los precursores opioides: la pro-opiomelanocortina, la pro-enkefalina y la pro-dinorfina.

Inicialmente se estudió el papel de estos péptidos como neurotransmisores y neuromoduladores en el sistema nervioso e, inclusive, como factores tróficos. Trabajos posteriores en los que se reportó su presencia en tejidos en desarrollo de origen endodérmico, mesodérmico y ectodérmico, así como su expresión en células del sistema inmune, han aportado evidencias importantes que sustentan la intervención de los péptidos opioides tanto en la inmuno-regulación, como en los procesos de proliferación y diferenciación de algunos tipos celulares (rev. en Bautista, 1997).

Opioides y opiáceos, antecedentes históricos



FIGURA 1. Esquema de la Amapola *Papaver somniferum* de la que se extrae la sustancia conocida como opio (2).

La planta *Papaver somniferum*, una de las más de 500 especies de amapola o ababo, produce unas semillas pequeñas de un milímetro de diámetro alojadas en un fruto seco de forma capsular (**Fig. 1**). De las cápsulas en su estado semimaduro, se extrae una sustancia conocida desde tiempos inmemoriales: el *opio*, savia desecada o látex de color blanco y pegajoso, mezcla compleja de más de 70 alcaloides, resinas, carbohidratos, grasas y muchas otras sustancias entre las que destacan unos 25 componentes activos, cuyos derivados se emplean en las industrias farmacéutica, alimenticia, de pinturas y de jabones, entre otras (1).

El opio ha sido uno de los compuestos más utilizados para disminuir o eliminar el dolor. Se sabe que en algunas zonas de Asia su uso se conocía desde el s. VIII a.C. Durante los siglos X al XIII de nuestra era, los comerciantes Arabes lo introdujeron en Asia menor y Europa, al establecerse la ruta del tráfico de seda. En la India, su introducción parece haber estado estrechamente relacionada con la difusión del Islam (2). En los años siguientes, la costumbre de fumar opio se propagó por Turquía, Egipto, y Europa (especialmente por Alemania e Inglaterra).

Más tarde, los trabajadores chinos empleados durante la construcción del ferrocarril de San Francisco, que inició en 1851, lo introdujeron por primera vez al continente americano. A lo largo de la historia, el mercado del opio fue causa del establecimiento de importantes rutas mercantiles, guerras y embargos económicos, tales como las famosas Guerras del Opio del siglo XVII (Brownstein, 1993), y el contrabando a gran escala entre Europa y Asia que se restableció en el siglo XVIII. Su uso como narcótico resultó especialmente famoso en las guerras americanas, la de Crimea y la Franco-Prusiana (1). El cultivo de amapola continuó sin reglamentación hasta que, el 10 de junio de 1998, la ONU pactó un acuerdo para acabar con esta práctica en un plazo máximo de diez años (2).

El compuesto activo del opio, que fue aislado desde 1806 por Sertüner, resultó ser un alcaloide al que, por su efecto, denominó *morfina*, del dios griego de los sueños, Morfeo (Brownstein, 1993). Debido a que la morfina inhibe los reflejos nociceptivos (percepción del dolor) e induce analgesia profunda, se le empezó a utilizar como calmante y anestésico general. Su uso se difundió enormemente con la invención de la aguja hipodérmica y la jeringa hacia la mitad del siglo XVII, hasta alcanzar su apogeo en las filas de los soldados que participaron en la Guerra Civil estadounidense.

Sin embargo, no pasó mucho tiempo antes de que se dieran a conocer los efectos adictivos que provoca su abuso. Esta situación impulsó la búsqueda y desarrollo de *opiáceos* sintéticos eficaces que fueran más seguros, con lo que se abrió el campo de estudio del efecto que provocan las drogas derivadas y compuestos relacionados con el opio sobre la fisiología humana. El primer intento de sintetizar opiáceos consistió en modificar la estructura química de la morfina, con lo que se obtuvo la heroína, en 1898, mucho más potente que su predecesor. El uso masivo de la morfina como calmante durante las dos grandes Guerras Mundiales, aceleró las investigaciones. En 1942, Weijlard y Erikson sintetizaron la *nalofina*,

cuya acción revertía los efectos depresivos sobre la respiración provocados por la morfina. A partir de este compuesto se desarrolló el primer antagonista de la morfina, la *naloxona* (Brownstein, 1993).

Hacia finales de la década de 1960 ya se sospechaba la existencia de compuestos endógenos con acción análoga a la de la morfina. Los trabajos de Pert y Snyder; Simon et al, y Terenius vieron la luz en 1973 cuando los tres equipos demostraron, simultáneamente, la existencia de receptores o sitios específicos de unión a opiáceos en el sistema nervioso central, cuya distribución no parecía ser uniforme (rev. en Brownstein, 1993). Poco a poco se concretó la idea de que estos sitios son el blanco de unión a *opiáceos endógenos* que actúan como neurotransmisores, neuromoduladores y agonistas de receptores opiáceos, a estas sustancias se las denominó *opioides*.

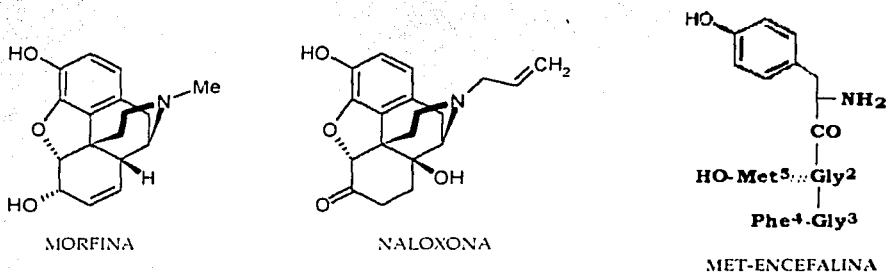


FIGURA 2. Comparación de la estructura de la morfina con la naloxona y la met-encefalina. Se observa la correlación entre la estructura aromática de los tres compuestos (Modificado de Borsodi y Toth, 1995).

Las *encefalinas* y *endorfinas* fueron los primeros péptidos opioides en ser aislados. En 1975 Kosterlitz y Waterfield encontraron un factor que inhibía la liberación de acetilcolina, efecto del que resultaron responsables dos pequeños pentapéptidos: la met-encefalina (Tyr-Gly-Gly-Phe-Met) (Fig. 2) y la leu-encefalina (Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu) (Hughes et al, 1975; en Brownstein, 1993). Un año más tarde, el equipo de Bradbury identificó que la secuencia de la met-encefalina era parte de otra molécula, la β -endorfina (Bradbury et al, 1976). Cinco años después se caracterizó a la tercera familia de opioides peptídicos, denominadas *dinorfinas*

(Goldstein et al, 1981). Finalmente, en 1989, a partir de la piel de la rana *Phyllomedusa bicolor* se aisló un cuarto grupo de péptidos de muy baja ocurrencia en la naturaleza, las *demorfinas* y *deltonfinas* (rev. en Brownstein, 1993).

Cada una de estas familias de péptidos se origina tras el procesamiento postraduccional de un precursor o pro-proteína. En mamíferos existen tres de estos precursores, que fueron reportados entre 1979 y 1982: la *proencefalina*, la *proopiomelanocortina* (que origina las endorfinas) y la *proclonofina*. El procesamiento de estas tres proproteínas origina más de veinte ligandos opioides. Además, se encontraron algunas evidencias que demuestran que en mamíferos se producen naturalmente algunos compuestos similares a la morfina y de que, por proteólisis *in vitro*, de las proteínas de la leche se pueden generar péptidos opioides llamados *casofinas*.

La probabilidad de unión a tantos ligandos reforzó la idea de la existencia de varios tipos de receptores a opioides. Los resultados de los experimentos subsecuentes demostraron la existencia de receptores μ , κ y δ , y sus subtipos. Los nombres de los primeros dos derivan de los fármacos utilizados en cada estudio: morfina y ketociclazocine, respectivamente, en tanto que el tercero se suponía debía encontrarse en los conductos deferentes. Todos estos receptores tienen en común su alta afinidad por compuestos con una estructura química básica; una amina protonada adyacente a un anillo aromático (rev. en Brownstein, 1993).

Dilucidar la estructura de los precursores proteicos fue un proceso lento. La investigación en la década de 1980 condujo al aislamiento y caracterización del gen de la proencefalina humana y de rata (Noda et al, 1982; Comb et al, 1983; Rosen et al, 1984), lo que resultó una herramienta esencial en los estudios moleculares sobre los opioides en mamíferos. Pese a todo, la estructura de los receptores opioides siguió siendo un misterio hasta que, una década después, los avances en biología molecular permitieron estudiar su expresión en células clonadas con insertos de DNA complementario (cDNA) que contuvieran la secuencia que codifica para los receptores correspondientes. De esta forma se demostró que los receptores opioides pertenecen a la superfamilia de los receptores de rodopsina y que al estar acoplados a una proteína G -específicamente G_i - inhiben la activación de la enzima adenilato ciclasa.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Biosíntesis de neuropéptidos

Las proteínas son la expresión de la información contenida en el DNA. Su síntesis es un proceso largo en el que interviene gran parte de la maquinaria celular. La mayoría de los componentes involucrados en el procesamiento del RNA se ensamblan, almacenan y reciclan en estructuras subnucleares tales como los *cuerpos de Cajal*, el *nudeo* y pequeños grupos de gránulos de *intencromatina* (Alberts et al, 2002).

El proceso inicia con el desenrollamiento y la apertura de una pequeña porción de la doble hélice de DNA para exponer las bases de cada hebra, una de las cuales sirve como molde o templado para copiar o transcribir varias veces el segmento correspondiente de DNA en forma de RNA (Alberts et al, 2002). En los organismos eucariotes, la *transcripción* (Fig. 3) ocurre dentro del núcleo por acción de las enzimas *RNA-polimerasas I, II y III* que, a su vez, requieren de la coparticipación de una gran variedad de factores y moléculas adicionales. La unión de la polimerasa II a la secuencia del gen que promueve el inicio de la transcripción (*promotor*), por ejemplo, forma un complejo con un conjunto de moléculas conocidas genéricamente como *factores de transcripción* (Nelson y Cox, 2000), que colaboran en el posicionamiento correcto de la enzima sobre ciertas secuencias, de las cuales la más importante es una que está compuesta en su mayoría por nucleótidos T y A, denominada *caja TATA*, localizada unos 25 nucleótidos arriba del sitio de inicio de la transcripción (Alberts et al, 2002).

El proceso de ensamblaje de los nucleótidos durante la transcripción se denomina *elongación* y la hebra de RNA resultante es el *transcrito primario* (Nelson & Cox 2000). Esta molécula sufre modificaciones específicas que consisten en editarla y añadir nucleótidos a cada extremo de la hebra para proteger al transcripto de la degradación enzimática y favorecer la unión del mRNA a los *ribosomas*. Cuando la RNA-polimerasa II ha producido alrededor de 25 nucleótidos de RNA, un trío de enzimas añaden un 7-metilguanosina en el extremo 5', conocido como "*5' cap*", gracias al cual es posible distinguir el mRNA de otros tipos de moléculas de RNA.

A continuación se remueven los segmentos o *intrones* que no se requieren en los pasos subsecuentes y los fragmentos restantes o *exones* se unen para formar una secuencia continua. En este proceso, conocido como *corte y empalme* (*splicing*), participan complejos de ribonucleoproteínas pequeñas (*snRNPs*, *small nuclear ribonucleoproteins*) que contienen RNAsas nucleares formadas por 100 o 200 nucleótidos (*snRNAs*, *small nuclear RNAs*), denominadas con las letras U1, U2, U4, U5 y U6. La unión de estas cinco moléculas origina un

complejo llamado *espliceosoma* y, de hecho, toda la reacción ocurre dentro de este complejo (Nelson y Cox, 2000). El final de la secuencia a transcribir está determinada en el DNA original por secuencias específicas como la *AUUAU* que, al transcribirse, promueven la unión y acción de enzimas accesorias como la *CstF* (*cleavage stimulation factor F*), la *CPSF* (*cleavage and polyadenylation specificity factor*) y una polimerasa dependiente de ATP (Alberts et al 2002), las cuales añaden, uno por uno, entre 80 y 250 residuos de adenina en el extremo 3' del mRNA naciente, para formar la *cola poli-A* (Nelson y Cox, 2000), asociada con el transporte del mensajero del núcleo hacia el citoplasma.

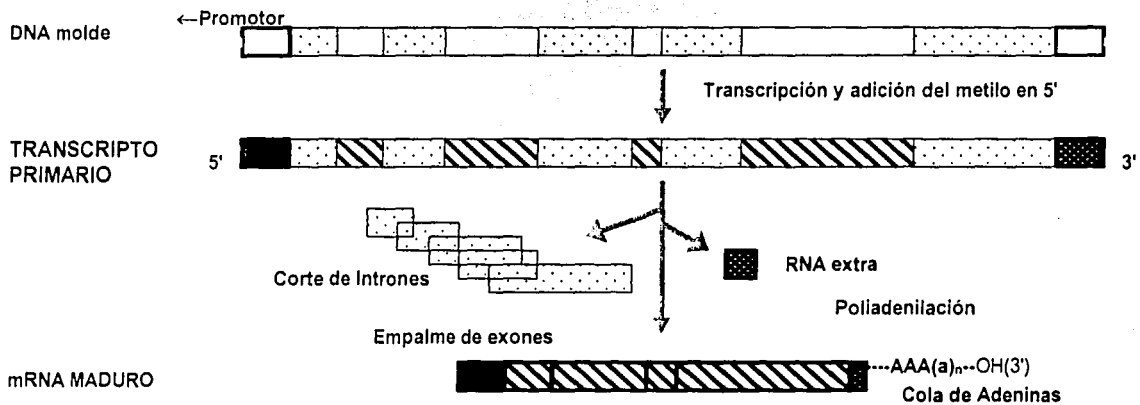


FIGURA 3. Esquema del proceso general de transcripción de un gen y procesamiento del mRNA resultante. La RNA -polimerasa II es la enzima encargada de la elongación del transcritto primario a partir de una de las hebras de la doble hélice del DNA correspondiente al gen que se va a transcribir. Aproximadamente un tercio del RNA del transcritto primario o pre-mRNA se elimina por acción enzimática (Modificado de Nelson & Cox 2000).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

