



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ



FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

**PROGRAMA DE POSGRADO EN CIENCIAS
FARMACOBIOLOGICAS**

TÍTULO:

**“EVALUACIÓN DEL ESTATUS DE p53 Y SU RELACIÓN CON LA EXPRESIÓN
DE TLR3 EN CÉLULAS PROSTÁTICAS MALIGNAMENTE TRANSFORMADAS
IN VITRO CON ARSENITO DE SODIO”**

**TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS FARMACOBIOLOGICAS**

PRESENTA

QFB. Pacheco Castillo Nancy Cecilia

Directora de tesis

Dra. Claudia Escudero Lourdes

Co-Directora:

Dra. Vanesa Olivares Illana

Asesores:

Dra. Catalina Arena Huertero

Dr. Erick Tokar

ESTE PROYECTO SE REALIZÓ CON APOYO DE:

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ

REALIZADO EN:

Laboratorio de Inmunotoxicología de la Facultad de Ciencias Químicas de la
Universidad Autónoma de San Luis Potosí
Laboratorio de Interacciones Biomoleculares y cáncer del Instituto de Física de la
Universidad Autónoma de San Luis Potosí



El programa de Maestría en Ciencias Farmacobiológicas de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT registro 003382, nivel en desarrollo.

Número de registro de la beca otorgada por CONACYT: 932257



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

**PROGRAMA DE POSGRADO EN CIENCIAS
FARMACOBIOLOGICAS**

TÍTULO:

**“EVALUACIÓN DEL ESTATUS DE p53 Y SU RELACIÓN CON LA EXPRESIÓN
DE TLR3 EN CÉLULAS PROSTÁTICAS MALIGNAMENTE TRANSFORMADAS
IN VITRO CON ARSENITO DE SODIO”**

**TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS FARMACOBIOLOGICAS**

PRESENTA

QFB. Pacheco Castillo Nancy Cecilia

SINODALES

PRESIDENTE (A):

Dra. Claudia Escudero Lourdes

SECRETARIO (A):

Dra. Vanesa Olivares Illana

VOCAL:

Dra. Catalina Arena Huertero

San Luis Potosí S.L.P. Agosto 2020



“EVALUACIÓN DEL ESTATUS DE p53 Y SU RELACIÓN CON LA EXPRESIÓN DE TLR3 EN CÉLULAS PROSTÁTICAS MALIGNAMENTE TRANSFORMADAS IN VITRO CON ARSENITO DE SODIO” por Pacheco Castillo Nancy Cecilia se distribuye bajo una [Licencia Creative Commons Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

SUBCOMITÉ DE TESIS

DIRECTORA DE TESIS: *Dra. Claudia Escudero Lourdes.* Adscrita al Posgrado en Ciencias Farmacobiológicas de la Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, S.L.P.

CO-DIRECTORA: *Dra. Vanesa Olivares Illana.* Adscrita al Posgrado en Ciencias Farmacobiológicas de la Facultad de Ciencias Químicas. Profesor Investigador del Instituto de Física, Universidad Autónoma de S.L.P.

ASESORA: *Dra. Catalina Arena Huertero.* Adscrita al programa en Ciencias de los Bioprocesos y Profesor Invitado del Posgrado en Ciencias Farmacobiológicas de la Facultad de Ciencias Químicas. Profesor Investigador de la Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, S.L.P.

ASESOR EXTERNO: *Dr. Erick Tokar.* Investigador adscrito al Instituto Nacional de Ciencias Ambientales y Salud (National Institute for Environmental Health Sciences, NIEHS), Triangle Park, Durham, North Carolina. USA.

AGRADECIMIENTOS

A mis padres (Estela y José Luis):

Por siempre mostrar la fuerza del titán Atlas, cargando en sus hombros mis sueños.

Deseando lograr ser digna hija de las grandes enseñanzas y valores mostradas por ustedes, estaré en deuda por siempre.

A mi novio (César):

Por su paciencia y cariño. Juntos hemos conocido el amor verdadero.

A mis hermanos (Diana y Luis):

Por su apoyo, por ser mis primeros amigos, y mis más preciados rivales.

Al Dr. Ismael:

Por ser un mentor extraído de alguna leyenda y siempre hacer más por mí, de lo que dictaba su deber.

A mi comité tutorial (Dra. Claudia, Dra. Vanesa y Dra. Catalina):

Por ser implacables utilizando sus conocimientos y experiencia para guiarme en el mundo vasto de la investigación, y mostrarme que los detalles hacen la perfección.

