



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS,  
ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD  
INSTITUTO NACIONAL DE MEDICINA GENÓMICA (INMEGEN)  
INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGÍA (INCan)

EFFECTOS DE LOS FACTORES YIN-YANG SOBRE LA EXPRESIÓN DE  
SMAC/DIABLO EN LA LÍNEA CELULAR DE CARCINOMA ORAL DE CÉLULAS  
ESCAMOSAS, CAL-27.

TESIS  
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
MAESTRÍA EN CIENCIAS MÉDICAS, ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD.

PRESENTA:  
SÁNCHEZ GUTIÉRREZ ELIZABETH

TUTOR PRINCIPAL:  
DR. JUAN CARLOS CUAUHTÉMOC HERNÁNDEZ GUERRERO  
JEFE DEL LABORATORIO DE INMUNOLOGÍA  
DIVISIÓN DE ESTUDIOS E INVESTIGACIÓN DE LA FACULTAD DE  
ODONTOLOGÍA

MÉXICO, D. F. JUNIO 2013



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.

# Í N D I C E

	<b>Página</b>
RESUMEN	3
ABSTRACT	4
INTRODUCCIÓN	5
ANTECEDENTES	7
<i>Epidemiología</i>	7
<i>Características clínicas, radiológicas e histológicas</i>	7
<i>Factores de riesgo</i>	9
<i>Apoptosis y COCE</i>	10
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	15
JUSTIFICACIÓN DEL PROBLEMA	16
OBJETIVO GENERAL	17
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
MATERIALES Y MÉTODOS	18
<i>Línea Celular</i>	18
<i>Cultivo Celular</i>	19
<i>Construcción del plásmido. Cultivo y crecimiento de bacterias transformadas</i>	19
<i>Purificación del plásmido</i>	22
<i>Transfección</i>	22
<i>Lipofectamine 2000</i>	22
<i>Escort II</i>	22
<i>Lipofectamine LTX y Plus</i>	23
<i>Extracción de ARN</i>	23
<i>RT-PCR</i>	24
<i>PCR para el gen YY1</i>	26
<i>PCR para el gen YY2</i>	27

<i>PCR para el gen Smac/DIABLO</i>	28
<i>Análisis Estadístico</i>	29
RESULTADOS	30
DISCUSIÓN	33
CONCLUSIONES	36
BIBLIOGRAFÍA	37

## **EFFECTOS DE LOS FACTORES YIN-YANG SOBRE LA EXPRESIÓN DE SMAC/DIABLO EN LA LÍNEA CELULAR DE CARCINOMA ORAL DE CÉLULAS ESCAMOSAS, CAL-27.**

### **RESUMEN**

El COCE es un problema de salud. En este cáncer se han buscado patrones de expresión como el de los genes YY1, YY2 y Smac/DIABLO; y sus posibles efectos sobre características clínico-patológicas para facilitar el diagnóstico y las estrategias terapéuticas.

**OBJETIVO:** Determinar si los factores de transcripción Yin-Yang 1 y 2 regulan la expresión de Smac/DIABLO en la línea celular de carcinoma oral de células escamosas, CAL-27. **MATERIAL Y MÉTODOS:** Transfección por diferentes técnicas liposomales de las líneas celulares CAL-27 (carcinoma de células escamosas en lengua humana) y HeLa (grupo control), con plásmidos de RNA de interferencia para los genes YY1, YY2. Se realizó PCR para curvas de saturación. **RESULTADOS:** En HeLa cualitativamente se observó mayor expresión de Smac comparado con YY1 y YY2, mientras que en CAL 27 el patrón fue inverso. CAL-27 no fue transfectable. HeLa presentó cambios morfológicos posteriores a la transfección. **CONCLUSIONES:** CAL-27 expresa YY1, YY2 y Smac/DIABLO. CAL-27 no pudo ser transfectada por liposomas catiónicos, probablemente por contaminación de *Mycoplasma* spp. No se demostró los efectos que pudieran tener los factores de transcripción de YY1 y YY2 sobre Smac/DIABLO en CAL-27. La transfección de YY1 y YY2 provocó cambios en la morfología celular de células HeLa.

## **ABSTRACT**

The OSCC is health problem. This cancer has sought expression patterns as the genes of YY1, YY2 and Smac / DIABLO, and its possible effects on clinical-pathologic features to facilitate diagnostic and therapeutic strategies. **OBJECTIVE:** To determine whether transcription factors Yin-Yang 1 and 2 regulate the expression of Smac / DIABLO in the cell line of oral squamous cell carcinoma, CAL-27. **MATERIAL AND METHODS:** Liposomal Transfection techniques for different cell lines CAL-27 (squamous cell carcinoma in human language) and HeLa (control group), with plasmids for RNAi genes YY1, y2. PCR was performed for saturation curves. **RESULTS:** HeLa qualitatively showed higher expression of Smac compared to YY1 and y2, while in CAL-27 was reverse pattern 27. CAL-27 was not transfectable. HeLa showed morphological changes after transfection. **CONCLUSIONS:** CAL-27 expressed YY1, YY2 and Smac / DIABLO. It was not transfectable by CAL-27 cationic liposomes probably by *Mycoplasma* contamination. It was not demonstrated that the effects might have transcription factor YY1 and YY2 on Smac / DIABLO in CAL-27. La YY1 and YY2 caused changes in cell morphology of HeLa.

## INTRODUCCIÓN

De acuerdo con la OMS, el Carcinoma Oral de Células Escamosas (COCE) se define como una neoplasia epitelial invasiva con variantes en diferenciación histológica, de invasión y metástasis temprana. Se presenta predominantemente en personas de la 5ta y 6ta década de la vida. Más del 90% de las neoplasias malignas de cavidad oral y orofaringe son carcinomas de células escamosas.

En México, los reportes de la Secretaria de Salud indican que el COCE representa el 0.75% de todas las neoplasias malignas. La supervivencia de los pacientes diagnosticados es de aproximadamente el 50%, sin embargo, un alto número de diagnósticos de COCE son realizados en estados avanzados, donde el tratamiento implicaría reducción en la calidad de vida del paciente.

Los factores de riesgo para el desarrollo del COCE pueden ser ambientales (tabaco, alcohol e infección por HPV, entre otros) y genéticos (mutaciones, deleciones y amplificaciones). Investigaciones sobre la conducta celular y molecular del COCE, indican que las células neoplásicas presentan alteraciones de las señales apoptóticas y estas se encuentran relacionadas con la disminución de expresión de la proteína proapoptótica Smac (Segundo activador mitocondrial de caspasas) en humanos; en ratones esta proteína es conocida como DIABLO (Proteína de unión a IAP con bajo punto isoeléctrico). El gen Smac/diablo se localiza en el humano en el cromosoma 12q y está compuesto de siete exones, se expresa y se localiza normalmente en las mitocondrias, cuando la célula está comprometida hacia la muerte celular programada se remueve una secuencia de 55 residuos de aminoácidos lo cual genera un proceso de translocación de Smac/DIABLO siendo liberado al citosol para inducir apoptosis; ya que en forma de dímero neutraliza la actividad antiapoptótica de la familia de IAPs (inhibidor de proteínas de la apoptosis) principalmente de XIAP el cual se encarga de reprimir la actividad de la caspasa-9 dentro del complejo-apoptosoma. Smac/DIABLO es una molécula importante en la determinación de la sensibilidad a la muerte apoptótica tanto para células normales como para células cancerosas, es importante investigar si sus niveles de expresión son regulados negativamente durante el inicio y progreso del cáncer, ya que esto nos permitirá aumentar nuestro conocimiento sobre la

conducta biológica del cáncer, además de quizá en un futuro considerarla como un blanco terapéutico en el COCE y otras neoplasias.

Otra molécula importante en la regulación celular es el factor de transcripción Yin Yang 1 (YY-1). Esta es una proteína de 68-kDa que contiene dedos de zinc y tiene la propiedad de regular la transcripción de diversos genes celulares y virales, mediante tres vías diferentes: reprime, activa, e inicia la transcripción. Entre los genes regulados se incluye a IFN- $\alpha/\beta$ -caseína, c-fos y c-myc, así como los promotores de diversos virus en los cuales se incluyen el CMV, el virus de la leucemia murina, el virus del papiloma humano, y el. Estudios recientes demostraron que YY1 puede reprimir la transcripción de los genes Fas, DR5 y probablemente de Smac/DIABLO, mediante su unión a la región silenciadora del promotor. Se ha demostrado que la sobreexpresión de YY1 en células tumorales comparada a las células normales, podría ser responsable de la resistencia ante la apoptosis.

Yin Yang 2 (YY2) está localizado en el cromosoma X, muestra una gran similitud a YY1 (homología del 86.4%). Este codifica para una proteína de dedos de zinc que reconoce los motivos de unión similares a los reconocidos por YY1, sin embargo, YY2 no contiene un dominio ácido, lo cual sugiere diferencias en la afinidad para ambas proteínas.

Se han realizado estudios de diversos tipos de carcinoma tales como: carcinoma cervical, carcinoma renal y adenocarcinoma mostrando diferentes patrones en la expresión de YY1, YY2 y Smac/DIABLO; según el tipo de cáncer. Sin embargo estos patrones de expresión no han sido establecidos en los carcinomas orales de células escamosas por lo que la búsqueda de correlaciones significativas entre la expresión de los genes YY1, YY2 y Smac/DIABLO; y sus posibles efectos sobre la proliferación, apoptosis, angiogénesis y metástasis, con características clínico-patológicas en los carcinomas orales nos permitirá obtener mayor conocimiento sobre la oncología oral, así como facilitar el diagnóstico de una neoplasia, lo cual permitiría establecer premisas sobre la conducta biológica. A largo plazo esto podría favorecer el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas.