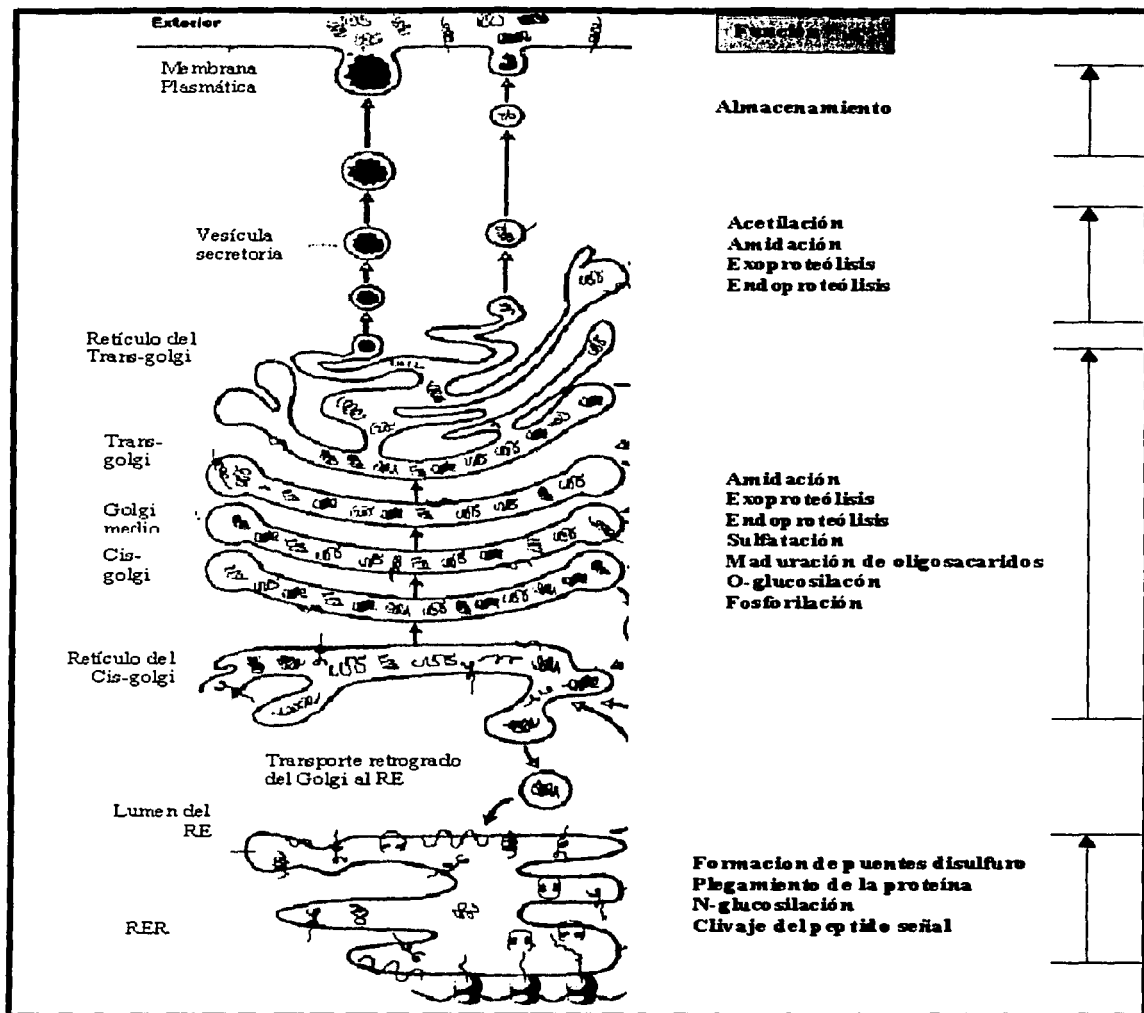


FIGURA 4. Esquema del transporte intracelular y procesamiento postraduccional de proteínas en la vía secretora. (Modificado de la figura original de Mains et al, 1990)

La traducción (Fig. 4) del transcrito primario ocurre fuera del núcleo, en los ribosomas que pueden o no estar asociados al *retículo endoplásmico* (RE). Las moléculas que se traducen en ribosomas que se unen al retículo endoplásmico se secretan fuera de la célula o forman parte de integral de los organelos de la vía secretoria o de la membrana celular. En el retículo la proteína ingresa como *preproteína*; donde el prefijo “pre” indica que contiene la secuencia del péptido señal en el extremo amino terminal, estructura que interactúa con una partícula ribonucleoprotéica (*SRP*) para formar un complejo que, al reconocer al receptor adecuado (*SSR*) en la membrana del retículo endoplásmico rugoso (RER), se internaliza (rev. en Bautista, 1997). Durante este proceso se pierde la secuencia señal y la estructura que queda se denomina *proteína*. Esta se transporta a la región posterior a la cisterna *trans* del aparato de Golgi, llamada *trans Golgi Network*, o *TGN*, en donde sufre los procesamientos proteolíticos post-traduccionales correspondientes que cortan la *proteína* para liberar sus productos e incorporarlos a vesículas o gránulos secretores primarios. Los gránulos maduros contienen a los péptidos biológicamente activos (Mains et al, 1990). A lo largo del transporte por las cisternas del Golgi ocurren otros cambios post-traduccionales como la glicosilación, sulfatación, metilación, fosforilación y N-acetilación.

Dentro de muchas secuencias de precursores de péptidos biológicamente activos, el péptido se localiza flanqueado por pares de aminoácidos básicos, la liberación del mismo se lleva a cabo por la acción secuencial de dos tipos de enzimas: las que actúan como *tripsina* cortando el extremo carboxilo terminal del par de aminoácidos básicos y las que tienen actividad de *carboxipeptidasas* (CPB) que remueven el aminoácido básico remanente. En algunos casos actúa, además, una *aminopeptidasa* que elimina un aminoácido básico remanente en el extremo amino terminal (Fisher y Sèller, 1988; rev. en Bautista 1997). Los pares de aminoácidos básicos más susceptibles de ruptura son aquellos que contienen lisina y/o arginina (Lys-Arg, Arg-Arg, Lys-Lys, Arg-Lys), (Dickerson y Noel, 1991; rev. en Bautista, 1997). Actualmente está bien establecido que la familia de proteínas convertasas (PCs) es responsable de la catálisis de proteínas precursoras de neuropéptidos (Salzet et al, 2000; rev. en Terán, 2003).

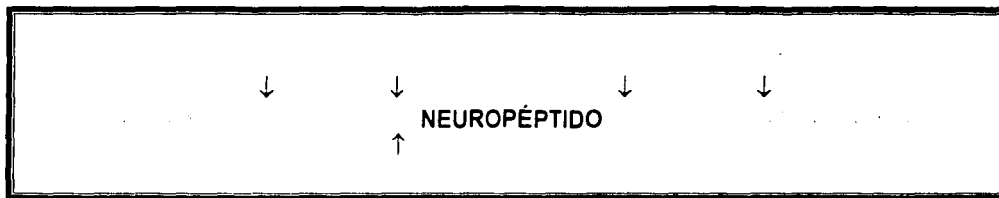


FIGURA 5. Maduración enzimática del precursor de neuropeptidos. Para liberar las secuencias de los péptidos derivados de los precursores, se cortan por acción enzimática los aminoácidos básicos adyacentes: lisina (Lys) o arginina (Arg) (Modificado de Rossier, 1993).

Identificación de péptidos opioides

Las encefalinas se liberan hacia los espacios extracelulares, por lo que pueden identificarse en los fluidos después de estimular su producción (Rossier, 1993) a través de métodos bioquímicos tales como la cromatografía seguida de la digestión de los precursores opioides con tripsina y CPB y radioinmunoensayo (rev. en Terán, 2003).

Las primeras encefalinas identificadas en los trabajos de Hughes y cols. publicados en 1975, fueron la met-encefalina y leu-encefalina: dos pentapéptidos que difieren sólo en el carboxilo terminal por contener leucina (Leu-encefalina) o metionina (Met-encefalina) en esta posición, siguiendo la secuencia base Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu/Met.

Todos los opiáceos endógenos -endorfinas, encefalinas y dinorfinas- se encuentran contenidos en las secuencias de tres genes que producen los siguientes péptidos opioides:

- Proopiomelanocortina (POMC).- α -endorfina, β -endorfina y γ -endorfina.
- Prodinorfina.- dinorfinas A, B, α -neoendorfina y β -neoendorfina.
- Proencefalina A (PENK A).- Péptidos Opioides: Leu-encefalina (Tyr-Gly²-Gly³-Phe⁴-Leu⁵), Met-encefalina (Tyr-Gly²-Gly³-Phe⁴-Met⁵), el heptapéptido ([Met³]enk-Arg⁶-Phe⁷), el octapéptido ([Met³]enk-Arg⁶-Phe⁷-Leu⁸), el péptido E (una Met-enk en el extremo NH₂- y una Leu-enk en el -COOH), el péptido F ([Met³]enk-Arg⁶-Arg⁷-Val⁸), los péptidos BAM 22P, BAM 20P y BAM 12P y otros péptidos pequeños descritos sólo por su peso molecular: 23.3, 18.2, 12.6, 8.6, 5.3 kDa. Péptidos no-opioides: Sinencefalina (SYN), Péptido B y Péptido I (Fig. 7).

El grupo de Lewis aisló en 1980 los péptidos contenidos en los gránulos secretorios de células cromafines. Los precursores de los péptidos opioides y sus productos intermedios se purificaron por cromatografía en gel seguida de una digestión enzimática con tripsina y CPB, y radioinmunoensayo (RIA) (Udenfriend y Kilpatrick, 1983; en Terán, 2003). Así se aislaron también péptidos opioides como la Met-encefalina, la Leu-encefalina, el octapéptido, los péptidos BAMP 22, 20 y 12, los péptidos E y F y otros péptidos no opioides como la sinencefalina (SYN), y el péptido I, cuyo extremo amino terminal no posee la secuencia Tyr-Gly-Gly-Phe, característica de los opiáceos endógenos, y no se une a receptores opioides.

La proencefalina (PENK)

La molécula precursora de las encefalinas es una proteína de 27 kDa cuya secuencia primaria contiene cierto número de péptidos neuroendocrinos pequeños tal y como se describe en la sección anterior, que en su mayoría presentan actividad opioide y están involucrados en funciones fisiológicas tales como la analgesia, la respuesta al estrés y al dolor, y la regulación del sueño y el apetito. La porción amino de cada molécula de proencefalina codifica para un péptido no opioide denominado sinencefalina (SYN), cuya secuencia es muy estable y está altamente conservada en los mamíferos (Liston et al, 1984).

Al deducir la secuencia de la PENK a partir de los cDNAs de cinco especies animales distintas (ratón, rata, humano, bovino y el sapo *Xenopus laevis*) se encontró un alto porcentaje de similitud. El hecho de que ciertas regiones sean idénticas en especies tan lejanas como el sapo y el hombre, sugirió que estas regiones podrían desempeñar un papel crucial en la estructura y/o función de esta proteína (Rossier, 1993). En 1982 el grupo de Noda presentó la caracterización del gen de la PENK humana. Seis años después, Litt y cols. reportaron que el gen en cuestión se localiza en la parte media distal del brazo largo del octavo cromosoma del cariotipo humano (revisado en Terán, 2003).

Los genes de la PENK de rata y sapo contienen 3 exones equivalentes y 2 intrones. El primer exón posee 191 pares de bases (pb) y está separado del segundo por 511 pb que corresponden al intrón A; entre el segundo exón (141 pb) y el tercero (978 pb) se encuentra el intrón B, que contiene 3500 pb. En el humano y el hámster el gen que codifica para esta misma proteína presenta 4 exones y 3 intrones, este gen es muy similar al de la rata, con la diferencia de que en el humano el primer exón está dividido en dos por un intrón denominado "A" de

87 pb, lo que genera un exón 1 de 70 pb y un exón 2 de 56 pb. Las similitudes entre los dos genes sugieren que un elemento transponible se insertó dentro del primer exón original (rev. en Weisinger, 1995).

Por otro lado, la concentración de los PDPs varía según la especie (el gen del sapo, por ejemplo, codifica para siete secuencias de Met-encefalina, pero para ninguna de Leu-encefalina) y el tejido. Así, en el cerebro la mayor parte de la PENK se procesa en forma que se producen mayor cantidad de péptidos de bajo peso molecular (Met-encefalina, Leu-encefalina y SYN libre), en tanto que en la médula adrenal se producen péptidos de alto y mediano peso molecular, sin SYN libre (Fig. 6) (Liston et al, 1983; en Bautista, 1997).

Regulación de la expresión del gen de PENK

Diversos estudios concluyen que la síntesis y liberación de neuropéptidos opioides está regulada por la activación de receptores y vías de segundos mensajeros. La transcripción del gen de PENK (Fig. 7) se regula en forma positiva por monofosfato cíclico de adenosina (cAMP) y Ca^{+2} intracelular que funcionan como segundos mensajeros y activan a proteínas cinasas A y C (PKA y PKC), las cuales, a su vez, controlan la biosíntesis, unión y activación de ciertos factores de transcripción (revisado en Bautista, 1997).

Entre otros mecanismos que controlan la expresión del gen se pueden mencionar el aumento de la actividad transináptica por hipoglicemia, el estrés por frío o por tratamiento con colinérgicos (Weisinger, 1990), así como la interacción con glucocorticoides que, para activar sus receptores, se unen a secuencias específicas del DNA asociadas con la regulación de la transcripción del gen conocidas como "elementos de respuesta a glucocorticoides (GRE)" (Beato, 1989; en Terán, 2003). La expresión génica puede controlarse por la interacción de proteínas reguladoras que reconocen secuencias específicas del DNA. Al comparar los genes de la proencefalina de rata, humano, bovino y sapo *Xenopus*, se identificaron regiones altamente conservadas en la porción del gen que se concentra alrededor de las secuencias que codifican para las encefalinas, tales como los sitios de iniciación a la transcripción (cuatro en rata y humano y dos en *Xenopus*, en el exón I). Otra región altamente conservada es un segmento de 132 pb rico en C-G, adyacente a la caja TATA, que quizá representa elementos regulatorios involucrados en el control de la expresión del gen de la proencefalina (Rosen et al, 1984).

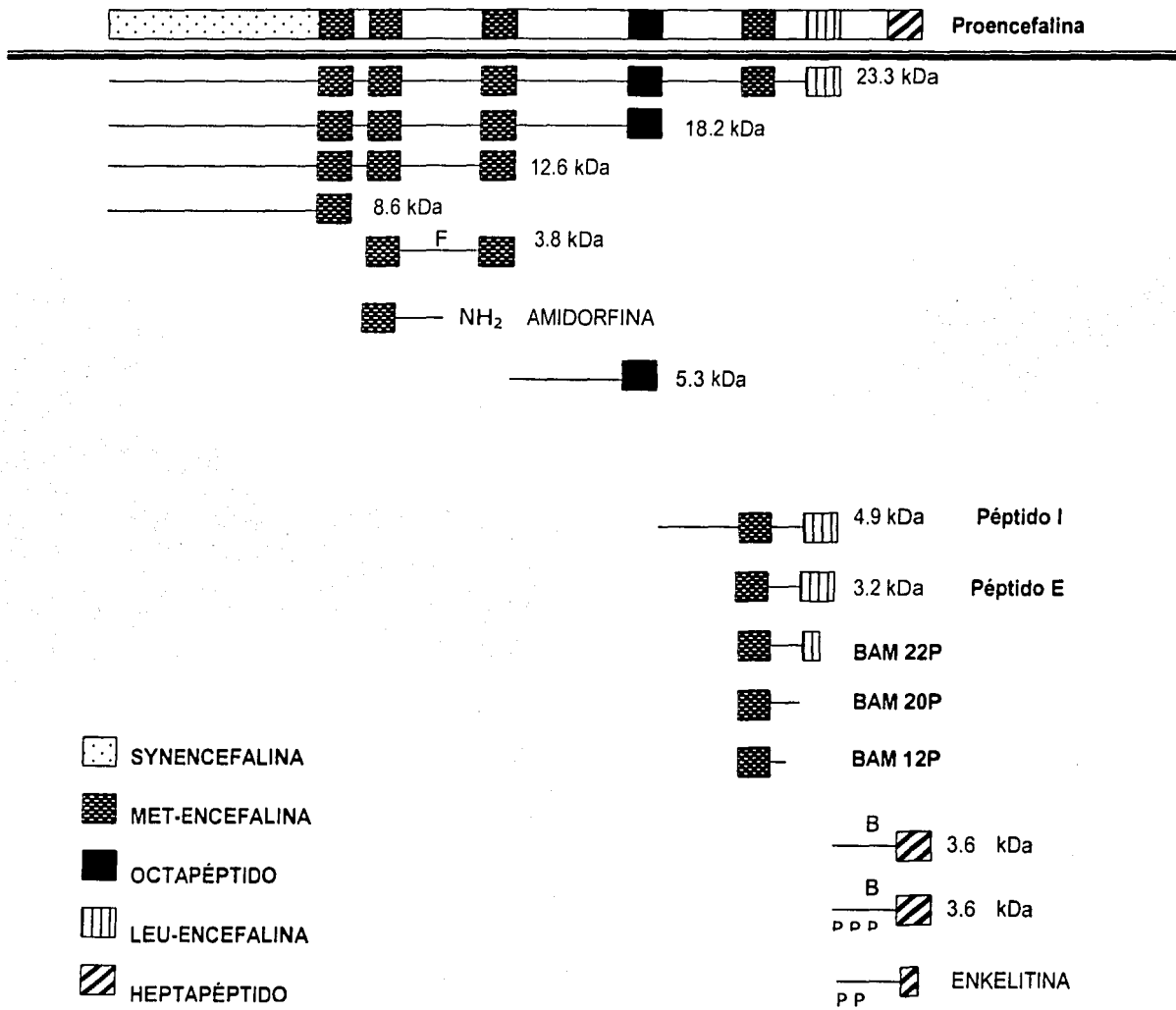


FIGURA 6. Péptidos derivados de la PENK en la médula adrenal de bovino.
(Modificado de Rossier, 1993).