Por las atenciones brindadas, la paciencia, y confianza que me llevaron a cumplir mis objetivos.

Evaluación del estatus de p53 y su relación con la expresión de TLR3 en células prostáticas malignamente transformadas *in vitro* con arsenito de sodio.

RESUMEN

La exposición humana a arsénico inorgánico (iAs) es un factor de riesgo para el desarrollo de cáncer de próstata (CaP). La activación del receptor tipo toll 3 (TLR3), que induce respuestas pro-apoptóticas e inflamatorias al unir a su ligando (dsRNA) se ha propuesto como una opción terapéutica anti-tumoral en etapas avanzadas de CaP. Células epiteliales prostáticas transformadas *in vitro* con iAs (CAsE-PE), expresan significativamente menos TLR3 que en el control no expuesto (RWPE-1), sin embargo, el mecanismo asociado no ha sido descrito. Siendo la proteína p53 el principal regulador de la expresión genética de TLR3, en este trabajo se evaluó el estatus de p53 y de su regulador negativo, MDM2. Mientras que la expresión de la proteína p53 no mostró diferencia significativa, la expresión del transcrito de MDM2 si se encontró significativamente incrementada en las células CAsE-PE en comparación con las células RWPE-1. Los resultados sugieren que la disminución en la expresión de TLR3 en CAsE-PE, puede ser el resultado de la sobre-expresión de MDM2.

Palabras clave: Cáncer de próstata, p53, MDM2, TLR3, arsénico, inmunoterapia

Evaluation of the status of p53 and its relationship to the expression of TLR3 in malignantly transformed prostate cells *in vitro* with sodium arsenite.

SUMMARY

Human exposure to inorganic arsenic (iAs) is a risk factor for the development of prostate cancer (CaP). Activation of toll like receptor 3 (TLR3), which induces pro-apoptotic and inflammatory responses by binding to its ligand (dsRNA) has been proposed as an anti-tumor therapeutic option in advanced stages of CaP. Epithelial prostatic cells transformed *in vitro* with iAs (CAsE-PE) express significantly less TLR3 than not exposed controls (RWPE-1), however the involved mechanism have not been described. Since p53 is the main regulator of TLR3 gene expression, in this work the status of this protein and its main negative regulator, MDM2 was conducted. While the expression p53 protein showed no significant difference, the expression of MDM2 transcript level was significantly increased in CAsE-PE cells compared to RWPE-1 cells. These results suggest that TLR3 decreased expression observed in CAsE-PE cells, may be the result of MDM2 over-expression.

Keywords: Prostate cancer, arsenic, p53, MDM2, TLR3, immunotherapy.

ÍNDICE GENERAL

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Arsénico como agente causal de cáncer	1
1.2 Cáncer de Próstata, epidemiología y factores de riesgo	2
1.3 Activación de receptores tipo Toll (TLRs) como terapia anti-tumoral	4
1.4 TLR3 y su actividad anti-cáncer, activación de la respuesta inflamatoria y apoptótica	9
1.4.1 Ligandos sintéticos de TLR3	9
1.4.2 Función antitumoral de los agonistas de TLR3	10
2. ANTECEDENTES	12
2.1 Efecto de la exposición de las células RWPE-1 a arsenito de sodio sobre la expresión de TLR3 y su activación con PIC	12
2.2 Reguladores de la expresión de TLR3	14
2.3 Supresor de tumores p53 y sus mecanismos anti-tumorales	16
2.4 Atenuación de la actividad de p53 en el CaP	18
2.4.1 Mutaciones	18
2.4.2 Incremento de sus reguladores negativos	20
2.4.3 Desbalance de isoformas de p53	21
3. JUSTIFICACIÓN	23
4. HIPÓTESIS	24
5. OBJETIVO GENERAL	25
6. OBJETIVOS ESPECIFICOS	25
7. ESTRATEGIA METODOLÓGICA GENERAL	26
7.1 Análisis estadístico	27
8. MATERIALES Y MÉTODOS	28
8.1 Líneas celulares y reactivos	28
8.2 Expresión de las proteínas p53, MDM2 y TLR3	29
8.2.1 Extracción de proteínas	29
8.2.2 Cuantificación de proteínas	29