## **ANTECEDENTES**

### ***Epidemiología***

El cáncer es la segunda causa de muerte en los países de altos ingresos, y para los países de bajos ingresos figura entre las tres principales causas de muerte de los adultos. El 12.5% del total de causas de muerte se atribuye al cáncer, porcentaje que sería el total de muertes debidas al SIDA, tuberculosis y la malaria consideradas conjuntamente. El cáncer se ha convertido en un problema de salud pública en todo el mundo no solo por sus graves manifestaciones clínicas y su alta letalidad, sino también por los factores de riesgo individuales y ambientales con los que se asocia.<sup>1</sup>

En el 2008, la Organización Mundial de la Salud (OMS) a través de Globocan, reportó 12, 662, 600 de nuevos casos de cáncer a nivel mundial, así como 7, 564, 800 muertes asociadas. En este mismo año se reportaron 263, 020 nuevos casos de cáncer oral, con una mortalidad de 127, 654 personas.<sup>2</sup>

Durante ese mismo periodo datos de Globocan en México indicaron 127, 000 nuevos casos de cáncer y 77, 700 muertes relacionadas. Así mismo, se reportaron 2, 300 casos nuevos de cáncer oral y 608 muertes asociadas, representado el 1.8% y 0.78% del total, respectivamente. Cifras de la Secretaria de Salud del año 2001, indicaron que el cáncer oral presentaba 774 casos y correspondía al 0.75% del total de los tumores, estos datos nos sugieren que ha existido aumento en la incidencia de esta neoplasia.<sup>3</sup>

### ***Características clínicas, radiológicas e histológicas***

La mayoría de los pacientes con cáncer oral son diagnosticados como carcinoma oral de células escamosas o COCE. El COCE es una neoplasia epitelial maligna invasiva, con diversos grados de diferenciación histológica y propensión a la pronta metástasis a ganglios linfáticos regionales. La incidencia del COCE es mayor en adultos consumidores de alcohol y tabaco que se encuentran entre la quinta y sexta década de vida.<sup>4</sup>

De manera habitual los pacientes con COCE no presentan síntomas en etapas tempranas, no obstante, en algunos pacientes se pueden presentar síntomas vagos y hallazgos clínicos mínimos, así como lesiones premalignas como leucoplasias o eritroplasias y ulceraciones.<sup>5,6</sup>

La sintomatología puede variar de acuerdo con la zona anatómica afectada; en lengua se puede referir dolor y/o crecimientos infiltrativos o exofíticos, mientras que en labio inferior se suele reportar zonas elevadas eritroplásicas, leucoplásicas o mixtas con ulceraciones no

cicatrizantes.<sup>7</sup> Según la Clasificación Internacional de Enfermedades para Oncología, el COCE puede presentarse en cualquier región oral, sin embargo, lengua, base de lengua y otras partes de lengua, encía, piso de boca, paladar y otras zonas son las más comunes (Cuadro 1).

Cuadro 1. Clasificación Internacional de Enfermedades para Oncología <sup>8</sup>	
CIE-O	Localización topográfica
C00	Labio
C01	Base de la lengua
C02	Otras partes y las no específicas de la lengua
C03	Encía
C04	Piso de boca
C05	Paladar
C06	Otras partes y las no específicas de la boca
C10	Orofaringe
C14	Sitios mal definidos de labio, cavidad bucal y faringe

Los hallazgos radiográficos ocurren únicamente cuando el COCE involucra a hueso (maxilar o mandíbula), caracterizándose por bordes mal definidos y sin cortical o bien como erosiones subyacentes, la principal utilidad del análisis radiográfico se fundamenta en el análisis pre-quirúrgico.<sup>4</sup>

Las características histológicas comúnmente presentadas por el carcinoma oral de células escamosas son la pérdida de la membrana basal y arquitectura del estrato basal epitelial, mayor número de mitosis, cambios displásicos, con presencia de pleomorfismo celular, invasión del tejido conjuntivo subyacente en forma aislada o como agregados o islas celulares.<sup>9</sup>

La OMS postuló una gradificación histológica con base en la diferenciación, pleomorfismo celular, queratinización o cornificación y número de mitosis, dividiendo al COCE en tres grados: 1) Bien diferenciado, 2) Moderadamente diferenciado y 3) Pobrementemente diferenciado.<sup>10</sup>

El estudio y gradificación histopatológica son considerados como el método diagnóstico por excelencia, sin embargo, aún existe controversia respecto a su utilidad como herramienta de valor predictivo en la conducta biológica del COCE.

### ***Factores de riesgo***

Los factores de riesgo asociados al desarrollo del COCE son ambientales, genéticos y epigenéticos. En la actualidad se acepta que la mayoría de las neoplasias resultan de un proceso de múltiples pasos, por la acumulación de alteraciones genéticas derivadas de la exposición a factores exógenos o ambientales que conducen a la formación y acción de oncogenes y la pérdida de dos o más genes supresores tumorales.<sup>11</sup>

Dentro de los factores de riesgo exógenos más frecuente asociados al COCE podemos encontrar a radiación ultravioleta, biológicos, el virus del papiloma humano, virus Epstein Barr, alcohol y tabaco, siendo estos últimos los principalmente reportados dentro de los antecedentes de pacientes con COCE.<sup>12</sup> El primer y más importante causa de cáncer en las vías aerodigestivas superiores es el hábito del tabaquismo, ya que es un dato presente en el 85 a 90% de los pacientes con COCE, con un riesgo proporcional a la intensidad de la exposición. La ingesta de alcohol tiene un efecto sinérgico con el tabaquismo y está asociado con el riesgo para el cáncer de lengua.<sup>13</sup>

Otros factores de riesgo implicados en su desarrollo son la condición socioeconómica y el estado nutricional. El riesgo familiar para el desarrollo de COCE ha sido reportado en un porcentaje pequeño de pacientes con síndrome de Li-Fraumeni, sin embargo, se ha reportado que polimorfismo en genes asociados al metabolismo de xenobioticos (CYP1A1 o genes que codifican para glutatión S-transferasa y N-acetiltransferasa) pueden estar asociados a personas con mayor susceptibilidad.<sup>14</sup> Actualmente la investigación de estas características celulares y moleculares son estudiadas arduamente, ya que, su comprensión y control, son alternativas para el diagnóstico temprano y tratamiento. En el tratamiento para el COCE existen diferentes modalidades tales como la quimioterapia adyuvante, de inducción, neoadyuvante y quimioterapia combinada con radioterapia las cuales son utilizadas en diferentes circunstancias. Aunque existen diferentes protocolos terapéuticos las posibilidades de mejorar la salud de los pacientes es baja.

Para la investigación del COCE líneas celulares continuas han sido establecidas, estas han llegado a ser importantes herramientas en el entendimientos de la patogénesis de cáncer, así como en la prueba de nuevos métodos terapéuticos. Actualmente existen, una variedad importante de líneas celulares. En 1982 Gioanni y Cols establecieron una nueva línea celular de COCE llamada CAL 27, esta fue derivada derivada de tejido tumoral de un hombre caucásico de 56 años de edad con un COCE pobremente diferenciado en la parte media de lengua. Esta línea celular es sumamente empleada gracias a su tumorigenicidad en ratones desnudos atímicos y la exanimación histológica de CAL 27 en xenoinjertos ha indico la presencia de carcinomas bien diferenciados con varios grados de madurez. Esta característica constituyó a CAL 27 como un modelo representativo para el estudio del COCE in vitro e in vivo.<sup>16</sup>

### *Apoptosis y COCE.*

Dentro de los eventos moleculares más frecuentes asociados al desarrollo neoplásico se ha reportado la autosuficiencia de señales proliferativas, evasión de señales inhibitorias, evasión del sistema inmune, potencial de replicación ilimitado, promoción de la inflamación, activación de la invasión y metástasis, inestabilidad del genoma, desregulación del metabolismo energético y evasión de la apoptosis.<sup>17</sup>

El concepto de que la muerte celular programada por apoptosis sirve como una barrera natural para el desarrollo del cáncer ha sido establecido por estudios funcionales convincentes realizados durante las dos últimas décadas.<sup>18-20</sup> La elucidación de los circuitos de señalización que regula el programa de apoptosis ha revelado cómo se activa la apoptosis en respuesta a diferentes tensiones fisiológicas que las células cancerosas experimentar durante el curso de la tumorigénesis o como resultado de la terapia anticáncer. Entre las presiones que inducen la apoptosis se reconocen a los desequilibrios resultantes de los elevados niveles de señalización oncogénica y el daño del ADN asociado con hiperproliferación. Sin embargo, también se reconoce que existen neoplasias que atenúan la apoptosis y tienen éxito en el avance de los estados de alto grado de malignidad y la resistencia a la terapia antineoplásica.<sup>18,19</sup>

La maquinaria apoptótica se compone de reguladores y efectores.<sup>18</sup> Los reguladores, a su vez, se dividen en dos circuitos principales, uno de recepción y procesamiento de inductores de señales de muerte extracelular (el programa apoptótico extrínseco, implicando por ejemplo el ligando Fas / Fas receptor), y el otro de detección de la integridad de una variedad de señales de origen intracelular (el programa intrínseco). Cada circuito culmina en la activación de proteasas normalmente latentes (caspasas 8 y 9, respectivamente), que proceden a iniciar una cascada de caspasas efectoras, lo que implica proteólisis responsables en la fase de efectora de la apoptosis. La célula es progresivamente desensamblada y posteriormente fagocitada tanto por células vecinas como por células fagocíticas profesionales. Actualmente se considera que el mecanismo de apoptosis intrínseco está ampliamente implicado como una barrera en la patogénesis del cáncer.

En la activación de apoptosis se transmite señales entre los reguladores y efectores, y esto es controlado por los miembros pro y antiapoptóticos de la familia de proteínas Bcl-2.<sup>18</sup> La proteína Bcl-2, junta con sus parientes más cercanos (Bcl-xL, Bcl-w, Mcl-1, A1) son inhibidores de la apoptosis, actuando como supresores al unirse a proteínas proapoptóticas desencadenantes (Bax y Bak); los cuales tienden a insertarse en la membrana mitocondrial externa. Cuando no existe presencia de proteínas antiapoptóticas, Bax y Bak rompen la integridad de la membrana mitocondrial externa, causando la liberación de proteínas de señalización proapoptóticas, una de la más importante es el citocromo c. La dimerización del citocromo c con Apaf-1, conduce a activación de una cascada de caspasas que actúan a través de sus actividades proteolíticas para inducir los múltiples cambios celulares asociados con el programa de apoptosis.