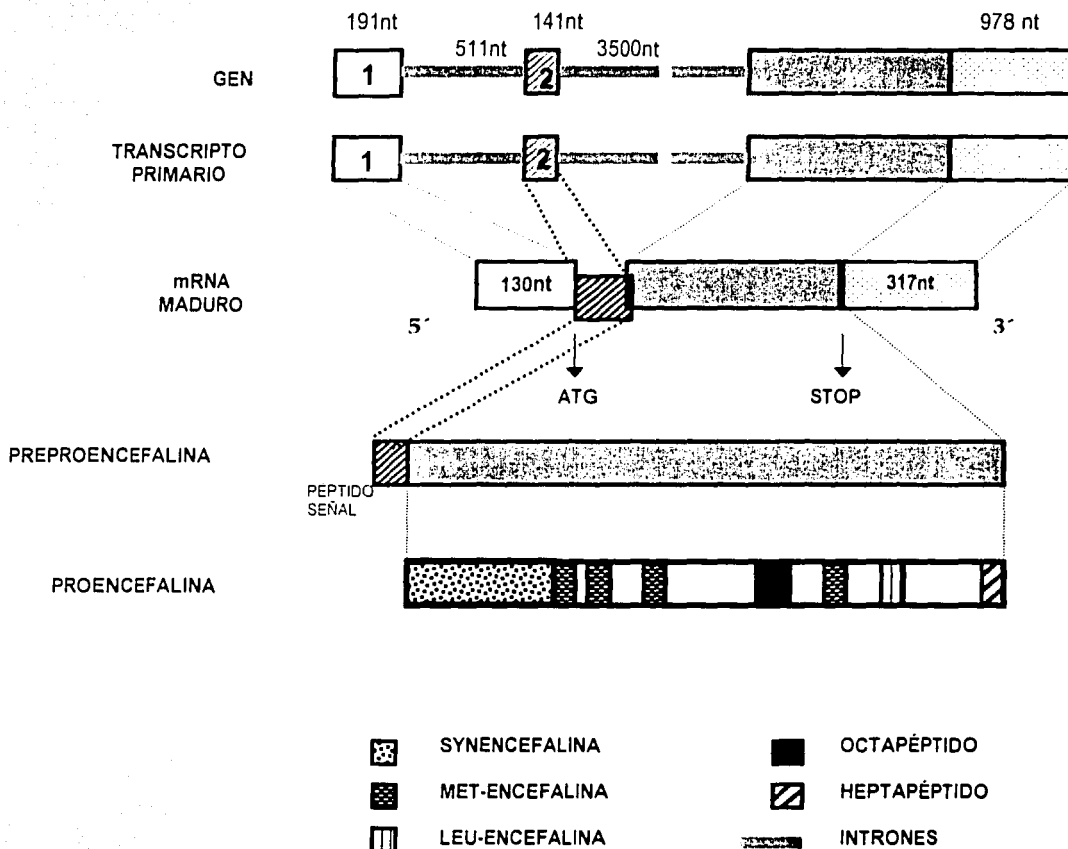


FIGURA 7. Expresión del gen de la proencefalina. El gen de la PENK de rata está formado por tres exones y 2 intrones. Al transcribirse se genera un transcripto primario que pierde los intrones en un proceso de corte y pegado ("splicing"), lo que genera mRNA de 1.4 kilobases. La traducción de este mRNA inicia en el cuarto nucleótido del exón 2 y da lugar a la preproencefalina. Los primeros 24 aminoácidos corresponden al péptido señal, secuencia que da entrada a la preproteína hacia el retículo endoplásmico. Al eliminarse el péptido señal queda el precursor protéico o proencefalina, que dentro de las membranas reticulares sufrirá las modificaciones postraduccionales que darán lugar a las encefalinas (Modificado de Weisinger 1995).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Distribución tisular de la proencefalina

Las tres familias de péptidos opioides están ampliamente distribuidas por el sistema nervioso central y periférico. En el sistema nervioso, la PENK se ha localizado en corteza cerebral, ganglios basales, sistema límbico, cerebro medio, tálamo, hipotálamo, hipófisis anterior y posterior (Weisinger, 1992). Además, se ha determinado la presencia de mRNA de la proencefalina en tejidos embrionarios de origen mesodérmico, endodérmico y ectodérmico; en distintos tipos celulares tales como neuronas, astrocitos, células endocrinas, células del sistema mesenquimático; y en ciertos tejidos reproductivos de mamíferos: testículos, ovarios, células de Sertoli y de Leydig, epidídimo, y células endometriales del útero, donde varían con el ciclo menstrual. En 1986 Kilpatrick reportó la expresión del gen de PENK en células somáticas testiculares de rata durante el desarrollo y en células espermatogénicas de ratas adultas. Más tarde estableció que la concentración de mRNA en etapas tempranas de la meiosis es menor a la encontrada en espermatoцитos y espermátides y declina de nuevo en los espermatozoides maduros. Otros tejidos con alta capacidad proliferativa en los que se ha reportado la expresión del gen de la PENK incluyen tejidos neonatos de fibroblastos, piel, intestino, hígado, pulmones, riñones, huesos y músculo esquelético, todos ellos de origen mesodérmico (rev. en Terán, 2003).

Tanto la expresión del transcrito primario, como la producción de la proproteína que ocupa este trabajo y de sus péptidos derivados, han sido reportados en diferentes linajes celulares del sistema inmune desde hace unos diecisiete años. Se le encontró no sólo en células hematopoyéticas normales (linfocitos T, timocitos, linfocitos B del bazo, linfocitos de la médula ósea, macrófagos de rata provenientes del peritoneo, mastocitos, etc), sino también en células patológicas (leucocitos de leucemias linfocítica T y B) (revisado en Terán, 2003). Además, en la rata, el mRNA de linfocitos T presenta un porcentaje de similitud del 93 % con el del cerebro (rev. en Bautista, 1997). Estas y otras observaciones llevaron a suponer que los péptidos opioides participan en la regulación de la interacción entre el sistema inmune y el sistema nervioso.

Participación de la proencefalina y/o sus péptidos derivados en el proceso de proliferación celular

Durante los últimos diez años, los estudios sobre la participación de la PENK en los procesos de proliferación y diferenciación celular se concentraron en analizar la función de las encefalinas liberadas al medio extracelular. De esta forma se demostró que la Met-encefalina y el péptido F inhiben la proliferación de células de la retina y de neuroblastoma (Zagon et al, 1998). En contraste, en otros trabajos se encontró que el DNA complementario (cDNA) antisentido de la PENK inhibe la proliferación celular (Weisinger et al, 1995) y que las células mesenquimáticas en proceso proliferativo producen y secretan péptidos opioides, en especial Met-encefalina, y no opioides como la sinencefalina (SYN) (rev. En Terán, 2003).

Por otro lado, Linner y cols. reportaron en 1991 que la expresión del gen de la PENK se induce por linfocinas y otras proteínas no identificadas hasta entonces, como respuesta a la activación o estimulación de la mitosis (rev. en Linner et al, 1996). Más adelante, Lomo y Nilsson en 1995, por separado, observaron que las citocinas inducen la expresión genética de la PENK y la producción de Met-encefalina en las células mononucleares. Los niveles de mRNA aumentan después de la estimulación con citocinas tales como el factor de crecimiento transformante β (TGF β), un inductor de la producción de cAMP. Además, se ha reportado que en cultivos primarios de fibroblastos embrionarios de rata la expresión del gen de la proencefalina aumenta durante la transición de la fase G1 (crecimiento) a S (diferenciación) del ciclo celular, y disminuye cuando las células están arrestadas en el crecimiento (revisado en Terán, 2003).

El hecho de que el mRNA de la PENK se exprese en grandes cantidades en los tejidos en desarrollo de mamífero aunado a la amplia distribución de los péptidos derivados de la PENK, son evidencias que sustentan la participación de esta molécula en los procesos de proliferación y diferenciación celular.

Péptidos opioides en el sistema inmune

Las células sanguíneas producen y liberan una gran cantidad de hormonas neuroendocrinas y neuropéptidos. Entre estos se encuentran los péptidos opioides, y en especial los derivados de la proencefalina (PDPs). La expresión del gen de la proencefalina A (PENK-A) en distintos linajes celulares del sistema hemático se demostró en 1986 con los trabajos realizados por el grupo de Monstein, en pacientes con leucemia crónica de células tipo

B (rev. en Bautista, 1997). En 1990, el grupo de Vindrola reporta que los neutrófilos polimorfonucleares, los leucocitos predominantes en la circulación sanguínea, contienen y liberan PDP-As.

Otras investigaciones han reportado diversos efectos de los péptidos opioides sobre el funcionamiento del sistema inmune: disminuyen la capacidad fagocitaria al reducir la expresión de filamentos de vimetina, favorecen la proliferación de células T, la producción de anticuerpos y la funcionalidad de neutrófilos y monocitos; mejoran la respuesta humoral secundaria por su acción sobre las citocinas, y los mecanismos generales de defensa inmunes. La Met-enkefalina y la β -endorfina, por ejemplo, potencian la actividad agresora natural o "natural killer" y aumentan la cantidad de linfocitos T. Por otro lado, tanto la α -endorfina como la Met-enkefalina y Leu-enkefalina, inhiben la respuesta del linfocito B a los glóbulos rojos, en tanto que la β -endorfina inhibe la respuesta humoral primaria a la hemocianina (rev. en Bautista, 1997).

Por otro lado, la concentración de los PDP-As es diferente para cada linaje celular. En los neutrófilos polimorfonucleares anteriormente mencionados, por ejemplo, la porción opioide de la PENK-A se procesa parcialmente, por tanto no se liberan péptidos de bajo peso molecular; la porción no opioide (SYN), en cambio, se procesa totalmente y origina un péptido de 1.0 kDa que se libera al activar los neutrófilos (Vindrola, 1990). En la médula ósea, la Met-enkefalina libre representa el 15% del total de PDPs, en tanto que en el bazo esta proporción alcanza el 66% del total. Los péptidos derivados de la SYN (SDPs) sólo se han detectado en células del sistema hematopoyético, pero su función aún no ha sido descrita (rev. en Bautista, 1997). Las enzimas convertasas PC1 y PC2 también se expresan de manera diferencial en neutrófilos polimorfonucleares y macrófagos alveolares, estas diferencias coinciden con las distinciones encontradas en el procesamiento postraduccional de la PENK-A en cada tipo celular (Vindrola et al, 1994).

Los efectos de los péptidos opioides sobre la modulación de las funciones de las células del sistema inmune, se ejercen a través de receptores opiáceos, tal como sucede en el sistema nervioso.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los trabajos iniciales consideraron que la proencefalina se sintetizaba como una molécula precursora que al entrar a la vía secretora de la célula producía los péptidos opioides (Rossier, 1993). Sin embargo, estudios recientes identificaron a la proencefalina intacta en el núcleo de células mesenquimáticas en cultivo (Böttger y Spruce, 1995), y de tejidos tumorales de hipófisis humana (Vindrola et al, 1998). La presencia de la proencefalina en el núcleo, unida a cromatina, sugirió su participación en la regulación de la expresión génica. El equipo de Böttger y Spruce (1995) detectó proencefalina en diferentes compartimentos sub-nucleares de una línea celular de fibroblastos embrionarios de ratón, donde la inmunoreactividad se presentó en forma de máculas y de punteado grueso y fino. En células arrestadas esta localización difirió de la encontrada en células subconfluentes en etapa proliferativa. Además, estos autores encontraron claras diferencias en la distribución sub-nuclear entre células de mioblastos de ratón, indiferenciadas y diferenciadas y demostraron que al transfectar el cDNA de la proencefalina con una mutación en el sitio ATG del exón II (sitio de inicio de la secuencia que codifica para el péptido señal), se genera una molécula que viaja al núcleo. Por otro lado, en un trabajo teórico se demostró que la proencefalina posee dominios de unión al DNA, además de una secuencia rica en aminoácidos ácidos, similar a la que tienen ciertos factores proteicos relacionados con la transcripción de genes (Balalkin et al, 1991). Estos descubrimientos han llevado a proponer a la proencefalina nuclear como uno de los factores proteicos que participan en el proceso de proliferación celular.

Desde hace siete años las investigaciones en el laboratorio de Bioquímica Celular del Instituto de Fisiología (BUAP), se han enfocado en estudiar los mecanismos involucrados en la síntesis, transporte al núcleo y unión al DNA de los péptidos derivados de la proencefalina; así como su participación en los procesos de proliferación normal y patológica de diferentes tipos celulares, entre los que figuran las leucemias humanas. Una serie de trabajos realizados por María Rosete Enriquez, estudiante del doctorado en Ciencias Biomédicas, UNAM (tesis y manuscritos en preparación), demuestran que en los fibroblastos embrionarios de ratón pertenecientes a la línea NIH 3T3, el gen de la proencefalina se expresa en etapas tempranas del ciclo celular. La estudiante observó, simultáneamente, que el mRNA de la proencefalina en estas células no contiene el exón II y por ende carece de la secuencia que codifica para el

péptido señal. Este mensajero tradujo proteínas que se transportan al núcleo y que se localizan en el nucleoplasma y los nucleolos. El mismo trabajo ha demostrado que la transfección transitoria y permanente de un cDNA que sólo contiene la secuencia que codifica para el exón III produce un incremento significativo en los niveles de la proencefalina citoplasmática y nuclear, a la vez que induce un gran aumento en la proliferación celular.

La proencefalina se expresa en altas concentraciones en células tumorales. Además se ha reportado que el estudio de la hipermetilación del promotor de este gen es un excelente marcador de la actividad carcinogénica. En un tumor altamente proliferativo de hipófisis se corroboró la presencia de la proencefalina en el núcleo (Vindrola y cols). Esto también se observó en células de neuroblastoma humano, donde la proencefalina se localizó en el nucleoplasma, los nucleolos y en las máculas o "*speckels*" (Terán, 2003). Sin embargo, en ninguno de estos estudios se caracterizó el papel de la proencefalina nuclear.