8.3	Western blot (WB)	29
8.4	Expresión de mRNA de <i>p53</i> , <i>MDM2</i> y <i>TLR3</i>	30
8.4.1	Extracción de RNA	30
8.4.2	Purificación de RNA	31
8.5	Transcripción reversa (RT) del RNA	32
8.6	Secuenciación del gen <i>TP53</i>	33
8.7	PCR en tiempo real	40
9.	RESULTADOS	42
9.1	Nivel de expresión de p53 en células CAsE-PE y RWPE-1	42
9.1.1	Expresión de p53 a nivel de proteína	42
9.1.2	Expresión de TLR3 a nivel de proteína	44
9.1.3	Expresión de <i>p53</i> y <i>TLR3</i> a nivel de mensajero	44
9.2	Expresión de MDM2 en células CAsE-PE y RWPE-1	47
9.2.1	Expresión de MDM2 a nivel de proteína	47
9.2.2	Expresión del mensajero de <i>MDM2</i>	47
9.3	Secuenciación del gen <i>TP53</i> para la detección de mutaciones	49
9.4	Determinación de la presencia de isoformas de p53 mediante WB	52
10.	DISCUSIÓN	54
11.	CONCLUSIONES	60
11.1	Aspectos éticos y de bioseguridad	60
12.	BIBLIOGRAFÍA	61
12.1	Páginas Web	66
13.	ANEXOS	67
	ANEXO 1: Extracción de Proteínas	67
	ANEXO 2: Determinación de proteínas: Método de Bradford	70
	ANEXO 3: Cámara Húmeda	74
	ANEXO 4: Extracción de RNA	76
	ANEXO 5: Purificación de RNA	77
	ANEXO 6: Reacción Transcriptasa Reversa	78

ANEXO 7: PCR para p47 PFU	80
ANEXO 8: Purificación del producto de PCR y formatos para enviar a secuenciar a LANBAMA	81
ANEXO 9: Secuenciación	85
14. GLOSARIO	88

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Etapas del Cáncer de Próstata	3
Figura 2. Estrategias terapéuticas para CaP	5
Figura 3. Receptor tipo Toll	6
Figura 4. Receptores tipo Toll	7
Figura 5. Vía de señalización TLR3	10
Figura 6. Expresión de TLR3 en las líneas celulares RWPE-1 y CAsE-PE	13
Figura 7. Expresión de TLR3 con y sin Tratamiento	14
Figura 8. Expresión de RAR β en las líneas celulares RWPE-1 y CAsE-PE	14
Figura 9. p53 Como regulador importante de TLR3	15
Figura 10. Estructura y Forma globular (activa) de p53	16
Figura 11. Activación de p53	17
Figura 12. Expresión de genes al ser activado p53	18
Figura 13. Estatus de p53 en células Wild Type (WT) y mutantes	19
Figura 14. Mutaciones en el dominio de unión	19
Figura 15. Autorregulación de p53/MDM2	20
Figura 16. Mecanismos de generación de isoformas de p53	21
Figura 17. Estructura de las isoformas de p53	22
Figura 18. Hipótesis	24
Figura 19. Estrategia metodológica general	27
Figura 20. Expresión de la proteína p53 en RWPE-1, CAsE-PE	43
Figura 21. Análisis de la expresión de p53 en RWPE-1, CAsE-PE con y sin Doxo	45

Figura 22. Análisis de la expresión de TLR3 en RWPE-1 y CAsE-PE con y sin Doxo	46
Figura 23. Expresión de MDM2 en RWPE-1 y CAsE-PE.	47
Figura 24. Expresión de MDM2 en RWPE-1, CAsE-PE con y sin Doxo	49
Figura 25. Análisis “Multialin” secuencia Wild Type, RWPE-1 y CAsE-PE	51
Figura 26. Esquema de secuencia consenso, p53 y alineamiento de los oligonucleótidos amplificados de RWPE-1 y CAsE-PE	52
Figura 27. WB preliminar para la detección de isoformas en RWPE-1 y CAsE-PE	53

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Componentes de la Reacción de Retrotranscripción	32
Tabla 2. Reacción de Retrotranscripción	32
Tabla 3. Condiciones de temperatura y tiempo de la Retrotranscripción	32
Tabla 4. Secuencia de los oligos	33
Tabla 5. Secuencia amplificada de p53 por los primers	35
Tabla 6. Preparación de la reacción	40
Tabla 7. Condiciones de termociclado	41

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Arsénico como agente causal de cáncer.