Las células tumorales pueden generar una variedad de estrategias para limitar o evitar la apoptosis. La más común es la pérdida de la función supresora de tumores p53, que elimina el sensor más importante al daño crítico e inducción de apoptosis. Alternativamente, los tumores pueden lograr fines similares por aumento de la expresión de los reguladores antiapoptóticos (Bcl-2, Bcl-XL) o de señales de supervivencia (IGF1/2), por la regulación negativa de factores proapoptóticos (Bax, Bim, Puma), o por un cortocircuito en la vía extrínseca inducida por ligando de muerte.

Verhagen et al., (2000)<sup>21</sup> identificaron una nueva molécula proapoptótica derivada de la mitocondria llamada Smac (Segundo activador mitocondrial de caspasas) también conocida como DIABLO (Proteínas de unión con bajo punto isoelectrico inhibidores directos de apoptosis), esta es codificada por un gen nuclear. Smac/DIABLO tiene un efecto proapoptótico mediado a través de su interacción con IAP (Inhibidores de apoptosis) y la liberación de caspasas. El motivo NH<sub>2</sub>-terminal de Smac/DIABLO contiene cuatro aminoácidos (Ala-Val-Pro-Ile) necesarios para la interacción con los dominios BIR2 y BIR3 de las XIAP (Inhibidores de apoptosis ligados al X) permitiendo la activación de la caspasa-3 y la caspasa-9.

Existen estudios que muestran la sobreexpresión de Smac/DIABLO sensibiliza las células neoplásicas a la apoptosis. En dichos estudios se desarrollaron péptidos derivados desde NH<sub>2</sub>-terminal de Smac/DIABLO y pequeñas moléculas que mimetizan las funciones de Smac/DIABLO como agentes terapéuticos induciendo muerte celular o incrementando los efectos apoptóticos de agentes quimioterapéuticos. Recientemente, se ha demostrado que compuesto miméticos a Smac/DIABLO inducen la activación de la vía NF-kB y a través de TNF- $\alpha$  promover la activación de la caspasa 8.

Debido a la importancia de Smac/DIABLO en la determinación de la sensibilidad de las células neoplásicas a la apoptosis inducida por diversos estímulos, es importante investigar si sus niveles pueden ser regulados negativamente durante la iniciación o progresión del cáncer. Esta información puede ser muy útil como biomarcador en el pronóstico o terapéutica, así como en el diseño de nuevos fármacos quimioterapéuticos.

Yang J, y col <sup>22</sup> caracterizaron un pequeño péptido Smac/DIABLO mimético(SM-164), con la capacidad de promover la degradación de cIAP-1 y BIRC2; activando también a las caspasas, provocando una sensibilidad a la radiación en algunas líneas celulares de carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (HNSCC). Sun Q, y col <sup>23</sup> encontraron que Smac tiene un papel importante en la mediación de la respuesta terapéutica de las células HNSCC y ofrece un fundamento firme para los análogos de Smac con otros agentes anticancerígenos para tratar a los HNSCC. Tanimoto T y col <sup>24</sup> analizaron los niveles de expresión proteica de cIAP-1 y Smac en líneas celulares de carcinoma de células escamosas esofaríngeas y de HNSCC. En 57 casos de HNSCC, encontraron una correlación inversa entre la expresión de cIAP-1 con la expresión de la caspasa-3 y SMAC/DIABLO, de igual

manera, no encontraron correlación entre SMAC/DIABLO con los parámetros clínico patológicos. Bonavida B y Cols; (2006) <sup>25</sup>, han sugerido al factor de transcripción NF-kB, Smac/DIABLO, Fas/Fas ligando y Yin-Yang 1 (YY1) como biomarcadores significativos en el pronóstico de una neoplasia.

Esta última molécula llamada YY1, fue descubierta como un factor de transcripción. Su actividad trascricional primeramente fue determinada como represora, pero se tiene datos que puede ser un activador de la oncoproteína viral E1A. Se ha demostrado que este puede regular la proliferación y diferenciación celular, y su deficiencia en ratones, resulta en la letalidad durante el desarrollo embrionario. YY1 es un miembro de la familia de las proteínas Polycomb. El gen humano de YY1 está localizado en la región telomérica del cromosoma 14 en el segmento q32.2, es altamente conservado en diferentes especies. La proteína de YY1 está constituida por 414 aminoácidos con un peso molecular estimado de 44 kDa, contiene cuatro dedos de zinc tipo C2H2. Las modificaciones post-traduccionales de YY1 pueden cambiar las funciones de YY1 en la transcripción por alteración de la proteína en la estabilidad y afinidad al DNA. <sup>26,27</sup> La actividad de YY1 es regulado por acetilación, fosforilación, poli-ADP-ribosilación y O-GlcNAc-ilación. <sup>28-32</sup>

Se ha reportado que YY1 modula la expresión de ciertos genes importantes en el desarrollo y progresión del cáncer, tales como c-myc, c-Fos, erbB2, E1A y p53. YY1 también interactúa físicamente con proteínas reguladoras de la proliferación y apoptosis tales como p53, Mdm2, Ezh2, Rb, caspasa y HDAC. Adicionalmente, la expresión de YY1 puede ser estimulada por diversos factores de crecimiento, así como señales antiproliferativas pueden antagonizar en su expresión. Este importante rol en la regulación de genes es a través del consenso cis en la reconocimiento de la secuencia CGCCATNTT. <sup>33</sup> Otras funciones postuladas son el control del estado pluripotente, mantenimiento de los programas de expresión genética y de linaje específico en células madre. <sup>34-35</sup> Además se ha descubierto que es un regulador de síntesis de proteínas ribosomales.

De acuerdo a estos antecedentes, se han realizado estudios sobre la expresión de YY1 en diversos tipos de cánceres, como el de ovario, cérvico uterino, osteosarcoma, leucemia mieloide, linfoma Hodgkin, linfoma no Hodgkin y próstata, reportándose una sobreexpresión de YY1. <sup>36-46</sup> Bonavida y Cols; (2007) <sup>47</sup> en su investigación sobre cáncer de próstata demostraron que la expresión de YY1 se asociaba con la expresión de los

receptores de citocinas y de muerte (DR5). Mecánicamente, YY1 regula negativamente la expresión del receptor Fas y DR5, lo cual dota a las células neoplásicas con resistencia a la inducción de apoptosis via Fas o TRAIL. Ferris y col <sup>48</sup> encontraron en la línea celular SCC090 derivado de un carcinoma orofaríngeo, la presencia de HPV-16, cuyo genoma fue secuenciando mostrando una delección en los sitios de unión de las proteínas YY1 y NFI, resultando así en la sobrerregulación de expresión de E6/E7, y contribuyendo así al desarrollo tumoral.

En el genoma de mamíferos se ha identificado un gen relacionado con YY1, recibe el nombre de Yin Yang 2 (YY2). YY2 se ha reportado en la placenta de mamíferos, tiene una estructura genómica de intrones y el carácter de las regiones circundantes, sugieren que YY2 es un producto de la duplicación de YY1 que se generó a través de la retroposición y que ha sido insertado dentro de otro gen locus llamado Mbtps2 (factor de transcripción unido a membrana del sitio 2 de proteasa). YY2 era considerado funcionalmente similar a YY1, sin embargo, en comparación con YY1, YY2 muestra diferentes patrones de expresión y también parece haber evolucionado a un ritmo inusual en los genomas de los mamíferos. Chen L. y Cols <sup>49</sup> demostraron al usar RNA de interferencia cortos para YY1 (shYY1) y YY2 (shYY2), se presenta cambios importantes en la expresión de genes humanos. Las proteínas ribosomales fueron las mayormente afectadas. En contraste, shYY2 revirtió los efectos antiproliferativos de shYY1, además de alterar genes del mecanismo de respuesta UV, respuesta plaquetaria y mitocondrial.

Sin embargo no se han realizado estudios sobre su expresión en el cáncer, ni se ha reportado su posible participación en la carcinogénesis.

## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

El COCE es actualmente un problema de salud pública no solo por su incidencia y mortalidad, sino por los factores de riesgo implicados que son ampliamente distribuidos, alcohol y tabaco. Datos de la encuesta nacional de adicciones en México, así como la OMS, reportan el aumento en el consumo de estos dos compuestos, e incluso su inicio de consumo cada vez a edades más tempranas. Es hallazgo genera un problema potencial, puesto que a mediano o largo plazo puede incrementar el riesgo a desarrollar enfermedades crónicas así como neoplasias, tal como el COCE, entre otros. Otra situación de importancia es el diagnóstico tardío del COCE, los factores personales y sociales que repercuten en que pacientes se presenten a la consulta cuando ya existe una neoplasia son diversos, desde la falta de educación para la salud hasta la carencia de servicios tienen participación en este fenómeno, no obstante, el resultado son neoplasias verdaderas, y actualmente estas solo podrán ser tratadas a través de terapéuticas quirúrgicas, por radioterapia o quimioterapia. La necesidad de clarificar cual es el mecanismo de inicio y progresión del COCE es un problema vigente, ya que esta información se requiere para la estipulación de nuevas alternativas terapéuticas en base a la información celular y molecular. Sin embargo, este alcance se encuentra distante, ya que aun se encuentra en construcción un conocimiento aplicable para lograr este fin. Las investigaciones en epidemiología, clínica y la investigación de los fenómenos básicos representan una parte importante de la investigación en COCE, sin embargo, la investigación sobre los mecanismo apoptóticos aun es muy poca. Si lográsemos comprender este fenómeno celular y aprovecharlo en beneficio del curso clínico esta característica es un reto vigente en la oncología oral.

## **JUSTIFICACIÓN DEL PROBLEMA**

Dentro del gran número de alteraciones celulares o moleculares que ocurren durante la transformación maligna, la apoptosis es básica para la progresión maligna, si una célula transformada no muere y esta es estimulada para su proliferación, el potencial de daño se magnifica. La apoptosis como muerte celular programada representa una alternativa deseable en el tratamiento del cáncer, por el hecho de que al conseguir recuperar o estimular esta función, la población de células neoplásicas disminuiría o bien se erradicaría. Adicionalmente, al comparar este tipo de muerte contra la necrosis el primer dato que sobresale es la ausencia de respuesta inflamatoria. Hanahan y Weinberg, han mostrado a la inflamación con un factor importante en promoción neoplásica.