El efecto de los péptidos opioides sobre el crecimiento celular en tumores es el opuesto al observado por la sobre-expresión del cDNA de la proencefalina que no contiene el exón II en fibroblastos. Esto nos sugiere que la función de los productos derivados de la proencefalina liberados por la vía secretora, los péptidos opioides, son independientes de los que viajan al núcleo. De los diversos tumores donde se está estudiando el papel fisiopatológico de la proencefalina nuclear en el laboratorio, los que más atención han tenido son las leucemias. En particular, se tiene bien caracterizado que el gen de la proencefalina se expresa en dos líneas celulares leucémicas humanas, HL-60 (promielocítica) y U937 (mielomonoblástica), en las que además existen las enzimas responsables del procesamiento post-traducciona l de este precursor. Sin embargo, al igual que lo observado en las células mesenquimáticas, estas líneas celulares presentan altas concentraciones de proencefalina en el núcleo y especialmente en los nucleolos. Uno de los mRNAs de la proencefalina que se expresan en estas células carece de la secuencia del exón III (en el humano este es el segmento que contiene la región que codifica para el péptido señal) y podría ser el que se traduce para dar las proteínas nucleares. Además, a diferencia de los resultados obtenidos en la línea celular de fibroblastos embrionarios de ratón, en la línea HL-60 no se observó ningún efecto sobre la proliferación luego de transfecciones transitorias del cDNA que contiene solamente el exón III de ratón (Padrós y cols, manuscrito en preparación). Esto nos llevó a pensar que el efecto se produciría solamente en células proliferantes no tumorales.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

HIPÓTESIS

Los resultados de las transfecciones transitorias nos llevaron a averiguar si en estas células de origen leucémico la proencefalina nuclear realmente participa en el proceso de proliferación celular tal y como lo hace en los fibroblastos embrionarios. Para responder a esta pregunta se generaron clones de la leucemia promielocítica humana de la línea celular HL-60, provenientes de la transfección estable (permanente) con el cDNA de la proencefalina que contiene solamente el exón III de ratón y codifica para la proteína nuclear (no contiene la secuencia correspondiente al péptido señal).

En estos clones se analizó la proliferación celular, y se realizaron estudios moleculares y bioquímicos para caracterizar la expresión del cDNA transfectado, así como los niveles y distribución subcelular de las proteínas traducidas.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

OBJETIVOS DEL PROYECTO

Objetivo general:

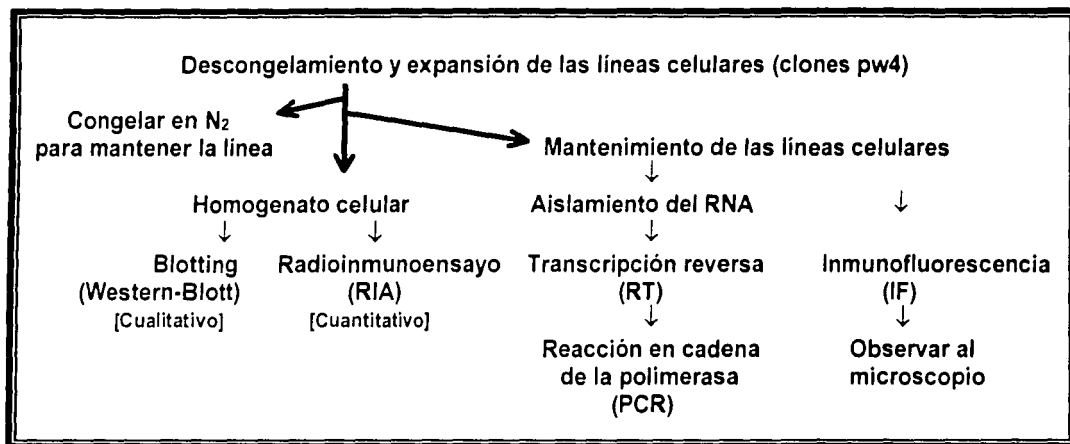
Caracterizar por inmunocitoquímica y métodos bioquímicos los péptidos derivados de la proencefalina en clones de la línea celular leucémica HL-60 transfectados en forma estable (permanente) con el cDNA de la proencefalina que produce la proteína nuclear. Los clones se seleccionaron previamente de acuerdo al efecto que produjeron sobre la proliferación celular. Además, como estudio comparativo y de referencia se analizaron los niveles del mRNA de la proencefalina endógena, el contenido y tipo de péptido derivados de este precursor tanto en células no-diferenciadas (en estado proliferativo), como en células diferenciadas a neutrófilos y a macrófagos.

Objetivos particulares:

1. Analizar por RT-PCR el mRNA de la proencefalina en células indiferenciadas y diferenciadas a neutrófilo con dimetil sulfóxido (DMSO) y ácido retinóico; y a macrófago con acetato de tetradecanoilforbol (TPA).
2. Caracterizar los péptidos derivados de la proencefalina por inmunoelectrotransferencia en células indiferenciadas y diferenciadas a neutrófilo (con DMSO y ácido retinóico) y a macrófago con TPA.
3. Expandir y mantener la línea HL-60 silvestre y los clones transfectados en forma estable con el cDNA del exón III de ratón.
4. Corroborar la transcripción del cDNA de la proencefalina transfectado en forma estable en las células clonadas mediante las técnicas de transcripción inversa y reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR).
5. Cuantificar e identificar en las células clonadas los péptidos derivados de la proencefalina por radioinmunoensayo (RIA) y por electroforesis en gel de poliacrilamida seguido de inmunoelectrotransferencia mediante el uso de anticuerpos específicos (Western Blot).
6. Estudiar por inmunocitoquímica la localización subcelular y subnuclear de la proencefalina en los clones de células HL-60 utilizando anticuerpos específicos.

METODOLOGÍA

Diagrama de Trabajo



• Expansión y mantenimiento en cultivo de los clones transfectados y de las células HL-60 silvestres.

Se usaron células leucémicas de la línea HL-60 (American Type Culture Collection, número de catálogo CCL240) provenientes del sistema hematopoyético humano (línea celular de leucemia promielocítica). La medición de la proliferación celular en estas líneas se evaluó por el método de incorporación de timidina tritiada según fue descrito anteriormente (Padrós y cols, 1989). La metodología de preparación, transfección, purificación y selección de los clones de la línea celular HL-60 se desarrolló completamente por la Dra. María Rosa Padrós Semorile, trabajo que forma parte de los proyectos de CONACYT 37882-N y 31764-N. El construido PLBC-1, donde se incorporó el exón III del gen de la proencefalina de ratón al plásmido pcDNA 3.1 (+) (Invitrogen), también se preparó en el Laboratorio de Bioquímica Celular del Instituto de Fisiología de la BUAP, secuenciado y actualmente su patente está en trámite. Las transfecciones estables con este construido se realizaron con modificaciones del método descrito anteriormente por Davis et al (1994). Los clones seleccionados presentaron diferentes

grados de inhibición de la proliferación al compararlos con las células HL-60 silvestre (células sin ningún tipo de transfección). Los clones y las células HL-60 silvestres se cultivaron en placas (Costar) y frascos (Corning) bajo las mismas condiciones: medio RPMI 1640 (GIBCO-BRL) suplementado con 2 mM de L-glutamina, 100 UI/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomycin y 10 mM de bicarbonato de sodio (NaHCO₃), 100 µl de gentamicina a una concentración de 80 mg/µl, y 10 % de suero bovino fetal (SBF, GIBCO-BRL). Las células se incubaron en atmósfera con 5 % de CO₂ a 37 °C, con cambio de medio fresco dos veces por semana. Se utilizó un inóculo de 10⁵ células viables/ml y el número y viabilidad de las células se determinó por la exclusión de azul de tripán. (Bautista, 1997).

- **Diferenciación a neutrófilo de las células HL-60 silvestres**

Este procedimiento fue descrito previamente (Bautista, 1997). Las células HL-60 silvestres se llevaron a una concentración de 2 x 10⁵ células/ml, se les agregó de dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma Chemical) al 1 % o 10 µM de ácido retinoico (Sigma Chemical) y se incubaron durante 5 días en las condiciones mencionadas anteriormente. La diferenciación a neutrófilo se comprobó por los cambios morfológicos que presentaron las células. Después de los cinco días de diferenciación más del 90 % de las células adquirieron la morfología de granulocitos. La pastilla celular se recuperó luego de 3 ciclos de lavado con PBS y centrifugación a 1500 r.p.m. por 10 min. Finalmente esta pastilla se congeló a -70 °C hasta su uso.

- **Diferenciación a macrófago de las células HL-60 silvestres**

Este procedimiento fue descrito previamente (Bautista, 1997). Las células HL-60 silvestres, a una densidad de 1 x 10⁶ células/ml, se incubaron con 10 nM de 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA, Sigma Chemical) por 48 h a 37 °C. Las células en suspensión se descartaron y las adherentes se lavaron 3 veces con PBS, y se despegaron con PBS suplementado con 1 mM de EDTA y utilizando un pequeño raspador de hule. Luego de dos ciclos lavado con PBS y centrifugaron a 1500 r.p.m. por 10 min., las células se congelaron a -70 °C hasta su uso. La diferenciación de las células HL-60 a macrófago se confirmó por la evidente extensión de pseudopodia y la intensa adherencia tanto entre ellas como a la pared del frasco de cultivo.

- Selección de los clones de HL-60 para los estudios bioquímicos y de inmunocitoquímica.

De las transfecciones permanentes con el cDNA del exón III de la proencefalina de ratón, se obtuvieron 12 clones a los cuales se les determinó la incorporación de timidina tritiada como medida de la proliferación celular. Los valores en cuentas por minuto (c.p.m.) se compararon con los de las células HL-60 silvestres (sin transfectar). El 90 % de los clones mostraron una disminución en la incorporación de la 3H-timidina. Para realizar los estudios bioquímicos se seleccionaron varios clones, los cuales presentaban diferentes porcentajes de inhibición de la incorporación de este nucleótido. Se eligieron dos clones con alta inhibición (D6E3 y D6D1), dos con niveles intermedios (F1D9 y F1G3) y un clon cuyos valores no diferían de los presentados por las células silvestres (F1F10).

CLONES de células HL-60 transfectados permanentemente con el cDNA de la PENK:

	D6E3	D6D1	F1D9	F1G3	F1F10
% inhibición	77.1	75.6	42.0	36.5	6.4

- Aislamiento del RNA total

Este procedimiento se describió anteriormente (Rosete, 1999; Teran, 2003). El RNA total de las células en cultivo se extrajo por el método de Chomezynski y Sacchi (1987). Las células se depositaron en un tubo Eppendorf y se lisaron con 1ml de TRIzol (GIBCO-BRL, Life Technologies) por cada millón de células. Para permitir la disociación completa de los complejos nucleoproteicos, el homogenato se incubó durante 5 min. a 22 °C. A continuación se le adicionaron 200µl de cloroformo a cada tubo, se agitó vigorosamente en un vortex durante 15 seg. y se les permitió reposar por 3 min. a temperatura ambiente. Después, las muestras se centrifugaron a 12000 g, 15 min., a 4 °C en una microcentrífuga (Eppendorf). La fase acuosa, la que contiene el RNA, se transfirió a un tubo Eppendorf nuevo y, se le agregaron 500 µl de isopropanol frío y se precipitó por centrifugación a 12 000 g, 10 min. a 4°C. El sobrenadante se desechó por decantación, la pastilla de RNA se lavó con 1 ml de etanol frío al 75% y se precipitó con una nueva centrifugación a 7500 g durante 5 min, a 4 °C.

El sobrenadante se decantó nuevamente y el RNA se disolvió en 50µl de agua tratada con dietilpircarbonato (DEPC) en baño María durante 10 min. (55-56 °C).

Las lecturas de este extracto se realizaron en un espectrofotómetro (Gene Quant-pro calculator) en diluciones 1:100 realizadas en agua con DEPC. Se realizó una lectura a 260 nm donde absorben los ácidos nucleicos y otra a 280 nm para las proteínas. La pureza de las muestras se determinó por la relación resultante de la lectura a 260 nm entre la lectura a 280 nm de absorbancia, donde valores entre 1.9 y 2.0 indican que las muestras poseen un alto grado de pureza, en tanto que números por debajo de estos son indicio de contaminación. La concentración se determinó considerando que una unidad de absorbancia a 260 nm equivale a 40 µg/ml de RNA, este dato, multiplicado por el factor de dilución, resultó en la cantidad de µg/ml contenido en cada muestra. La integridad del material genético se corroboró por electroforesis en gel de agarosa (Bio-Rad) al 3 %.

- **Transcripción Inversa (RT)**

Este procedimiento fue descrito anteriormente (Rosete, 1999; Terán, 1997). El DNA complementario (cDNA) que sirvió como molde o templado para amplificar el gen de interés en la PCR, se sintetizó a partir de una dilución de 0.5 µg/µl del RNA total en agua tratada con DEPC, el cual se incubó por 5 min. a 90 °C y se enfrió en hielo. 10µl de esta mezcla, denominada "RT", se llevaron a 20µl con una dilución de 4 µl de amortiguador MgCl₂ 5X para PCR (100 mM Tris-HCl, pH=8.3, 150 mM KCl, 6 mM MgCl₂, 20 mM DTT, GIBCO-BRL), 1µl de cada uno de los nucleótidos activados o *dNTPs* (Promega), 1 µl (40 U/µl) de iniciadores (*random primers*, Promega), 0.5 µl de inhibidor de RNAasas (*RNAasin*, Promega) y 0.5 µl de la enzima transcriptasa inversa (200U/µl) tipo M-MLV (Promega). Cada uno de los nucleótidos o *dNTPs* se llevó, por separado, a una concentración de 10 mM, diluyéndolos previamente en agua tratada con DEPC.

La alineación del random primer, síntesis del cDNA e inactivación de la enzima se realizaron por incubación de 1 h a temperatura ambiente, 45 min. a 37 °C y 5 min. a 94 °C, respectivamente.

- **Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**

Con las células clonadas se corrieron tres ensayos con tres pares distintos de oligonucleótidos sentido y antisentido del exón III del mRNA de la proencefalina de ratón (marcados como pares #1, #2 y #3) y se midió el mRNA de la enzima β -actina como control de la calidad de los RNAs y de expresión constitutiva. En las células silvestres que se utilizaron para los experimentos de diferenciación a neutrófilo o macrófago se midió el mRNA de la proencefalina humana con oligonucleótidos que amplifican parte del exon IV. Como controles la expresión constitutiva se midieron los mRNAs de las enzimas β -actina y glutaraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GADPH). Los oligonucleótidos utilizados fueron diseñados en el laboratorio con el programa Oligo-4, sintetizados por Life Technologies y las secuencias se muestran en la tabla siguiente:

Nombre		Secuencia (GIBCOBRL)	Tamaño teórico del fragmento
PENK ratón (Par #1)	Exón III	CAG GAT GAG AGC CAC TTG CT (sentido)	566 pb
	Mouse 3'UTR1	GGG GTC ACT GCT GGA AAA (antisentido)	
PENK ratón (Par #2)	Exón III	CAG GAT GAG AGC CAC TTG CT (sentido)	751 pb
	Mouse 3'UTR2	CAT AGC CAT AAG AGA CCA A (antisentido)	
PENK ratón (Par #3)	Exón III	CAG GAT GAG AGC CAC TTG CT (sentido)	255 pb
	Exón III	AGA AGC TTC TCT TGT TGG TGG CTG TCT TT (a)	
PENK humana	Exón IV	GAA GAA AGC CAT TTG CTA (sentido)	246 pb
	Exón IV	ATT CGT GGC TAC GCT CTC GGT TG (antisentido)	
Control	ACTIN-1	GTC GGC CGC CCT AGG CAC CAG (sentido)	540 pb
	ACTIN-2	CTC TTT ATT GTC ACG CAC GAT TTC (antisentido)	
Control	GAPDH-1	TGC ATG AAT TCT GAT TCT ACC CAC GGC AAG T (s)	380 pb
	GAPDH-2	TGC ATA AGC TTG TCA TGA GCC CTT CCA CGA T (a)	

