



UNIVERSIDAD CENTRAL DE  
VENEZUELA  
FACULTAD DE CIENCIAS

**EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL COMPUESTO  
*ENT-16 $\beta$ -17 $\alpha$ -DIHIDROXIKAURANO (DHK)* SOBRE  
LA REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL DEL GEN  
DE LA TELOMERASA (hTERT) EN LA LÍNEA  
CELULAR MCF-7.**

**Trabajo Especial de Grado:**

Presentado ante la ilustre Universidad Central de Venezuela, por la Bachiller **Dolly Estella Montaña Espinosa**, como requisito parcial para optar al título de Licenciada en Biología.

**Tutor: Dr. Iván Galindo**

**Asesor académico: Prof. Fernando González**

CARACAS, VENEZUELA

Octubre, 2014

## **DEDICATORIA**

Este trabajo está dedicado a mis padres, María Estella Espinosa y Antonio Montaña, por su incondicional amor, apoyo y paciencia durante la materialización de este sueño. Un proyecto de vida que comenzó con las palabras...

“mamá, papá, quiero estudiar Biología”.

A mi hermano, Ronny Montaña, el ser más especial que me han regalado mis padres. Eres un milagro y cada día me inspiras a ser un mejor ejemplo para ti.

## **AGRADECIMIENTOS**

Ante todo quiero agradecer este logro a Dios, pues ha preparado un camino lleno de aprendizajes y bendiciones durante toda mi carrera. Él ha dirigido mi fe y mis principios, ha escuchado mis peticiones y ha respondido de la manera más extraña que puede haber, pero me ha enseñado que sus planes están milimétricamente calculados.

Pocas son las palabras para agradecer tanto amor incondicional de mis padres. Ellos han tenido la sabiduría de guiar mis pasos, de dejarme tropezar cuando es necesario y de enseñarme que la constancia y el esfuerzo son el inicio del éxito. Siempre los percibí como personas dedicadas a la academia, al conocimiento y a las letras. Ustedes inculcaron en mí esa pasión por estudiar, por descubrir cosas y por buscar respuestas a mis preguntas, luego dejaron que tomara esta decisión de vida y me apoyaron sin titubear ni un segundo, estuvieron allí en toda la carrera, con sus altos y bajos, detrás de todo el esfuerzo que ha significado cumplir esta meta. Por todo esto y por mucho más, estaré siempre agradecida con ustedes, los amo y me siento orgullosa de tenerlos como padres.

A mi querido hermano le estoy infinitamente agradecida, por existir y ser esa persona con la que incondicionalmente tendré un hermoso vínculo, hasta el final de nuestra existencia. Eres parte de esa fuente de inspiración que me ayuda a crecer como persona y científico. Tú, con tus frecuentes preguntas de filosofía y tu constante necesidad de hallar una explicación a todo, me haces estudiar y retomar mis libros para darte una buena respuesta. Gracias hermano, te amo.

A Wolfgang Vivas, mi pareja, mi amigo y confidente, por toda su amistad y apoyo durante la carrera. Gracias por todo tu amor y comprensión durante este último año, has sabido regalarme sonrisas y una gran motivación para continuar mis proyectos. Espero que juntos podamos crecer en este maravilloso mundo de la ciencia y que Dios nos prepare un camino lleno de retos, éxitos y mucha felicidad.

Al Dr. Iván Galindo, quien ha guiado mi proceso de aprendizaje en esta última etapa de mi carrera. Cada conocimiento impartido por usted es un tesoro que aprecio mucho, gracias por toda su confianza, dedicación y enseñanza. Me siento afortunada de haber recibido sus consejos, pues indudablemente me han permitido crecer y ver muchas cosas desde otra perspectiva. Gracias por inculcarme un bonito sentido de pertenencia por nuestro lugar de trabajo y por enseñarme que debemos tener criterio para tomar las mejores decisiones.

A Annamil Álvarez, quien me acompañó y apoyó durante la realización de este trabajo. Profesora, gracias por toda su paciencia, por todas sus enseñanzas y por todas las colas a mi casa tras una larga jornada de trabajo. Usted me ha enseñado que ser cuidadoso en cada detalle rinde sus frutos, que si esperamos resultados diferentes debemos hacer las cosas de otra manera, usted me ha demostrado que la práctica hace al maestro.

A Riward Campelo, por todo su apoyo desde el inicio en la ejecución de este trabajo. Gracias por tu paciencia y disposición para ayudar, muchos de tus consejos fueron de gran utilidad y contribuyeron con mi formación durante esta etapa.

A la Dra Katherine Figarella, Sabrina Marsiccobetre e Irina Arocha, quienes me apoyaron y animaron desde un principio. Ustedes hicieron más amenos mis días y mis almuerzos durante la realización de mi tesis. Gracias por toda su confianza, gentileza, rectitud, nobleza y por enseñarme que la humildad va de la mano con un excelente equipo. Espero seguir encontrándolas en este inesperado camino, muchas gracias por su amistad.

A Mari Gaby, Marjorie, María Alejandra, Jaís, Maleja, José Manuel, Pedro, Irima y Blanca, porque todos y cada uno de ellos me brindó su ayuda en diversos momentos. Cada una de las experiencias compartidas con ustedes son recuerdos invaluable, las risas en los ratos libres y unas cuantas meriendas en la tarde. Gracias por permitirme ser parte de este grupo y hacer grata mi estadía en el IDEA.

A los profesores Renato Nobrega, Roschman Gonzales, Guillermina Alonso, Jesús Romero, Palmira Guevara, Yadira Rangel, Marcia Toro, Héctor Finol, Fernando Gonzáles, Zelandia Fermín y Elizabeth Merentes, por enamorarme cada semestre de esta carrera. Gracias por su dedicación, por impartir conocimiento con tanto profesionalismo y entusiasmo, por planificar cada una de las clases con tanta responsabilidad y por continuar preparando a las siguientes generaciones de biólogos. Ustedes sin duda alguna, son el tesoro más preciado de la escuela, pues dedican parte de su vida a enseñar y formar profesionales de calidad, de valores y apasionados por esta carrera.

A mi jurado, la Dra. Guillermina Alonso, el Dr. Gustavo Benaim y mi asesor académico, el profesor Fernando González, por toda su dedicación, sus consejos, por acompañarme y orientarme en esta última etapa de mi carrera.

A mis amigos, que me han apoyado y acompañado durante todo este andar, María Marrero, Victoria Navas, Rossana Mendoza, Naymar Delgado, Jenniffer Triviño, Sonia Chacón, Jessica Ariza, Daniel Ortiz y Andrea Moncada. Ustedes son regalos que Dios envió para hacer el camino más fácil y agradable, gracias por los buenos momentos y por los ratos de estudio. Tengo de cada uno un recuerdo invaluable que me hace recordar todos estos años con una gran sonrisa. Gracias a todos, los quiero.

Finalmente quiero agradecer a mi amada Universidad Central de Venezuela, por permitirme ser parte de ella y darme una estupenda formación académica, a pesar de las dificultades. Mi amada universidad, siempre autónoma, plural de pensamiento y abierta al conocimiento, gracias por ser la casa que vence la sombra.

## RESUMEN

El *ent*-16 $\beta$ -17 $\alpha$ -dihidroxi-kaurano (DHK) es un diterpeno aislado de la corteza de la especie *Croton malambo*. Un pequeño árbol conocido popularmente en Venezuela como “palomatias” o “torco.” Este compuesto posee un efecto citotóxico y proapoptótico en el crecimiento de células derivadas de adenocarcinoma de mama (MCF-7), su  $CI_{50}$  es de 12,5  $\mu$ g/ml, unas 2,66 veces menor en comparación con el valor correspondiente en células no malignas. El DHK también disminuye 1000 veces los niveles del ARNm de la subunidad catalítica de la telomerasa (hTERT). Una enzima que contrarresta el acortamiento progresivo de los telómeros, mediante la síntesis de repeticiones en tándem al final del cromosoma. Su actividad representa un importante papel en la inmortalización celular y es casi universal en los diferentes tipos cáncer; además, se encuentra aproximadamente en un 85-90% de los tumores primarios.

Poco se conoce acerca del efecto del DHK sobre la regulación transcripcional de la telomerasa. Por tal razón, nos propusimos evaluar el mecanismo de acción de este compuesto sobre un complejo de proteínas que han sido asociadas a la regulación de hTERT, entre estas: Ap2, Rb y E2F-1. Para ello decidimos estudiar la interacción entre estas proteínas a través de un ensayo de co-inmunoprecipitación y además evaluar la capacidad de unión de E2F-1 al ADN en presencia del compuesto, mediante un ensayo de cambio de la movilidad electroforética (EMSA). También estudiamos el cambio en la concentración de hTERT en presencia de DHK, con la finalidad de determinar si existe una relación entre la represión de la subunidad catalítica y los resultados obtenidos a partir de la co-inmunoprecipitación y del EMSA.

En este trabajo hemos planteado la posible participación de los factores de transcripción E2F-1, Ap2- $\alpha$  y la proteína pRb, en el complejo de transactivación del gen de hTERT. Los resultados sugieren que en presencia de DHK, el factor de transcripción Ap2- $\alpha$  se disocia de las proteínas E2F-1 y pRb, de manera que estas últimas parecieran ejercer una represión transcripcional sobre hTERT. Por otra parte, determinamos que el factor de transcripción E2F-1 se une a su secuencia consenso en presencia del compuesto. Asimismo, se observó de manera preliminar que los niveles de hTERT disminuyen casi a la mitad, luego de 24 horas de exposición al compuesto.

Estos resultados sugieren que la disociación de Ap2- $\alpha$  del complejo y la unión de E2F-1 al ADN, no parecen ser eventos aislados, sino que ambos convergen en la represión transcripcional de hTERT; sin embargo, es necesario confirmar esta hipótesis mediante algún ensayo que permita determinar si efectivamente los factores de transcripción E2F-1 y Ap2- $\alpha$ , se unen de manera específica a sus secuencias consenso en el promotor de hTERT.

# ÍNDICE DE CONTENIDOS

	<b>Pág.</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
1.1. Procesos celulares fundamentales y el mantenimiento de la homeostasis en organismos multicelulares.....	1
1.2. El cáncer como consecuencia de mutaciones en genes que controlan procesos celulares fundamentales.....	5
1.3. El papel de los telómeros y la telomerasa en la supervivencia de células cancerígenas.....	8
1.4. La Telomerasa como un blanco terapéutico contra el cáncer.....	14
1.5. El compuesto DHK reduce los niveles de ARNm de la telomerasa.....	17
<b>2. ANTECEDENTES</b> .....	19
2.1. Efecto del DHK sobre la regulación transcripcional del gen antiapoptótico Bcl-2.....	19
2.2. Regulación transcripcional del gen de la telomerasa.....	22
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	27
<b>4. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	28
4.1. Mantenimiento de cultivo celular.....	28

4.2. Medición de los niveles de citotoxicidad del compuesto DHK mediante el ensayo de reducción del bromuro (MTT).	28
4.3. Extracción de proteínas.	29
4.4. Cuantificación de proteínas mediante el método de Bradford.	30
4.5. Electroforesis en condiciones disociantes (SDS-PAGE).	30
4.6. Transferencia de proteínas.	31
4.6.1. Tinción con rojo Ponceau.	31
4.6.2. Inmunodetección o Western blot.	31
4.7. Co-inmunoprecipitación.	32
4.8. Alineamiento de oligonucleótidos correspondientes a la secuencia consenso de unión de E2F-1.	33
4.8.1. Ensayo de cambio de la movilidad electroforética (EMSA).	34
4.9. Diseño de oligonucleótidos para amplificar un fragmento del promotor de hTERT, en el que se encuentran los sitios de unión de Ap2- $\alpha$ y E2F-1	35
<b>5. RESULTADOS.</b>	<b>36</b>
5.1. Niveles de hTERT en presencia y ausencia del compuesto.	36
5.2. Co- Inmunoprecipitación.	37

5.2.1. Estudio densitométrico de la co-inmunoprecipitación.....	39
5.2.1.2. Análisis estadístico del estudio densitométrico.....	40
5.3. Ensayo de cambio de la movilidad electroforética.....	41
<b>6. DISCUSIÓN.....</b>	<b>42</b>
<b>7. CONCLUSIONES.....</b>	<b>57</b>
<b>8. RECOMENDACIONES.....</b>	<b>59</b>
<b>9. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>60</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS.

	<b>Pág.</b>
<b>Figura 1:</b> Equilibrio entre de la proliferación y la muerte celular.....	5
<b>Figura 2.-</b> Marcadores moleculares de la progresión tumoral.....	6
<b>Figura 3:</b> Cambios genéticos que convierten a los protooncogenes en oncogenes.....	7
<b>Figura 4:</b> Telómeros humanos.....	9
<b>Figura 5:</b> Formación de la horquilla terminal. ....	12
<b>Figura 6:</b> Comparación de la longitud de los telómeros en función del número de divisiones celulares en diferentes tipos de células.....	13
<b>Figura 7:</b> Regulación de la transcripción.....	15
<b>Figura 8.</b> Secuencias del promotor basal y proximal.....	16
<b>Figura 9:</b> Estructura química del DHK.....	18
<b>Figura 10:</b> Regulación transcripcional positiva del gen antiapoptótico Bcl-2.....	20
<b>Figura 11:</b> Represión transcripcional del gen Bcl-2, debido a la disociación del complejo de iniciación de la transcripción frente a la exposición al DHK.....	21
<b>Figura 12:</b> El núcleo de la secuencia promotora del gen que codifica para hTERT.....	23
<b>Figura 13:</b> Sitios de unión del factor de transcripción E2F-1 al promotor de hTERT.....	23

<b>Figura 14.:</b> Hipótesis sobre el mecanismo de acción del DHK, sobre el complejo de iniciación de la transcripción de hTERT.....	26
<b>Figura 15:</b> Niveles de expresión de hTERT en ausencia y presencia del compuesto.....	36
<b>Figura 16:</b> Inmunoprecipitación de pRb. ....	37
<b>Figura 17:</b> Interacción entre pRb, E2F-1 y Ap2- $\alpha$ .....	38
<b>Figura 18:</b> Análisis estadístico de las proporciones t/c.....	40
<b>Figura 19:</b> Ensayo de cambio de la movilidad electroforética.....	41
<b>Figura 20:</b> Propuesta del mecanismo de acción del DHK, sobre la interacción de proteínas asociadas a la regulación transcripcional de hTERT.....	50
<b>Figura 21:</b> Diseño de oligonucleótidos.....	51
<b>Figura 22:</b> Resultado esperados de la Inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP).....	52
<b>Figura 23:</b> Factores de transcripción de hTERT.....	55

## LISTA DE ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxirribonucleótido.

AP: Fosfatasa alcalina.

Ap-2: activador de proteína 2 (Protein activator 2).

APS: Persulfato de amonio.

Bcl-2: Linfoma de células  $\beta$ .

BSA: Albúmina sérica bovina.

DHK: *ent*-16 $\beta$ -17 $\alpha$ -dihidroxicaurano.

DMEM: Medio Eagle modificado de Dulbecco.

DMSO: Dimetilsulfóxido.

DTT: Ditiotreitól.

EDTA: Ácido etilendiamino tetra-acético.

HDAC: Histona deacetilasas.

HEPES: Solución tamponante ácido [4 - (2-hidroxietil)-1-piperazinetanosulfónico].

hTERT: Transcriptasa Reversa de la Telomerasa humana.

MCF-7: Línea celular derivada de adenocarcinoma de mama humano.

MTT: Bromuro de (3,4,5 dimetil-2-tiazolil)- 2,5- difeniltetrazólico.

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.

pRb: Proteína Retinoblastoma

PVDF: Membrana de polifluoruro de vinilideno.

PMSF: Fluoruro de fenilmetilsulfonilo.

Rb: Gen que codifica para la proteína Retinoblastoma.

RIPA: Solución tamponante de Radio inmunoprecipitación.

SDS: Duodecilsulfato sódico.

SFB: Suero fetal de bovino

TEMED: N,N',N'-tetrametiletildiamida.

TRF: factor de unión a repeticiones teloméricas.

TBST: tampón Tris salino y Tween 20.

## 1. INTRODUCCIÓN

El adecuado desarrollo y funcionamiento de organismos multicelulares depende básicamente del equilibrio entre tres procesos celulares fundamentales, la proliferación celular; la diferenciación y la apoptosis (Walensky, 2006). Un balance entre estos procesos permite que se lleve a cabo la síntesis de nuevas células y a su vez la eliminación de aquellas que pudieran amenazar la supervivencia del organismo; es por tal razón que cada uno de estos mecanismos debe ser regulado por una compleja red de señalización celular.

### **1.1. Procesos celulares fundamentales y el mantenimiento de la homeostasis en organismos multicelulares.**

La proliferación celular es un proceso esencial para la supervivencia de los organismos multicelulares, implicando un incremento del número de células como resultado del crecimiento y de la división celular; cada uno de ellos regulado de forma muy específica durante el ciclo celular. Este último se encuentra dividido en cuatro fases; la mitosis o fase M donde tiene lugar la división de la célula; la interfase, constituida por la fase G1 donde se acumulan las enzimas y moléculas requeridas para la replicación del ADN; la fase S en la que ocurre la replicación de los cromosomas; la fase G2 donde continúa el crecimiento de la célula y se prepara para la división (Watson, 2006).

Los procesos que se llevan a cabo durante el ciclo celular se encuentran regulados en diferentes puntos de control. El primero se encuentra entre las fases G1/S, donde se examina el tamaño de la célula y la integridad del material genético previo a la replicación;

en el segundo punto de control ubicado entre las fases G2/M, se verifica la culminación de la síntesis de ADN así como su integridad; mientras que en el tercer punto se examina la correcta formación del sistema de fibras del huso acromático y se encuentra en la fase M. Existen proteínas como las ciclinas y la quinasas dependientes de ciclinas (CDK), que forman complejos proteicos capaces de fosforilar y activar selectivamente otras proteínas que promueven el paso a través del ciclo celular (Hartwell y Kastan, 1994).

Los organismos multicelulares deben mantener un equilibrio interno dada la interacción de forma dinámica con su ambiente. Esto implica la coordinación de diversos procesos fisiológicos que permitan su supervivencia; este proceso también es conocido como homeostasis (Hill, 2006). Para ello es necesaria la existencia de diferentes tipos de células que permitan llevar a cabo diversos procesos. Por tal razón algunas células reciben señales que inducen la detención de la proliferación celular y permanecen metabólicamente activas pero no crecen ni se dividen (quiescencia), si no que expresan un perfil de genes característicos que les permiten adquirir una morfología y funciones de un tipo celular específico; este proceso también es conocido como diferenciación celular (Schwanbeck, 2014).

Durante el ciclo celular, la mayoría de células diferenciadas permanecen indefinidamente en estado de quiescencia y se encuentran en la fase conocida como G0. Sin embargo, es posible que las células puedan entrar de nuevo en el ciclo celular mediante estímulos por señales de crecimiento externas. El proceso de diferenciación celular también es regulado muy específicamente por una compleja red de señalización, que permite establecer un equilibrio entre todos estos procesos (Hartwell y Kastan, 1994).