Los mecanismos extrínsecos e intrínsecos de la apoptosis, representan la activación y regulación de diversas vías de señalización. Las investigaciones sobre Smac/Diablo y YY1/YY2 han tratado de elucidar el mecanismo por el cual la célula entra en este tipo de muerte celular, además, como ya se ha mencionado estas moléculas han presentado patrones de expresión interesantes en células neoplásicas. Mientras los factores de riesgo para el desarrollo de cáncer, como el alcohol y el tabaco, sean tan ampliamente distribuidos y el diagnóstico temprano no sea fundamentado en la práctica clínica, el cáncer oral seguirá siendo un problema de salud pública. El investigar y comprender los mecanismos biológicos por los cuales el COCE progresa, representa una pequeña parte a la solución de este gran problema. El trabajo conjunto, a nivel de salud pública, clínica e investigación biomédica es fundamental para el éxito en la comprensión y limitación del cáncer oral.

## **OBJETIVO GENERAL**

Determinar si los factores de transcripción Yin-Yang 1 y 2 regulan la expresión de Smac/DIABLO en la línea celular de carcinoma oral de células escamosas, CAL-27.

## **OBJETIVOS PARTICULARES**

1. Generar líneas estables que expresen ARNs de interferencia para los genes YY1 y YY2.
2. Determinar los niveles de inhibición de la expresión de YY1 y YY2.
3. Analizar los niveles de expresión de Smac/DIABLO en estas líneas celulares.
4. Analizar la sensibilidad a apoptosis y la clonogenicidad en las líneas con YY1 y YY2 desregulados.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

### **Líneas celulares**

La línea celular de carcinoma de células escamosas en lengua humana, CAL-27 (ATCC, Rockville, MD No.Cat. CRL-2095) fue establecida en 1982 por J. Gioanni (Centro de Antonie Lacassagne, Nice Cedex, Francia) tomando tejido de un paciente de 56 años de edad, género masculino, caucásico con lesión en la parte media de la lengua (Fig 1).

Las células CAL-27 son epiteliales, tiene forma poligonal y citoplasma altamente granular. En estudios de inmunocitoquímica mostraron tinción positiva con anticuerpos anti-queratina.

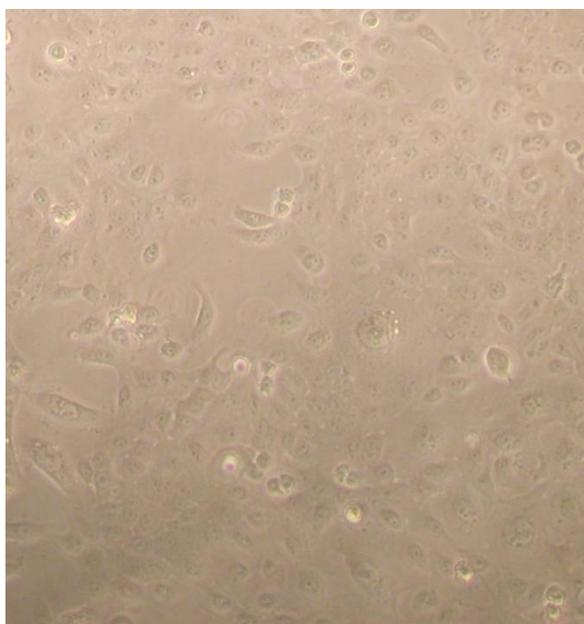


Fig.1.Línea celular CAL-27, microscopio óptico OLYMPUS (10x)

Como grupo control se trabajo con la línea celular de carcinoma epitelial humana, HeLa (ATCC, Henrietta Lacks, No. Cat. CCL-2) obtenido el tejido en 1951 de un paciente de 31 años de edad, género femenino, caucásica, a partir de un adenocarcinoma de cérvix. (Fig. 2).

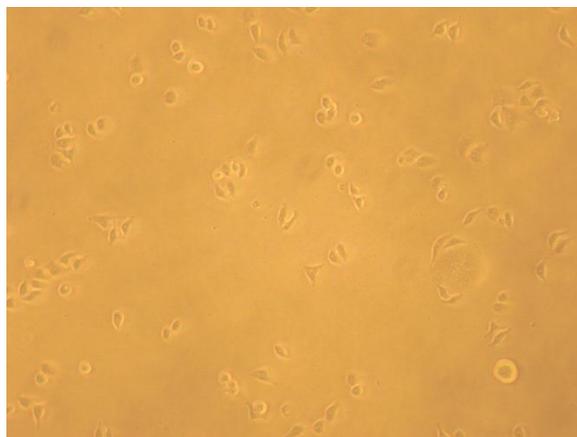


Fig.2.Línea celular HeLa, microscopio óptico OLYMPUS (10x)

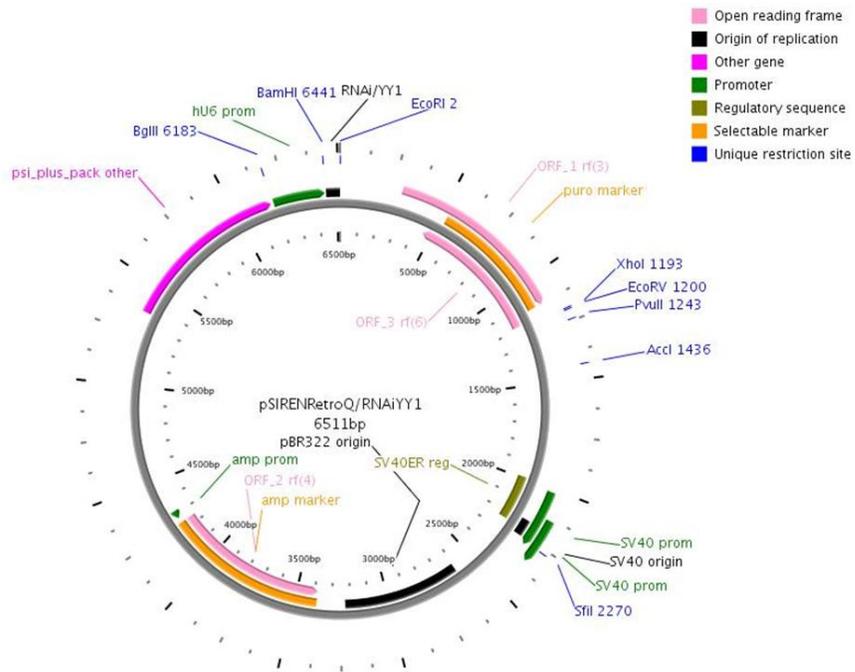
### **Cultivo celular**

Las líneas celulares CAL-27 y HeLa, se cultivaron en DMEM (Gibco, UK) suplementada con 10% de suero fetal bovino (Gibco, UK), 2 mM L-glutamina, 100 U/ml de penicilina y 100  $\mu$ g/ml de estreptomicina en una atmósfera húmeda con 5% de CO<sub>2</sub> a 37 °C. Se congelaron  $3 \times 10^6$  células aproximadamente en alícuotas con 180  $\mu$ l de suero fetal bovino y 20  $\mu$ l de DMSO, y se mantuvieron a -70°C.

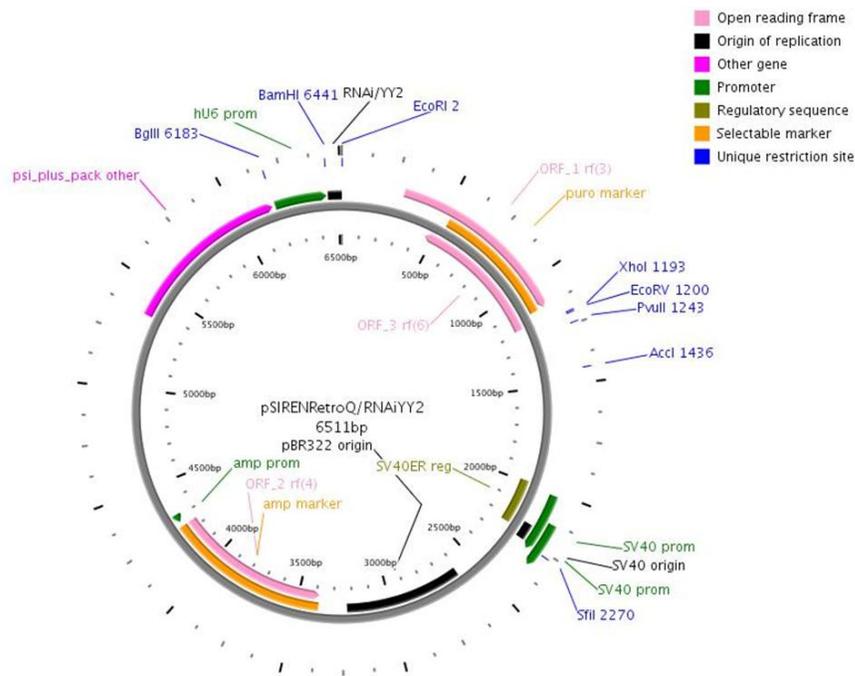
### **Construcción del plásmido. Cultivo y crecimiento de bacterias transformadas.**

De forma paralela, se cultivó *Escherichia coli* que fue transformada con los plásmidos: RNAi-Ready pSIREN-Retro Q YY1, RNAi-Ready pSIREN-Retro Q YY2 y RNAi-Ready pSIREN-Retro Q (Fig. 3, No. Cat. 631526, Clontech, CA), cuyo diseño fue realizado por la Dra. Vilma Maldonado Lagunas (Fig. 4 y 5). Después se cultivaron las bacterias en placas de agar Luria Bertani con penicilina a 37°C, para su posterior cultivo en medio Luria Bertani con penicilina durante 12 hrs a 37°C en constante agitación.





A.



B.

Fig. 5. A. Mapa del Vector RNAi-Ready Psiren-RetroQ.YY1 B. Mapa del Vector RNAi-Ready Psiren-RetroQ.YY2.

## **Purificación de plásmido.**

La extracción de los plásmidos se realizó por medio de lisis alcalina (HiSpeed Plasmid Purification Handbook, Qiagen No. Cat. 12643), posteriormente se analizó integridad de los plásmidos en gel de agarosa desnaturalizante y se cuantificó por medio de Nano Drop. La cantidad de células fue particular para cada técnica de transfección.