El arsénico (As) es un metaloide ampliamente distribuido en la naturaleza alrededor del mundo; está presente en rocas, suelo, agua y aire; diferentes compuestos del As también se identifican en plantas y tejidos animales. El As forma compuestos con el oxígeno, cloro y azufre, facilitando la formación de compuestos inorgánicos (*IARC, 2004*).

Los compuestos inorgánicos de As (iAs), poseen una alta toxicidad para el humano, teniendo como principal consecuencia de su efecto tóxico el desarrollo de diferentes tipos de cáncer, por lo que es clasificado por la agencia internacional para la investigación del cáncer (IARC, por sus siglas en inglés) como carcinógeno del primer grupo.

La contaminación con iAs, afecta a aproximadamente 45 millones de individuos alrededor del mundo, a través de la exposición crónica. Dado que el iAs es altamente soluble en agua, se libera fácilmente de los minerales que lo contienen en las fuentes de agua subterránea, por ello, la principal fuente de exposición para el humano, es el agua que se utiliza para beber y cocinar, aunque también se encuentra en alimentos regados con agua contaminada como el arroz, frutas y vegetales (*OMS, 2018*).

Una vez en el organismo, el iAs es metabolizado a través de reacciones de reducción y metilación; la mayor parte de los metabolitos generados son excretados a través de la orina, sin embargo, otra proporción de ellos se acumula en diversos tejidos del organismo humano (*Benbrahim, et al., 2008*). La exposición prolongada a iAs está asociada al desarrollo de diversos tipos de cáncer, entre los cuales se destaca el cáncer de pulmón, hígado y piel, así como en el sistema urogenital (UGS) afectando la vejiga y riñón (*IARC, 2004*).

Existe evidencia que sugiere fuertemente una asociación entre la exposición humana a iAs y el desarrollo de cáncer de próstata en individuos expuestos en países de Asia, así como en Estados Unidos y Australia, (*Benbrahim, et al., 2008*), sin embargo, los mecanismos asociados no se han descrito completamente a la fecha.

Un modelo *in vitro* utilizado para estudiar los mecanismos de carcinogenicidad el iAs sobre la próstata, es la línea de células del epitelio prostático llamada RWPE-1, desarrollada por *Webber, et al., (1997)*, la cual deriva del epitelio de próstata humano normal, y, que fue inmortalizado mediante la transfección con una copia del genoma del virus de papiloma humano 18 (HPV-18). Estas células son un modelo epitelio prostático, que no poseen capacidad tumorigénicas en ratones inmunodeprimidos.

En este modelo se demostró que la exposición *in vitro* a arsenito de sodio por un período de 29 a 30 semanas da lugar a la transformación maligna de las células, generando una línea celular ahora llamada CasE-PE, que muestra todas las características de las células cancerosas con expresión incrementada de marcadores de supervivencia, invasividad y resistencia a fármacos (*Tokar et al., 2010^a*). Estudios posteriores realizados por este mismo grupo mostraron la relevancia de las células madre y células madre cancerosas en el proceso de transformación maligna de estas células (*Tokar et al., 2010^a, 2010^b y 2012*).

1.2 Cáncer de Próstata, epidemiología y factores de riesgo.

De acuerdo a la Sociedad Americana de Cáncer (American Cancer Society, ACS), el Cáncer de Próstata (CaP) es una neoplasia que se origina cuando las células de la próstata crecen descontroladamente y adquieren la capacidad de invadir otros tejidos en el aparato reproductor masculino (*American Cancer Society, 2019*).

La próstata se encuentra debajo de la vejiga y delante del recto e incrementa de tamaño de acuerdo a la edad, en esta glándula se produce parte del líquido que constituye al semen. El cáncer en esta glándula tiene cuatro etapas y es originado cuando las células prostáticas crecen descontroladamente (Figura 1). La mayoría de los cánceres de próstata son adenocarcinomas (tumor maligno desarrollado en el

epitelio glandular), que se desarrollan a partir de las células de la próstata, sin embargo, existen otros tipos de cáncer que se pueden dar origen a: Carcinomas de células pequeñas, tumores neuroendocrinos, carcinomas de células transicionales y sarcomas, siendo poco comunes (*American Cancer Society, 2019*).