Las muestras se amplificaron en tubos eppendorf de 0.5ml, adicionando por cada muestra, lo siguiente: para lograr una concentración 200 μ M de cada uno de los nucleótidos activados o dNTPs (Promega), 1 μ M de los oligonucleótidos sentido y antisentido

correspondientes, 1.5 mM de MgCl₂ (GIBCO-BRL), 1.25 U de la enzima Taq Polimerasa (GIBCO-BRL), 2 μl amortiguador para PCR 10X (GIBCO-BRL) y 9.2 μl de agua con DEPC, para un volumen final de 20 μl. La síntesis de un fragmento de DNA por PCR requiere de tres eventos: desnaturalización de la cadena de DNA que funciona como molde, alineación o hibridización del oligonucleótido específico con la secuencia complementaria del DNA blanco, y la síntesis o extensión del DNA por medio de una polimerasa termoestable. La amplificación de los genes arriba mencionados se realizó en tres etapas, en un termociclador (RoboCycler gradient 40, Stratagene), bajo los siguientes tiempos y temperaturas:

		Etapa 1	Etapa 2	Etapa 3
Par #1 PENK ratón Upper: EXON III Lower: 3'UTR1	Desnaturalización	94°C / 5 min	94°C / 1 min	-
	Alineación	65°C / 2 min	65°C / 1 min	-
	Síntesis	72°C / 3 min	72°C / 1.5 min	72°C / 10 min
	Número de ciclos	1	30	1
Par #2 PENK ratón Upper: EXON III Lower: 3'UTR2	Desnaturalización	95°C / 5 min	95°C / 1 min	-
	Alineación	62°C / 2 min	62°C / 1 min	-
	Síntesis	72°C / 3 min	72°C / 1.5 min	72°C / 10 min
	Número de ciclos	1	30	1
Par #3 PENK ratón Upper: EXON III Lower: EXON III	Desnaturalización	94°C / 5 min	94°C / 1 min	94°C / 1 min
	Alineación	55°C / 2 min	55°C / 1 min	55°C / 1 min
	Síntesis	72°C / 3 min	72°C / 1.5 min	72°C / 10 min
	Número de ciclos	1	30	1
PENK humana Upper: EXON IV Lower: EXON IV	Desnaturalización	94°C / 5 min	94°C / 1 min	94°C / 1 min
	Alineación	55°C / 2 min	55°C / 1 min	55°C / 2 min
	Síntesis	72°C / 3 min	72°C / 1.5 min	72°C / 10 min
	Número de ciclos	1	30	1
β- actina Control	Desnaturalización	95°C / 2 min	94°C / 45 min	-
	Alineación	-	60°C / 2 min	-
	Síntesis	-	72°C / 3 min	72°C / 7 min
	Número de ciclos	1	30	1
GAPDH Control	Desnaturalización	94°C / 5 min	94°C / 1 min	94°C / 1 min
	Alineación	60°C / 2 min	60°C / 1 min	60°C / 2 min
	Síntesis	72°C / 3 min	72°C / 1.5 min	72°C / 10 min
	Número de ciclos	1	30	1

Los productos de PCR se fraccionaron por electroforesis en un minigel de agarosa al 3% disuelto en amortiguador TAE teñido con bromuro de etidio y se visualizaron en un transiluminador de luz UV (Stratagene) y se compararon con un marcador VIII de peso molecular (GIBCO) para determinar el tamaño del fragmento.

- **Preparación de extractos celulares**

Para evaluar cualitativa y cuantitativamente los péptidos derivados de la proencefalina en los clones transfectados y en las células silvestres, ambas se cultivaron hasta obtener alrededor de 50 millones de células de cada línea. Se lavaron 3 veces con PBS, se centrifugaron a 2000 rpm por 10 min, y el pellet se congeló a -20°C . Posteriormente los extractos se resuspendieron en ácido acético 2 M, se hirvieron por 15 min, se enfriaron en hielo y se homogenizaron por pasajes sucesivos a través de agujas hipodérmicas de dos diferentes diámetros. Los homogenatos se centrifugaron a 18,000 rpm durante 1h y los sobrenadantes se almacenaron a -20°C .

En los sobrenadantes se realizó la cuantificación de proteínas cuyos resultados se utilizaron para aplicar en los geles de poliacrilamida la misma concentración de éstas de cada extracto de las líneas celulares. Además se las empleó para calcular la concentración de los péptidos derivados de la proencefalina medidos por radioinmunoensayos (RIA).

- **Determinación de la concentración de proteínas**

Para cuantificar las proteínas en los sobrenadantes se utilizó el método de Bradford (Bradford, 1976) modificado por BioRad, que emplea el colorante azul de Coomassi G-250, cuya absorbancia máxima en su forma libre es a 470 nm y unido a proteínas a 595 nm. Las alícuotas de los sobrenadantes se agregaron a un volumen final de 1ml de agua al cual se le agregaron 100 μl del reactivo de color y se leyó en un espectrofotómetro Ultrospec II (LKB, Biochem). Para la curva de calibración se utilizó albúmina, partiendo de una solución de 10 mg/ml se prepararon soluciones de 2, 4, 8, 16 y 32 μg de proteína.

- **Electroforesis en gel de poliacrilamida e inmunoelectrotransferencia**

Con base en el método descrito en Vindrola y cols. en 1998, se prepararon geles de poliacrilamida de 7.3 x 8.3 cm (gel separante: 12% acrilamida, 8% bisacrilamida y 3.75% de 4X Tris-Cl/SDS; gel de aplicación: 3.9% acrilamida, 0.8% bisacrilamida, 3.75% de 4X Tris-Cl/SDS; pH=8.8), iniciando la polimerización de los geles con la adición de persulfato de amonio (0.005%) y acelerándola con TEMED (N, N, N', N'-tetrametiletilendiamina) al 0.01%. La polimerización ocurrió después de 20 min.

Las alícuotas de los extractos celulares se diluyeron en solución amortiguadora para muestras (amortiguador de Laemli: 25 ml de 4X Tris-Cl/SDS pH=6.8, 20 ml de glicerol; 4 g de

SDS, 2 ml de β -mercaptoetanol, 1 mg de azul de bromofenol, aforando a 100 ml), se hirvieron por 5 min., se depositaron en el gel de aplicación (tamaño grande de peine) y se sometieron a electroforesis en una solución amortiguadora a pH alcalino (0.192M glicina, 0.025M Tris, 0.1% SDS) a 100 voltios.

Posteriormente, las bandas de proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa mediante el sistema de electrotransferencia (*Western-Blotting*), durante 1.5 h a 190mA. Terminada la transferencia, los sitios inespecíficos de la membrana se bloquearon por incubación durante 1 h en una solución de Tween 20 al 0.05% disuelta en amortiguador Tris salino (TBS-Tween) (50 mM tris, 200mM NaCl, ph 7.4). Los geles se tiñeron en una solución de azul de Coomasi, y las membranas se incubaron a 4°C toda la noche en agitación constante con los anticuerpos policlonales (obtenidos en conejo) dirigidos contra diferentes epítopes de la proencefalina, y diluidos en una solución de albúmina serica bovina al 3% en amortiguador TBS:

- Heptapéptido (anticuerpo "H4", dilución 1:500, donado por el Dr. Miguel Asai, Instituto Nacional de Psiquiatría, México D.F.)
- Synencefalina completa (dilución 1:500, Donado por el Dr. Jean Rossier, Université Pierre et Marie Curie, Paris, Francia)
- Porción carboxilo terminal de la synencefalina: syn 63-70 (anticuerpo "DAM5", dilución 1:1000, producido en el laboratorio)

Se realizó un control omitiendo el primer anticuerpo e incubando las membranas solamente con la solución de albúmina bovina. Después de dos lavados con amortiguador de TBS-Tween y uno con TBS solo, las membranas se incubaron a temperatura ambiente por 1 h con un segundo anticuerpo obtenido en cabra contra IgG de conejo, marcado con fosfatasa alcalina. Finalmente las membranas se lavaron una vez con TBS-Tween y dos con TBS solo, durante 10 min., y se revelaron con 3-cloro indoil fosfato y azul de nitrotetrazolium disueltos en solución amortiguadora (100mM de Tris, 100mM de NaCl y 5mM de MgCl₂, pH=9.5). En simultáneo con las muestras se corrió un standard de referencia con proteínas de peso molecular conocido y coloreadas (*Rainbow Marker*, Amersham-Pharmacia). Las bandas se analizaron con un densitómetro de imágenes (Bio-RAD, Modelo GS-670), y los resultados se graficaron a través del programa Prism 3.0.

- Cuantificación de los péptidos derivados de la proencefalina por radioinmunoensayo (RIA)

Los procedimientos descritos en este apartado fueron previamente publicados por el laboratorio.

Preparación de las muestras. Con base en la cantidad de proteínas, se liofilizaron alícuotas de 1 ml y 2 ml de los sobrenadantes de los homogenatos celulares en tubos de polipropileno y utilizando el sistema de Speed-Vac. Después de este tiempo, los pellets se reconstituyeron en 200 μ l de amortiguador Tris-HCl (Tris 0.05M, 2mM de CaCl_2 , pH 8.4).

Digestión enzimática secuencial. Se denomina encefalina total o sinencefalina total a la cuantificada luego de someter las muestras a digestión enzimática secuencial con tripsina y carboxipeptidasa-B (CPB). Con este método se pueden identificar y cuantificar las moléculas provenientes de la proencefalina que contengan las secuencias de la Met-encefalina y la sinencefalina. Las muestras reconstituidas en el amortiguador Tris se le agregaron 200 μ l de solución de tripsina-TPCK (Sigma) en una concentración de 20 μ g/ml y se incubaron a 37°C durante toda la noche. Al día siguiente, la enzima se inactivó hirviendo las muestras durante 15 min, se enfriaron, se centrifugaron y se les agregó 100 μ l de carboxipeptidasa-B (CPB) de páncreas porcino (Roche) en una concentración de 0.1 μ g/ml. Después de incubarlas a 37°C durante 1 h exactamente, la acción de la enzima se neutralizó inmediatamente por calor de la misma forma que se hizo con la tripsina. Bajo estas condiciones, el octapéptido (Met-encefalina-Arg-Phe-Leu) y el heptapéptido (Met-encefalina-Arg-Phe) se convierten cuantitativamente en Met-encefalina. Posteriormente, las muestras digeridas se oxidaron por incubación durante toda la noche por adición de 50 μ l de peróxido de hidrógeno al 10% en amortiguador Tris (Tris-HCl 50 mM, 2 mM de CaCl_2 , 2 mM, pH 8.4). Este procedimiento se realizó porque el anticuerpo contra la met-encefalina tiene mayor afinidad por el péptido oxidado.

Radioinmunoensayo (RIA). Los radioinmunoensayos se realizaron en tubos transparentes de poliestireno. Con cada RIA de las muestras se corrió simultáneamente una curva estándar y como trazadores se utilizaron los mismos péptidos usados para la producción de los anticuerpos y la curva standard, marcados con I^{125} .

Los tubos de RIA, mantenidos en baño de hielo, llevaban 100 μ l de muestra en amortiguador Tris, 100 μ l de la dilución del anticuerpo y 100 μ l de la dilución del péptido (10000 c.p.m.) marcado diluidos en un amortiguador de RIA (amortiguador de fosfatos 20 mM, 0.9% de NaCl, 0.01% de albúmina sérica bovina y 0.02% de azida de sodio, pH: 7.4). Posteriormente las muestras se incubaron a 4°C toda la noche. A continuación los péptidos unidos al anticuerpo se separaron de los péptidos libres al agregar a 4°C 1 ml de solución de sulfato de amonio saturado, diluido en agua tridestilada al 70% y 20 μ l de suero bovino fetal como acarreador. Luego de resuspender la mezcla en cada tubo con el vórtex, los tubos se centrifugaron a 3000 r.p.m. durante 30 min a 4°C y se aspiró por vacío el sobrenadante. La radioactividad remanente en el precipitado se midió en un contador gamma (Isodata, 10 canales, ICN) durante 2 min. Los cálculos de concentración se realizaron automáticamente por medio de un programa que posee el contador gamma.

La unión inespecífica se calculó por cuadruplicado agregando 100 μ l del amortiguador de Tris, 100 μ l de amortiguador RIA de fosfatos y 10,000 c.p.m. de la solución de antígeno marcado radiactivamente, y se procedió de la misma forma que con las muestras. Para determinar el 100% de radiactividad se prepararon tubos, también por cuadruplicado, con los mismos componentes que para la unión inespecífica. Estos tubos no se sometieron al proceso de precipitación con suero bovino y sulfato de amonio. El 100% de unión al anticuerpo se determinó en cuatro tubos al agregar a cada uno 100 μ l del amortiguador Tris, 100 μ l de la solución del anticuerpo y 10,000 c.p.m. del antígeno marcado, procediendo a la precipitación de la misma forma que las muestras. Tanto las muestras como las curvas correspondientes se evaluaron por duplicado.

La siguiente tabla esquematiza el contenido de los tubos que se emplearon en este procedimiento:

NÚMERO DE TUBO	NOMBRE	VOLUMEN	CONTENIDO
1,2,3,4	100% de Ag*	100µl	Dilución de Ag*
5,6,7,8	Unión inespecífica	100µl	Dilución de Ag*
		200µl	Buffer utilizado
9,10,11,12	Cero	100µl	Dilución de Ag*
		100µl	Buffer utilizado
		100µl	Dilución de Ab
13 - variable (Depende del péptido)	Curva Estándar	100µl	Dilución de Ag*
		100µl	Dilución de Ab
		100µl	Diluciones seriadas del Ag frío
(Variable)	Muestras	100µl	Dilución de Ag*
		100µl	Dilución de Ab
		100µl	Muestras

Terminología utilizada: Ag* = Antígeno radiactivo, Ab = Anticuerpo

Curvas estándar. Para cada RIA se elaboró la curva estándar utilizando el mismo antígeno que se empleó para la marcación. Las curvas estándar contuvieron diez diferentes concentraciones de los péptidos; sinencefalina (de 8000 a 7.81pg) y met-encefalina (de 4000 a 3.4pg), donde cada punto representa la mitad de la concentración del punto anterior, a saber: 8000, 4000, 2000, 1000, 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.62, 7.81 y 3.4 pg (**Fig. 8**).

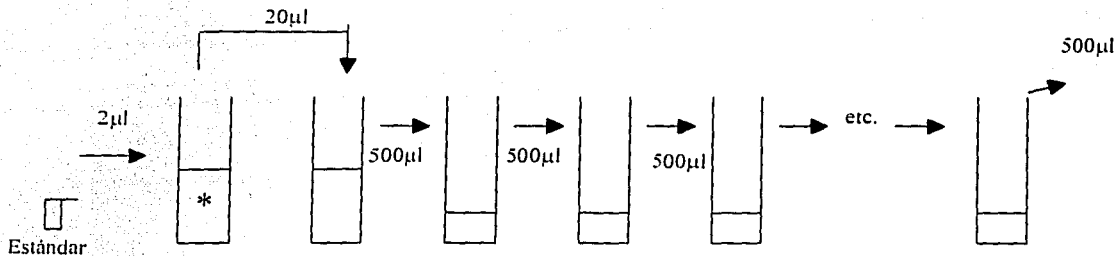


FIGURA 8. Esquema de la curva estándar para el radioinmunoensayo. El asterisco (*) indica la solución primaria en la que se diluye el antígeno marcado radioactivamente, a partir de la cual se toman pequeños volúmenes para las siguientes diluciones (Velázquez, Com. Pers.).