## **Transfección**

- **LIPOFECTAMINE 2000 (INVITROGEN, No. Cat. 11668-027)**

Previo a la transfección, se recolectaron  $3 \times 10^5$  células para ser sembradas en 1,5 ml de medio DMEM suplementado. Se diluyó 45  $\mu\text{g}$  de plásmido en 250  $\mu\text{l}$  de medio sin suero. Después se diluyó 7  $\mu\text{l}$  LIPOFECTAMINE 2000 Reactivo en 250  $\mu\text{l}$  de medio sin suero, se combinó con la disolución de plásmido dentro de los siguientes 15 min. Se añadieron los complejos directamente a cada pozo y se mezcló suavemente mediante agitación de la microplaca de 6 pozos. Se incubó a  $37^\circ\text{C}$  con 5% de  $\text{CO}_2$  durante 6 hrs. Posteriormente, complejo fue sustituido por medio de cultivo. Se determinó los extractos de células *in situ* para la actividad del gen reportero en 24 a 72 horas después de la adición de los complejos de las células. Para lograr una expresión estable del plásmido, se sustituyó el medio de cultivo y se realizó pase de las células 24 hrs después de la transfección. A los 48 hrs después de la transfección se agregó puromicina (0.5  $\mu\text{g}$  / ml de DMEM) para selección de células transfectadas. Se espero 2 semanas para estabilizar la expresión.

- **ESCORT II (SIGMA-ALDRICH, No. Cat. L60037)**

Un día anterior de la transfección, se tripsinizó, se realizó conteo celular y sembraron  $3 \times 10^5$  células. Las células fueron sembradas en 1,5 ml de medio suplementado. Se diluyó 4  $\mu\text{g}$  de plásmido en 75  $\mu\text{l}$  de medio sin suero y se agregó 5  $\mu\text{l}$  del reactivo ESCORT dejando pasar 15 minutos. Se añadió el complejo a cada pozo y se mezcló suavemente mediante agitación de la microplaca de 6 pozos. Se incubó a  $37^\circ\text{C}$  con 5% de

CO<sub>2</sub> durante 5 hrs. Alternativamente, el medio de cultivo fue sustituido. Se realizó pase de las células 24 hrs después de la transfección. A los 48 hrs después de la transfección se agregó puromicina (0.5 µg / ml de DMEM) para selección de células transfectadas. Se esperaron 2 semanas para estabilizar la expresión. Similares observaciones como a la técnica anterior.

- **LIPOFECTAMINE LTX Y PLUS (INVITROGEN, No. Cat. 15338-100)**

Un día anterior de la transfección, se tripsinizó, se realizó conteo de la suspensión celular y se sembraron 5x10<sup>5</sup> células en DMEM.

Se realizaron diferentes concentraciones de plásmido con LIPOFECTAMINE LTX (Cuadro 2).

Cuadro 2. Concentraciones de Lipofectamine LTX y Plus				
Reactivo	Plásmido	Lipofectamine LTX	Reactivo Plus	Medio DMEM sin suero
Concentración 1	1 µg	1.5 µl	1 µl	75 µl
Concentración 2	2 µg	2 µl	2 µl	
Concentración 3	3 µg	3 µl	3 µl	

Se añadió el complejo a cada pocillo en una placa de 6 pozos y se mezcló suavemente por agitación de la microplaca. Se incubó a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> durante 5 hrs. Alternativamente, el medio de cultivo fue sustituido. Se determinó la actividad del gen reportero en 24 a 72 horas después de la adición de los complejos de las células en los extractos de células *in situ*. Para que estuviera estable la expresión, se realizó un pase de las células en medio de cultivo fresco 1 día después de la transfección y se añadió a puromicina (0.5 µg / ml de DMEM) durante 2 días para selección de células transfectadas.

### **Extracción de ARN.**

Se colocaron 5x10<sup>6</sup> células suspendidas en 1.5ml de medio de cultivo DMEM en tubo Falcon.

Se centrifugaron las células en una microfuga durante 3 seg, para así retirar sobrenadante. Se agregó 1ml de trizol durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se colocaron 200 µl

de cloroformo durante 10 minutos a 4 °C. El homogeneado se centrifugó a 8000 rpm durante 10 min a 6°C. Se obtuvo aproximadamente 500 µl sobrenadante (pseudo-ARN, líquido transparente). Se agregó 500 µl de alcohol isopropil y se incubó por 10 min a 4°C. Se centrifugó a 10,000 rpm durante 15 min a 6°C. Se obtuvo el sobrenadante y se agregó etanol al 70% (en solución con DEPC), se centrifugó a 8000 rpm durante 5 min a 6°C. Se desechó el etanol, y se obtuvo en el botón el ARN, que se re-suspendió con 20 µl de DEPC (Inhibidor de RNAsas, SIGMA-ALDRICH, No. Cat. D5758). Se realizó cuantificación con un espectrofotómetro Nano Drop ND 1000 colocando 1µl de ARN y se procedió a realizar una electroforesis en condiciones desnaturalizantes; para conocer el estado y pureza del ARN extraído.

### **RT-PCR.**

El ARN total se convirtió en ADN complementario con la preamplificación High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems), bajo las siguientes condiciones, en la cámara para PCR:

Se realizó mezcla No. 1

<b>Reactivo</b>	<b>Cantidad para 1 Rx (µl)</b>
10x RT Buffer	2
25x Dntp (100 mM)	0.8
10x RT Random Primers	2
Multiscribe Reverse Transcriptasa	1
Watter Free Nuclease	4.2

Posteriormente se realizó mezcla No. 2

Reactivo	Cantidad para 1 Rx (µl)
RNA	2
Water Free Nuclease	0.8

Se continuó con la dilución de las mezclas No. 1 y 2 para obtener un total de 20 µl, que se colocaron en el termociclador (EPPENDORF, No. Cat. 5333000018) bajo las siguientes condiciones:

Temperatura (C°)	Tiempo
25	10 ´
37	120 ´´
85	5´´
4	∞

El PCR se utilizó para amplificar el ADN complementario, con primers sentido y anti-sentido (Tabla 1).

Tabla 1.

GEN	PRIMER SENTIDO	PRIMER ANTI-SENTIDO
<b>Smac/DIABLO</b>	GCG CGG ATC CAT GG CGG CTC TGA AGA GTT GGC T	AGC TCT CTA GAC TCA GGC CCT CAA TCC TCA CGC
<b>YY1</b>	TGC ACG AGA TCG AGG TGG AGA	TCT GCA CCA GGA TCA CCT CCT
<b>YY2</b>	AAT AGA ATT CAG CCA TGG CCT CCA ACG	GAG GGG GTC CTC CTT TCA CGG GTT GTT T
<b>GAPDH</b>	CCC CTT CAT TGA CCT CAA CT	TTC TCA TGG ATG ACC TTG GC

## PCR para el gen YY1

Se preparo los siguientes reactivos en la cámara para PCR, y se ajusto el volumen final a 25  $\mu$ l:

Reactivo	Cantidad para 1 Rx ( $\mu$ l)
Buffer 10x MgCl <sub>2</sub>	2.5
Mg 50mM	0.75
Taq polimerasa	0.25
dNTP	1
YY1 F	1
YY1 R	1
DDW	17.5
cDNA	1
<b>TOTAL</b>	<b>25</b>

Posteriormente la mezcla se colocó en el termociclador bajo las siguientes condiciones, con 30 ciclos (HeLa, grupo control) y 35 ciclos (CAL-27):

Temperatura (C°)	Tiempo
95	10´
95	10´
95	30´´
62	30´´
72	1´
72	7´
4	$\infty$

## PCR para el gen YY2

Se realizó la mezcla de los siguientes reactivos en la cámara para PCR, para obtener un volumen final de 25  $\mu$ l:

Reactivo	Cantidad para 1 Rx ( $\mu$ l)
Buffer 10x MgCl <sub>2</sub>	2.5
Taq polimerasa	0.25
dNTP	1
Primer YY2 F	1
Primer YY2 R	1
DDW	17.5
cDNA	1
<b>TOTAL</b>	<b>25</b>

Posteriormente la mezcla se colocó en el termociclador bajo las siguientes condiciones, con 35 ciclos (HeLa, grupo control)\* y 30 ciclos (CAL-27)\*:

Temperatura (C°)	Tiempo	Temperatura (C°)	Tiempo	Ciclos
95	10´			
94	30´´	68	2´	3
94	30´´	60	2´	*
72	5´			
4	$\infty$			

### PCR del gen Smac/DIABLO

Se realizó mezcla de los siguientes reactivos en la cámara para PCR, y se ajustó el volumen final a 25 µl:

Reactivo	Cantidad para 1 Rx (µl)
Buffer 10x MgCl <sub>2</sub>	2.5
Taq polimerasa	0.25
dNTP	1
Primer Smac F	1
Primer Smac R	1
DDW	17.5
cDNA	1
<b>TOTAL</b>	<b>25</b>

La mezcla obtenida se colocó en el termociclador bajo las siguientes condiciones, con 30 ciclos (HeLa, grupo control)\* y 32 ciclos (CAL-27)\*:

Temperatura (C°)	Tiempo	Ciclos
95	10´	
95	30´´	
72	2´	3
95	30´´	
68	30´´	*
72	1´	
72	5´	
4	∞	

Los productos del PCR se separarán en un gel de agarosa 2%, teñido con bromuro de etidio y posteriormente fueron visualizados bajo luz ultravioleta (UV).

### **Análisis estadístico**

Los resultados obtenidos se analizaron con medidas de tendencia central y dispersión, además de realizar pruebas estadísticas de ANOVA y análisis post hoc de Dunnett.

## RESULTADOS

En el procedimiento de extracción de ARN de las líneas celulares HeLa (grupo control) y CAL-27 obtuvimos las siguientes lecturas en promedio:

LINEA CELULAR	ARN ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )
HeLa (grupo control)	1.989
CAL-27	0.501

Se realizó el procedimiento de PCR para la obtención de transcritos YY1, YY2 y Smac/Diablo en las líneas celulares HeLa (grupo control) y CAL-27, obteniendo las siguientes curvas de saturación (Fig 6 y 7), confirmando la expresión de estas moléculas en ambas líneas celulares.