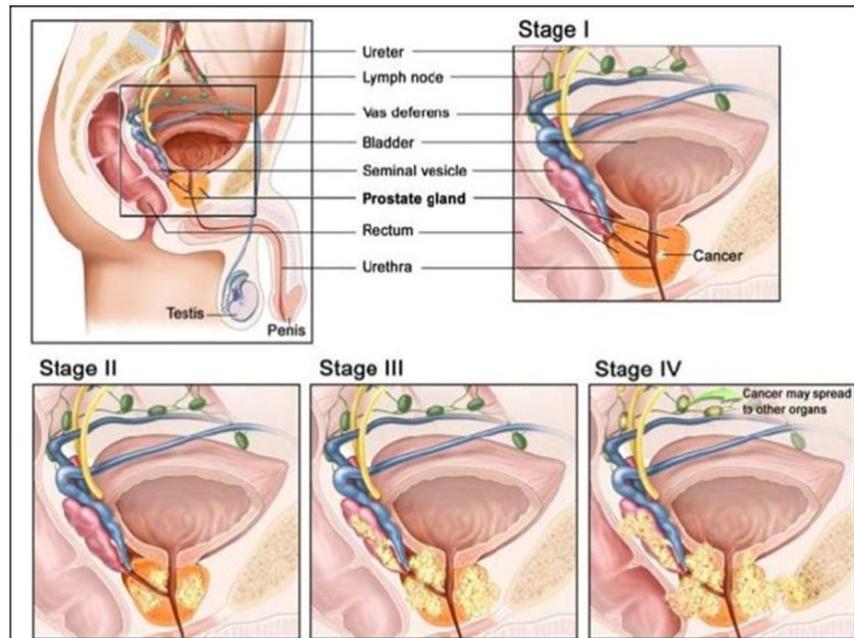


Figura 1. Etapas del Cáncer de Próstata (Tomada de Vama, et al., 2010).

Después del cáncer de piel, el CaP es la segunda causa de muerte en los individuos de sexo masculino en Norteamérica; la ACS, estima que para el año 2020 se diagnosticarán alrededor de 174,650 casos nuevos de cáncer de próstata y se reportarán 31,620 muertes con un riesgo de aproximadamente 1 en 9 hombres en Estados Unidos de América, aunado a ello, a nivel mundial, de acuerdo con las estimaciones del proyecto GLOBOCAN 2012, el CaP es la segunda causa de cáncer y la quinta causa de muerte por cáncer en hombres.

Dentro de nuestro país, a pesar de que la incidencia de CaP es al menos tres veces menor que la de Estados Unidos de América, la mortalidad causada por este cáncer es prácticamente la misma (11.3 vs. 9.8 muertes por cada 100 mil hombres), por ello

en México, el CaP es el principal causante de muertes que se presentan en los varones (*Instituto Nacional de Salud Pública, 2017*).

Existe una relación directamente proporcional entre la edad y el riesgo para el desarrollo de CaP, constituyendo uno de los factores de riesgo de mayor importancia, por ejemplo, antes de los 45 años se diagnostican menos del 0,6% de todos los casos, mientras que, a partir de los 65 años, la incidencia incrementa hasta entre 62-85%.

Las tasas de incidencia anual de CaP ajustadas a la edad presentan grandes variaciones entre países y grupos étnico-raciales, encontrándose a nivel mundial, al continente americano con la tasa más alta y superando los 270 nuevos casos por 100.000 hombres/año y Asia con la tasa más baja. De acuerdo al porcentaje, los hombres de raza negra presentan un riesgo mayor para el desarrollo CaP que los de raza blanca, con alta probabilidad de desarrollar este cáncer a una edad más temprana y de tener tumores agresivos, de crecimiento rápido.

Como todos los otros tipos de cáncer, el CaP es una enfermedad ocasionada por la acumulación de mutaciones cromosómicas, genéticas, epigenéticas, entre otras; generadas por la selección clonal de células de comportamiento agresivo. En la gran mayoría de casos, las mutaciones son somáticas y únicamente se encuentran en las células tumorales del epitelio prostático. Cuando algunas mutaciones están presentes en las células germinales se transmiten de generación en generación y están presentes en todas las células del organismo, incluyendo las prostáticas (*Ferris I et al., 2011*).