Asimismo, los organismos multicelulares deben eliminar células en las que haya ocurrido daños irreparables, ocasionados entre otras causas por: infección de microorganismos o virus, agentes químicos tóxicos, ausencia de nutrientes, daños mecánicos y pérdida de su función. Todos estos eventos comprometen la integridad celular y promueven cambios morfológicos, funcionales y bioquímicos, que impiden a las células realizar sus funciones vitales y por lo tanto conducen a su muerte. En la mayoría de los casos este proceso transcurre mediante mecanismos regulados y es conocido como apoptosis o muerte celular programada (Lizarbe, 2007).

El proceso de apoptosis es un proceso natural que permite un adecuado desarrollo de los organismos. Interviene en procesos de morfogénesis durante el desarrollo fetal, en la metamorfosis de algunos anfibios e insectos y también en la eliminación de células que amenazan la supervivencia, como en las células defectuosas o anormales en las que se producen daños irreparables en el ADN (Lizarbe, 2007).

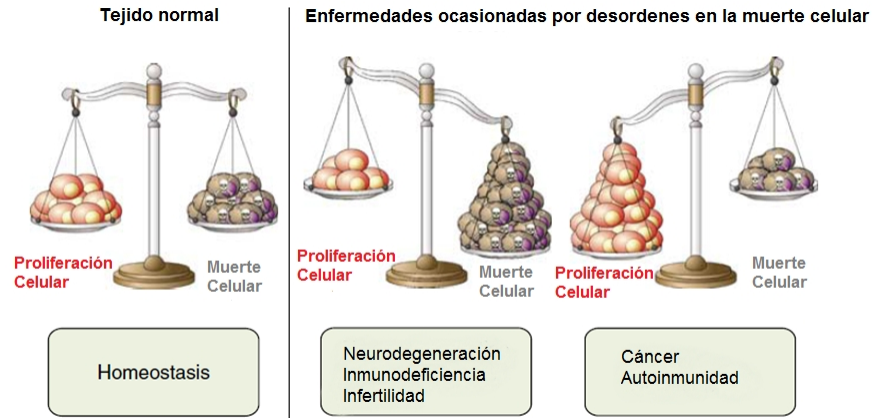
Una vez iniciada la apoptosis, las células experimentan ciertos cambios que incluyen la formación de vesículas en la membrana plasmática, cambios en la distribución de fosfolípidos de membrana, fragmentación enzimática del ADN cromosómico y finalmente la formación de cuerpos apoptóticos, de manera que no se produzca ningún proceso de respuesta a daño celular o inflamación, a diferencia de otros tipos de muerte celular no programada como lo es la necrosis (Savill y Fadok, 2000).

Dependiendo del estímulo recibido por la célula, el proceso de apoptosis puede ser activado mediante distintas vías, sin embargo, todas las señales convergen al final en la activación de una familia de cisteín-proteasas denominadas caspasas, que cortan la proteína

diana detrás de un residuo de aspártico. Estas proteasas se dividen en dos clases de caspasas, las iniciadoras que promueven la apoptosis al dividir y activar otras caspasas y las caspasas efectoras que inician los cambios celulares mencionados anteriormente (Alnemri y col., 1996).

Las caspasas son características de dos vías involucradas en la señalización de muerte celular; la vía extrínseca de la apoptosis, que está mediada por la activación de receptores de muerte, capaces de reconocer ligandos extracelulares y estimular la muerte de la célula que porta el receptor, mediante la caspasa iniciadora 8, mientras que la vía intrínseca o mitocondrial de la apoptosis, mediada por la caspasa iniciadora 9, es activada en respuesta a estímulos nocivos, tales como: radiación ultravioleta, fármacos quimioterapéuticos, inanición y ausencia de factores de crecimiento necesarios para la supervivencia. No obstante, ambas vías convergen finalmente en la activación de caspasas efectoras 3, 6 y 7 (Siegel, 2006).

Una alteración en el balance entre la proliferación, diferenciación y muerte celular, puede conducir a una serie de enfermedades modificando el recambio celular y ocasionando un desequilibrio en la homeostasis (Figura 1). Algunas de estas enfermedades pueden estar asociadas a una muerte celular excesiva, tal como procesos neurodegenerativos, mientras que otras están asociadas a una disminución excesiva de la apoptosis, produciendo un incremento descontrolado del número de células y derivando en una supervivencia celular implacable, como ocurre en procesos de tumorigénesis (Lizarbe, 2007).



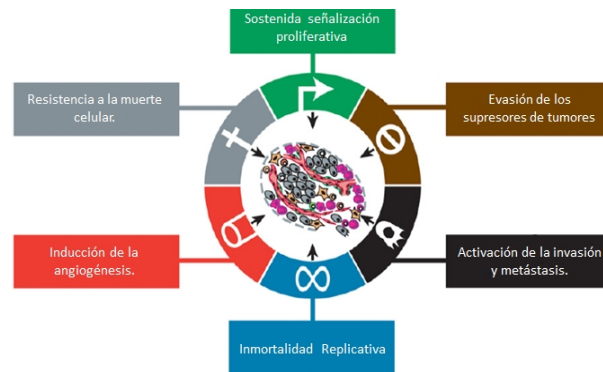
**Figura 1.- Equilibrio entre de la proliferación y la muerte celular.** La desregulación de este balance puede conducir a un gran número de enfermedades. Tomado con modificaciones de Walensky, 2006.

## 1.2. El cáncer como consecuencia de mutaciones en genes que controlan procesos celulares fundamentales.

El cáncer se define como un conjunto de enfermedades complejas, que se comportan de manera diferente según los tipos celulares en los que se originan y que surgen a partir de mutaciones en genes que controlan aspectos básicos de las funciones celulares (proliferación celular, diferenciación, apoptosis y reparación del ADN). Este conjunto de enfermedades no surge como consecuencia de una sola mutación, sino de la acumulación de varias mutaciones, que se originan principalmente en los errores intrínsecos de la replicación del ADN y superan la tasa espontánea de mutaciones ( $10^{-6}$  por gen/ por división celular) (Sherr, 1999; Hanahan y Weinberg, 2000).

Los diferentes tipos de cáncer varían en la edad de aparición, la tasa de crecimiento, su capacidad invasiva y la respuesta a tratamientos. No obstante, a nivel molecular el cáncer comprende seis características biológicas adquiridas durante su desarrollo, tales como; el mantenimiento de la señalización proliferativa, evasión de los supresores de

tumores, resistencia a la muerte celular, lo que permite su inmortalidad replicativa, inducción de la angiogénesis, activación de la invasión y metástasis (Figura 2) (Hanahan y Weinberg, 2011).

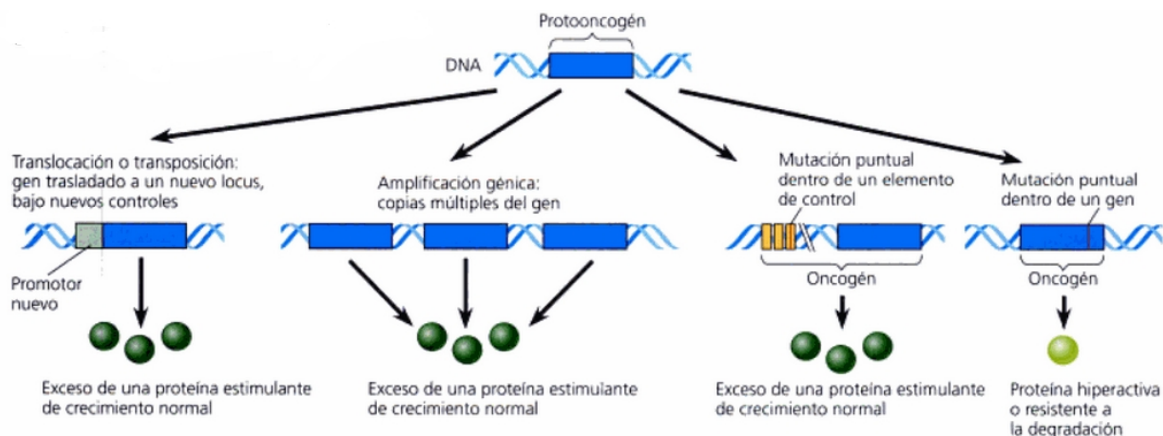


**Figura 2.- Marcadores moleculares de la progresión tumoral.** Tomado con modificaciones de Hanahan y Weinberg, 2011.

Estos últimos seis marcadores de la carcinogénesis, se adquieren de forma progresiva en un proceso denominado progresión tumoral y son consecuencia de mutaciones en cuatro clases de genes; los que regulan la reparación del ADN, los que regulan la apoptosis, protooncogenes y genes supresores de tumores (Hanahan y Weinberg, 2011).

Algunas células pierden la capacidad de reparar errores en el ADN, debido a mutaciones en genes que regulan este proceso. Estas células son capaces de acumular mutaciones en otros genes, incluyendo aquellos que son críticos para el control de la proliferación celular y la inducción de la apoptosis. El gen Bcl-2 por ejemplo, codifica una proteína que evita la muerte celular programada; su expresión excesiva permite una amplia supervivencia de las células, incluso de aquellas que presentan daños irreparables en el ADN, promoviendo la acumulación y aparición de nuevas mutaciones (Anderson y col., 2014).

Los protooncogenes mutados también contribuyen con la formación de distintos tipos de cáncer. Estos genes codifican proteínas que estimulan el crecimiento y la división celular normal (factores de crecimiento, receptores de factores de crecimiento, proteínas transductoras de señal, ciclinas y quinasas dependientes de ciclinas). Sin embargo, cuando ocurre un cambio genético que conduce a un aumento de la cantidad de su producto o de la actividad intrínseca de cada proteína, se asocia específicamente a las transformaciones neoplásicas y pasa a denominarse oncogén (Campbell y Reece, 2007). Existen tres mecanismos mediante los cuales un protooncogen puede convertirse en un oncogén (Figura 3), estos son: reordenamiento cromosómico, amplificación de los genes y mutaciones puntuales en un elemento de control o en el gen en sí mismo (Campbell y Reece, 2007).



**Figura 3.- Cambios genéticos que convierten a los protooncogenes en oncogenes.** Tomado de Campbell y Reece, 2007.

La carcinogénesis también puede estar asociada a mutaciones y pérdida de función de genes supresores de tumores. Estos son genes cuyos productos normales inhiben la proliferación celular, una vez que se ha detectado un daño irreparable en el material genético. Además, se ha reportado que participan en el control de la adhesión celular, pues la pérdida de proteínas mediadoras de este proceso, facilita la disgregación de las células

neoplásicas. Las proteínas supresoras de tumores inhiben el ciclo celular en puntos específicos; en el primer punto de control, entre la fase G1 y la fase S, y en el segundo punto de control, posterior a la replicación del ADN. Algunas de las proteínas más reconocidas de este tipo son P16, p53 y pRb. (Dyson, 1998).

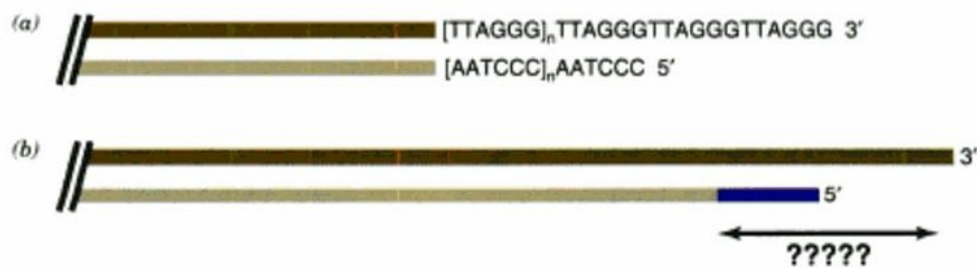
Retinoblastoma (Rb) es un importante gen supresor de tumores que participa en la regulación de diversos procesos celulares y codifica la proteína (pRb). Esta proteína se encuentra inactiva en la mayoría de cánceres humanos, conduciendo a un aumento de la capacidad proliferativa de células que deben iniciar un proceso de muerte celular programada. A pesar de que pRb ha sido asociada principalmente a la supresión de tumores, también se ha demostrado que participa en procesos antiapoptóticos, esto es debido a que ambos eventos son regulados por distintos mecanismos de fosforilación. Además, las funciones reguladoras de pRb dependen de la interacción específica que esta tenga con otras proteínas (Duanduan y col., 2003).

### **1.3. El papel de los telómeros y la telomerasa en la supervivencia de células cancerígenas.**

La replicación de los cromosomas lineales representa una gran dificultad, puesto que la síntesis de la hebra sentido puede proseguir con normalidad hasta su extremo, pero la hebra antisentido no puede hacerlo. Durante la replicación, se eliminan los cebadores de ARN tras la síntesis de una nueva cadena y los espacios vacíos son completados por adición de nucleótidos al grupo 3' OH libre. Sin embargo, no hay ninguna cadena que proporcione un grupo 3' OH al final de la cadena antisentido, para la adición de nucleótidos

en este nuevo espacio vacío (Gómez y col., 2014) (Figura 4b). Luego de muchos ciclos de replicación, esta situación provoca un acortamiento en los extremos del cromosoma y con ello la pérdida de genes fundamentales. Una solución a este problema es la adición de repeticiones teloméricas al final de los cromosomas, a través de la enzima telomerasa (Devlin, 2004).

Los telómeros son estructuras nucleoproteicas especializadas que constituyen el extremo de los cromosomas. Su longitud predice la capacidad replicativa de las células y, por lo tanto, se dice que estos determinan una especie de reloj mitótico (Vaziri y col., 1994). Estas estructuras consisten en una repetición en tándem de un oligonucleótido corto, que en el caso de los humanos está determinado por la secuencia (TTAGGG<sub>n</sub>), (Moyzis y col., 1998). Estas repeticiones en tándem, generalmente son más ricas en G en la hebra sentido, en la que sobresalen unos 12-18 nucleótidos en comparación con la hebra antisentido, que es más rica en C (Figura 4a) (Arvelo y Morales, 2004).



**Figura 4.- Telómeros humanos.** (a) Repeticiones en tándem de una secuencia de 6 nucleótidos, con la cadena rica en G prolongada 12-18 nucleótidos más allá de la cadena rica en C. (b) problema de replicación de los telómeros. El extremo 3' de la hebra parental que sirve de molde para la síntesis de la hebra antisentido discontinua, se muestra en color oscuro, mientras que la hebra hija se muestra en color claro y el cebador de ARN en azul. El segmento indicado con las flechas y los signos de interrogación representa el fragmento vacío tras la eliminación de los cebadores, y la ausencia de un grupo 3' OH libre al que se pudieran añadir nucleótidos. Tomado de Devlin, 2004.

El ADN telomérico puede formar estructuras secundarias particulares, debido a que el extremo saliente u “overhang” de la cadena sentido, permite la formación de una estructura conocida como la horquilla o “T-loop” (Figura 5). Esta estructura se origina debido a la interacción entre los grupos guanina, a través de los puentes de hidrógenos y es esencial para la protección del extremo de los cromosomas, de la degradación por nucleasas y además evita la fusión de los mismos. (Greider, 1999). Existe un grupo de proteínas involucradas en la formación y protección del telómero; entre ellas están: Rap1, TRF1 y TRF2. La primera se encarga de controlar la longitud del telómero a través de su interacción con TRF2 mientras que TRF1 regula la longitud del telómero bloqueando el acceso de la telomerasa al extremo 3' (Bilaud y col., 1997; Deng y col., 2003).

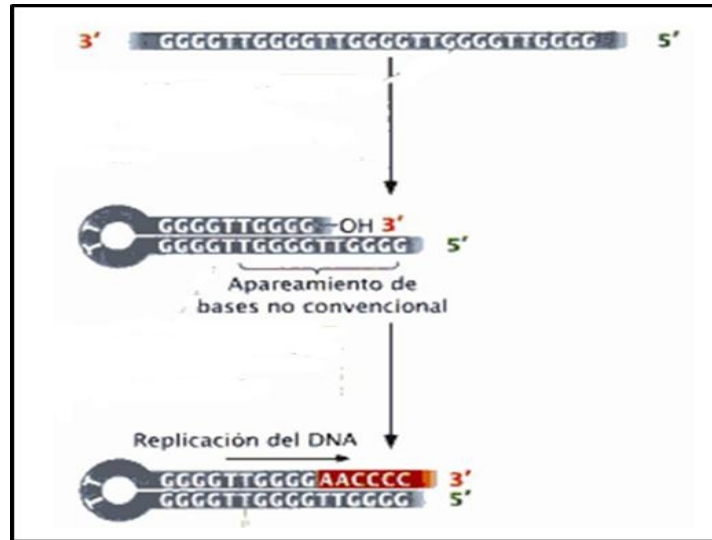
Las repeticiones hexaméricas que constituyen los telómeros en humanos, se encuentran repetidas entre 150 y 2000 veces en el extremo terminal. En las células somáticas normales luego de cada división celular, ocurre un acortamiento en la longitud del telómero, de manera que se pierden alrededor de 10 a 200 pares de bases por año (Counter y col., 1992). Este acortamiento deriva posteriormente en un proceso de senescencia celular, debido a la interrupción de la capacidad para proteger los extremos de los cromosomas, dado que no se puede ensamblar la estructura de horquilla (Fagagna y col., 2003). Cuando el tamaño del cromosoma es críticamente corto, se desencadena una respuesta localizada al daño en el ADN, que generalmente induce el proceso de apoptosis (Takai y col., 2003).

La telomerasa es un complejo de ribonucleoproteínas, que se encarga principalmente de contrarrestar el acortamiento progresivo de los telómeros durante cada replicación celular, mediante la síntesis de nuevas repeticiones teloméricas al final del

cromosoma (Collins y Mitchell, 2002). En humanos, esta holoenzima está constituida por una subunidad catalítica con actividad transcriptasa reversa denominada por sus siglas en inglés hTERT (human telomerase reverse transcriptase), además de un templado de ARN denominado hTR o hTERC (human telomerase ARN) (Nakamura y col., 1997).

El mecanismo de acción de la telomerasa consiste en añadir desoxirribonucleótidos a la cadena anti-sentido, usando ARN como molde (subunidad hTR, de la telomerasa); parte de este es complementario a la cadena rica en G (hebra sentido) y se aparea con ella para la síntesis de nuevas repeticiones. La transcripción inversa continua hasta una posición determinada del molde de ARN, luego este se desplaza a lo largo del ADN y se añaden más nucleótidos; por lo general se agregan más nucleótidos al extremo 3' de la cadena rica en G (entre 12 y 18n). Una vez que la telomerasa ha terminado el proceso, el molde de ARN se desaparea del ADN y se produce la síntesis de la cadena complementaria, llenando el fragmento faltante de ADN producido por la eliminación del cebador de ARN durante la replicación (Devlin, 2004).

La formación de la horquilla terminal (t-loop), se origina debido a que el extremo extendido por la telomerasa puede plegarse sobre sí mismo, por medio de un apareamiento no convencional de bases, confiriendo protección al final de los cromosomas de la degradación por endonucleasas; además, aporta un grupo 3' OH libre para la unión de nucleótidos de ADN a lo largo de la cadena rica en C (Figura 5) (Pierce, 2009).