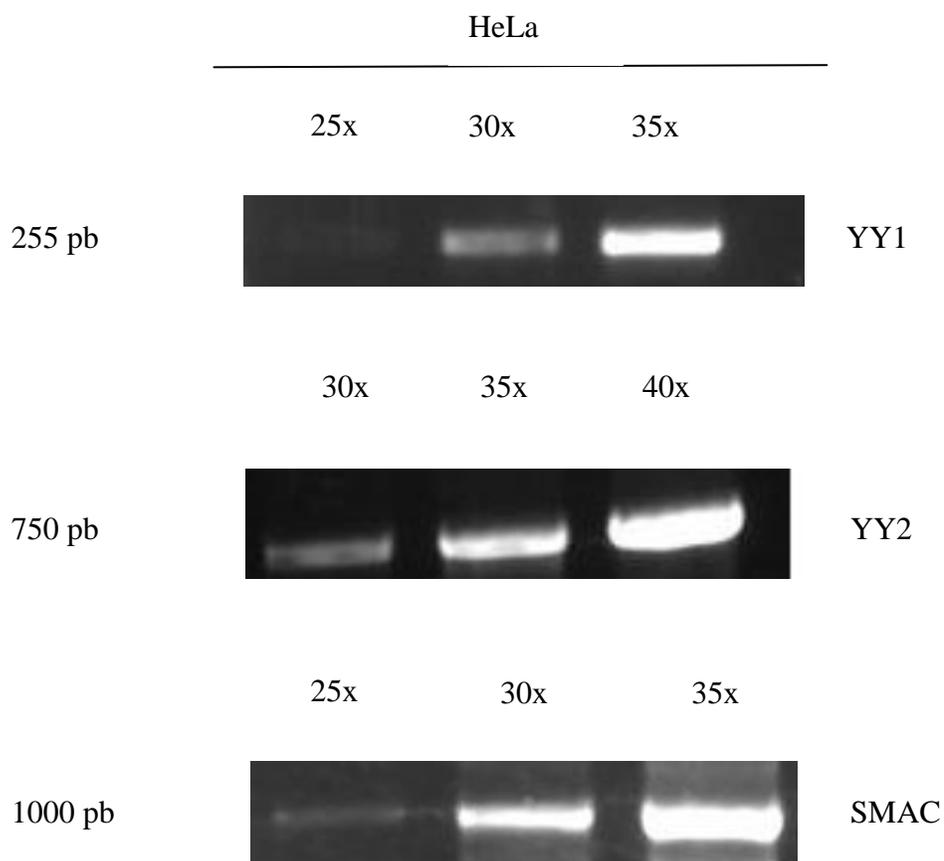


Fig 6. Curvas de saturación para los transcritos de YY1, YY2 y Smac/DIABLO, en la línea celular HeLa.

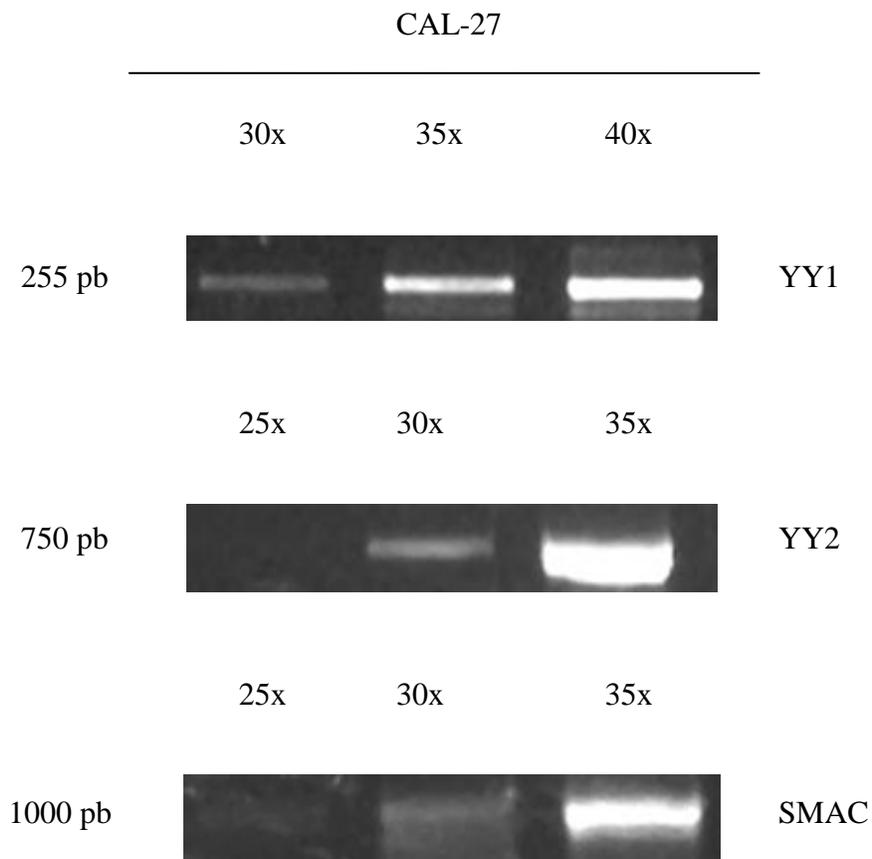


Fig. 7. Curvas de saturación para los transcritos de YY1, YY2 y Smac/DIABLO, en la línea celular CAL-27.

Posteriormente se procedió a la transfección por medio de Lipofectamine LTX y Plus de las líneas celulares HeLa y CAL-27. En la línea celular HeLa tranfectada con el plásmido RNAi-Ready pSIREN-Retro Q YY1 se observó algunas células con morfología multinucleadas y en huso. La transfección con HeLa RNAi-Ready pSIREN-Retro Q YY2 algunas de estas células se mostraban multinucleadas y con una morfología parecida a lamelipodios. La línea celular HeLa RNAi-Ready pSIREN-Retro Q, no presentó cambios morfológicos importantes comparadas a la de la línea celular HeLa no tranfectada (Fig. 8).

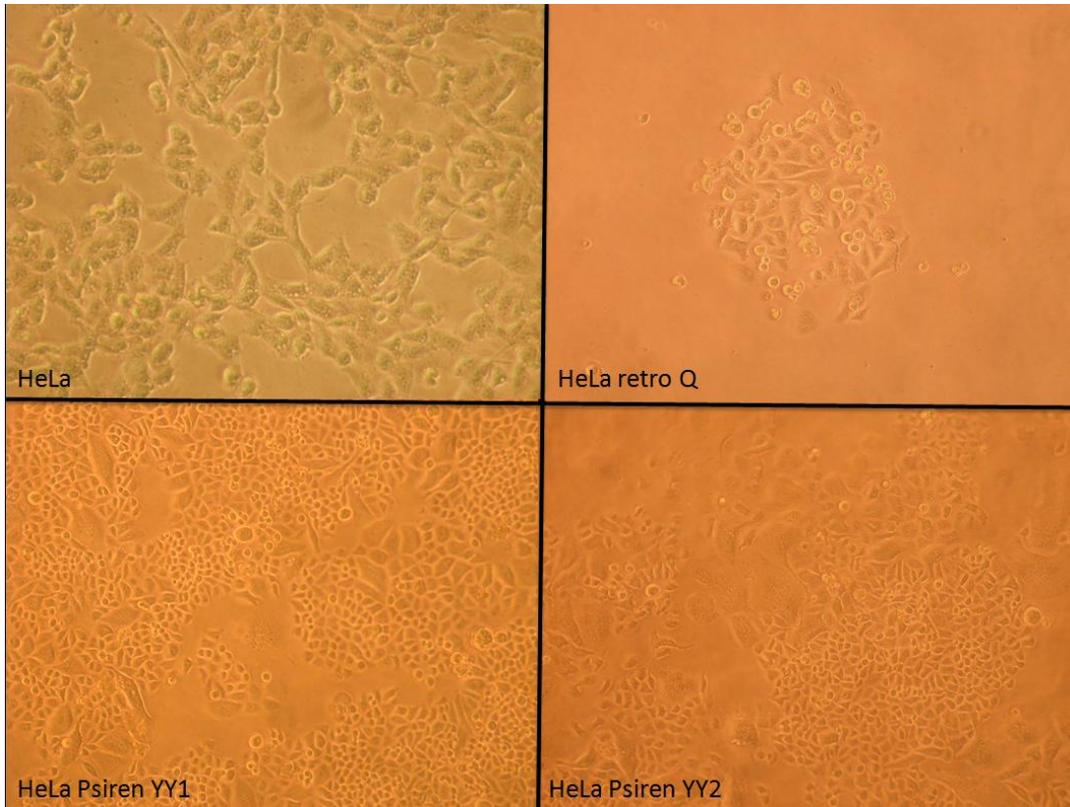


Fig. 8. Línea celular Hela y sus transfecciones con los plásmidos: RNAi-Ready pSIREN-Retro Q YY1, RNAi-Ready pSIREN-Retro Q YY2 y RNAi-Ready pSIREN-Retro Q. Microscopio óptico OLYMPUS (10x)

Las células de la línea CAL-27 no fue transfectable con tres procedimientos distintos (LIPOFECTAMINE 2000, ESCORT y LIPOFECTAMINE LTX). La línea celular CAL-27 al ser transfectadas con el vector RNAi-Ready pSIREN-Retro Q Zs Green presento muerte celular a las 24 hrs, disminuyendo su densidad celular hasta un 30%. Estas células no expresaron fluorescencia dentro las primeras 72 horas de la transfección. Lo cual fue un dato de transfección negativa.