1.3 Activación de receptores tipo Toll (TLRs) como terapia anti-tumoral.

Las terapias empleadas contra el CaP son altamente efectivas en las fases iniciales, sin embargo, en una importante proporción de pacientes, el cáncer evoluciona hacia cáncer metastásico invasivo que muestra una alta resistencia a los medicamentos antitumorales (Figura 2). Por este motivo se han propuesto diversas estrategias terapéuticas alternativas, siendo una de ellas la inmunoterapia, de la cual una

estrategia clara y que ha mostrado alta efectividad, implica la activación de receptores tipo Toll o Toll-Like (TLR) (*American Cancer Society and National Center Institute, 2019*).

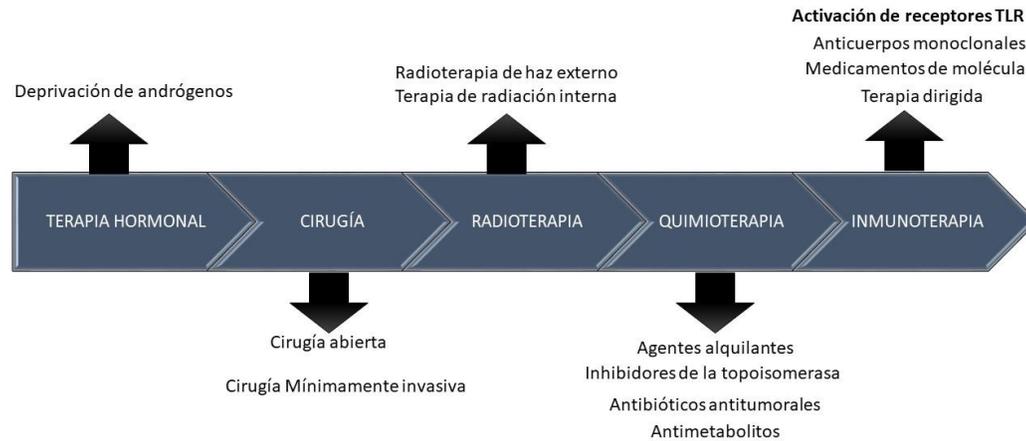


Figura 2. Estrategias terapéuticas para CaP (Tomada y modificada de American Cancer Society, 2019; National Cancer Institute, 2019).

Los receptores transmembrana tipo Toll (TLR) están conformados por de un dominio extracelular, un dominio intracelular y una región transmembrana (Figura 3), juegan un papel muy importante en la prevención contra la invasión de patógenos, reconocen patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) y patrones moleculares asociados a daño (DAMPs). Los PAMPs son estructural y evolutivamente conservados en bacterias, virus, hongos y parásitos (*Zhao et al., 2014*).

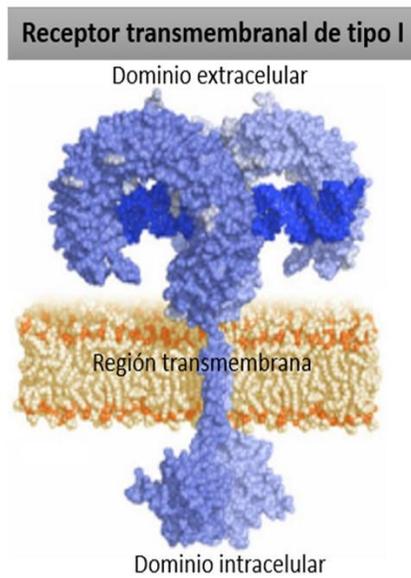


Figura 3. Receptor tipo Toll (Tomada y modificada de Helen M. et al., 2000).

A la fecha, se han descrito 10 TLRs en humanos, los cuales se expresan principalmente en células dendríticas, macrófagos y células asesinas naturales (NK); ubicándose en la superficie celular los TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 y TLR6 o dentro de los endosomas los TLR3, TLR7, TLR8 y TLR9, (Figura 4). Cada uno particularmente exhibiendo especificidad en el reconocimiento de ligandos, por ejemplo, el TLR2 reconoce lipoproteínas bacterianas, TLR3 reconoce RNA de doble cadena (dsRNA), TLR4 lipopolisacáridos (LPS), TLR5 la flagelina, TLR7 reconocer RNA monocatenario y TLR9 DNA que contiene dinucleótidos CpG (CpG-ODN) mientras que TLR10 es hasta ahora un receptor huérfano y está altamente expresado en el bazo humano y en las células B (Zhao et al., 2014).