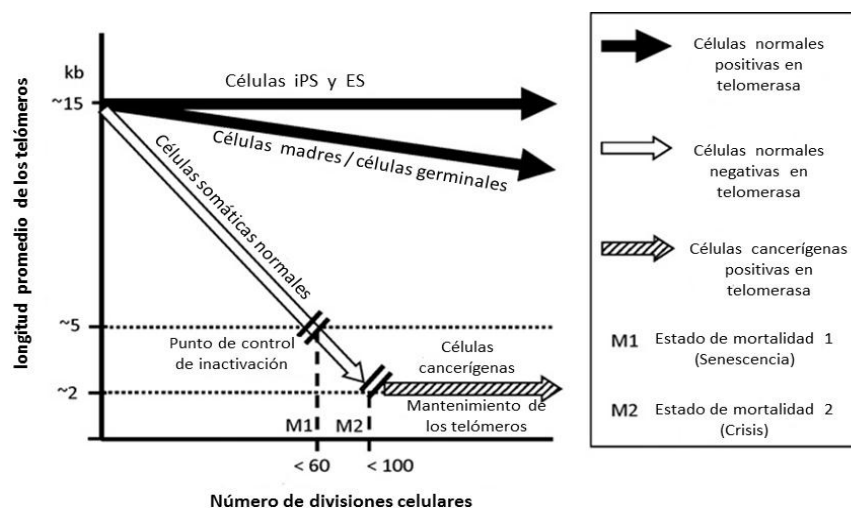
**Figura 5.- Formación de la horquilla terminal.** El extremo de la cadena simple rica en G que es extendido por la telomerasa puede plegarse sobre sí mismo y formar un bucle terminal por medio de un apareamiento de bases no convencional. Tomado de Pierce, 2009.

La capacidad de replicación limitada de algunas células somáticas como: fibroblastos, células epiteliales, mioblastos, astrocitos y linfocitos, está asociada principalmente a la ausencia de actividad de la telomerasa (Allsopp y col., 1992). Las células somáticas normales tienen una especie de reloj mitótico, debido al acortamiento progresivo de los telómeros por cada ciclo de replicación. Esto determina el límite del número de divisiones celulares, que también es conocido como el límite de Hayflick. En humanos este límite se encuentra entre las 50 y 100 divisiones (Varizi, 1994).

Otro tipo de células están dotadas de una mayor longevidad, tal como las células pluripotentes adultas, células proliferativas de tejidos de renovación y las células germinales. Todas estas tienen en común la expresión de la telomerasa, de manera que logran compensar el acortamiento de los telómeros (Wright y col., 1996). A diferencia de la mayoría de células somáticas, la actividad de la telomerasa es casi universal en líneas celulares de cáncer humano y se encuentra en aproximadamente en el 85-90% de los

tumores primarios, por lo que se establece una relación entre la telomerasa y la inmortalización celular (Kim y col., 1994).

La mayoría de células somáticas normales, luego de alcanzar el límite de Hayflick, entran en un estado de senescencia celular denominado fase de mortalidad M1 (Wright y Shay, 1992). Ocurre cuando algunos telómeros se acortan y los extremos de los cromosomas quedan desprotegidos, de manera que son reconocidos como roturas de la doble cadena que necesitan ser reparadas (Hande y col., 1999). Durante esta fase las células tumorales pueden inducir la expresión de oncogenes o inactivar genes supresores de tumores, de manera que puedan superarla. Luego, tras unas 20 divisiones más, entran en la segunda fase de mortalidad denominada crisis M2 (Figura 6), esta se caracteriza por la pérdida de genes esenciales y la inducción de la apoptosis. No obstante, la activación de telomerasa en la mayoría de células tumorales, les permite escapar de esta fase, estabilizar los cromosomas y adquirir una capacidad de crecimiento indefinido (Bodnar y col., 1998).



**Figura 6.- Comparación de la longitud de los telómeros en función del número de divisiones celulares en diferentes tipos de células.** (ES) células madre de embriones humanos, (iPS) células madre pluripotentes inducidas. Tomado con modificaciones de Buseman, 2011.

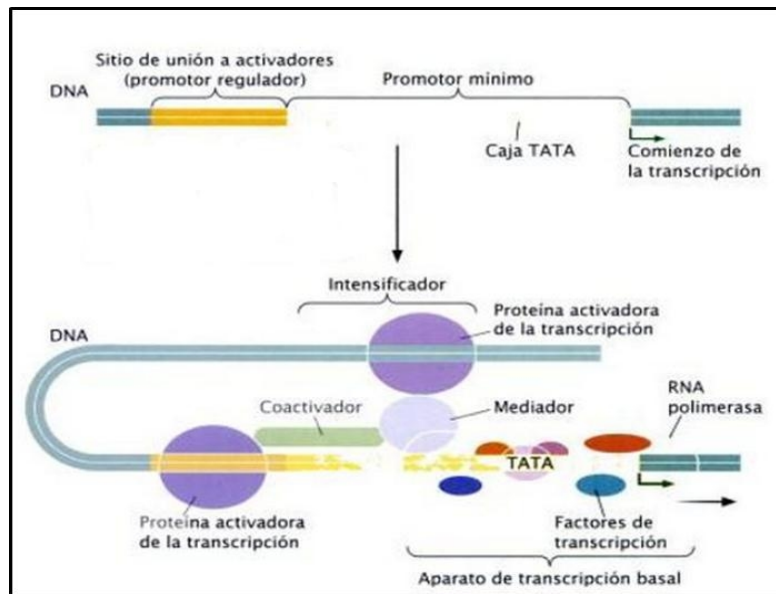
#### **1.4. La Telomerasa como un blanco terapéutico contra el cáncer**

La inhibición de la expresión de la subunidad catalítica (hTERT), limita la actividad de la telomerasa (Bodnar y col., 1998). Esta transcriptasa reversa tiene un importante papel en la inmortalización celular. Por lo tanto, su inhibición conduce a la inducción de un acortamiento telomérico en células malignas (Hahn y col., 1999), logrando evitar la progresión tumorogénica, disminuyendo la capacidad replicativa, induciendo la senescencia y posteriormente la apoptosis. De esta manera, la telomerasa se convierte en un potencial blanco terapéutico contra algunos tipos de cáncer (Hanahan y Weinberg, 2011).

La expresión diferencial de hTERT entre las células tumorales y células normales, confiere un punto a favor de la telomerasa como blanco terapéutico contra el cáncer. Esta enzima es sobre-expresada en tumores y ausente en la mayoría de células somáticas normales. En este sentido, la telomerasa se convierte en un blanco para drogas antitumorales que estén dirigidas más específicamente hacia células cancerígenas. Para tal efecto, diferentes estrategias se han desarrollado para inhibir la actividad de la enzima, entre estas, la represión de los distintos componentes del complejo ribonucleoprotéico (hTERT, hTR y otras proteínas asociadas) (Gómez y col., 2014).

La regulación de la expresión de la telomerasa depende de la transcripción de hTERT. Todas las secuencias nucleotídicas importantes para iniciar este proceso constituyen el promotor. Una región adyacente al gen que comprende numerosas secuencias con diferentes funciones. Estas secuencias incluyen el “promotor central”, también conocido como promotor basal, que es el sitio en el que se ensambla el complejo de iniciación. Este complejo está constituido por una colección de proteínas denominadas

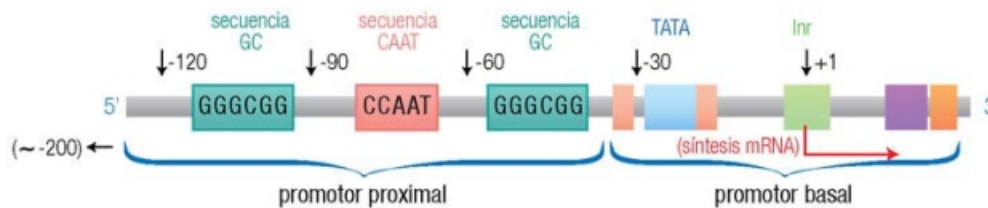
factores de transcripción, capaces de unirse a una secuencia consenso denominada caja TATA y conforman un sitio de reconocimiento, que permite al ARN polimerasa II unirse al promotor basal (Figura 7) (Solari, 2007; Watson, 2006). Además, el promotor también contiene uno o más elementos promotores corriente arriba, que proporcionan una mayor eficiencia en el ensamblaje y el proceso de transcripción (Brown, 2008).



**Figura 7.- Regulación de la transcripción.** Los factores de transcripción, la ARN polimerasa y los activadores de la transcripción, se unen al ADN en la región promotora del gen y estimula la transcripción. Tomado de Pierce, 2009.

Entre los elementos promotores corriente arriba se encuentran las secuencias proximales y las secuencias distales. Las secuencias proximales generalmente se encuentran entre las posiciones -30 hasta -200 y determinan la frecuencia con la que se produce el inicio de la transcripción (Figura 8). A diferencia de las secuencias basales estas no especifican el sitio de inicio, pero favorecen la interacción del ARN polimerasa II con el ADN en respuesta a la unión de diversos factores de transcripción. Por otra parte, las secuencias distales se encuentran alejadas del origen y se clasifican según el tipo de

molécula que se unan a ellas, entre estas se encuentran; las potenciadoras o activadoras, que pueden aumentar la velocidad de inicio de la transcripción, mientras que las silenciadoras o inhibidoras cumplen una función opuesta. (Herráez, 2012).



**Figura 8. Secuencias del promotor basal y proximal.** El promotor basal generalmente está constituido por la caja TATA y el elemento iniciados Inr, mientras que el promotor proximal contiene secuencias consenso tales como; la cajas CAAT y GC. Tomado con modificaciones de Herráez, 2012.

Diversos tipos de factores de transcripción se unen a secuencias específicas del promotor. Los factores de transcripción generales, son aquellos que reconocen los elementos basales de un promotor y promueven la formación del complejo de iniciación de la transcripción, alrededor del punto de inicio o núcleo del promotor. Por otra parte; los factores de transcripción de clase II se clasifican de acuerdo a su unión con las diferentes secuencias o elementos promotores corriente arriba. Entre estos se encuentran los factores de transcripción proximales, que reconocen específicamente los elementos proximales del promotor, y los factores de transcripción inducibles, que se unen a los elementos distales del promotor (Bray, 2006).

La regulación de la expresión comprende un conjunto de elementos de actuación “cis” y “trans”. Los elementos de actuación cis son partes adyacentes de la misma molécula de ADN. El promotor basal, así como el promotor proximal y el distal, son elementos de actuación cis. En contraste, los factores de actuación trans son moléculas que se unen a elementos del promotor y contribuyen con la transcripción. Estos pueden regular la expresión de diferentes genes (Passarge, 2010).

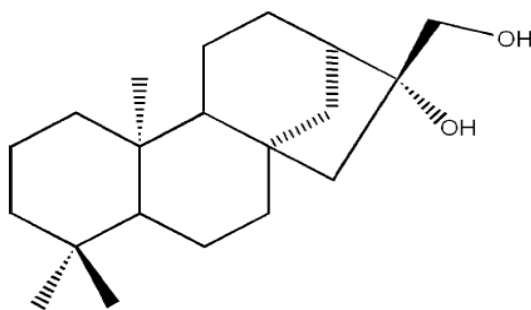
### **1.5. El compuesto ent-16 $\beta$ -17 $\alpha$ -Dihidroxikaurano (DHK) reduce los niveles de ARNm de la telomerasa.**

El ent-16 $\beta$ -17 $\alpha$ -dihidroxikaurano (DHK) es un diterpeno aislado de la corteza de la especie *Croton malambo*, un pequeño árbol conocido popularmente en Venezuela como “palomatias” o “torco” (Suárez y col., 2003). Morales y colaboradores en el 2004, demostraron mediante ensayos de reducción del bromuro de (3,4,5 dimetil-2-tiazolil)- 2,5-difeniltetrazólico (MTT), que el DHK posee un efecto citotóxico y proapoptótico en el crecimiento de células malignas, específicamente en células derivadas de adenocarcinoma de mama (MCF-7). Además, reportaron que el CI<sub>50</sub> del compuesto es de 12,5  $\mu$ g/ml, unas 2,66 veces menor en comparación con el valor correspondiente en células no malignas (Morales y col, 2004).

El compuesto natural DHK disminuye significativamente los niveles de ARNm de hTERT, así como los de ARNm y de proteína del gen antiapoptótico Bcl-2. La represión transcripcional de la subunidad catalítica, es particularmente fuerte, debido a que los niveles de ARNm disminuyen 1000 veces en células que fueron tratadas con el compuesto, con respecto a células que no fueron tratadas. Además, se ha reportado una estrecha relación entre la sobreexpresión de Bcl-2 y aumentos de la transcripción de la telomerasa (Morales y col., 2004).

Para la obtención del compuesto se recolectaron plantas de la especie *Croton malambo* en Santa Bárbara del Zulia, al oeste de Venezuela, donde se ha comprobado que la infusión de la corteza de esta planta es biológicamente activa. El compuesto fue extraído a través de una cromatografía de columna sobre sílica gel, sobre la cual cargaron extractos

de diclorometano con la infusión de la corteza de *C. malambo* y eluyeron el ingrediente activo con una mezcla de diclorometano y acetato de etilo (CHCl<sub>2</sub>/EtOAc) 1:1. Este compuesto fue caracterizado por ser un kaurano polar, que contiene dos grupos hidroxilos, cuya fórmula molecular es C<sub>20</sub>H<sub>34</sub>O<sub>2</sub> (Figura 9) (Suárez y col., 2003).



**Figura 9. Estructura química del DHK. Imagen extraída de Morales y col, 2004.**

En base a todos los conocimientos que se tienen sobre la subunidad catalítica hTERT y la importante reducción de sus niveles de ARNm frente a la exposición al compuesto, el DHK podría considerarse como un posible agente quimioterapéutico, orientado a la inhibición transcripcional del gen de la telomerasa en la línea celular derivada de adenocarcinoma de mamá MCF-7, induciendo la senescencia celular y posteriormente el proceso de apoptosis. Poco se conoce acerca del efecto de este compuesto sobre la regulación transcripcional de la telomerasa; por tal razón, en este trabajo de investigación se propone evaluar el mecanismo de acción del compuesto sobre el complejo de iniciación de la transcripción de hTERT.

## 2. ANTECEDENTES

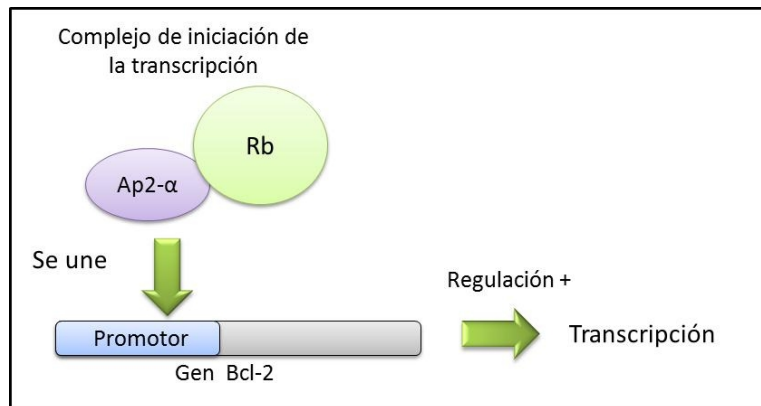
El efecto del DHK ha sido objeto de estudio en la regulación transcripcional de otros genes relacionados con los procesos de neoplasia, debido a que muchos de estos representan un blanco terapéutico contra el cáncer; uno de ellos es el gen antiapoptótico Bcl-2, encargado principalmente de inhibir la apoptosis en células normales. Asimismo, su sobreexpresión en células tumorales se encuentra fuertemente vinculada a la supervivencia de las mismas (Cory y col., 2003).

### 2.1. Efecto del DHK sobre la regulación transcripcional del gen antiapoptótico Bcl-2.

Los primeros estudios realizados sobre la expresión del gen antiapoptótico Bcl-2 (linfoma de células B) se realizaron en *C. elegans*, al demostrar que la proteína humana Bcl-2 podía inhibir la muerte celular programada (Vaux, 1992). Años más tarde, se comprueba que mutaciones en el gen que codifica esta proteína contribuyen con la supervivencia de células tumorales (Cory y col., 2003). No obstante, no todos los miembros de esta familia inhiben la apoptosis, Bax y Bak por ejemplo, son proteínas pro-apoptóticas, que comparten homología en los dominios BH1, BH2 y BH3 y difieren en el BH4 (Youle y Strasser, 2008).

La transcripción del gen Bcl-2 es regulada positivamente por el gen supresor de tumores Rb y el factor de transcripción Ap-2 (activador de proteína 2), en células epiteliales (Decary y col., 2002), la participación de la proteína pRb en este proceso pareciera ser contradictoria, debido a su conocido papel en la restricción de la proliferación celular. Por otra parte, también se ha demostrado que interviene en procesos de diferenciación celular y

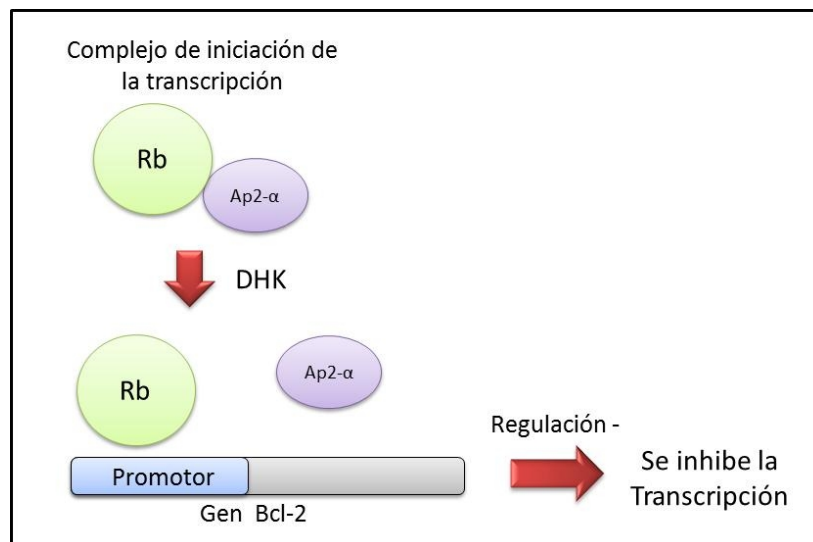
en la inhibición de la apoptosis (Morris y Dyson, 2001). La pRb no posee capacidad de unión directa al ADN; por lo tanto, su participación en esta regulación es mediada por el factor de transcripción Ap-2 y la unión directa de este a una secuencia promotora específica del gen Bcl-2 (Figura 10), cabe destacar que este mecanismo también fue observado con anterioridad en el gen de la E-cadherina (Bastche y col., 1998).



**Figura 10. Regulación transcripcional positiva del gen antiapoptótico Bcl-2.**

En 2004 Morales y colaboradores determinaron mediante PCR en tiempo real y ensayos de inmuno-detección, que los niveles de ARNm y de proteína de Bcl-2 disminuían hasta seis veces en células MCF-7 tratadas con DHK, con respecto a células sin tratamiento. Asimismo, reportan que dicha reducción es independiente de la capacidad de unión de la proteína NFκB a su secuencia consenso, abriendo una nueva interrogante sobre el mecanismo de acción del compuesto, en la regulación transcripcional de Bcl-2.