Anticuerpos utilizados. Se utilizaron anticuerpos dirigidos contra diferentes epítopes de la PENK (Fig. 9):

- **Porción carboxilo terminal de la synencefalina [Tyr⁶³]-syn⁶³⁻⁷⁰:** anticuerpo "DAM5" (Vindrola et al, 1998). Este anticuerpo (DAM5) está dirigido contra los ocho aminoácidos finales de la porción C-terminal de la synencefalina. Dicho octapéptido se acopló a albúmina sérica bovina, se inyectó a conejos New Zealand y se purificó por afinidad. El anticuerpo usado mostró una reactividad cruzada del 1% con la synencefalina de 8.6kDa encontrada en la médula adrenal bovina, cuando esta se digirió con tripsina mostró una reactividad cruzada del 20% la cual aumentó al 100% cuando se digirió completamente utilizando tripsina y carboxipeptidasa B. No se observó reactividad cruzada con la met-enkefalina, met-enkefalina-Arg, met-enkefalina-Arg-Phe, met-enkefalina-Arg-Gly-Leu, leu-enkefalina, péptidos F y E, dinorfina B, amidorfina y metorfamida.

- **Met-enkefalina :** anticuerpo "E-11" (Vindrola, 1981). El anticuerpo policlonal dirigido contra este pentapéptido. Reconoce a la met-enkefalina oxidada en un 100%, y tiene un cruzamiento del 0.3 % con la leu-enkefalina y menos del 0.01% con met-enkefalina-Arg, dynorfina y con α , γ y β -endorfina.

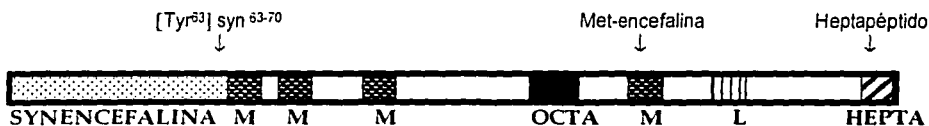


FIGURA 9. Esquema de los epítopes de la proencefalina reconocidos por diferentes anticuerpos (Modificado de Rossier 1993).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Análisis de resultados. Los resultados se expresaron en picogramos por miligramo de proteínas. Estos datos se graficaron por medio del programa Prism 3.0

• **Inmunocitoquímica**

Este procedimiento fue descrito anteriormente (Terán, 2003). Las células HL-60 silvestres y las transfectadas permanentemente con el cDNA del exón III de la proencefalina de ratón, se adhirieron a cubre-objetos de vidrio recubiertos con poli-L-lisina por incubación durante 10 min. a temperatura ambiente, se fijaron con metanol-acetona (50:50) durante 5 min. a -20°C. Luego de realizar tres lavados con PBS durante 10 min., las células se inubaron en una solución de bloqueo (5% de suero bovino fetal diluido en PBS) durante 15 min. a temperatura ambiente, para evitar la unión inespecífica de los anticuerpos. Se lavaron 3 veces con PBS y se incubaron durante toda la noche a 4°C con los siguientes anticuerpos primarios dirigidos contra distintos epítopes de la molécula de la PENK:

- **Porción carboxilo terminal de la synencefalina** [Tyr⁶³]-syn⁶³⁻⁷⁰ (anticuerpo "DAM5", dilución 1:200) (Vindrola, 1998).
- **Heptapéptido** (anticuerpo "H4" en dilución 1:200, donado por el Dr. Miguel Asa).
- **Synencefalina completa** (dilución 1:200, donado por el Dr. Jean Rossier).

La especificidad del ensayo de inmunocitoquímica se comprobó por omisión del primer anticuerpo en algunos preparados. Después de tres lavados con PBS, las células se incubaron en cámara húmeda y en obscuridad total con el segundo anticuerpo (fragmento Fab'2 de chivo contra cadenas H+L de conejo) marcado con isotiocinato de fluoresceína (FIT-C), diluido en solución de bloqueo, durante 1 h a temperatura ambiente. Posteriormente, los preparados se lavaron tres veces con PBS, y se montaron en portaobjetos con solución de montaje (glicerol). Finalmente las laminillas se observaron en un microscopio Nikon E-800 y las imágenes necesarias se obtuvieron a través de una cámara fotográfica Nikon FDX-35, acoplada al microscopio. Las diapositivas se digitalizaron y analizaron utilizando el programa Photoshop 5.0.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

RESULTADOS

1. Cultivo y expansión de los clones de células HL-60 transfectadas en forma estable con el cDNA de la proencefalina.

Desde el momento en que se lograron los clones de células HL-60 que contienen el cDNA con el exón III de la proencefalina de ratón, se veía claramente que estas células crecían a una velocidad mucho menor que las células HL-60 silvestres o que otras células HL-60 transfectadas con diferentes construidos que no tienen efectos sobre la proliferación celular. Esta información fue corroborada por la Dra. Padrós con los datos de incorporación de timidina tritiada (Figura 10).

Incorporación de ^3H -timidina en clones de células HL-60 transfectadas en forma estable con el cDNA de la proencefalina PLBC-1

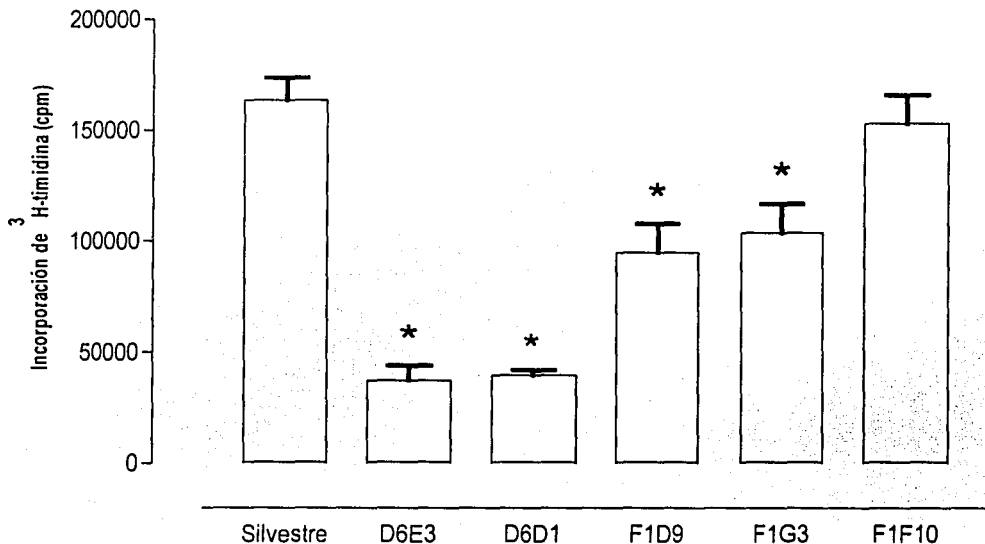


FIGURA 10. Estos resultados previos se obtuvieron recientemente en el laboratorio (Padrós y cols) y su manuscrito se encuentra en preparación. * $p < 0.05$ comparado con las células silvestres utilizando el ensayo de la "t" de Student

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

2. Expresión del gen de la proencefalina en la línea celular HL-60, efecto de la diferenciación celular.

La línea celular de leucemia promielocítica humana HL-60 contiene el mRNA de la proencefalina (Fig. 11). Este mensajero sólo se detectó al utilizar pares de oligonucleótidos que amplifican el exón IV. Como control positivo de la especificidad de estos resultados, se usaron los mismos pares de oligonucleótidos que se habían usado en una línea celular de neuroblastoma humano, los cuales comprenden los exones II, III y IV, así como el intrón A, (Terán 2003, Tesis de Maestría). Esta última línea, la SK-N-MC, a diferencia de la HL-60, produce tres mensajeros: a) uno que contiene los exones II-III y IV, b) otro que abarca el intrón A, exón III y IV, y c) el que corresponde al observado en la línea HL-60 y que solamente contiene el exón IV. Si bien este último mRNA ya fue secuenciado, el trabajo de purificación del mismo no correspondió a este trabajo de tesis. Estos resultados nos muestran que la línea HL-60, al igual que la de fibroblastos embrionarios de ratón, expresa un mRNA de la proencefalina que no posee la secuencia que codifica para el péptido señal.

La diferenciación celular a macrófago y a neutrófilo (esta última inducida por dos diferentes agentes, DMSO y ácido retinóico) produjo un incremento significativo en los niveles del mRNA de la proencefalina (Fig. 11). Utilizando como agente diferenciador el DMSO, el efecto se observó a partir de las 24 horas (Fig. 11, línea 2), alcanzando el máximo a las 48 horas (línea 3), este incremento se mantuvo hasta por 5 días (línea 4), que es cuando se alcanza la diferenciación celular completa. Los valores más altos se detectaron en las células diferenciadas a macrófago (línea 5).

Esta línea celular contiene proteínas derivadas de la proencefalina de 44-46 kDa, 34-32 kDa, 27 kDa 17-16 kDa. Dichas moléculas se caracterizaron por inmunoelectrotransferencia utilizando anticuerpos dirigidos contra la porción amino (Fig. 12, B) y contra el carboxilo terminal de la proencefalina (Fig. 12, A). La diferenciación a neutrófilo con DMSO (Fig. 12, línea 7) y con ácido retinóico (Línea 6) indujo un aumento en los niveles de las proteínas de 34-32 kDa y en las de 46-44 kDa, en tanto que con la diferenciación a macrófago solamente se observó aumento en aquellas de 46-44 kDa (Línea 8). En un estudio previo de distribución subcelular de los PDPs se encontró que las proteínas con peso molecular de 34-32 kDa se encuentran localizadas en el núcleo (Vindrola y cols, 1998).

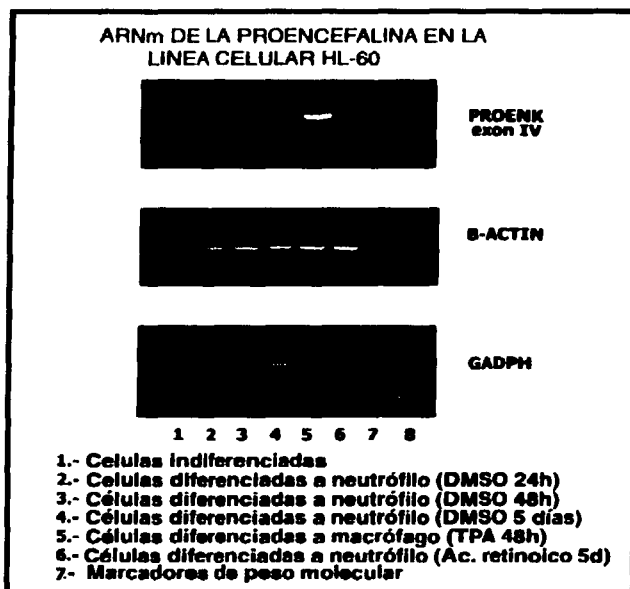
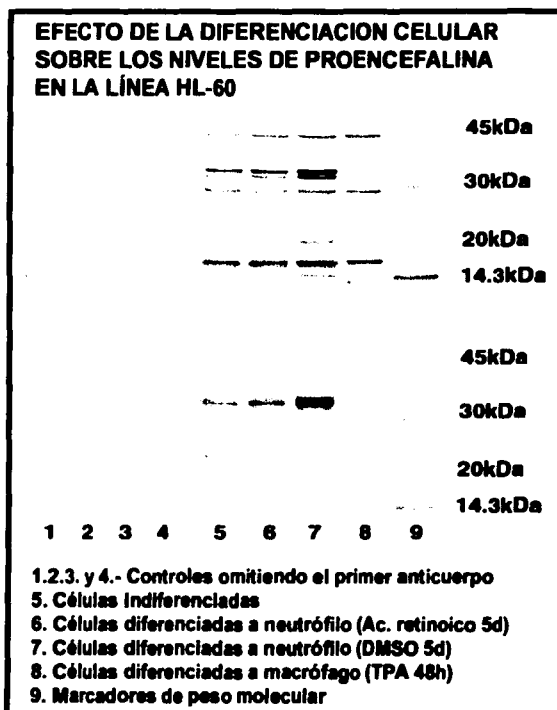


FIGURA 11. mRNA de la proencefalina en la línea celular HL-60 diferenciada a neutrófilo con DMSO y ácido retinoico, y a macrófago con TPA.

FIGURA 12.

Imunoelectrotransferencia de la proencefalina en células HL-60 utilizando anticuerpos dirigidos contra el octapéptido C-terminal de la sinencefalina (anticuerpo DAM5) (A) y el heptapéptido (B). En los carriles 1 a 4 se omitió el uso del primer anticuerpo.



TESIS CON FALLA DE ORIGEN

La diferenciación celular de la línea HL-60 produce un arresto en el crecimiento de la misma y por ende, una marcada disminución de la proliferación celular. De acuerdo a los datos anteriores, los procesos de diferenciación se presentaron acompañados por el aumento en los niveles de expresión del mensajero y de las proteínas derivadas de la proencefalina. Esto nos llevó a pensar que el efecto de la transfección permanente del cDNA que solamente contiene el exón III del ratón (IV del humano) debería producir un efecto opuesto al observado en la línea celular de fibroblastos embrionarios de ratón. De hecho fue este el resultado que se encontró en el laboratorio, antes de comenzar con los estudios bioquímicos de esta tesis.

3. Determinación de la presencia del mRNA de la proencefalina proveniente de la transcripción del cDNA transfectado en forma estable los clones de células HL-60.

La presencia del mRNA proveniente de la transcripción del cDNA que contiene solamente el exón III de ratón se analizó por medio de una reacción en cadena de la polimerasa acoplada a transcriptasa reversa (RT-PCR). Previamente se controló la integridad del RNA total en las diferentes muestras por electroforesis en gel de agarosa y tinción posterior con bromuro de etidio, así como con la cuantificación del mRNA de la beta-actina.

En ninguno de los clones, al igual que en las células HL-60 silvestres, se pudo detectar el mRNA transcrito por el cDNA de la proencefalina transfectado. Como se menciona en la metodología, se ensayaron tres pares de oligonucleótidos cubriendo las regiones traducibles y no traducibles del mensajero. Sin embargo, como veremos mas adelante, las células transfectadas mostraron un aumento en los niveles de la proteína. Además la viabilidad de este cDNA se demostró por datos que no se muestran en esta tesis (Tesis de Doctorado María Rosete Enriquez, manuscrito en preparación), donde se comprobó por experimentos de transcripción y traducción *in vitro* la síntesis de tres proteínas de 22,25 y 28kDa. La mayoría de los estudios publicados solamente reportan los cambios en los niveles de las proteínas traducidas luego de las transfecciones estables, para los próximos estudios el laboratorio además de la proencefalina va a medir la neomucina como complemento y control de la viabilidad del cDNA transfectado. La imposibilidad de detección del mRNA podría deberse a una corta vida media del mismo.