## DISCUSION

Los nanoliposomas son partículas coloidales de membranas bilaminares compuestas por moléculas lipídicas auto-agregables capaces de generar vesículas. Estos son capaces de encapsular una fracción de medio en el cual son suspendidos. Las vesículas liposomales han atraído la atención en la investigación como acarreadores potenciales de diversas moléculas bioactivas y fármacos que pueden ser utilizados en aplicaciones terapéuticas en humanos y animales. Este tipo de medio ha sido utilizado exitosamente en el uso de agentes quimioterapéuticos contra el cáncer y recientemente son considerados como una alternativa para la expresión génica. En base a las características de baja toxicidad, inmunogenicidad, fácil preparación, envío independiente del tamaño de los ácidos nucleicos ha convertido a los liposomas en el sistema de transfección no viral más utilizado.<sup>50</sup>

En nuestro estudio se planteó el empleo de sistema de transfección liposomales, los cuales han sido empleados tanto para células en suspensiones como adheridas, así como en experimentos de silenciamiento génico a través de siRNA y shRNA. Los resultados de transfección sobre nuestro grupo control HeLa fueron exitosos, sin embargo bajo las mismas condiciones de transfección CAL-27 no fue positiva al procedimiento. Las posibles explicaciones para este fracaso pueden derivar de errores en la estandarización del protocolo o bien por características endógenas de la línea celular. Roche Diagnostics GmbH<sup>51</sup>, reporta que uno de las causas de fracaso en la transfección de líneas celulares es la contaminación por *Mycoplasma* spp; en el caso de CAL-27 está reportado por ATCC que durante su cultivo, la línea celular presentó contaminación por *Mycoplasma* spp y se trató con BM Cyclin (Ciprofloxacino)(ATCC, Product Information for ATCC CRL-2095).<sup>16</sup> De igual manera, durante nuestros experimentos, dos stocks de CAL-27 se contaminaron con *Mycoplasma* spp y fueron tratados con BM Cyclin (5 µl/ml durante 14 días, posteriormente se colocó 2.5 µl/ml durante 5 días) El problema de una infección por *Mycoplasma* spp radica en el tamaño de esta célula, que es menor de 1 µm, y por lo tanto son difíciles de detectar con un microscopio convencional, adicionalmente, esta célula requiere de colesterol para el crecimiento. Estos datos nos sugieren el riesgo latente de infección y los problemas posteriores para la transfección derivados de la posibilidad de la alteración de la membrana plasmática por la pérdida de colesterol.<sup>51</sup>

La estandarización de un protocolo es fundamental para el éxito de cualquier experimento. Al observar que la línea celular CAL-27 no fue transfectable, una explicación posible fue la susceptibilidad a la concentración empleada de liposomas catiónicos, para este fin se empleó diferentes concentraciones de LIPOFECTAMINE 2000 y otras alternativas de transfección menos tóxicas como ESCORT II y LIPOFECTAMINE LTX Y PLUS, no obstante, ante este ajuste en la línea celular presentó muerte celular, llegando a sobrevivir tan solo el 30%. Una posible alternativa para solucionar este problema en futuros experimentos puede ser la disminución de la cantidad de RNA, el tamaño de los liposomas y mejorar la carga o afinidad de la superficie de estos vectores.<sup>50</sup>

Durante los procedimientos de extracción de ARN en las líneas celulares, se obtuvo de CAL-27 una mínima cantidad de ARN a comparación de HeLa, probablemente esté relacionado al número de ciclos celulares correspondientes a cada línea celular, ya que hay conocimiento sobre el aumento de la cantidad de ARN en la fase G<sub>1</sub>, esto a su vez estaría relacionado con el nivel de proliferación de la línea celular. CAL-27 durante nuestros estudios mostró tener un nivel más bajo de confluencia celular que HeLa, debido a que al sembrar 3x10<sup>5</sup> células en cajas de cultivo de 35cm<sup>2</sup> de cada línea celular, se observó una confluencia celular del 100% en CAL-27 al día 5 posterior al cultivo, sin en cambio con HeLa en la cual se obtenía confluencia del 100% en el día 3 posterior al cultivo. Estas observaciones podrían tratarse de características peculiares de la línea celular CAL-27 o tener relación con la contaminación de *Mycoplasma* spp, ya que se reporta que esta bacteria altera el crecimiento celular.<sup>52,53</sup>

Las curvas de saturación mostraron un dato interesante respecto a la expresión de Smac/Diablo, YY1 y YY2 tanto en HeLa como en CAL 27. En HeLa cualitativamente se observó mayor expresión de Smac comparado a YY1 y YY2, mientras que en CAL 27 el patrón fue inverso. Esto nos sugiere la posibilidad de mayor susceptibilidad a la apoptosis a través de la vía mitocondrial para la línea HeLa. La mitocondria juega un papel fundamental en la apoptosis. La permeabilización de la membrana externa es una característica prominente de la apoptosis, esto resulta en la redistribución de ciertas proteínas hacia el espacio intermembranal y así generar una cascada de activación proapoptótica. Las proteínas involucradas en esto son el citocromo c, Smac/DIABLO, factor inductor de apoptosis, HtrA2/Omi y endonucleasa G. Se ha demostrado que las

células HeLa, al ser estimuladas proapoptóticamente tanto citocromo c como Smac salen de la mitocondria simultáneamente.<sup>54</sup>

Con respecto a los cambios morfológicos observados de la línea celular HeLa al ser tranfectada con el plásmido RNAi-Ready pSIREN-Retro Q YY1 en el cual se observó en algunas células una morfología similar a la de huso, en el cual nos podría hablar sobre una Transición Epitelio Mesenquimatoso (EMT), debido probablemente a que la sobreexpresión del factor de transcripción YY1 esté involucrado en la expresión de genes que participan en la EMT como Msx2 (Than DP, 2002 y Satoh K, 2004)<sup>55,56</sup> y de manera indirecta supresión del gen de E-cadherina al regular la transcripción de su represor Snail.<sup>57</sup> En la transfección del plásmido RNAi-Ready pSIREN-Retro Q YY2 en la línea celular HeLa, se observó cambio en su morfología como la formación de algunas células con lamelopodios, posiblemente porque el factor de transcripción YY2 regule a genes involucrados con la adhesión celular, que en caso del carcinoma podría tratarse en su participación en la migración celular, el cual es importante durante la metástasis, sin embargo aún en la literatura no se cuenta con los suficientes datos sobre los genes que son regulados por YY2 para determinar si alguno de ellos están involucrados la migración celular<sup>58,59</sup>

Los problemas en la transfección de CAL 27, limitaron el avance de los experimentos y obtención de resultados subsecuentes. La utilidad de estos resultados podría permear a la nueva corriente terapéutica contra el cáncer. El ideal es conseguir fármacos capaces de alterar la patogénesis del cáncer. Como ya se ha mencionado la apoptosis como alternativa terapéutica es promisoría. En base a nuestras curvas de saturación particular CAL 27 mostro cualitativamente mayor expresión de YY1 y YY2 que Smac, los cuales confieren una resistencia a la apoptosis a través de la vía extrínseca. Este resultado reafirma el interés y objetivo de esta línea de investigación, ya que si se logra aumentar la susceptibilidad o en el mejor de los casos inducir la apoptosis, los alcances clínicos son prometedores.

## CONCLUSIONES

De acuerdo a nuestros resultados podemos concluir lo siguiente:

No fue posible demostrar los efectos que pudieran tener los factores de transcripción de YY1 y YY2 sobre Smac/DIABLO en la línea celular CAL-27.

La línea celular CAL-27 expresa los genes YY1, YY2 y Smac/DIABLO. Sin embargo aún se desconoce su expresión de manera cuantitativa.

La línea celular CAL-27 durante el estudio no fue transfectable por liposomas catiónicos probablemente por contaminación de *Mycoplasma* spp.

La transfección de YY1 y YY2 provocó cambios en la morfología celular de HeLa.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Stewart BW, Kleihues P. World cancer report, Lyon: WHO International Agency for Research on Cancer; 2003.
2. Globocan. Cancer Incidence and Mortality Worldwide in 2008, IARC, WHO, como: <http://globocan.iarc.fr/>
3. Betancourt M. C.C.-RHM-01 MORTALIDAD y MORBILIDAD Compendio de Cáncer 2001. Registro Histopatológico de Neoplasias Malignas. Secretaria de Salud.
4. Barnes L, Evenson JW, Rihad D, Sidransky D. Pathology and genetic of Head and neck tumours. WHO. 2005. Chapter 4. Tumours of the oral cavity and oropharynx; 168-175.
5. Ludwig JA, Weinstein JN. Biomarkers in cancer staging, prognosis and treatment selection. *Nature Rev.* 2005;5:845-56.
6. Scully C, Bagan J. Oral squamous cell carcinoma: overview of current understanding of aetiopathogenesis and clinical implications. *Oral Dis.* 2009 Sep;15(6):388-99.
7. Leite ICG, Koifman S. Survival analysis in a sample of cancer patients at a reference hospital in Rio de Janeiro, Brazil. *Oral Oncol.* 1998;34:347-52.
8. Fritz A, Percy C, Jack A, Shanmugaratham K, Sobin L, Parkin DM, Whelan S. CIE-O. Clasificación Internacional de Enfermedades para Oncología. Organización Panamericana de la Salud. Oficina Sanitaria Panamericana, Oficina Regional de la Organización Mundial de la Salud. 3ª. Ed. Washington, D.C. 2003
9. Konkimalla VB, Suhas VL, Chandra NR, Gebhart E, Efferth T. Diagnosis and therapy of oral squamous cell carcinoma. *Expert Rev Anticancer Ther.* 2007 Mar;7(3):317-29.
10. Pindborg JJ, Reichart PA, Smith CJ, van der Waal I. Histological typing of cancer and precancer of the oral mucosa 2<sup>nd</sup> Edition, 1997 WHO, Springer.