Años más tarde se comprobó mediante un ensayo de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP), que la disminución de los niveles de expresión de Bcl-2 en células MCF-7, se debía a la disociación del complejo de iniciación de la transcripción (Ap2- $\alpha$ / Rb) (Figura 11), asimismo, asociaron la represión transcripcional a la pérdida de la capacidad de unión de Ap2- $\alpha$  al ADN, mediante un ensayo del cambio de la movilidad electroforética (EMSA) y demostraron a través de inmunolocalización que en presencia del compuesto, este factor de transcripción se relocaliza del núcleo a la periferia celular (Morales y col., 2011).



**Figura 11.- Represión transcripcional del gen Bcl-2 debido a la disociación del complejo de iniciación de la transcripción frente a la exposición al compuesto DHK. Modelo basado en Morales y col., 2011.**

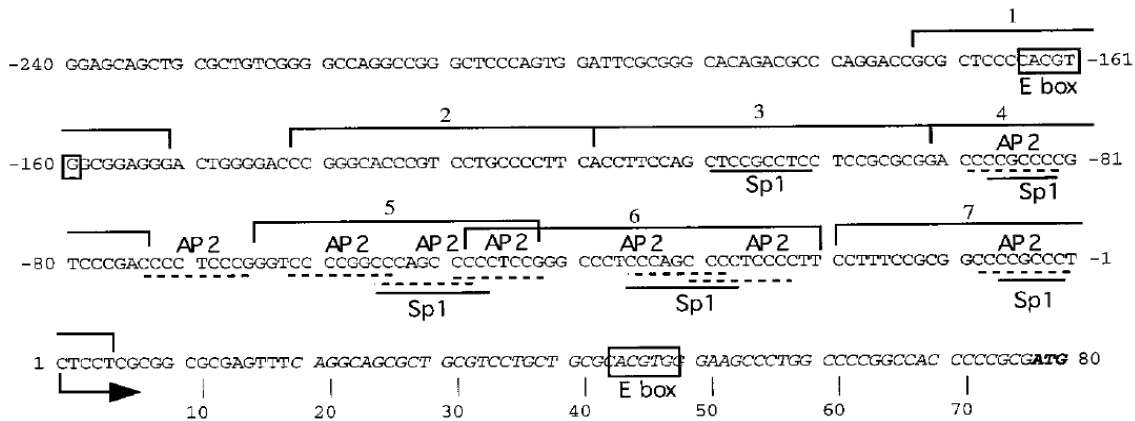
El mecanismo de acción mediante el cual el DHK induce la represión transcripcional del gen Bcl-2, nos permite plantearnos posibles efectos de este compuesto sobre la regulación transcripcional de otros genes, que son considerados blancos terapéuticos contra el cáncer y sobre los que se han detectado cambios a nivel transcripcional luego de la exposición al compuesto; tal como la telomerasa, cuyos niveles

de ARNm disminuyen 1000 veces en células MCF-7 con 72 horas de exposición al compuesto, en comparación con células no tratadas (Morales y col., 2011).

## **2.2. Regulación transcripcional del gen de la telomerasa**

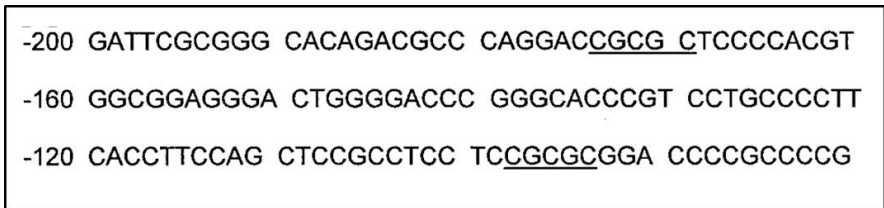
La subunidad catalítica hTERT es esencial y limitante para la actividad enzimática de la telomerasa, por lo tanto, es importante conocer cómo está regulada su expresión en células humanas. El clonamiento de hTERT, la identificación del promotor y secuencias esenciales para la activación de la transcripción, fueron algunos de los estudios pioneros que contribuyeron en gran medida a la comprensión de los mecanismos moleculares de la regulación transcripcional de la telomerasa.

El núcleo del promotor es una de las secuencias esenciales para la activación de la transcripción. Takakura y colaboradores determinaron en 1999 que este se encuentra ubicado 181-pb arriba del sitio de iniciación de la transcripción. Además, reportaron la ausencia de la caja TATA en la región promotora. No obstante, encontraron un elemento iniciador putativo que ayuda a posicionar la ARN polimerasa y ubicar un sitio de iniciación de la transcripción, este elemento iniciador comprende la secuencia (CCTCTCC) y se ubica en la posición -3. Asimismo, determinaron varios motivos consenso a los que se unen dos factores de transcripción, Sp1 y Ap2 (Figura 12).



**Figura 12-** El núcleo de la secuencia promotora del gen que codifica para hTERT. El -1 indica el primer nucleótido 5' de la región promotora, +1 indica el primer nucleótido que codifica para el ARNm, las líneas continuas y punteadas señalan los diferentes sitios de unión de los factores de transcripción y el codón ATG de iniciación se muestra en negrita. Tomado de Takakura y col., 1999.

Años más tarde, E2F-1 fue identificado como otro factor de transcripción que participa en la regulación transcripcional del gen que codifica hTERT. Análisis de secuenciación revelaron dos potenciales sitios de unión para este factor y determinaron que estaban localizados en la posición -174 y -98 (Figura 13), próxima al sitio de iniciación de la transcripción. Además comprobaron la unión de E2F-1 a una secuencia consenso del promotor de hTERT, a través de ensayos de la movilidad electroforética y observaron que el factor se unía específicamente a los sitios putativos mencionados anteriormente (Crowe y col., 2001).



**Figura 13.-** Sitios de unión del factor de transcripción E2F-1 al promotor de hTERT. Los sitios -174 y -98 son señalados con líneas continuas. Tomado de Crowe y col., 2001.

Los sitios de unión de E2F-1 al promotor de hTERT fueron mutados, con la finalidad de evaluar la relación entre la unión del factor y la transcripción de la subunidad catalítica. De esta manera, encontraron que mutaciones en estos sitios incrementan dramáticamente la actividad del promotor de hTERT. Además determinaron efectos de la sobreexpresión de E2F-1 y encontraron que éste inducía una disminución del 70% de la actividad de hTERT, sugiriendo que este factor de transcripción actúa como un represor transcripcional de este gen (Crowe, 2001).

La regulación transcripcional de hTERT fue estudiada en varios tipos de cáncer, entre ellos el cáncer de pulmón. Estos estudios determinaron el importante rol que tiene la familia de factores de transcripción Ap-2 en la inducción de la transcripción de hTERT; en especial las isoforma Ap2- $\beta$ , que parece tener un rol protagónico en este tipo de cáncer, mientras que Ap2- $\alpha$  ha sido implicado directamente en la progresión de otros tipos de cáncer, tales como melanoma, cáncer de mama y de próstata, lo que sugiere que este factor de transcripción juega un papel importante en la regulación de la expresión de hTERT, en este tipo de células cancerígenas (Deng y col., 2007).

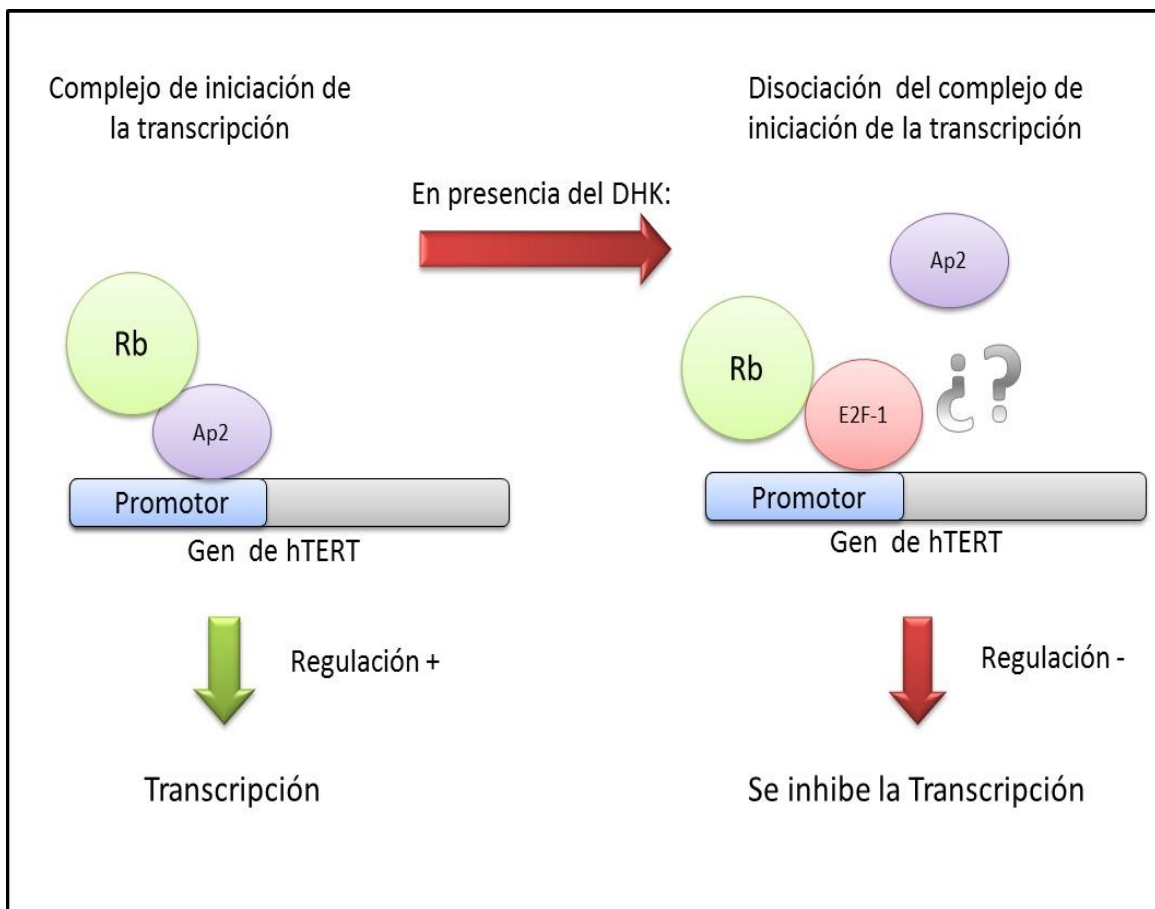
Otros estudios recientes, realizados en líneas celulares derivadas de carcinoma de pulmón (A549 y H1299), indican que AP2- $\alpha$  se une a la región promotora de hTERT y promueve directamente su expresión, pues determinaron que luego del tratamiento con un compuesto denominado Berberine se interrumpía la unión del factor de transcripción a la región promotora de hTERT, produciendo una fuerte disminución de su expresión (Fu y col., 2013). Sin embargo, aún no queda claro el papel que ejerce AP2- $\alpha$  en líneas celulares derivadas de adenocarcinoma de mama, entre ellas MCF-7 y si esta isoforma de la familia

Ap-2 tiene un papel protagónico en la regulación transcripcional de la telomerasa, en este tipo de células.

La iniciación transcripcional de hTERT no sólo está regulada por factores de transcripción que se unen directa e indirectamente a la región promotora (c-Myc, Sp1, HIF-1, AP2 y ER); también incluye otro conjunto de proteínas que actúan como transactivadores y regulan la transcripción mediante su interacción con otros factores, tal como pRb. Esta proteína parece estar involucrada en la inhibición transcripcional de hTERT a través del factor de transcripción E2F-1. Algunos ensayos demuestran que la pérdida de la capacidad de interacción de este factor con pRb, anula la habilidad de E2F-1 de reprimir la transcripción de hTERT (Kyo, 2008).

Aproximadamente el 90% de los diferentes tipos de cáncer sobre-expresan telomerasa, aumentando su capacidad de supervivencia. Por tal razón, este complejo ribonucleoprotéico ha sido considerado como un blanco terapéutico contra el cáncer. Diversos estudios se han realizado en la búsqueda de compuestos quimioterapéuticos que logren evitar la progresión tumorigénica, disminuyan la capacidad replicativa e induzcan la apoptosis a través de la represión transcripcional de la telomerasa. En virtud de todos los antecedentes anteriormente expuestos, decidimos estudiar el efecto del compuesto *ent*-16 $\beta$ -17 $\alpha$ -dihidroxicaurano (DHK) sobre la regulación transcripcional del gen de la telomerasa (hTERT) en la línea celular MCF-7.

Para esta investigación hemos planteado como hipótesis inicial, que el complejo de iniciación de la transcripción del gen hTERT, está conformado por el factor de transcripción Ap2 y la proteína Rb y que dicha interacción regula positivamente la transcripción de la subunidad catalítica. Asumiendo que la suposición anterior fuese cierta, creemos que en presencia del DHK este complejo de iniciación se disocia y pRb permanece unido al promotor, mientras que Ap2 pierde su capacidad de unión al mismo. Sin embargo, pese a que pRb no se une de manera directa al ADN, proponemos la participación del factor de transcripción E2F-1 en la regulación transcripcional negativa de hTERT (Figura 14).



**Figura 14.- Hipótesis sobre el mecanismo de acción del DHK, sobre el complejo de iniciación de la transcripción de hTERT, basada en la literatura descrita en los antecedentes.**

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo general:**

Determinar el efecto del *ent*-16 $\beta$ -17 $\alpha$ -dihidroxicaurano (DHK) sobre el complejo de iniciación de la transcripción (Rb/Ap2- $\alpha$  y E2F1) en el promotor del gen de la telomerasa (hTERT) en línea celular MCF-7.

#### **3.2. Objetivos Específicos:**

1. Comprobar la posible disociación del complejo de iniciación de la transcripción (Ap2- $\alpha$ /pRb) en presencia del DHK.
2. Determinar el efecto del compuesto DHK sobre la interacción entre las proteínas E2F1, Ap2- $\alpha$  y pRb.
3. Evaluar la interacción entre el factor de transcripción E2F1 y la región promotora del gen de la telomerasa (hTERT) en presencia del DHK.

## **4. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **4.1. Mantenimiento de cultivo celular.**

Se trabajó con la línea celular MCF-7 (derivada de adenocarcinoma de mama humano). Las células fueron cultivadas en medio DMEM suplementado con 10% de suero fetal de bovino, 100 µg/ml de penicilina, 100 µg/ml estreptomina y 2,5 µg/ml de anfotericina B y se mantuvieron a 37 °C y 5% de CO<sub>2</sub> en una incubadora humidificada hasta alcanzar la confluencia deseada. Para los experimentos en los que se evaluó el efecto del DHK, se agregó el compuesto para alcanzar una concentración final de 12,5 µg/ml (IC<sub>50</sub>) y se incubó bajo las condiciones anteriores durante 24 horas.

### **4.2. Medición de los niveles de citotoxicidad del compuesto DHK mediante el ensayo de reducción del bromuro de (3,4,5 dimetil-2-tiazolil)- 2,5- difeniltetrazólico (MTT).**

A fin de corroborar el efecto y la actividad del compuesto se realizó un ensayo MTT. Para ello se cultivaron células MCF-7 en una placa de cultivo durante 25 horas a 37°C en atmósfera de CO<sub>2</sub> (5%) y con una densidad de 5x10<sup>3</sup> células por pozo. Posteriormente se agregó el DHK en diferentes pozos de la placa, a distintas concentraciones (50 µM, 25 µM, 12,5 µM, 6,25 µM, 3,125 µM) y por triplicado, luego se incubó durante 72 horas. Posteriormente se agregó 100 µL del reactivo MTT en cada pozo y se incubó por 2 horas, finalmente se añadieron 100 µL de DMSO y se leyó la absorbancia a una longitud de onda de 570 nm.

### 4.3. Extracción de proteínas.

En algunas inmunodetecciones (“western blots”), fue necesario extraer proteínas totales. Para ello las células fueron despegadas de un vial de cultivo con tripsina 0,01M y centrifugadas a 1159 g. Una vez obtenido el sedimento celular (aproximadamente  $4 \times 10^6$  células), se resuspendieron en 20  $\mu$ l de PBS 1X frío y se agregó 40  $\mu$ L buffer de lisis RIPA (50 mM Tris-HCl pH 7,4, 150 mM NaCl, EDTA 1 mM, 0,1% SDS y 0,5% Nonidet P-40), así como también una mezcla de inhibidores de fosfatasa (1 mM ortovanadato sódico, 10 mM NaF) y de proteasas (10  $\mu$ g/ml aprotinina, 10  $\mu$ g/ml leupeptina, 100  $\mu$ M PMSF). Posteriormente se incubó durante 30 minutos en hielo, colocando la muestra en un vortex cada 10 minutos, después se centrifugó a 39443 g. por 10 minutos y se tomó el sobrenadante. Las proteínas se almacenaron a una temperatura de  $-70$  °C.

En los ensayos de co-inmunoprecipitación y cambio de la movilidad electroforética (EMSA), fue necesario extraer proteínas nucleares. Para ello se trabajó con un sedimento celular de aproximadamente  $12 \times 10^6$  células, se resuspendió en 300  $\mu$ l de tampón A (10mM HEPES, pH 7.9, 1,5 mM  $MgCl_2$ , 10 mM KCl, 0.5mM DTT y una mezcla de inhibidores de proteasas) y se incubaron en hielo por 10 min. Posteriormente se agregó Nonidet P-40 al 10% y se incubó en hielo 1 minuto, seguido de una centrifugación a 6000 g. por 5 minutos a  $4$  °C; luego se removió el sobrenadante y se resuspendió el sedimento en 200  $\mu$ l de tampón B (20 mM HEPES, pH 7.9, 25% glicerol, 420 mM NaCl, 1.5 mM  $MgCl_2$ , 0,2 mM EDTA, 0,5 DTT y una mezcla de inhibidores de proteasas) durante 50 minutos a  $4$ °C, finalmente se centrifugó a 16.000 g. por 10 min a  $4$ °C, se distribuyeron alícuotas del sobrenadante y se almacenó a  $-70$  °C.

#### **4.4. Cuantificación de proteínas mediante el método de Bradford.**

En una placa de 96 pozos, se agregó por triplicado 1, 2 y 4  $\mu\text{L}$  de la muestra en 200  $\mu\text{L}$  de Bradford 1X, posteriormente se incubó durante 5 minutos y se estimó la absorbancia a 595 nm en un espectrofotómetro BIO-RAD. Para obtener las concentraciones a partir de las absorbancias, se construyó una curva de calibración con diluciones seriadas de albúmina bovina (BSA), luego, a través de la ecuación de la recta obtenida de esta regresión lineal, fue posible calcular la concentración de proteínas.