4. Caracterización de los péptidos derivados de la proencefalina en los clones de HL-60 por inmunoelectrotransferencia

En todos los clones se observaron las mismas moléculas derivadas de la proencefalina que se encuentran en las células silvestres y que se describieron con anterioridad (Fig. 13). Estas fueron identificadas con tres diferentes anticuerpos antes descritos. La diferencia fundamental que se encontró consiste en que cuatro de los cinco clones presentaron un incremento significativo en los niveles de las moléculas con peso molecular de 34-32 kDa que corresponden a las que se detectan en el núcleo luego de un fraccionamiento subcelular. Este efecto se pudo verificar con dos anticuerpos dirigidos contra el heptapéptido, la sinencefalina completa y el carboxilo terminal de la sinencefalina (Fig. 13 A, B, C; respectivamente). Por otro lado, el anticuerpo que reconoce la secuencia completa de la sinencefalina demostró ser el más sensible, pues el efecto de aumento se pudo ver en todos los clones seleccionados. Cabe destacar que en todos los tipos celulares donde se ha utilizado este anticuerpo, sólo se detectan las moléculas de 34-32 y 17-16 kDa (ver Fig. 13). Además hay que recordar que el exón III contiene más del 50% de la secuencia de la sinencefalina. Estos resultados corroboran que la transfección estable del cDNA que contiene únicamente el exón III de la proencefalina de ratón aumenta los niveles de las proteínas de 34-32 kDa, tal y como se observa en los procesos de diferenciación celular. Además en ambos casos este aumento fue acompañado de una reducción importante en la proliferación celular. Estudios posteriores, utilizando marcadores de membranas específicos permitirán corroborar si la proencefalina nuclear produce o participa en la diferenciación de la línea celular HL-60. Uno de los datos interesantes que se obtuvieron con las diferentes células que se han transfectado con este cDNA de la proencefalina en el laboratorio es que el tipo de proteína que incrementa sus niveles en los clones es diferente en cada una de ellas pero corresponde a la proteína endógena respectiva que viaja al núcleo.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

PROENCEFALINA EN LOS CLONES DE CÉLULAS HL-60 TRANSFECTADAS EN FORMA ESTABLE CON EL CONSTRUIDO PLBC-1

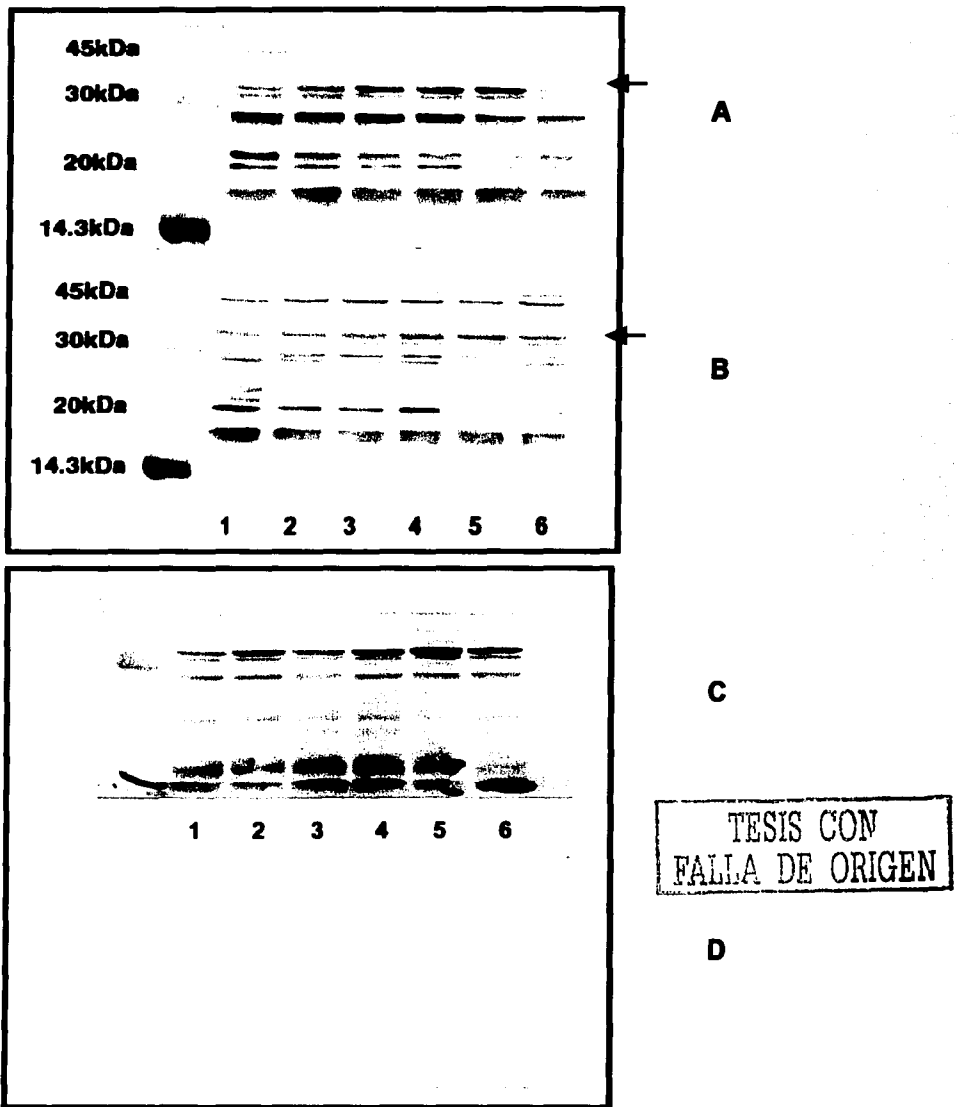


FIGURA 13 . Inmunoelctrotransferencia para las proteínas derivadas de la proencefalina en células HL-60 silvestres (1) y en los clones D6E3 (2), D6D1 (3), F1d9 (4)F1G3 (5) y F1F10 (6). Las proteínas se identificaron con anticuerpos dirigido contra el heptapéptido C-terminal de la proencefalina (A), el octapéptido C-terminal de la sinencefalina (B) y la sinencefalina completa (C). En)D) se muestran los resultados que se obtienen al omitir el primer anticuerpo. Resultados de un solo experimento.

Análisis por inmunoelectrotransferencia de la proencefalina en clones de células HL-60 transfectadas en forma estable con el cDNA PLBC-1.

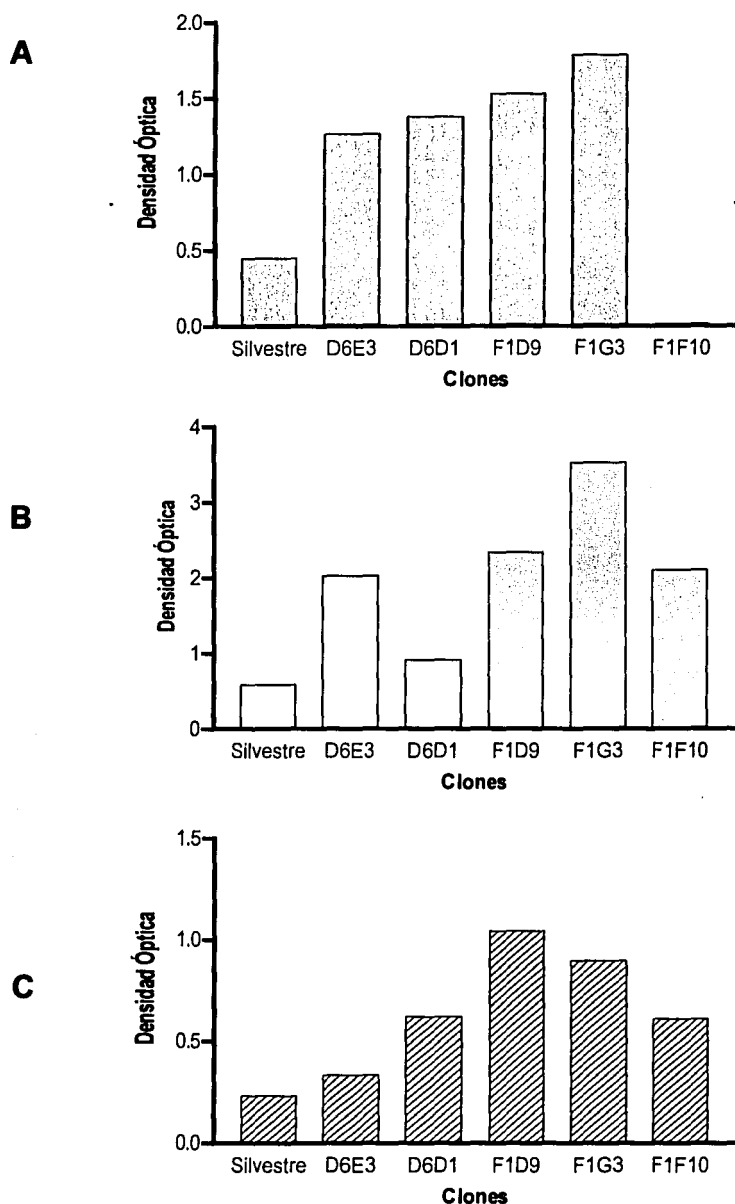


FIGURA 14. Análisis densitométrico de las moléculas de 34-32 kDa en los diferentes clones de células HL-60. A) HEPTA anticuerpo contra el heptapéptido, B) anticuerpo contra la sinencefalina completa, C) anticuerpo contra el c-terminal de la sinencefalina.

5. Cuantificación de los péptidos derivados de la proencefalina por radioinmunoensayo

Los péptidos derivados de la proencefalina presentes tanto en las células silvestres como en los diferentes clones, se cuantificaron por radioinmunoensayo utilizando anticuerpos dirigidos contra la porción carboxilo-terminal de la sinencefalina (proencefalina 63-70) y contra la met-encefalina después de someter las muestras a una digestión enzimática secuencial con tripsina y carboxipeptidasa B. Al igual que lo observado en la inmunoelectrotransferencia, el radioinmunoensayo (Fig. 15) muestra un aumento en los niveles de la encefalina total en los extractos de los clones transfectados con el cDNA del exón III de la proencefalina de ratón. Sin embargo, este aumento es poco perceptible debido a que este método posee una sensibilidad y eficiencia menores que la inmunoelectrotransferencia.

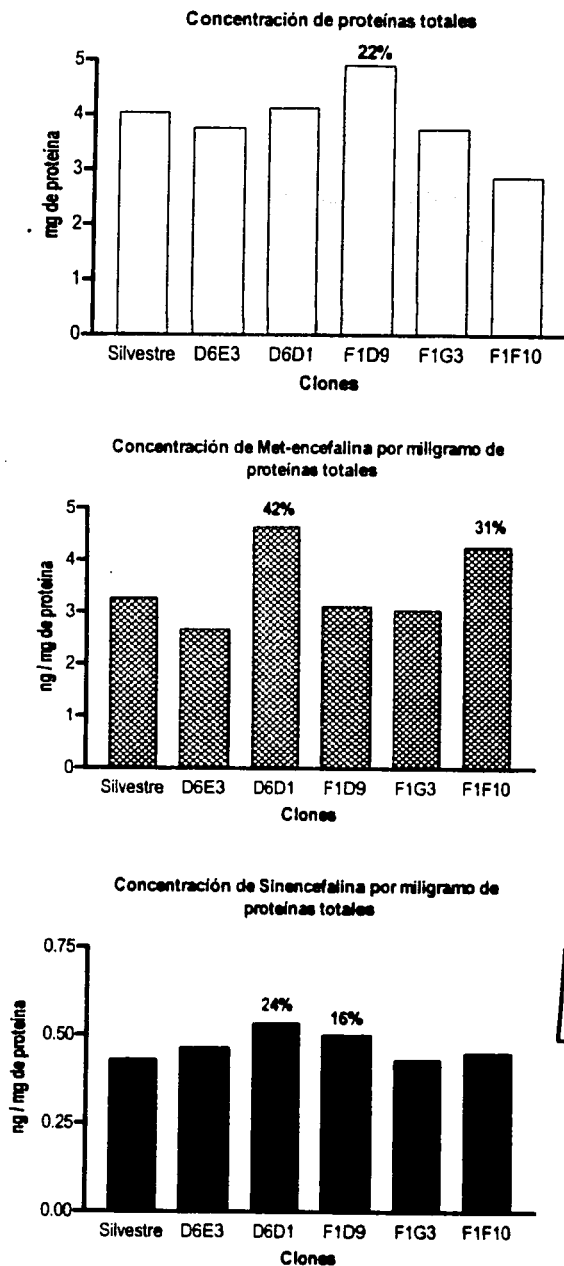
6. Localización subcelular y subnuclear de la proencefalina por inmunocitoquímica.

Los resultados mostraron claramente que los clones de la línea celular HL-60 transfectados permanentemente con el cDNA que contiene solamente el exón III de la proencefalina de ratón presentaron una mayor intensidad de la fluorescencia en los nucleolos, los cuales además presentaron un tamaño menor (Fig. 16 A). Por otro lado, se observó una mayor inmunoreactividad en forma de punteado grueso y en formaciones aún no identificadas claramente que se localizan en el nucleoplasma (ver flechas en la figura) (Fig. 16 B).

Fue muy notorio el cambio general en la morfología de las células transfectadas, sin embargo, la imagen no corresponde a ninguna de las formas que se observan después de que las células han pasado por los procesos de diferenciación hacia neutrófilo o macrófago (ver Fig. 16 C y D). Estudios posteriores en los que se utilicen marcadores específicos para la diferenciación de la línea celular HL-60, podrán ayudarnos a discernir la naturaleza de estos cambios.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Análisis por radioinmunoensayo (RIA) de los péptidos derivados de la proencefalina en clones de células HL-60 transfectadas en forma estable con el construido PLBC-1.



TESIS CON FALLA DE ORIGEN

FIGURA 15 Análisis de la concentración de proteínas totales y de los péptidos derivados de la PENK (Met-enkefalina y Sinencefalina) obtenidos a partir de los homogenatos celulares de distintos clones de células HL-60.



A



B



C



D

FIGURA 16. Localización intracelular por inmunofluorescencia de la proencefalina en células HL-60 silvestres (A, C) y en los clones F1D9 (B,D), utilizando el anticuerpo dirigido contra las secuencias de la **sinencefalina completa** (renglón superior) y el **octapéptido C-terminal de la sinencefalina** (Syn 63-70) (renglón inferior).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

DISCUSIÓN

Durante 20 años la proencefalina ha sido considerada, exclusivamente, como el precursor de una gama de péptidos biológicamente activos, de los cuales los más importantes son los péptidos opioides y, entre ellos las encefalinas, que fueron los primeros de estos péptidos en ser descubiertos. Esto es de por sí un hecho que ocurre en las neuronas maduras tanto del sistema nervioso central como del periférico, así como en células endocrinas de la hipófisis y las células cromafines de la glándula suprarrenal.

Al descubrirse que durante el desarrollo embrionario se presentan altas concentraciones del mRNA de la proencefalina en células de diferentes linajes y que este fenómeno está acompañado de la presencia de precursores proteicos, pero no de los péptidos opioides, surgieron varias líneas de trabajo para responder a esta pregunta. No fue sino hasta el año 1995 que un estudio realizado en Inglaterra por el grupo de la Dra. Barbara Spruce, se demostró que en células mesenquimáticas en cultivo, la proencefalina se encuentra como molécula intacta en el núcleo y nunca se procesa para dar lugar a los péptidos opioides. Lo mismo fue reportado por el grupo del Dr. Vindrola en tumores de hipófisis humana (Vindrola 1998). En estos trabajos se realizaron estudios de inmunocitoquímica y bioquímicos, en los que se observó que la proencefalina estaba asociada a la cromatina y se distribuía en forma de puntados gruesos y finos, así como en estructuras llamadas máculas ("*speckels*"). Además, en el estudio hecho en tumores (Vindrola y cols) se describe por vez primera un doblete de moléculas para la proencefalina de 44-46 kDa, que después se corroboró en tumores de mama que también expresan el gen de la proencefalina.

En el laboratorio de Bioquímica Celular del Instituto de Fisiología de la BUAP, se están realizando una serie de estudios cuyo objeto consiste en analizar los aspectos moleculares, bioquímicos y fisiológicos de la proencefalina nuclear. Al principio la mayoría de los experimentos se enfocaron, como ya se mencionó en el planteamiento del problema, en células mesenquimáticas no transformadas (Rosete y cols, manuscrito y tesis en preparación). Así se demostró que la proencefalina es una proteína nucleolar, que se une al DNA e induce un aumento en la proliferación de fibroblastos embrionarios de ratón.

Otro de los intereses del grupo fue conocer lo que ocurría con la proencefalina nuclear en los procesos tumorales. En publicaciones previas ya se habían descrito niveles altos del mRNA de este precursor en diferentes tipos de tejidos y líneas celulares cancerosas. Además, la hipermetilación de la región promotora del gen de la proencefalina se ha descrito como un marcador sensible de la actividad tumoral. Recientemente se encontró que la línea celular de neuroblastoma humano SK-N-MC produce la molécula de proencefalina nuclear la cual se localiza en los nucleolos, máculas y punteados grueso y fino (Terán, 2003; Tesis de maestría, trabajo manuscrito en preparación). Sin embargo el papel funcional de la proencefalina en estas células no ha quedado esclarecido completamente.