11. Pelucchi C, Gallus S, Garavello W, Bosetti C, La Vecchia C. Cancer risk associated with alcohol and tobacco use: focus on upper aero-digestive tract and liver. *Alcohol Res Health*. 2006;29(3):193-8.
12. Gillison ML, Koch WM, Capone RB, Spafford M, Westra WH, Wu L, *et al*. Evidence for a causal association between human papillomavirus and a subset of head and neck cancers. *J Natl Cancer Inst*. 2000;92: 709-20.
13. Tirado-Gómez, Granados M. Epidemiología y etiología del cáncer de cabeza y cuello. *Cancerología* 2007; 2: 9-17.
14. Sato M, Sato T, Izumo T, Amagasa T. Genetically high susceptibility to oral squamous cell carcinoma in terms of combined genotyping of CYP1A1 and GSTM1 genes. *Oral Oncol*. 2000 May;36(3):267-71.
15. Harty LC, Caporaso NE, Hayes RB, Winn DM, Bravo-Otero E, Blot WJ, *et al*. Alcohol dehydrogenase 3 genotype and risk of oral cavity and pharyngeal cancers. *J Natl Cancer Inst*. 1997 Nov 19;89(22):1698-705.
16. ATCC, Product Information for ATCC CRL-2095, como: <http://www.atcc.org/ATCCAdvancedCatalogSearch/ProductDetails/tabid/452/Default.aspx?ATCCNum=CRL-2095&Template=cellBiology>
17. Hanahan D, Weinberg R. The Hallmarks of Cancer. 2011;144: 646-74.
18. Adams JM, Cory S. The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. *Oncogene* 2007; 26:1324-37.
19. Lowe SW, Cepero E, Evan G. Intrinsic tumour suppression. *Nature* 2004; 432:307-15.
20. Evan G, Littlewood T. A matter of life and cell death. *Science* 1998; 281:1317-22.
21. Verhagen, AM, Ekert PG, Pakusch M, Silke J, Connolly LM, Reid GE, *et al*. Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell* 2000; 102:43-53.
22. Yang J, McEachern D, Li W, Davis MA, Li H, Morgan MA, Bai L, Sebolt JT, Sun H, *et al*. Radiosensitization of head and neck squamous cell carcinoma by a SMAC-mimetic compound, SM-164, requires activation of caspases. *Molecular Cancer Therapeutics* 2011; 10(4):658-69.

23. Sun Q, Zheng X, Zhang L, Yu J. Smac modulates chemosensitivity in head and neck cancer cells through the mitochondrial apoptotic pathway. *Clinical Cancer Research* 2011; 17(8):2361-72.
24. Tanimoto T, Tsuda H, Imazeki N, Ohno Y, Imoto I, Inazawa J, Mtsubara O. Nuclear expression of cIAP-1, an apoptosis inhibiting protein, predicts lymph node metastasis and poor patient prognosis in head and neck squamous cell carcinomas. *Cancer Letters* 2005; 224(1):141-51.
25. Gordon S, Akopyan G, Garban H, Bonavida B. Transcription factor YY1: structure, function, and therapeutic implication sin cancer biology. *Oncogene* 2006; 25:1125-42.
26. Yao YL, Dupont Br, Ghosh S, Gang Y, Leach RJ, Seto E. Cloning chromosomal localization and promoter analysis of the human transcription factor YY1. *Nucleic Acids Research* 1998; 26:3776-83.
27. Hiromura M, Choi CH, Sabourin NA, Jones H, Bachvarov D, Usheva A. YY1 is regulated by O-linked N-acetylglucosaminylation. *The Journal of Biological Chemistry* 2003; 278:14046-52.
28. Yao YL, Yang WM, Seto E. Regulation of transcription factor YY1 by acetylation and deacetylation. *Molecular and Cellular Biology* 2001; 21:5979-91.
29. Austen M, Luxcher B, Luscher-Firzlaff JM. Characterization of the transcriptional regulator YY1. The bipartite transactivation domain is independent of interaction with the TATA box-binding protein, transcription factor IIB, TAF1155, or cAMP-responsive element-binding protein (CPB)-binding protein. *The Journal of Biological Chemistry* 1997; 272:179-17.
30. Becker KG, Jedlicka P, Templeton NS, Liotta L, Ozato K. Characterization of hUCRBP (YY1, NF-E1, delta): a transcription factor that binds the regulatory regions of many viral and cellular genes. *Gene* 1994; 150:259-66.
31. Oei SL, Shi Y. Poly (ADP-ribosyl)ation of transcription factor Ying Yang 1 under conditions of DNA damage. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2001; 285:27-31.

32. Hiromura M, Choi CH, Sabourin NA, Jones H, Bachvarov D, Usheva A. YY1 is regulated by O-linked N-acetylglucosaminylation (O-glcNAcylation). *The Journal of Biological Chemistry* 2003; 278; 14046-52.
33. Rosenwald A, Wright G, Chan WC, Connors JM, Campo P, Fisher RI, et al. The use of molecular profiling to predict survival after chemotherapy for diffuse large-B-cell lymphoma. *The New England Journal of Medicine* 2002; 346:1937-47.
34. Kohler C, Villar CB. Programming of gene expression by Polycomb group proteins. *Trends Cell Biology* 2008; 18:236-243.
35. Schuettengruber B, Chourrout D, Vervoort M, Leblanc B, Cavalli G. Genome regulation by polycomb and trithorax proteins. *Cell* 2007; 128:735-45.
36. Seligson D, Horvath S, Huerta-Yepez S, Hanna s, Garban H, Roberts A, et al. Expression of transcription factor Yin Yang 1 in prostate cancer. *International Journal Oncology* 2005; 27:13-41.
37. Seligson D, Horvath S, Huerta-Yepez S, Hanna s, Garban H, Roberts A, et al. Expression of transcription for Yin Yang 1 in prostate cancer. *International Journal of Oncology* 2005; 27:131-41.
38. Berchuck A, Iversen ES, Lancaster JM, Pittman J, Luo J, Lee P, et al. Patterns of gene expression that characterize long-term survival in advanced stage serous ovarian cancers. *Clinic Cancer Research* 2005; 11:3686-96.
39. Matsumura N, Huang Z, Baba T, Lee PS, Barnett JC, Mori S, et al. Ying Yang 1 modulates taxane response in epithelial ovarian cancer. *Molecular Cancer Research* 2009; 7:210-20.
40. Allouche A, Nolens G, Tancredi A, Delacroix L, Mardaga J, Fridman V, et al. The combined immunodetection of AP-2alpha and YY1 transcription factors is associated with ERBB2 gene overexpression in primary breast tumors. *Breast Cancer Research* 2008; 10:9.
41. Baritaki S, Sifakis S, Huerta-Yepez S, Neonakis IK, Soufla G, Bonavida B, et al. Overexpression of VEGF and TGFβ1 mRNA in Pap smears correlates with progression of cervical intraepithelial neoplasia to cancer: implication of YY1 in cervical tumorigenesis and HPV infection. *International Journal of Oncology* 2007; 31:69-79.

42. De Nigris F, Botti C, de Chiara A, Rossiello R, Apice G, Fazioli F, et al. Expression of transcription factor Yin Yang 1 in human osteosarcomas. *European Journal of Cancer* 2006; 42:2420-4.
43. Grubach L, Juhl-Christensen C, Rethmeier A, Olesen LH, Aggerholm A, Hokland P, et al. Gene expression profiling of Polycomb, Hox and Meis genes in patients with acute myeloid leukaemia. *European Journal of Haematology* 2008; 8:112-22.
44. Dukers DF, van Galen JC, Giroth C, Jansen P, Sewalt RG, Otte AP, et al. Unique polycomb gene expression pattern in Hodgkin's lymphoma and Hodgkin's lymphoma-derived cell lines. *The American Journal of Pathology* 2004; 164:873-81.
45. Sakhinia E, Glennie C, Hoyland JA, Menasce LP, Brady G, Miller C, et al. Clinical quantitation of diagnostic and predictive gene expression levels in follicular and diffuse large B-cell lymphoma by RT-PCR gene expression profiling. *Blood* 2007; 109:3922-8.
46. Libra M, Castellano G, Baritaki S, Huerta-Yepez S, Ligresti G, Militello L, et al. Expression, role in transformation and prognostic significance of the transcription factor Yin Yang 1 (YY1) in non-Hodgkin's lymphoma: analyses in NHL tissues by experimental and bioinformatic approaches. *Blood (ASH Annual Meeting Abstracts)* 2008; 112:2827.
47. Yeun-Lee JI, Huerta-Yepez S, Vega M, Vroula S, Spandidos DA, Bonavida B. The NO TRAIL to YES TRAIL in cancer therapy (Review). *International Journal of Oncology* 2007; 31:685-91.
48. Ferris RL, Martínez I, Sirianni N, Wang J, López-Albaitero A, Gollin SM, et al. Human papillomavirus-16 associated squamous cell carcinoma of the head and neck (SCCHN): A natural disease model provides insights into viral carcinogenesis. *European Journal of Cancer* 2005; 41:807-15.
49. Chen L, Shioda T, Coser KR, Lunch MC, Yang C, Schmidt EV. Genome-wide analysis of YY2 versus YY1 target genes. *Nucleic Acids Research* 2010; 38 (12): 4011-26.

50. Samadikhah HR, Majidi A, Nikkhah M, Hosseinkhani S. Preparation, characterization, and efficient transfection of cationic liposomes and nanomagnetic cationic liposomes. *Int J Nanomedicine* 2011; 6:2275-83.
51. Diagnostics GmbH, H, ,como:[http://www.gmp-compliance.org/daten/training/ECA\\_EuropMycoplasmaConference.pdf](http://www.gmp-compliance.org/daten/training/ECA_EuropMycoplasmaConference.pdf)
52. Baseman JB, Tully JG. Mycoplasmas: sophisticated, reemerging, and burdened by their notoriety. *Emerg Infect Dis.* 1997 Jan-Mar;3(1):21-32.
53. Rivera-Tapia JA, Muñoz ZG, Román MC. Contaminación por micoplasmas en cultivos celulares. *Asociación Medica Centro Médico ABC.* 2006;51(3): 109-12.
54. Ng H, Smith DJ, Nagley P. Application of flow cytometry to determine differential redistribution of cytochrome c and Smac/DIABLO from mitochondria during cell death signaling. *PLOS One* 2012; 7(7): e42298.
55. Tan DP, Nonaka K, Nuckolls GH, et al. YY1 activates Msx2 gene independent of bone morphogenic protein signaling. *Nuclei Acids Research* 2002; 30: 1213-23.
56. Satoh K, Ginsburg E, Vonderhaar BK. Msx-1 and Msx-2 in mammary gland development. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia* 2004; 9: 195-205.
57. Shrivastava A, Yu J, Artandi S, Calame K. YY1 and c-Myc associate in vivo in a manner that depends on c-Myc levels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1996; 93: 10638-41.
58. Chunqing L, Xiaochen L, Lisa S, Joomyeong K. Rapid evolution of a recently retroposed transcription factor YY2 in mammalian genomes. *Genomics* 2006; 87:348-55.
59. Nguyens N, Zhang X, Olashaw N, Seto E. Molecular cloning and functional characterization of the transcription factor YY2. *The Journal of Biological Chemistry* 2004; 279(24):25927-34