#### **4.5. Electroforesis en condiciones disociantes (SDS-PAGE).**

Considerando el rango de masa molecular de las proteínas (110 kDa- 48 kDa), se trabajó con un gel discontinuo de poliacrilamida al 10% (agua destilada, acrilamida al 10%, 0,4 M Tris, 0,1% de SDS, 0,1% de persulfato de amonio y 0,4 mM TEMED). Posteriormente se agregó buffer de carga 1X (SDS 12% (p/v), 125 mM Tris-HCl, glicerol 50% (v/v),  $\beta$ -mercaptoetanol 6% (v/v), 0,004% azul de bromofenol) al extracto de proteínas y se hirvió la muestra durante 5 min, transcurrido el tiempo se cargaron las muestras en los bolsillos del gel. Luego las proteínas fueron sometidas a un campo eléctrico en un buffer de corrida (0.025M Tris, 0.192M Glicina, 0.1% SDS pH 8.3) contenido dentro de en una cámara electroforética, a la que se aplicó un voltaje de 100V durante 90 minutos.

#### **4.6. Transferencia de proteínas.**

Posterior a la electroforesis en condiciones disociantes, se equilibró el gel en buffer de transferencia (48 mM Tris, 39 mM glicina, 20% metanol, 0.04% SDS) durante 2 minutos; a su vez, se activó una membrana de polifluoruro de vinilideno (PVDF) (Amersham Hybond-P) en metanol al 100% por 10s y se equilibró en buffer de transferencia por 10 minutos. Posteriormente se ensambló el sándwich (esponjas, papel de filtro, gel, membrana, papel de filtro, esponjas) desde el cátodo hacia el ánodo, de manera que las proteínas se transfirieran del gel hacia la membrana, después de ser sometidas a un campo eléctrico en un buffer de transferencia, contenido dentro de una cámara de electroforesis, a la que se aplicó un voltaje de 100V durante 90 minutos a 4°C.

##### **4.6.1. Tinción con rojo Ponceau.**

Después de la transferencia de proteínas, la membrana se dejó incubando en 50 ml del colorante rojo Ponceau [0,2 % rojo Ponceau (p/v), 0,1% ácido acético (v/v)] durante 5 minutos, luego se lavó brevemente con agua destilada y se registró la detección de proteínas. Finalmente se retiró todo el colorante con abundante agua destilada.

##### **4.6.2. Inmunodetección o “Western blot”.**

Al finalizar la transferencia se removió la membrana y se enjuagó con TBST (0,5M Tris- HCl, 1,5M NaCl, Tween 20), luego se incubó en una solución de bloqueo (leche descremada al 5%, TBST) durante 60 minutos. Seguidamente, la membrana se incubó con

el anticuerpo primario (ver Tabla 1) a 4°C durante 90 minutos, seguido de 3 lavados consecutivos con TBST, cada uno de 5 minutos, después se incubó 60 minutos con el anticuerpo secundario, seguido de 3 lavados con TBST de 5 minutos cada uno y finalmente la proteína fue detectada por quimioluminiscencia.

**Tabla 1. Condiciones empleadas del anticuerpo primario y secundario para la inmunodetección de proteínas.**

<b>Proteína inmunodetectada</b>	<b>Casa comercial del anticuerpo primario</b>	<b>Isotipo</b>	<b>Dilución empleada</b>	<b>Casa comercial del anticuerpo Secundario</b>	<b>Dilución empleada</b>
Rb	Biolegend	Rabbit IgG	1:2000	Thermo scientific	1:2000
E2F-1	Santa Cruz	Rabbit IgG	1:800	Thermo scientific	1:2000
Ap2- $\alpha$	Santa Cruz	Rabbit IgG	1:400	Thermo scientific	1:2000
hTERT	Santa Cruz	Rabbit IgG	1:100	Thermo scientific	1:2000

#### **4.7. Co-inmunoprecipitación.**

Aproximadamente 240  $\mu$ g del extracto de proteínas nucleares fueron incubados con 1  $\mu$ g del anticuerpo anti-humano Rb IgG, durante toda la noche a 4° C bajo agitación suave. Seguidamente se añadieron 70  $\mu$ l de perlas de Proteína A- sefarosa y se mezcló el complejo proteína-anticuerpo con las perlas, luego se incubó a 4°C bajo agitación rotatoria durante 4 horas y se centrifugaron a 1000g, removiendo el sobrenadante. El complejo fue lavado 2 veces en buffer de lisis B para eliminar el resto de proteínas del extracto y finalmente se realizó una electroforesis en condiciones disociantes (SDS-PAGE), cargando 45  $\mu$ l de la proteína inmunoprecipitada, seguida de una transferencia e inmunodetección.

A través de un estudio densitométrico se determinó por triplicado la densidad (INT/mm<sup>2</sup>) de cada una de las proteínas (Rb, Ap-2  $\alpha$  y E2F-1), posteriormente se determinó la proporción de proteínas obtenidas en el tratamiento con respecto al control (Ecuación 1). Una vez obtenido el valor de dicha proporción, se realizó una prueba T-Student con el programa Past, a fin

de determinar diferencias entre las medias de Rb-E2F-1 y Rb-Ap2- $\alpha$ . Para esta prueba se trabajó con nivel de significancia  $\alpha = 0,05$ , Grados de libertad  $(n-1) = 2$  y siguiendo una distribución t-student de dos colas.

$$\text{Proporción } t/c = \frac{\text{densidad obtenida en el tratamiento}}{\text{densidad obtenida en el control}}$$

**Ecuación 1.-** Cálculo de la proporción de proteínas obtenidas en el tratamiento con respecto al control.

#### **4.8. Alineamiento de oligonucleótidos correspondientes a la secuencia consenso de unión de E2F-1, para el ensayo del EMSA.**

Los oligonucleótidos empleados en este ensayo, representan la secuencia consenso (doble cadena) de unión del factor de transcripción E2F-1 (5'-CGCCCAGGACCGCGCTCCCCACGT-3'). Inicialmente, se mezclaron los oligonucleótidos complementarios en una relación molar 1:1, alcanzando una concentración final de 1  $\mu\text{mol}/\mu\text{l}$  para los oligonucleótidos marcados con Biotina y de 2  $\mu\text{mol}/\mu\text{l}$  para el competidor específico no marcado. Para ello se empleó una solución amortiguadora (10 mM Tris HCl, 1 mM EDTA y 50mM) y finalmente se realizó el alineamiento en un termociclador, siguiendo las condiciones de la Tabla 2.

**Tabla 2. Condiciones para el alineamiento de oligonucleótidos complementarios.**

	<b>Ciclos</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Tiempo</b>
<b>Paso 1</b>	1	95°C	5 min
<b>Paso 2</b>	70	95°C (-1°C/ciclo)	1 min
<b>Paso 3</b>		4°C	Sostenido

#### **4.8.1. Ensayo de cambio de la movilidad electroforética (EMSA)**

Se llevó a cabo 3 reacciones de unión: la primera reacción contenía solución amortiguadora 10 X, 50 ng/ul de competidor inespecífico poli (dI-dC), 2,5% de Glicerol, 0,05% Np-40, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM EDTA y 20 fmol de oligonucleótidos doble cadena, marcados con Biotina. En la segunda reacción se agregó la misma cantidad de componentes que en la primera y además se añadió 14 µg de proteínas nucleares. Para la tercera reacción, se agregaron los mismos componentes de la segunda, conjuntamente con 8 pmol de competidor específico no marcado. Todas las reacciones fueron llevadas a un volumen final de 20 µl con agua ultrapura y se dejaron incubando durante 20 minutos a 27°C.

La electroforesis se realizó en un gel de poliacrilamida en condiciones no disociantes (TBE 0,5X, poliacrilamida 4%, 0,25% glicerol, 0,16 % de TEMED y 0,66% de persulfato de amonio, para un volumen final de 6ml) y como solución amortiguadora para la corrida se empleó TBE 0,5 X (45mM Tris- HCl, 45 mM ácido bórico y mM EDTA, pH 8,3). Previo a la electroforesis se realizó una pre-corrída y se aplicó 100V durante 30 min a 4°C, en seguida se lavaron los pozos del gel y se cargaron las 3 reacciones de unión del paso 6.2.1, luego se aplicó 60V durante 90 minutos.

Posterior a la electroforesis, se transfirieron las reacciones de unión a una membrana de nylon cargada positivamente. Para ello se equilibró la membrana en TBE 0,5 X durante 10 minutos y se ensambló el “sándwich” de transferencia (esponjas, papel de filtro, gel, membrana, papel de filtro, esponjas) desde el cátodo hacia el ánodo, luego se aplicó 100V durante 60 minutos a 4°C. Al terminar la transferencia, se fijó el ADN a la membrana, utilizando una cama de UV a 12000J. Finalmente, se realizó la detección de los

oligonucleótidos marcados, mediante un kit de quimioluminiscencia de la casa comercial Thermo Scientific, que contiene; solución de bloqueo (15 minutos de incubación), conjugado estreptavidina- peroxidasa (15 minutos de incubación), solución de lavado (4 lavados de 5 minutos de incubación), solución amortiguadora del sustrato (5 minutos de incubación), solución de luminol y solución de peróxido (5 minutos de incubación).

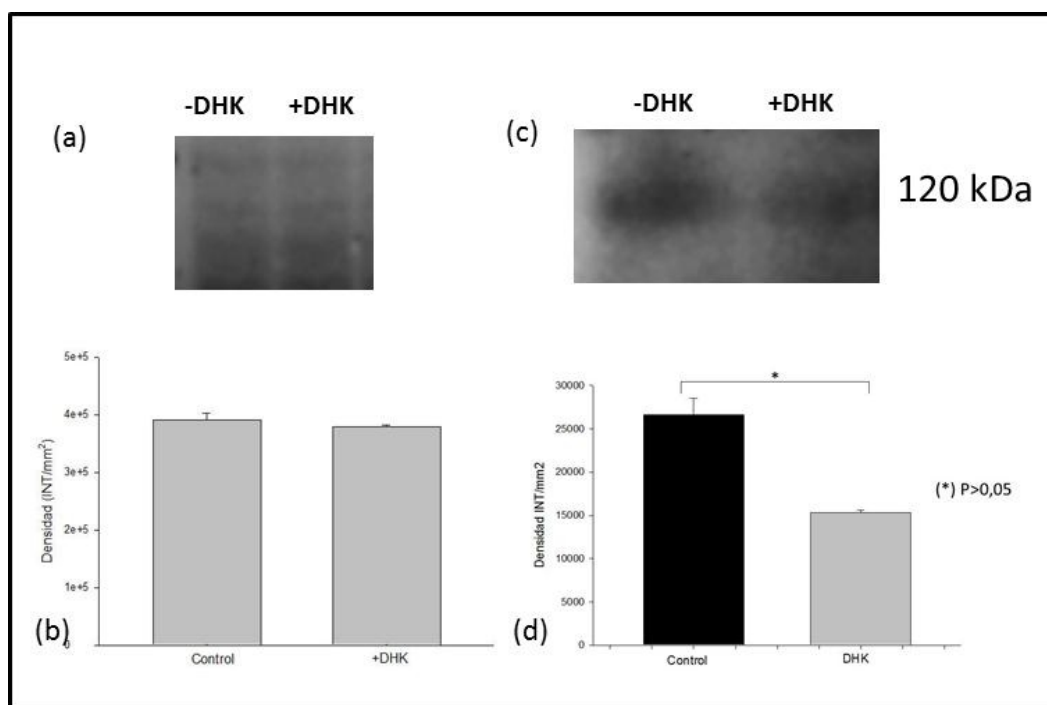
#### **4.9. Diseño de oligonucleótidos para amplificar un fragmento del promotor de hTERT, en el que se encuentran los sitios de unión de Ap2- $\alpha$ y E2F-1.**

Para la amplificación del fragmento (aproximadamente 200pb) del promotor de hTERT en el que se encuentran los sitios de unión de Ap2- $\alpha$  y E2F-1, se diseñó un par de oligonucleótidos que permitirá llevar a cabo una reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Para ello, se realizó un alineamiento múltiple con el software de (Corpet, 1998), entre varias secuencias del promotor de hTERT encontradas en la base de datos NCBI (AF097365.1; AF098956.1; AF121948.1; AF128893.1) y las secuencias reportadas por (Takakura y col., 1999; Crowe y col., 2001). Luego de encontrar una gran homogeneidad entre estas secuencias, se procedió a diseñar un par de oligonucleótidos, a través del programa Oligo Explorer 1.5, tomando en cuenta la temperatura de fusión ( $T_m$ ), complementariedad entre los oligonucleótidos (sentido y antisentido) y la auto-complementariedad de cada uno.

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Niveles de expresión de hTERT en presencia y ausencia del compuesto.

A través de un ensayo de inmunodetección se evaluó el cambio en la concentración de hTERT en presencia y ausencia del compuesto. Inicialmente, con la finalidad de asegurar que ambos extractos de proteínas (-DHK y +DHK) se encontraban en concentraciones iguales, se realizó una tinción con rojo ponceau y un análisis densitométrico. Posteriormente se determinó que había igual concentraciones de ambos extractos (Figura 15a y 13b). Luego de realizar la inmunodetección, se observó que a las 24 horas de tratamiento había una disminución de la concentración de la subunidad catalítica de la telomerasa, tal como se puede observar en la Figura 15c.

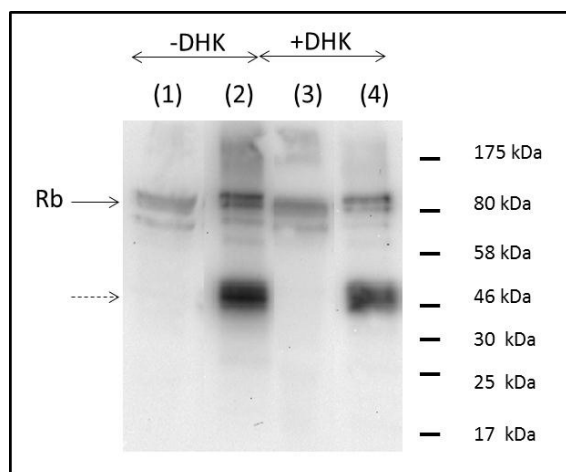


**Figura 15.- Niveles de expresión de hTERT.** Concentración de hTERT (-DHK y +DHK). (a) control de carga de proteínas nucleares (rojo Ponceau). (b) análisis densitométrico del control de carga. (c) Inmunodetección de hTERT. Se observa una disminución de concentración de la subunidad catalítica en presencia del DHK en comparación de la señal observada en el control (-DHK). (d) Estudio densitométrico y análisis estadístico. Se determinó que la diferencia entre los promedios es estadísticamente significativa (\*). Las barras representan el promedio  $\pm$  desviación estándar

Para medir la disminución de los niveles de hTERT en presencia del compuesto, se realizó una cuantificación densitométrica a través del programa de densitometría óptica Quantity One del equipo Chemi-Doc XR Bio-Rad. En este estudio se registró la intensidad de cada señal en función del área, a fin de obtener la densidad óptica (INT/mm<sup>2</sup>). De esta manera, se determinó que la concentración de hTERT en el control es 1,74 veces mayor con respecto al tratamiento (Ecuación 1). Posteriormente tras realizar un análisis estadístico se determinó que esta diferencia es significativa (Figura 15d).

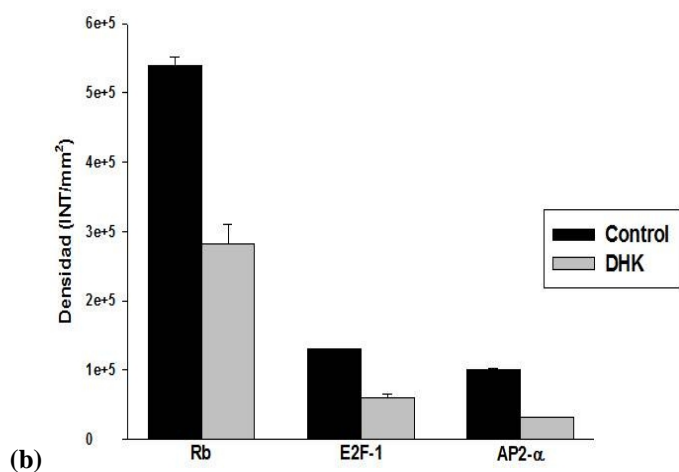
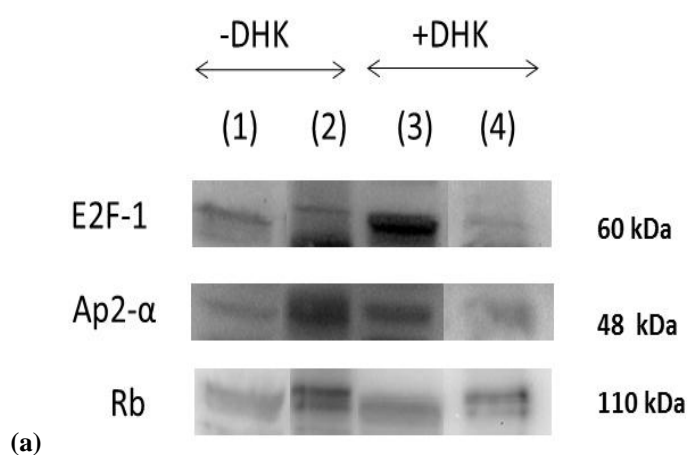
## 5.2. Co-Immunoprecipitación.

Mediante este ensayo se evaluó la interacción entre las proteínas Rb, E2F-1 y Ap2- $\alpha$ . Para ello, se inmunoprecipitó pRb a través de la metodología establecida en la sección 5.7 (Figura 16) y posteriormente se realizó una inmunodetección de E2F-1 y de Ap2- $\alpha$  bajo las condiciones establecidas en la sección 5.6.2. (Figura 16).



**Figura 16.- Inmunoprecipitación de pRb.** Control de proteínas nucleares sin inmunoprecipitar (carril 1 y 3), proteína Inmunoprecipitada (carril 2 y 4), control experimental (-DHK), proteínas provenientes de células con tratamiento (+DHK), marcador de peso molecular (PM), pRb (flecha) y cadena pesada de la inmunoglobulina IgG (flecha punteada).

El resultado anterior muestra la purificación de pRb. En la en la Figura 16 (carriles 2 y 4) se pueden observar dos bandas de gran intensidad, una de ellas de 110 kDa perteneciente a la proteína y la otra de 50 kDa correspondiente a la cadena pesada del anticuerpo (IgG) (flecha punteada). Para este experimento se utilizó como control, el extracto de proteínas nucleares sin inmunoprecipitar (carriles 1 y 3, Figura 16). Allí se puede observar una menor intensidad en la banda correspondiente a la proteína Rb y la ausencia de la cadena pesada del anticuerpo.