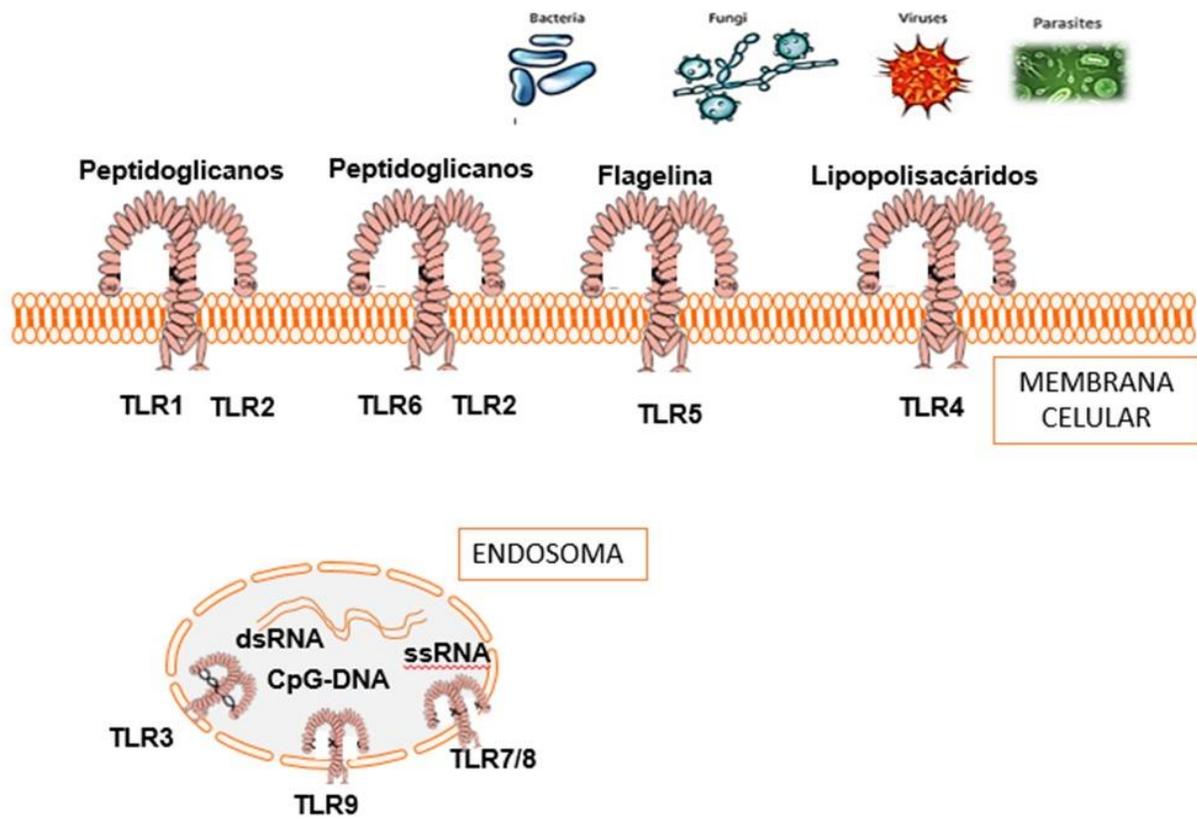


Figura 4. Receptores tipo Toll; (Tomada y modificada de Du, B. et al., 2016).

La activación de estos receptores contribuye tanto al reconocimiento como a la eliminación de microorganismos y virus, involucrando transmisión de señales a través de proteínas y dando lugar a la producción de citocinas proinflamatorias, quimiocinas, así como de moléculas de adhesión; facilitando de esta manera la activación de la respuesta inmune adaptativa. Estas señales se transmiten a través de proteínas adaptadoras como el factor de diferenciación mieloide 88 (MyD88) (Excepto para TLR3), TICAM1 (TRIF), TIRAP (MAL) y TICAM2 (TRAM o TIRP). Además, la vía de activación de los TLR conduce a su vez a la activación de $\text{NF-}\kappa\text{B}$, MAPk, cinasas N-terminales de Jun (JNK), p38 y ERK, así como a las vías de señalización del factor regulador del interferón (IRF3, IRF5 e IRF7), dando como resultado la producción de citocinas inflamatorias (Zhao S et al., 2014).