El mismo grupo ha trabajado durante varios años en células cancerosas de origen hematopoyético. Los clones sobre los cuales versa el presente proyecto se diseñaron a partir de la línea celular de leucemia promielocítica humana conocida como HL-60, cuyas células fueron transfectadas permanentemente con el cDNA del exón III de ratón de la proencefalina. En estos clones se observó una clara disminución de la proliferación celular; aunado a este dato, en la presente tesis se demuestra que se produce un aumento significativo en los niveles de las moléculas de 34-32 kDa, y de su inmunoreactividad en los nucleolos. Estos resultados sugieren que el cDNA transfectado genera un mRNA similar al endógeno que producen estas células (sólo exón IV), lo que se demuestra por el aumento en los niveles de una de sus proteínas, y no en la aparición de altos niveles de una proteína distinta. Los experimentos de RT-PCR no permitieron visualizar el mRNA debido, quizá, a que el mensajero se degrada muy rápidamente.

Por otro lado se demostró que el arresto del crecimiento que se produce por la diferenciación a neutrófilo de la línea HL-60 induce también un aumento en los niveles de la proencefalina nuclear. Es importante aclarar que el ácido retinóico se utiliza en la terapia de pacientes con leucemia por su capacidad de arrestar el crecimiento e inducir la diferenciación a neutrófilo.

Estos resultados sugieren que a diferencia de lo que ocurre en células no tumorales al menos en algunos tipos de leucemia, la proencefalina nuclear podría actuar como un supresor tumoral. Esta idea ya fue sugerida para otros tumores cuando se demostró el fenómeno de hipermetilación de la región promotora de este gen, fenómeno característico de los represores tumorales tales como el p21 y el p16, entre otros.

CONCLUSIÓN

En esta tesis se demuestra que en los clones de la línea celular HL-60 transfectados en forma estable con un cDNA de la proencefalina de ratón que sólo contiene el exón III, se produce un aumento significativo en los niveles de la proencefalina nuclear, fundamentalmente en los nucleolos, al igual que ocurre durante el proceso de diferenciación a neutrófilo de esta línea celular. En ambos casos se produce un arresto del crecimiento que sugiere que, en este tipo de células, esta proteína podría actuar como un supresor tumoral.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

BIBLIOGRAFÍA

- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K & Walter P. (2002), Molecular Biology of the Cell, ed. Garland Science, 4ª. Ed., EEUU, 1463 pp.
- Balalkin GY, Ponomarev D, Sarkisyan RA & Terenius L.(1991), Sequence similarity between opioid precursors and DNA-binding proteins K, Federation of European Biochemical Societies (FEBS), Vol. 282(1), Abril, pp 175-177.
- Balalkin G, Telkov M, Yakóvleva T & Terenius L, (1995), [Leu⁵]Enkephalin-encoding sequences are targets for a specific DNA-binding factor, Proc. Natl. Acad. Sci., Vol. 92, Septiembre, pp 9024-9028.
- Bautista E, D. (1997), Biosíntesis de la proencefalina A durante la diferenciación de la línea celular HL-60, Tesis de Maestría en Ciencias Fisiológicas, BUAP, Puebla, Mex.
- Brownstein, Michael, J.(1993), A brief history of opiates, opioid peptides, and opioid receptors, Proc. Natl. Acad. Sci, USA 90, pp 5391-5393.
- Borsodi A & Toth G. (1995), Characterization of Opioid Receptor Types and Subtypes with new ligands, Ann N Y Acad Sci, Vol. 10(757), pp 1251-1262.
- Bottger A. & Spruce B.J. (1995), Proenkephalin Is a Nuclear Protein Responsive to Growth Arrest and Differentiation Signals, J. Cell Biol. Vol. 130, pp 1251-1262.
- Comb M, Rosen H, Seeburg P, Adelman J & Herbert E (1982), Primary structure of the human proenkephalin gene, Nature, Vol. 295, pp 663-666.
- Goldstein AG, Fischli W, Lowney LI, Hunkapiller M & Hood L (1981), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 78, pp 7219-7223.
- Goumont Y, Strub JM, Moniatte M, Nullans G, Poteur L, Hubert P, Van Dorsselaer A, Aunis D & Metz-Boutigue MH (1996), The C-terminal biphosphorylated proenkephalin-A-(209-237)-peptide from adrenal medullary chromaffin granules possesses antibacterial activity, Eur. L Biochem, Vol. 235, pp 516-525.
- Lewis RV, Stein S, Grber LD, Rubinstein M & Udenfriend S (1978), High molecular weight opioide-containing proteins in stristum, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, Vol. 75(8), pp 4021-4023.
- Linner KM, Quist HE & Sharp BM, (1996), Expression and Function of Proenkephalin A Messenger Robonucleic Acid in Murine Fetal Thymocytes, Endocrinology, Vol. 173(3), pp 857-863.
- Liston D, Pate G, Rossier J, Verbanck P & Vanderhaeghen JJ (1984), Processing of proenkephalin is tissue-specific, Science, Agosto, Vol. 225(4663), pp 734-7.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

A TESIS NO SATI
LA BIBLIOTECA

- Mains RE, Dickerson IM, May V, Stoffers DA, Perkins SN, Ouafik LH, Husten EJ & Eipper BA (1990), Cellular and Molecular Aspects of peptide Hormone Biosynthesis, Frontiers in Neuroendocrinology, NY, USA, Vol. 11(1), pp1-38.
- Nelson DL & Cox MM. (2000), Lehninger Principles of Biochemistry, Worth Publishers, 3^a. Ed. EEUU.
- Noda M, Furutani Y, Takahashi H, Toyosato M, Hirose T, Inayama S, Nakanishi S & Numa S (1982), Cloning and sequence analysis of cDNA for bovine adrenal proenkephalin, Nature, Vol. 295, Enero, pp 202-208.
- Padrós MR, Saravia F, Vindrola O (1995), Antibodies against the amino-terminal portion of proenkephalin inhibit DNA synthesis in human peripheral mononuclear cells, Journal of Neuroimmunology, vol. 61, 79-83
- Przewlocki R, Hassan AHS, Lason W, Epllen C, Herz A & Stein C, (1992), Gene expression and localization of Opioid peptides in immune cells of inflamed tissue: functional role in antinociception, Neuroscience, Vol. 48(2), UK, 491-500.
- Rodriguez Vida MI, Kleid MC, Ase A, Finkielman S, Nahmod VE & Vindrola O (1994), Syntenkephalin processing in embryonic rat brain, Developmental Brain Research, Vol. 77, pp 151-156.
- Rosete Enríquez, M. (1999), Proencefalina A en la piel del Ambystoma tigrinum: expresión, procesamiento postraduccional y efecto del estrés por inmovilización, BUAP, Puebla, Tesis de Licenciatura.
- Rosen H, Douglass J & Herbert E (1984), Isolation and characterization of the rat proenkephalin gene, J Biol Chem, Nov., Vol. 259(22), pp 14309-13.
- Rossier, J. (1993) Biosynthesis of Enkephalins and Proenkephalin-Derived Peptides, Handbook of Experimental Pharmacology, Vol. 104/I, Chapter 18, 423-439.
- Roth KA, Lorenz RG, Unanue RA & Weaver, CT (1989), Nonopiate active proenkephalin-derived peptides are secreted by T helper cells, FASEB J., Vol 3, pp 2401-2407.
- Saravia F, Ase A, Aloyz R, Kleid MC, Ines M, Vida R, Nahmod VE & Vindrola O. (1993), Differential Posttranslational Processing of Proenkephalin in Rat Bone Marrow and Spleen Mononuclear Cells: Evidence for Syntenkephalin Cleavage, Endocrinology, Vol. 132(4), pp 1431-1437.
- Saravia F, Padros MR, Ase A, Aloyz R, Duran S & Vindrola O, (1998), Differential response to a stress stimulus of proenkephalin peptide content in immune cells of naive and chronically stressed rats, Neuropeptides, Vol. 32(4), pp 351-359.

- Terán V. L. (2003) Transcripción, traducción, distribución subcelular y subnuclear de la proencefalina y su efecto en la sobre-expresión de su cDNA sobre la proliferación celular de la línea SK-N-MC, Tesis de Maestría, BUAP, Puebla, Mex.
 - Vindrola O (1979), Las encefalinas. Aspectos generales y posible papel fisiológico, Mayo-Agosto, Psiquiatría, Vol. 9(2), pp 47-56.
 - Vindrola O, Briones R, Asai M & Fernandez-Guardiola A (1981), Brain content of leu5- and met5-enkephalin changes independently during the development of kindling in the rat, Neuroscience Letters, Vol. 26, pp 125-130.
 - Vindrola O, Padrós MR, Sterin-Prync A, Ase A, Finkielman S, Nahmod V (1990), Proenkephalin system in human polymorphonuclear cells. Production and release of a novel 1.0-kD peptide derived from synenkephalin, J Clin Invest, Aug 86(2), pp 531-537.
 - Vindrola O, MR Padrós, D Bautista. Opioides endógenos en la comunicación entre el sistema nervioso y el sistema inmune, Instituto de Fisiología, BUAP.
 - Vindrola O, Chervin A, Vitale M, Mella AN, Aloyz R & Basso A, (1998), Elevated Proenkephalin-Derived Peptide levels in ACTH-Producing Adenomas, Endocrine, Vol. 8(3), Junio, pp 231-240.
 - Weisinger G. (1995), The transcriptional regulation of the proenkephalin gene, Chem. J., UK, Vol 307, pp 617-629.
 - Zagon IS, Wu Y & McLaughlin PJ (1999), Opioid growth factor and organ development in rat and human embryos, Brain Research, Vol. 839, Junio, pp 313-322.
 - Zurawski G, Benedick M, Kamb BJ, Abrams JS, Zurawski SM & Lee FD (1986), Activation of Mouse T-Helper Cells Induces Abundant Preproenkephalin mRNA Synthesis, Science, Vol. 232, Mayo, pp 772-775.
- 1). <http://www.geocities.com/manesvil/opio.htm>
 - 2). <http://www.2020site.org/opium>

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

ÍNDICE DE FIGURAS

INTRODUCCIÓN:

1. **FIGURA 1. Esquema de la Amapola *Papaver somniferum* de la que se extrae la sustancia conocida como opio (2).**Pag. 3
2. **FIGURA 2. Comparación de la estructura de la morfina con la naloxona y la met-enkefalina.** El anillo A de la morfina corresponde al anillo A de la naloxona (antagonista opiáceo) y a la Tirosina N-terminal de la met-enkefalina (Muller y Borsodi, 1995).Pag. 5
3. **FIGURA 3. Esquema del proceso general de transcripción de un gen y procesamiento del mRNA resultante.** La RNA polimerasa II es la enzima encargada de la elongación del transcrito primario a partir de una de las hebras de la doble hélice de DNA, correspondiente al gen que se va a transcribir. Aproximadamente un tercio del RNA del transcrito primario o pre-mRNA se elimina por acción enzimática (Modificado de Nelson & Cox 2000).Pag. 8
4. **FIGURA 4. Esquema de la traducción y procesamiento de proteínas** (modificado de la figura original de Mains et al., 1990).Pag. 9
5. **FIGURA 5. Maduración enzimática del precursor de neuropéptidos.** Para liberar las secuencias de los péptidos derivados de los precursores, se cortan por acción enzimática los aminoácidos básicos adyacentes: lisina (Lys) o arginina (Arg) (Modificado de Rossier, 2003).Pag. 11
6. **FIGURA 6. Biosíntesis de la penK en la médula adrenal de bovino** (Modificado de Rossier, 1993)..Pag. 14
7. **FIGURA 7. Expresión del gen de la proencefalina.** El gen de la PENK de rata está formado por tres exones y 2 intrones. Al transcribirse se genera un transcrito primario que pierde los intrones en un proceso de corte y pegado ("splicing"), lo que genera mRNA de 1.4 kilobases. La traducción de este mRNA inicia en el cuarto nucleótido del exón 2 y da lugar a la preproencefalina. Los primeros 24 aminoácidos corresponden al péptido señal, secuencia que da entrada a la preproteína hacia el retículo endoplásmico. Al eliminarse el péptido señal queda el precursor proteico o proencefalina, que dentro de las membranas reticulares sufrirá las modificaciones postraduccionales que darán lugar a las enkefalinas (Modificado de Weisinger 1995. Revisión).Pag. 15

METODOLOGÍA:

8. **FIGURA 8. Esquema de la curva estándar para un radioinmunoensayo** El asterisco (*) indica la solución primaria en la que se diluye el antígeno marcado radioactivamente, a partir de la cual se toman pequeños volúmenes para las siguientes diluciones (Velázquez, Com. Pers.).Pag. 34
9. **FIGURA 9. Esquema de los epitopes de la proencefalina reconocidos por diferentes anticuerpos** (Modificado de Rossier 1993).Pag. 34

RESULTADOS:

10. **FIGURA 10. Incorporación de ³H-timidina en clones de células HL-60 transfectadas en forma estable con el cDNA de la proencefalina PLBC-1.** Estos resultados previos se obtuvieron recientemente en el laboratorio (Padrós y cols) y su manus-crito se encuentra en preparación. *p<0.05 comparado con las células silvestres utilizando el ensayo de la "t" de Student.Pag. 36
11. **FIGURA 11. ARNm de la proencefalina en la línea celular HL-60 diferenciada a neutrófilo con DMSO y ácido retinóico y a macrófago con TPA.**Pag. 38
12. **FIGURA 12. Inmunoelctrotransferencia de la proencefalina en células HL-60 utilizando anticuerpos dirigidos contra el octapéptido C-terminal de la sinencefalina (anticuerpo DAM5) (A) y el heptapéptido (B).** En los carriles 1 a 4 se omitió el uso del primer anticuerpo.Pag. 38
13. **FIGURA 13. Inmunoelctrotransferencia para las proteínas derivadas de la proencefalina en células silvestres (1) y en los clones: D6E3 (2), D6D1 (3), F1G3 (5) Y F1F10 (6).** Las proteínas se identificaron con los anticuerpos dirigidos contra el heptapéptido C-terminal de la proencefalina (A), el octapéptido C-terminal de la sinencefalina (B) y la sinencefalina completa (C). En (D) se muestran los resultados que se obtienen al omitir el primer anticuerpo. Resultados de un solo experimento.Pag. 41
14. **FIGURA 14. Análisis densitométrico de las moléculas de 34-32 kDa en los diferentes clones de células HL-60.** A) Anticuerpo contra el heptapéptido, B) anticuerpo contra la sinencefalina completa, destaca el clon F1G3. C)Anticuerpo contra el C-terminal de la sinencefalina.Pag. 42
15. **FIGURA 15. Análisis de la concentración de proteínas totales y de los péptidos derivados de la proencefalina** (Sinencefalina total y Met-enkefalina total) obtenidos a partir de los homogenatos celulares de los distintos clones HL-60.Pag. 44
16. **FIGURA 16. Localización intracelular por inmunofluorescencia de la proencefalina** en células HL-60 silvestre (A), y en los clones F1D9 (B), utilizando el anticuerpo dirigido contra a secuencia de la **sinencefalina completa**. Localización intracelular por inmunofluorescencia de la proencefalina en células HL-60 silvestre (C), y en los clones F1D9 (D), utilizando el anticuerpo dirigido contra el **octapéptido C-terminal de la sinencefalina**.Pag. 45

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

52