**Figura 17.- Interacción entre pRb, E2F-1 y Ap2-α.** (a) **Co-inmunoprecipitación.** La presencia de las tres proteínas luego de la co-inmunoprecipitación sugiere que existe una interacción entre las mismas. Control de proteínas nucleares sin inmunoprecipitar (carril 1 y 3), proteínas Co-inmunoprecipitadas (carril 2 y 4), control experimental (-DHK), proteínas provenientes de células con tratamiento (+DHK). (b) **Estudio densitométrico de la co-inmunoprecipitación.** Se midió la intensidad de cada señal en función del área, obteniendo la densidad (INT/mm<sup>2</sup>) de cada una de las proteínas co-inmunoprecipitadas de los carriles 2 y 4. Las barras representan el promedio  $\pm$  desviación

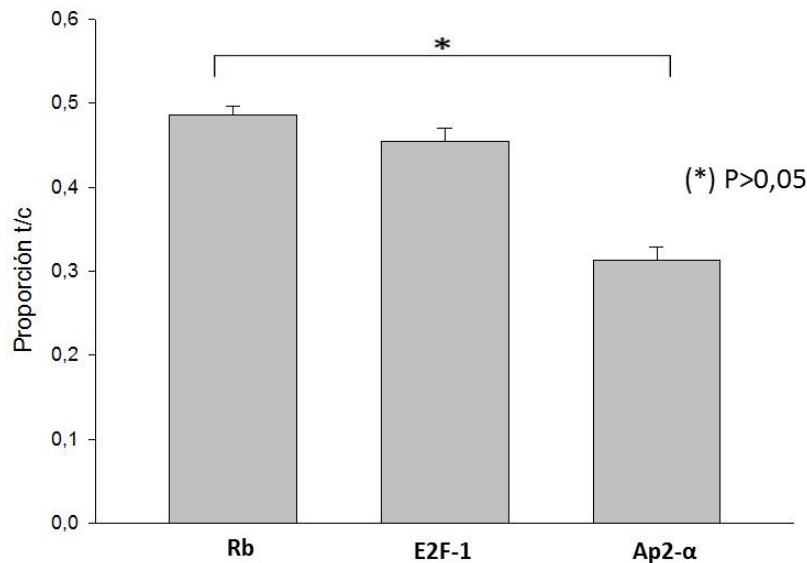
Luego de la Co- inmunoprecipitación, en los carriles 2 y 4 de la Figura 17a se pueden observar tres bandas muy definidas, cada una de estas representa una proteína (Rb, E2F-1 y Ap2- $\alpha$ ). La presencia de estas proteínas sugiere que existe una interacción entre ellas. Sin embargo, tras aplicar el tratamiento la señal de las tres proteínas disminuye (carril 4) con respecto al control experimental (carril 2), siendo la de Ap2- $\alpha$  la que más disminuye en mayor proporción. Además, se pudo observar que las tres proteínas también se encontraban en el extracto al que no se había realizado la inmunoprecipitación (carriles 1 y 3). Curiosamente, la señal observada de las proteínas E2F-1 y Ap2- $\alpha$  es mayor con el tratamiento (carril 3) con respecto al control (carril 1).

### **5.2.1. Estudio densitométrico de la co-inmunoprecipitación.**

Con la finalidad de cuantificar la disminución de la interacción entre las proteínas Rb, E2F-1 y Ap2- $\alpha$ , se realizó un estudio densitométrico de la co-inmunoprecipitación a través del programa de densitometría óptica Quantity One del equipo Chemi-Doc XR Bio-Rad, en el que se registró la intensidad de cada señal en función del área, a fin de obtener la densidad óptica (INT/mm<sup>2</sup>). Tras realizar este estudio, se observó que la densidad de las tres proteínas disminuye en presencia del compuesto, como se pudo observar en la Figura 17b; además, se puede apreciar que pRb y E2F-1 disminuyen aproximadamente la mitad de la densidad con el DHK, mientras que Ap2- $\alpha$  disminuye más de la mitad en presencia del compuesto.

### 5.2.1.2. Análisis estadístico del estudio densitométrico.

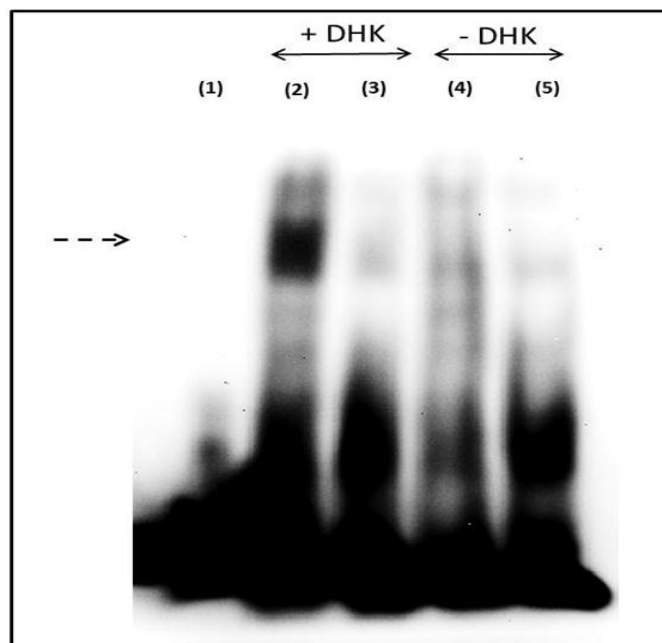
A partir de las densidades obtenidas en el estudio densitométrico, se realizó una relación entre la cantidad de proteína obtenida en el tratamiento con respecto al control (proporción t/c) (Ecuación 1, sección 5.7), de cada una de las proteínas. Posteriormente se compararon las medias de la proporción t/c de pRb y de las otras dos proteínas. Se determinó que no había diferencias estadísticamente significativas entre la proporción t/c de Rb y de E2F-1 (Figura 18), indicando que ambas proteínas disminuyen en igual proporción, mientras que las diferencias encontradas entre Rb y Ap2- $\alpha$  son estadísticamente significativas, lo que indica que el factor de transcripción Ap2- $\alpha$  comienza a disociarse del complejo (pRb, E2F-1) debido a la exposición al compuesto.



**Figura 18.- Análisis estadístico de las proporciones t/c.** Se realizó un análisis estadístico de la proporción de la cantidad de proteína obtenida en el tratamiento con respecto al control, entre (pRb, E2F-1) y (pRb, Ap2- $\alpha$ ), obteniendo una diferencia estadísticamente significativa (\*) entre la proporción t/c de Rb y Ap2- $\alpha$ . Las barras representan el promedio  $\pm$  desviación estándar.

### 5.3. Ensayo de cambio de la movilidad electroforética.

En la Figura 19 se puede observar, que los oligonucleótidos marcados con Biotina no presenta ningún retardo en la movilidad electroforética (carril 1), sin embargo, cuando son incubados con el extracto de proteínas nucleares provenientes de células que han sido tratadas (carril 2), se observó un cambio en la movilidad electroforética (flecha), además, en presencia de un competidor específico (carril 3), esta señal disminuye drásticamente. Por otra parte, al incubar los oligonucleótidos con el extracto de proteínas que no habían sido tratadas (carril 4), no se observaron cambios en la movilidad electroforética. Este mismo patrón se observó al incubar el competidor específico (carril 5). Este resultado indica que existe una interacción entre el factor de transcripción E2F-1 y su secuencia consenso de unión, en presencia del tratamiento.



**Figura 19.- Ensayo de cambio de la movilidad electroforética de la secuencia consenso para E2F1.** Se observa un retardo en la movilidad tras incubar el extracto de proteínas nucleares que han sido tratadas, con la secuencia consenso de unión de E2F-1 (flecha). (Carril 1) oligonucleótidos marcados con Biotina, (carriles 2 y 4) oligonucleótidos marcados más extracto de proteínas nucleares, (carriles 3 y 5) oligonucleótidos marcados más extracto de proteínas nucleares y competidor específico, (-DHK) control experimental, (+DHK) proteínas provenientes de células con tratamiento.

## 6. DISCUSIÓN

La inmortalidad replicativa es uno de los marcadores biológicos de progresión tumoral descritos por Hanahan y colaboradores en el 2000. Esta característica de la mayoría de células tumorales se debe principalmente a la activación de la telomerasa. Por lo tanto, la inhibición del este complejo ribonucleoprotéico se ha convertido en un blanco de interés terapéutico contra el cáncer. La subunidad catalítica con actividad transcriptasa reversa (hTERT), es quien lleva a cabo la actividad enzimática del complejo. Su expresión tiene una función clave en la activación de la telomerasa en células cancerígenas. En consecuencia, su regulación transcripcional representa un foco de interés frente a posibles tratamientos contra el cáncer.

Estudios anteriores evaluaron el efecto del DHK sobre la expresión de hTERT y determinaron que tras 72 horas de exposición al compuesto, los niveles de ARNm disminuyen 1000 veces con respecto a células que no fueron tratadas. Esta represión transcripcional es particularmente fuerte, en comparación con la represión ejercida sobre la transcripción del gen Bcl-2, donde los niveles de ARNm disminuyen 6 veces en presencia del compuesto (Morales y col., 2004). En este trabajo nosotros evaluamos la concentración de hTERT tras 24 horas de tratamiento, a través de un ensayo de inmunodetección y de un estudio densitométrico.

En la Figura 15c se puede observar que la concentración de la subunidad catalítica disminuye en presencia del compuesto. Luego, con la finalidad de cuantificar dicha disminución se realizó un estudio densitométrico, en el que se determinó que la concentración de hTERT disminuye casi la mitad con el DHK (Figura 15d). Estos

resultados coinciden con los estudios realizados por Morales y colaboradores en 2004, debido a que existe una estrecha relación entre disminución del ARNm de hTERT y su expresión. Cabe destacar que la disminución de la concentración no es tan intensa en comparación con los niveles de ARNm. Sin embargo, los tiempos de exposición al compuesto varían en cada uno de estos ensayos, influyendo notablemente en la cantidad de proteína y ARNm cuantificados.

Estos resultados junto con los estudios realizados por Morales y colaboradores en 2004, indican que efectivamente el DHK tiene un efecto represor sobre la subunidad catalítica de la telomerasa. No obstante, aún no se conoce el efecto de este compuesto sobre la regulación transcripcional del gen de hTERT, más específicamente sobre proteínas y factores de transcripción que regulan su expresión. Ap2- $\alpha$ , pRb y E2F-1 son algunas de las proteínas que han sido asociadas a la regulación transcripcional de hTERT. Por consiguiente, nos propusimos estudiar la interacción entre estas proteínas y determinar el efecto del compuesto sobre dicha interacción, a través de un ensayo de Co-Imunoprecipitación (Co-IP).

Los factores de transcripción que participan en la inducción de la transcripción de hTERT, son de especial interés como blancos terapéuticos contra el cáncer. La inhibición de su función por efecto de un compuesto, induce la represión transcripcional de la telomerasa. Deng y colaboradores en 2007, determinaron que la familia de factores de transcripción Ap2, inducía la transcripción del gen de hTERT luego de unirse a su región promotora. Años más tarde, Wei y colaboradores describieron que la isoforma Ap2- $\alpha$  también induce la transcripción de la subunidad catalítica, en células derivadas de carcinoma de pulmón (A547) (Wei y col., 2009).

Luego de la co-inmunoprecipitación, nuestros resultados indican que las proteínas pRb, E2F-1 y Ap2- $\alpha$  interactúan en ausencia y presencia de DHK. Sin embargo, estas interacciones se reducen luego de 24 horas de exposición al compuesto (carriles 2 y 4, Figura 17a), siendo el factor de transcripción Ap2- $\alpha$  el que disminuye en mayor proporción con respecto al control (Figura 17b). Conjuntamente, la proporción t/c de Ap2- $\alpha$  y pRb presentan una diferencia estadísticamente significativa (Figura 18). Estos resultados sugieren que la interacción entre Ap2- $\alpha$  y pRb disminuyen y que el factor de transcripción comienza a disociarse. De esta manera, nuestros resultados concuerdan con los estudios realizados por Deng y colaboradores en 2007 y por Wei y colaboradores en 2009.

Además, Decary y colaboradores en 2002 determinaron que el factor de transcripción Ap2- $\alpha$  es regulado por la interacción con la proteína pRb, formando un complejo de transactivación que induce la transcripción del gen antiapoptótico Bcl-2 y del gen de la E-Cadherina. La interacción observada entre Ap2- $\alpha$ , Rb y E2F-1 en ausencia del compuesto (Figura 17a), sugiere que de manera homóloga a Bcl-2 y E-Cadherina, estas proteínas forman parte del complejo de transactivación que induce la transcripción de hTERT, en células MCF-7.

Las proteínas que inhiben la transcripción de hTERT, también juegan un importante papel en la represión de la telomerasa. Generalmente, estas se unen a una secuencia específica en el promotor del gen de hTERT e impiden la transcripción. Algunos estudios pioneros describen que la expresión del gen Rb, es necesaria para la represión de la actividad de la telomerasa en células cancerígenas y que la inactivación de este gen, así como del que codifica para el factor de transcripción E2F-1, contribuye con la expresión de la telomerasa en diferentes tejidos tumorales (Nguyen y Crowe 1999; Crowe y col., 2000).

Las proporciones t/c de pRb y de E2F-1 no arrojaron diferencias significativas (Figura 18), lo que indica que en presencia de DHK el factor de transcripción E2F-1 y la proteína Rb, disminuyen en igual proporción. Por lo tanto, la interacción entre estas proteínas permanece aún en presencia del compuesto y sugiere que la formación de este complejo induce una represión transcripcional de hTERT. Estos resultados se ajustan a los estudios anteriormente realizados por Nguyen y Crowe en 1999 y en 2000, en los que señalan que la expresión de ambas proteínas es necesarias para inactivar este gen.

Asimismo, estudios realizados por Kyo y colaboradores en 2008 coinciden con nuestros resultados. Ellos reportan que en células derivadas de carcinoma de pulmón (H1229), la represión transcripcional de la subunidad catalítica de la telomerasa (hTERT), se debe a la unión de miembros de la familia E2F a su región promotora y que esta familia de factores de transcripción, es regulada por la interacción directa con pRb, una proteína que también se encarga del reclutamiento de histonas deacetilasas (HDAC).

La inhibición transcripcional de la subunidad catalítica también fue estudiada en células humanas no tumorales (fibroblastos). Allí se determinó que la unión del complejo conformado por E2F-1, pRb y HDAC al promotor de hTERT, regula negativamente su transcripción (Won y col., 2004). Aunque esta regulación está descrita para células no tumorales, también guarda una relación con los resultados observados entre la interacción de E2F-1 con pRb y la represión de la expresión de hTERT inducida por el DHK.

Durante el ensayo de co-inmunoprecipitación también se utilizaron como controles extractos de proteínas nucleares sin inmunoprecipitar, en presencia y ausencia del compuesto. Esto nos permite tener una noción de la cantidad de proteína co-inmunoprecipitada, en relación a la cantidad de proteína total del extracto nuclear (Figura 17a). En el caso de las proteínas que fueron co-inmunoprecipitadas se puede observar una disminución de la señal tras la exposición al compuesto, con respecto a la cantidad de proteína obtenida sin el tratamiento (carriles 2 y 4, Figura 17a). Sin embargo, para las proteínas que no fueron co-inmunoprecipitadas, especialmente en el caso de las proteínas E2F-1 y Ap2- $\alpha$ , se observa una mayor cantidad de proteínas tras la exposición al DHK en comparación con la cantidad de proteínas obtenidas sin el tratamiento.

El patrón mencionado anteriormente se explica debido a que durante el proceso de apoptosis, tras una cascada de señales activadas por las caspasas efectoras, ocurre un conjunto de procesos simultáneos entre los que se encuentran la activación de genes supresores de tumores y la desactivación de genes antiapoptóticos (Green, 2011). Estos procesos requieren de la participación de diferentes proteínas, tales como; Ap2- $\alpha$ , E2F-1 y Rb. Es por tal razón que no toda la cantidad expresada de estas proteínas, interaccionan entre ellas para reprimir la transcripción de hTERT, sino que también participa en diversos procesos inducidos por la apoptosis.

En 2004 Morales y colaboradores demostraron que el compuesto DHK induce apoptosis en células MCF-7, incluso a las 24 horas de tratamiento. Durante este proceso se promueve la inhibición de genes antiapoptóticos, como es el caso de Bcl-2. Un gen cuya regulación transcripcional ha sido asociada a la disociación entre las proteínas Ap2- $\alpha$  y pRb. Además, ocurre la activación de genes pro-apoptóticos, tales como PUMA. Un gen es

regulado por el factor de transcripción E2F-1 y cuyo producto se demostró que aumentaba en presencia del compuesto a las 24 y 48 horas de exposición (Morales y col., 2011).

Trabajar con igual cantidad de proteínas en ausencia y presencia del compuesto, fue otra de las condiciones establecidas durante el ensayo de co-inmunoprecipitación. Trabajos previos han descrito que el DHK induce apoptosis en células MCF-7, incluso a las 24 horas de exposición. Esta condición implica una serie de eventos que incluyen la degradación de diversas proteínas, así como la fragmentación enzimática del ADN cromosómico; entre otros (Savill, 2000). Por esta razón, se debía garantizar que la disminución en la interacción de las proteínas co-inmunoprecipitadas, es debido al efecto del compuesto y no a la disminución de la concentración de estas proteínas, como consecuencia del proceso de apoptosis.

Por otra parte, en la Figura 17b se puede observar que los valores de densidad de las proteínas E2F-1 y Ap2- $\alpha$ , se encuentran muy por debajo del valor de densidad de pRb. La diferencia entre estas densidades sugiere que cierta cantidad de la proteína pRb no interacciona con E2F-1 y Ap2- $\alpha$ . Dicho evento se explica debido a que esta proteína participa en diversos procesos celulares, además de la regulación transcripcional de hTERT. En su mayoría, estos procesos son regulados por distintos eventos de fosforilación; además, la función reguladora de pRb depende de su interacción específica con diferentes proteínas. En muchos casos esta proteína está relacionada con la regulación sobre la expresión de varios genes (Duanduan y col., 2003; Gordon y Du, 2011).

Luego de realizar el estudio densitométrico de la co-inmunoprecipitación, se pudo observar que los niveles de densidad de Ap2- $\alpha$  se encuentran por debajo de los niveles de E2F-1 y pRb (Figura 17b). Este factor de transcripción participa en varios procesos durante el desarrollo embrionario de vertebrados, tales como; la proliferación, diferenciación y apoptosis (Hualei, 2006). A pesar de inducir la expresión del gen antiapoptótico Bcl-2 y de hTERT, diversas investigaciones sugieren que el gen que codifica esta proteína, también actúa como un supresor de tumores. La pérdida y bajos niveles de su expresión están asociados a diversos tipos de cáncer, entre ellos; cáncer de mama, de colon y melanomas, (Wajapeyee y Somasundarán, 2003). Es por esta razón que su concentración se encuentra en menor proporción, considerando que la investigación se ha realizado con células derivadas de adenocarcinoma de mama (MCF-7).

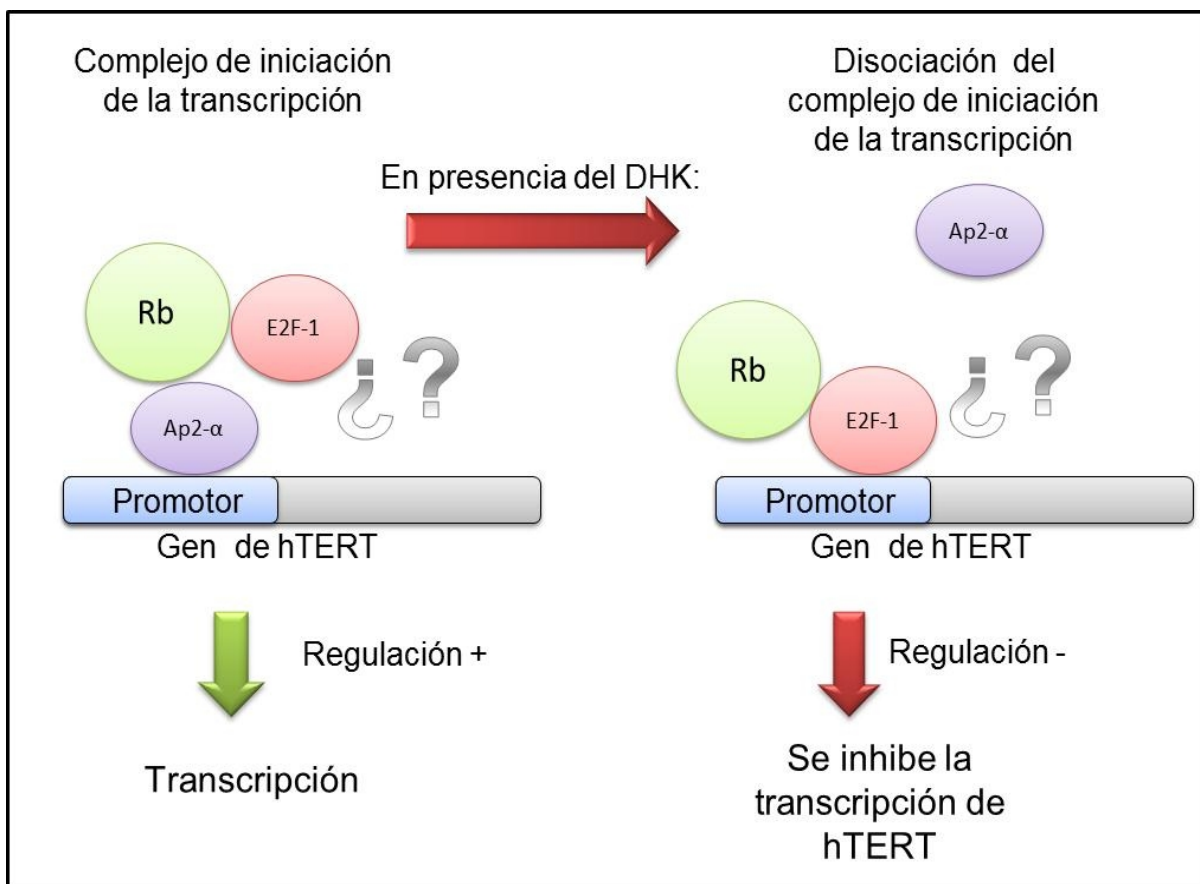
Por otra parte, Morales y colaboradores en 2011 mediante un ensayo de inmunoprecipitación de la cromatina, demostraron que pRb permanecía asociada a la región promotora de Bcl-2 en presencia y ausencia del compuesto. Además, se determinó que su participación en la regulación positiva era mediada por Ap-2- $\alpha$  (Figura 10) (Decary y col., 2002). Sin embargo, tras la disociación del complejo, de alguna manera pRb permanecía asociada a la región promotora (Figura 11). Nosotros, en la regulación transcripcional negativa de la subunidad catalítica hTERT, planteamos que en presencia de DHK, la participación de pRb es mediada por E2F-1, debido a que esta proteína (Rb) no posee capacidad de unión directa al ADN (Figura 14).

Con la finalidad de evaluar la capacidad de unión de E2F-1 al ADN, en presencia de DHK, realizamos un ensayo de cambio de la movilidad electroforética (EMSA), en el que se empleó la secuencia consenso de unión del factor de transcripción E2F-1 (5'-CGCCCAGGACCGCGCTCCCCACGT-3'). Este ensayo nos permite detectar la interacción entre el factor de transcripción y el ADN, debido a que la movilidad electroforética del complejo es mucho menor con respecto al ADN sólo (Hellman y Fried, 2007).

Luego de realizar el EMSA, nuestros resultados muestran un retardo en la movilidad electroforética de la secuencia consenso de unión de E2F-1, cuando se incubaba el extracto de proteínas nucleares proveniente de células que fueron expuestas al DHK, con la secuencia consenso de unión de E2F-1 (carril 2, Figura 19). Esto indica que existe una interacción entre este factor de transcripción y el ADN en presencia de DHK. Además, comprobamos que dicha interacción es específica, debido a que al añadir el competidor específico en exceso, la señal desaparece (carril 3, Figura 19). Este patrón no fue observado con el extracto de proteínas nucleares proveniente de células que no habían sido tratadas (carriles 4 y 5, Figura 19), lo que sugiere que la formación del complejo E2F-1-ADN es inducida por el compuesto.

Los resultados descritos anteriormente coinciden con el estudio realizado por Crowe y colaboradores en 2001, donde encontraron que mutaciones en los sitios de unión de E2F-1 al promotor de hTERT, incrementaban dramáticamente su actividad; además, demostraron que la sobreexpresión de E2F-1 induce una disminución del 70% de la actividad de hTERT, determinando que este factor de transcripción actúa como un represor transcripcional de la subunidad catalítica de la telomerasa.

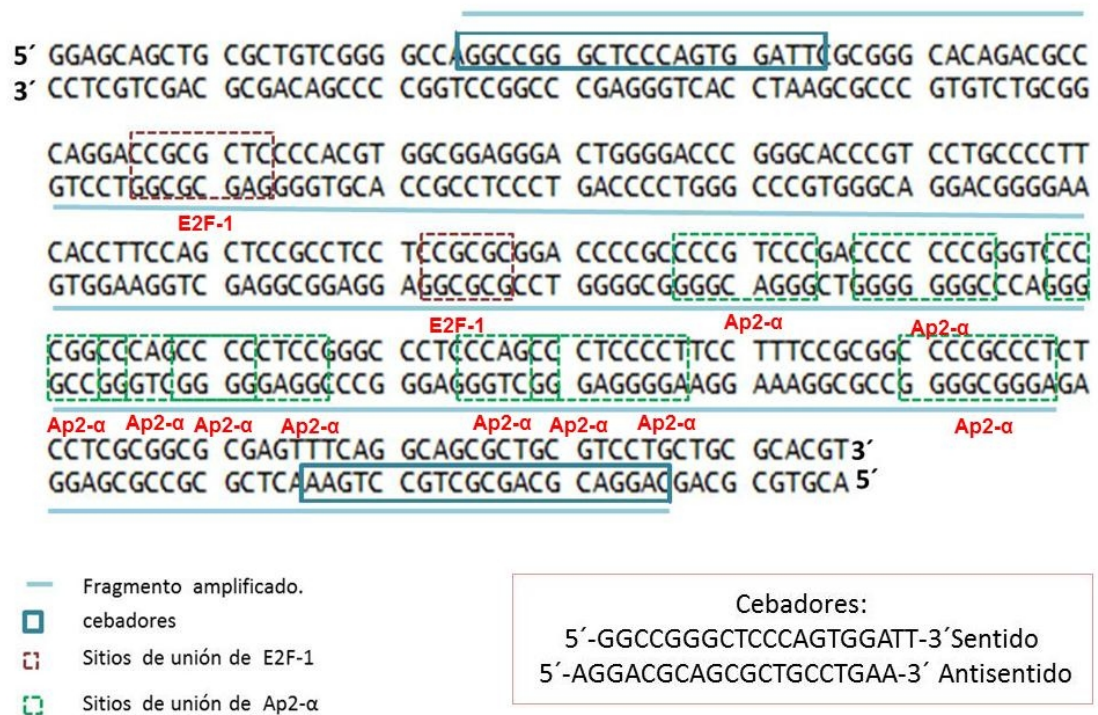
La disminución en los niveles de expresión y concentración de hTERT, sugiere que la disociación de Ap2- $\alpha$  del complejo (pRb- E2F-1) y la unión de E2F-1 a la secuencia consenso de unión, ambas inducidas por el DHK, no parecen ser eventos aislados, sino que estos convergen en la represión transcripcional de la subunidad catalítica. Sin embargo, es necesario constatar la unión de los factores de transcripción Ap2 $\alpha$  y E2F-1 a la región promotora de hTERT, a fin de evaluar si efectivamente estos factores participan en la regulación transcripcional positiva y negativa de la subunidad catalítica, tal como se propone en la Figura 21. Por lo tanto, sugerimos que para futuros estudios se realice un ensayo de Inmunoprecitación de la cromatina (ChIP).



**Figura 20.-. Propuesta del mecanismo de acción del DHK, sobre la interacción de proteínas asociadas a la regulación transcripcional de hTERT.**

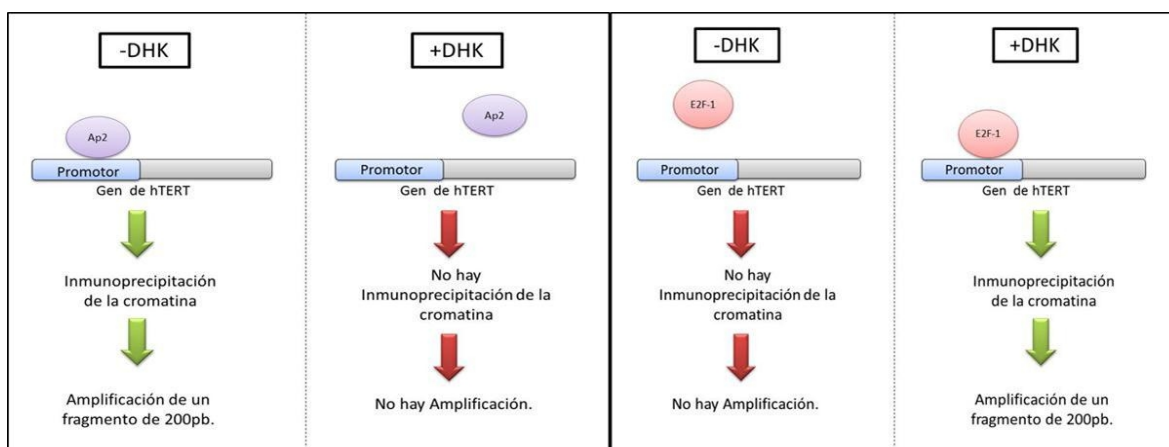
El ensayo de Inmunoprecitación de la cromatina (ChIP), permitirá evaluar la interacción entre los factores de transcripción E2F-1, Ap2- $\alpha$  y el fragmento de cromatina correspondiente a la región promotora de hTERT, en presencia y ausencia del compuesto. Posteriormente tras inmunoprecipitar dichos fragmentos, estos podrán ser amplificados a través de una reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Para ello se diseñaron un par de oligonucleótidos que pudiera amplificar el fragmento del promotor, en el que se unen E2F-1 y Ap2- $\alpha$  (Figura 21)

Esta posible interacción entre las proteínas (E2F-1, Ap2- $\alpha$ ) y el promotor de hTERT, permitirá la inmunoprecipitación del fragmento en el que se encuentra los sitios de unión de estas proteínas y posteriormente su amplificación.



**Figura 21. Diseño de oligonucleótidos.** En la figura anterior se muestra el fragmento de la región promotora de hTERT que se desea amplificar a través de una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y luego de la inmunoprecipitación de la cromatina. En este fragmento se encuentran los sitios de unión al promotor de los factores de transcripción E2F-1 y Ap2  $\alpha$  (Montaño, D; Galindo I., 2014).

Luego de analizar todos los resultados y tomando en cuenta la hipótesis planteada del posible mecanismo de acción del DHK, sobre la interacción de proteínas asociadas a la regulación transcripcional de hTERT (Figura 20). Se esperaría que tras realizar el ensayo de inmunoprecipitación de la cromatina, específicamente en ausencia del compuesto, se observe una amplificación del fragmento de cromatina al que posiblemente se une Ap2- $\alpha$ , mientras que para el factor de transcripción E2F-1 no habría tal amplificación. Sin embargo, tras la exposición al compuesto habría de esperarse que no haya un producto de amplificación en el caso de Ap2- $\alpha$ , debido a su posible pérdida de la capacidad de unión a la región promotora y para E2F-1 probablemente se observaría un amplicón de aproximadamente 200pb (Figura 22).



**Figura 22.-** Resultado esperado de la Inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP) y luego de la amplificación por PCR, de un fragmento de 200 pb aproximadamente, en el que se encuentran los sitios de unión de E2F-1 y Ap2- $\alpha$ .

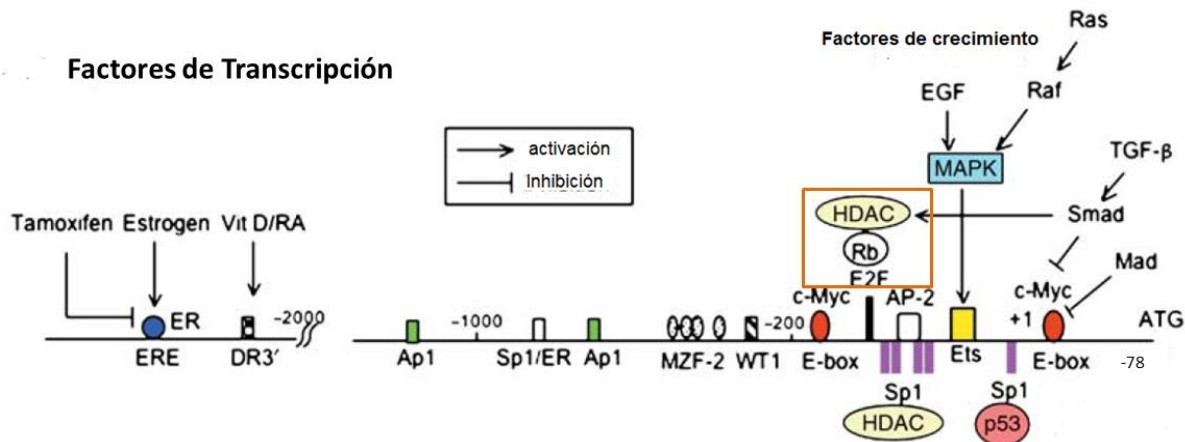
La regulación transcripcional de hTERT, no sólo está restringida a la interacción entre los factores de transcripción Ap2 $\alpha$ , E2F-1 y la proteína Rb. Se han identificado un gran número de elementos de actuación "cis" y "trans" en el promotor, que intervienen en la activación y represión de la subunidad catalítica (Figura 23). Algunos de estos han sido asociados al desarrollo de diferentes tipos de cáncer.

Entre los diversos elementos de actuación "trans" que han sido identificados y asociados con el proceso de oncogénesis, se encuentran los factores de transcripción codificados por la familia de oncogenes Myc. El factor de transcripción c- Myc se conoce como un activador de la telomerasa (Wang y col., 1998), que se une a la caja E (CACGTG) localizada en el nucleótido -165 y promueve la transcripción (Kyo y col., 2000). Otros estudios demostraron que el factor Sp1 también incrementa la actividad transcripcional al unirse a la caja GC (GGGCGG) (Wu y col., 1999). Sin embargo, este factor no está estrechamente relacionado con procesos de carcinogénesis.

Asimismo, el factor inducible de Hipoxia 1 (HIF-1) también promueve un aumento *in vitro* de los niveles de expresión de ARNm de hTERT, en células cancerígenas. Se conocen dos sitios putativos de unión al promotor de hTERT mediante los cuales induce la activación transcripcional. Además, este factor de transcripción regula la expresión de varios genes vinculados al metabolismo energético y a la angiogénesis, uno de los marcadores biológicos adquiridos durante la carcinogénesis (Yatabe y col., 2004; Nishi y col., 2004). Por otra parte, el factor de transcripción AP-1 tiene una función transcripcional represora y posee dos sitios de unión en el promotor de hTERT (-1665 y -718) (Takakura y col., 2005).

Algunas hormonas también participan en la regulación transcripcional de hTERT. El estrógeno (ER) es una de estas y se asocia con la activación de la transcripción a través de la unión del ligando-receptor de estrógeno activado  $\alpha$  (ER $\alpha$ ), al elemento receptor de estrógeno (ERE) ubicado en el promotor (Kyo y col., 1999; Misiti y col., 2000). El estrógeno también activa la expresión mediante mecanismos post- transcripcionales, a través de la acumulación nuclear de hTERT. Este proceso es mediado por la ruta de señalización de Akt, que se encuentra involucrada con diversas vías de supervivencia celular (Kimura y col., 2004). Incluso algunas citoquinas como el factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF-  $\beta$ ), intervienen en la regulación de hTERT, reprimiendo su transcripción mediante la interacción directa con Smad3 y la inhibición de c-Myc (Hu y col., 2006).

Las interacciones entre las proteínas Ap2 $\alpha$ , E2F-1 y Rb que se evaluaron durante esta investigación, son una pequeña apertura al estudio sobre el efecto que pudiera tener el DHK en la regulación transcripcional de la subunidad catalítica hTERT. Tal como se describió anteriormente, esta regulación implica una diversidad de moléculas, que en algunos casos pudieran estar siendo inhibidas o activadas por este compuesto. Por lo tanto, resulta de gran interés proponer estudios en los que se pueda evaluar el posible efecto del DHK, sobre esta variedad de moléculas asociadas a la regulación transcripcional de hTERT.



**Figura 23.- Factores de transcripción de hTERT.** Se pueden observar distintos factores de transcripción y moléculas, sobre la región promotora del gen que codifica para hTERT. En el recuadro color naranja se puede apreciar el complejo de represión transcripcional, conformado por Histona deacetilasa (HDAC), la proteína Rb y el factor de transcripción E2F-1, unido a la región promotora. Tomado con modificaciones de (Kyo, 2008).

De manera general, se podría decir que el *ent-16β-17α*-dihidroxicaurano (DHK), además de poseer un efecto proapoptótico en el crecimiento de células malignas (MCF-7) y reprimir la expresión de la subunidad catalítica (hTERT), nos proporciona la posibilidad de estudiar y comprobar su regulación transcripcional, así como de plantear posibles mecanismos de acción, a través de los cuales inhibe la transcripción de esta enzima.

Además, la regulación de varios genes vinculados a marcadores moleculares adquiridos durante el proceso de tumorigénesis pudieran ser evaluados mediante el efecto del DHK. Decary en el 2002 demostró que Ap2α y Rb se unen al promotor y regula la expresión del gen antiapoptótico Bcl-2 y de la E-cadherina. Una molécula dependiente de Ca<sup>2+</sup> que media la adhesión célula-célula y cuya pérdida de expresión o función facilita la disgregación de las células neoplásicas, conduciendo a la progresión de tumores a un estado invasivo metastásico (Hajra y col., 2002). Por lo tanto, resulta de gran interés evaluar el

efecto de este compuesto en la regulación de la transcripción de la E-cadherina. Así como también, de moléculas vinculadas a otros marcadores moleculares, tales como; sostenida señalización proliferativa, evasión de los supresores de tumores e inducción de angiogénesis.

## 7. CONCLUSIONES

- Nuestra hipótesis inicial planteaba que el complejo de transactivación del gen que codifica la subunidad catalítica de la telomerasa hTERT, estaba conformado por el factor de transcripción Ap2- $\alpha$  y la proteína Rb. Tras realizar el ensayo de Co-Imunoprecipitación, se plantea la posibilidad de que el factor de transcripción E2F-1 también participe en este complejo.
- El factor de transcripción Ap2- $\alpha$  disminuye su interacción con la proteína pRb, luego de 24 horas de exposición al compuesto ent-16 $\beta$ -17 $\alpha$ -dihidroxikaurano (DHK). Este evento parece indicar que Ap2- $\alpha$  se disocia del complejo (pRb- E2F-1) en presencia de DHK y que probablemente pierde capacidad de unión a la región promotora de hTERT.
- El factor de transcripción E2F-1 mantiene su interacción con la proteína pRb, incluso tras 24 horas de exposición al DHK. Este patrón, aunado a la disminución de la expresión y concentración de hTERT en presencia del compuesto, parece indicar que el complejo E2F-1- pRb reprime la transcripción de hTERT.
- Ensayos de cambio de la movilidad electroforética permitieron determinar que el factor de transcripción E2F-1, se une a su secuencia consenso en presencia de DHK. Este evento sugiere que la represión de la transcripción de hTERT está mediada por la unión de E2F-1 a la región promotora del gen.

- Los resultados obtenidos en esta investigación permiten proponer un mecanismo de acción del DHK, sobre la interacción de las proteínas Ap2- $\alpha$ , E2F-1, pRb y la regulación transcripcional que estas ejercen sobre hTERT. Sin embargo, es necesario realizar otros ensayos que permitan evaluar la unión directa de Ap2- $\alpha$  y E2F-1 a la región promotora de hTERT a fin de comprobar la hipótesis establecida. Uno de estos ensayos podría ser la inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP).

## 8. RECOMENDACIONES

- Nuestros resultados sugieren que interacciones entre las proteínas Ap2- $\alpha$ , E2F-1 y pRb, están involucradas en la regulación transcripcional de hTERT. A fin de dilucidar si los mecanismos planteados en este trabajo efectivamente intervienen en este proceso de regulación, nosotros sugerimos la realización de ensayos que permitan demostrar la interacción directa entre estos factores de transcripción y la región promotora del gen que codifica para hTERT, en presencia y ausencia de DHK.
- Estudios anteriores han demostrado que Ap2- $\alpha$  y pRb regulan la transcripción de la E-cadherina. Dos proteínas que también han sido relacionadas a la regulación transcripcional del gen antiapoptótico Bcl-2 y del gen de hTERT. Por tal razón, nosotros recomendamos hacer una evaluación del efecto de DHK sobre la regulación transcripcional de la E-cadherina. Esto permitiría esclarecer si el compuesto posee diferentes blancos, lo que incrementaría su potencial como posible agente quimioterapéutico.
- Estudios anteriores demostraron que el DHK reprime en menor proporción los niveles de ARNm de hTERT en células no tumorales, específicamente en fibroblastos. Sería conveniente evaluar el efecto de este compuesto en otro tipo de células que expresen constitutivamente telomerasa; tal como en células madre pluripotentes (iPS).
- Los estudios realizados en este trabajo se hicieron en células derivadas de adenocarcinoma de mama (MCF-7). Nosotros recomendamos realizar estudios en varias

líneas celulares derivadas de diferentes tipos de cáncer, a fin de evaluar la universalidad del compuesto.

## 9. BIBLIOGRAFÍA

1. Allsopp, R., Varizi, H., Patterson, C., Goldstein, S., Younglai, V., Futcher, B., Greider, C. y col. 1992. . Telomere length predicts replicative capacity of human fibroblast. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **89**: 10114-10118.
2. Anderson, M., Huang, D., Roberts, A. 2014. Targeting BCL2 for the treatment of lymphoid malignancies. *Semin Hem.* **51**: 219-27.
3. Arvelo, F., Morales, A. 2004. Telómero, telomerasa y cáncer. *Acta. Cien. Ven.* **55**: 288-303.
4. Alnemri, S., Livingston, D., Nicholson, D., Salvensen, G., Thornberry, N., Wong, W., Yuan, J. 1996. Human ICE/CED-3 Protease Nomenclature. *Cell.* **87**:171.
5. Batsche, E., Muchardt, C., Behrens, J., Hurst, H., Cremisi, C. 1998. RB and c-Myc activate expression of the E-cadherin gene in epithelial cells through interaction with transcription factor AP-2. *Mol. Cell. Biol.* **18**:3647– 3658.
6. Bilaud, T., Brun, C., Ancelin, K., Koering, C., Laroche, T., Gilson, E. 1997. Telomeric localization of TRF2, a novel human telobox protein. *Nat. Genet.* **17**: 236-239.
7. Bray, D. 2006. Introducción a la biología celular. Editorial Médica Panamericana, Segunda Edición, Buenos Aires, Argentina.
8. Brown, T. 2008. Genomas/Genomes. Editorial Médica Panamericana, Tercera Edición, Buenos Aires, Argentina.
9. Buseman, C., Wright, W., Shay, J. 2011. Is telomerase a viable target in cancer? *Mutat Res.* **730**: 90-7.

10. Bodnar, A., Ouellette, M., Frolkis, M., Holt, S., Chiu, C., Morin, G., Harley, C. y col. 1998. Extension of life span by introduction telomerase into normal cells. *Science*. **279**: 349. 352.
11. Campbell, N., Reece, J. 2007. *Biología*. Editorial Médica Panamericana, Séptima Edición, Madrid, España.
12. Collins, K., Mitchell, J. 2002. Telomerase in the human organism. *Oncogene*. **21**: 21564–21579.
13. Corpet, F. 1988. "Multiple sequence alignment with hierarchical clustering". *Nucl. Acids Res.* **16**: 10881-90
14. Cory, S., Huang, D., Adams, J. 2003. The Bcl-2 family: roles in cell survival and oncogenesis. *Oncogene*. **22**: 8590-8607.
15. Crowe, D., Nguyen, D. 2000. Rb and E2F-1 regulate telomerase activity in human cancer cells. *Biochim Biophys Acta*. **1518**:1-6.
16. Crowe, D., Nguyen, D., Tsang, K., Kyo, S. 2001. E2F-1 represses transcription of the human telomerase reverse transcriptase gene. *Nucleic Acids Res.* **29**:2789-2794.
17. Counter, M., Avilion, A., LeFeuvre, C., Stewart, N., Greider, C., Harley, C., Bacchetti, S. 1992. Telomere shortening associated with chromosome instability is arrested in immortal cells which express telomerase activity. *EMBO J.* **11**:1921-1929.
18. Decary, S. 2002. The Retinoblastoma Protein Binds the Promoter of the Survival Gene Bcl-2 and Regulates Its Transcription in Epithelial Cells through Transcription Factor AP-2. *Mol Cell Biol.* **22**: 7877–7888

19. Deng, Z., Atanasiu, C., Burg, J., Broccoli, D., Lieberman, P. 2003. Telomere repeat binding factors TRF1, TRF2, and hRAP1 modulate replication of Epstein-Barrvirus Orip. *J. Virol.* **77**: 11992-12001.
20. Deng, W., Jayachandran, G., Wu, G., Xu, K., Roth, J., Ji, L. 2007. Tumor-specific activation of human telomerase reverses transcriptase promoter activity by activating enhancer-binding protein-2beta in human lung cancer cells. *J Biol Chem.* **282**:26460-26470.
21. Devlin, T. 2004. Bioquímica Editorial Reverté, Quinta Edición, Barcelona, España.
22. Dyson, N. 1998. The regulation of E2F by pRB-family protein. *Genes Dev.* **12**:2245–2262.
23. Duanduan, M., Zhou, P., Harbour, J. 2003. Distinct Mechanisms for Regulating the Tumor Suppressor and Antiapoptotic Functions of Rb. *J Biol Chem.* **278**: 19358–19366.
24. Fagagna, F., Reaper, P., Clay-Farrace, L., Fiegler, H., Carr, P., von Zglinicki, T. Saretzki, G. y col. 2003. A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence. *Nature.* **426**: 194–198.
25. Fu, L., Chen, W., Guo, W., Wang, J., Tian, Y., Shi, D., Zhang, X. 2013. Berberine Targets AP-2/hTERT, NF-κB/COX-2, HIF-1α/VEGF and Cytochrome-c/Caspase Signaling to Suppress Human Cancer Cell Growth. *PLoS One.* **8**: 1-13.
26. Green, D. 2011. Apoptosis: Physiology and Pathology. Editorial Cambridge University Press, Primera Edición, Estados Unidos de América.
27. Greider, W. 1999. Telomeres do D-loop-T-loop, *Cell.* **97**: 419–422.
28. Gómez, D., Armando, R., Farina, H., Gómez, D. 2014. Telomerase and telomere: their structure and dynamics in health and disease. *Medicina (B Aires).* **74** :69-76.

29. Gordon, G., Du, W. 2011. Targeting Rb inactivation in cancers by synthetic lethality. *Am J Cancer Res.* **1**: 773-786.
30. Hahn, W., Stewart, S., Brooks, M., York, S., Eaton, E., Kurachi, A., Beijersbergen, R. y col. 1999. Inhibition of telomerase limits the growth of human cancer cells. *Nat Med.* **5**: 164-170.
31. Hajra, K., Fearon, E. 2002. Cadherin and Catenin Alteration in Human Cancer. *Genes Chromosomes Cancer.* **34**:255-268.
32. Hande, M., Samper, E., Lansdorp, P., Blasco, M. 1999. Telomere length dynamics and chromosomal instability in cells derived from telomerase null mice. *J. Cell Biol.* **144**: 589-601.
33. Hanahan, D., Weinberg, R. 2000. The hallmarks of cancer, *Cell.* **100**: 57–70.
34. Hanahan, D., Weinberg, R. 2011. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell.* **144**: 646-74.
35. Hartwell, H., Kastan, B. 1994. Cell cycle control and cancer. *Science.* **266**: 1821-27.
36. Hellman, L., Fried, M. 2007 .Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) for detecting protein–nucleic acid interactions. *Nat Protoc.***8**: 1849–1861.
37. Herráez, A. 2012. Biología molecular e ingeniería genética. Editorial Elsevier, Primera Edición, Barcelona, España.
38. Hill, R. 2006. Fisiología Animal. Editorial Médica Panamericana, Segunda Edición, Madrid, España.
39. Hu, B., Tack, D., Liu, T., Wu, Z, Ullenbruch, M., Phan, S. 2006. Role of Smad3 in the regulation of rat telomerase reverse transcriptase by TGFbeta. *Oncogene.* **25**: 1030–41.

40. Hualei, L., Prabhat, G., Frederick, D. 2006. AP-2 Induces p21 Expression, Arrests Cell Cycle, and Inhibits the Tumor Growth of Human Carcinoma Cells. *Neoplasia*. **8**: 568 – 577.
41. Iiwin, M., Marin, MC, Phillips C. 2000. Role for the p53 homologue p73 in E2F-1-induced apoptosis. *Nature*. **407**: 645-648.
42. Kim, N., Piatyszek, M., Prowse, K., Harley, C., West, M., Ho, P., Coviello, G. y col. 1994. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science*. **266**: 2011–2015.
43. Kimura, A., Ohmichi, M., Kawagoe, J. 2004. Induction of hTERT expression and phosphorylation via Akt cascade by estrogen in human ovarian cancer cell lines. *Oncogene*. **23**: 4505–15.
44. Kyo, S., Takakura, M., Kanaya, T. 1999. Estrogen activates telomerase. *Cancer Res*. **59**: 5917–21.
45. Kyo, S., Takakura, M., Taira, T. 2000. Spl cooperates with c-Myc to activate transcription of the human telomerase reverse transcriptase gene (hTERT). *Nucleic Acids Res*. **28**: 669–77.
46. Kyo, S., Takakura, M., Fujiwara, T., Inoue, M. 2008. Understanding and exploiting hTERT promoter regulation for diagnosis and treatment of human cancers. *Cancer Sci*. **99**: 1528-1538.
47. Lizarbe, M. 2007. El suicidio y la muerte celular. *Rev. R. Acad. Cienc. Exact. Fís. Nat. (Esp)*. **101**: 1-31.
48. Lodish, H., Berk, A., Matsudaira, P., Kaiser, C., Krieger, M., Scott, M., Zipursky, L. y col. 2006. Biología celular y molecular. Editorial Médica Panamericana, Quinta Edición, Madrid, España.

49. Misiti, S., Nanni, S., Fontemaggi, G. 2000. Induction of hTERT expression and telomerase activity by estrogens in human ovary epithelium cells. *Mol Cell Biol.* **20**: 3764–71.
50. Morales, A., Pérez, P., Mendoza, R., Compagnonec, R., Suarez, A., Arvelo, F., Ramírez, J., Galindo, I. 2004. Cytotoxic and proapoptotic activity of ent-16b-17a-dihydroxykaurane on human mammary carcinoma cell line MCF-7. *Cancer Letters.* **218**: 109–116.
51. Morales, A., Pérez, P., Mendoza, R., Compagnonec, R., Suarez, A., Arvelo, F., Galindo, I. 2011. The natural diterpene ent-16b-17a-dihydroxykaurane down-regulates Bcl-2 by disruption of the Ap-2 $\alpha$ /Rb transcription activating complex and induces E2F1 up-regulation in MCF-7 cells. *Apoptosis.* **16**: 1360-8185.
52. Morris, E., Dyson, N. 2001. Retinoblastoma protein partners. *Adv. Cancer Res.* **82**:1–54.
53. Moyzis, R., Buckingham, J., Cram, L., Dani, M., Deaven, L., Jones, M., Meyne, J. y col. 1998. A highly conserved repetitive DNA sequence (TTAGGG)<sub>n</sub>, present at the telomeres of human chromosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **85**: 6622–6626.
54. Nishi, H., Nakada, T., Kyo, S., Inoue, M., Shay, J., Isaka, K. 2004. Hypoxia-inducible factor mediates up-regulation of telomerase (hTERT). *Mol Cell Biol.* **24**: 6076–83.
55. Nguyen, D., Crowe, D. 1999. Intact functional domains of the retinoblastoma gene product (pRb) are required for downregulation of telomerase activity. *Biochim Biophys Acta.* **1445**:207-15.

56. Nakamura, T., Morin, G., Chapman, K., Weinrich, S., Andrews, W., Lingner, J., Harley, B. y col. 1997. Telomerase catalytic subunit homologs from fission yeast and human. *Science*. **277**: 955–959.
57. Passarge, E. 2010. Genética texto y atlas. Editorial Médica Panamericana, Tercera Edición, Barcelona, España.
58. Pierce, B. 2009. Genética: un enfoque conceptual. Editorial Médica Panamericana. Tercera Edición, Madrid, España.
59. Phillips, A., Vousden, K. 2001. E2F-1 induced apoptosis. *Apoptosis*. **6**: 173–182.
60. Savill, J., Fadok, V. 2000. Corpse clearance defines the meaning of cell death. *Nature*. **407**: 784-788.
61. Schwanbeck, R. 2014. The Role of Epigenetic Mechanisms in Notch Signaling During Development. *J Cell Physiol*. **229**: 1301–1569
62. Sherr, J. 1996. Cancer cell cycles. *Science*. **274**: 1672-77.
63. Siegel, R. 2006. Caspases at the crossroads of immune-cell life and death. *Nat. Rev. Immunol*. **6**: 308–317.
64. Solari, A. 2007. Genética humana: fundamentos y aplicaciones en medicina. Editorial Médica Panamericana, Tercera Edición, Buenos Aires, Argentina.
65. Suarez, A., Compagnone, R., Salazar, M., Tillet, S., Delle, F., Di Giulio, C. y col. 2003. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of Croton malambo barkaqueous extract. *J. Ethnopharmacol*. **88** 11–14.
66. Takai, H., Smogorzewska, A., De Lange, T. 2003. DNA damage foci at dysfunctional telomeres. *Curr. Biol*. **13**: 1549–1556.
67. Takakura, M., Kyo, S., Kanaya, T., Hirano, H., Takeda, J., Yutsudo, M., Inoue, M. 1999. Cloning of human telomerase catalytic subunit (hTERT) gene promoter and

- identification of proximal core promoter sequences essential for transcriptional activation in immortalized and cancer cells. *Cancer Res.* **59**:551-557.
68. Takakura, M., Kyo, S., Inoue, M., Wright, W., Shay, J. 2005. The function of AP1 on transcription of telomerase reverse transcriptase gene (TERT) in human and mouse cell. *Mol Cell Biol.* **18**: 8037-43.
69. Vaux, D. 1992. Apoptosis time line. *Cell Death Differ.* **9**: 349-354.
70. Vaziri, H., Dragowska, W., Allsopp, R., Thomas, T., Harley, C., Lansdorp, P. 1994. Evidence for a mitotic clock in human hematopoietic stem cells: loss of telomeric DNA with age. *Proc Natl Acad Sci.* **91**:9857-9860.
71. Wajapeyee, N., Somasundaran, K. 2003. Cell cycle arrest and apoptosis induction by activator protein 2 alpha (Ap2alpha) in the roll of p53 and p21WAF1/CIP1 in Ap-2alpha-mediated growth inhibition. *J Biol Chem.* **278**: 25093-25101.
72. Walensky, L. 2006. BCL-2 in the crosshairs: tipping the balance of life and death. *Cell Death Differ* **13**:1339-1350.
73. Wang, J., Xie, L., Allan, S., Beach, D., Hannon, G. 1998. Myc activates telomerase. *Genes Dev.* **12**: 1769-174.
74. Watson, J. 2006. Biología Molecular del gen. Editorial Médica Panamericana, Quinta Edición, Barcelona, España.
75. Wei, C., Lin, C., Yu, Y., Lin, C., Lin, P., Wu, M., Chen, C. 2009. N-Butylidenephthalide induced apoptosis in the A549 human lung adenocarcinoma cell line by coupled down-regulation of AP-2alpha and telomerase activity. *Acta Pharmacol Sin.* **30**:1297-306.
76. Wright, W., Shay, E. 1992. The two-stage mechanism controlling cellular senescence and immortalization. *Exp. Gerontol.* **27**: 383-389.

77. Wright, W., Piatyszek, M., Rainey, W., Byrd, W., Shay, J. 1996. Telomerase activity in human germline and embryonic tissues and cells. *Dev. Genet.* **18**: 173–179.
78. Won, J., Chang, S., Oh, S., Kim, T. 2004. Small-molecule-based identification of dynamic assembly of E2F-pocket protein-histone deacetylase complex for telomerase regulation in human cells. *Proc Natl Acad Sci.* **101**:11328-33.
79. Wu, K., Grandori, C., Amacker, M. 1999. Direct activation of TERT transcription by c-MYC. *Nature Genet.* **21**: 220–4.
80. Yatabe, N., Kyo, S., Maida, Y. 2004. HIF-1-mediated activation of telomerase in cervical cancer cells. *Oncogene.* **23**: 3708–15.
81. Youle, R., Strasser, A. 2008. The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **9**: 47-59.
82. Zhao, J., Zhang, Z., Liao, Y., Du, W. 2014. Mutation of the retinoblastoma tumor suppressor gene sensitizes cancers to mitotic inhibitor induced cell death. *Am J Cancer Res.* **4**:42-52.