Específicamente, el TLR3, participa en el reconocimiento y la unión de RNA de doble cadena (dsRNA) viral y, como se mencionó, es localizada generalmente en endosomas celulares; este receptor posee un zipper extracelular de leucinas, conocido como LLR, y una región citoplásmica conservada denominada, Toll/ IL-1 (TIR). El TLR3 es expresado por células del sistema inmune innato, células dendríticas y macrófagos, sin embargo, también es expresado por células no inmunes, incluyendo células epiteliales, fibroblastos y células endoteliales. La función del TLR3 es activar la respuesta inmune natural e instaurar un estado antiviral (*Bianchi, et al., 2017*).

De manera importante, además de las funciones canónicas de protección contra patógenos, los TLRs también se expresan en muchas células epiteliales cancerosas y pueden afectar positiva o negativamente al crecimiento del tumor. Muchos tipos de cáncer expresan el TLR3, incluyendo carcinoma de mama, carcinoma de células orales, carcinoma de esófago, carcinoma de ovario, carcinoma de próstata, carcinoma de cabeza y cuello, carcinoma de células escamosas de pulmón y adenocarcinoma, carcinoma hepatocelular y melanoma.

Relevantemente, los TLR también son activados mediante una amplia gama de moléculas endógenas liberadas por las células del organismo cuando han sufrido daño tisular (conocido como patrón molecular asociado al daño, DAMP). Algunas de estas moléculas incluyen al ácido hialurónico y las moléculas derivadas de células necróticas y apoptóticas, incluyendo DNA y RNA celular. La interpretación que los macrófagos, células dendríticas y células normales que expresan TLRs hacen de tales señales, pueden estimular respuestas inmunes antitumorales específicas, las cuales en muchos casos mejoran significativamente la terapia contra el cáncer.

Los agonistas de TLRs, así como los antagonistas de sus reguladores negativos, se están desarrollando para el tratamiento del cáncer, las infecciones virales y como adyuvantes de vacunas para mejorar las respuestas inmunitarias contra los tumores y las enfermedades infecciosas (*Menendez et al., 2016*).

1.4 TLR3 y su actividad anti-cáncer, activación de la respuesta inflamatoria y apoptótica.

Específicamente, la activación de TLR3 ha sido utilizada ampliamente para inducir una respuesta inmune antitumoral, y varios agonistas de este receptor están siendo estudiados mediante ensayos clínicos, ya que también poseen la capacidad de inducir la inmunidad antitumoral (Dowling, et al., 2016).

Así como las células normales responden a ligandos del receptor TLR3, secretando citocinas inflamatorias, interferón de tipo I (IFN I) y quimiocinas, las cuales contribuyen al incremento de la respuesta inmune, también lo hacen diversas líneas celulares cancerosas. Sin embargo, interesantemente, los agonistas de TLR3 provocan directamente la inhibición del crecimiento tumoral *in vitro* en algunos modelos de células de cáncer murino y humano a través de dos mecanismos principales: 1) disminución de la proliferación y 2) inducción de muerte celular programada (apoptosis), (Bianchi, et al., 2017).

Los agonistas de este receptor ralentizan la proliferación de células de cáncer de mama y próstata, así como en algunos histotipos tumorales (diferentes tipos de tumores) como: mama, melanoma, cabeza y cuello, próstata, carcinoma renal, colon, cervical y pulmón (Paone, et al., 2010).

Las líneas celulares del cáncer también responden a la activación con los ligandos de TLR3 secretando citocinas inflamatorias, IFN I y quimiocinas, que mejoran el reclutamiento y la activación de las células inmunitarias (Bianchi, et al., 2017).

1.4.1 Ligandos sintéticos de TLR3.

El TLR3, que se activa con el dsRNA también lo hace tras la unión con sus análogos sintéticos, como el poli (I: C) (poli-inosínico: ácido policitiidílico) o PIC y el poli (A: U)

(poliadenílico: ácido poliuridílico) o PAU, los cuales se han utilizado para imitar la respuesta a la infección por virus con genoma RNA y se administran comúnmente *in vitro* y en estudios *in vivo* para activar respuestas celulares mediadas por TLR3, tanto de la vía inflamatoria como apoptótica.

Al unirse a su receptor, PIC o PAU producen la activación del factor regulador de interferón 3 (IRF3), así como de la producción del IFN- β y otros interferones de tipo 1 a través de la proteína adaptadora TRIF (TICAM-1). (Figura 5) Por otra parte puede activar una segunda vía que desencadena la producción de citocinas y quimiocinas inflamatorias a través de la activación factores de transcripción como NF- κ B y AP-1 (Bianchi, et al., 2017).

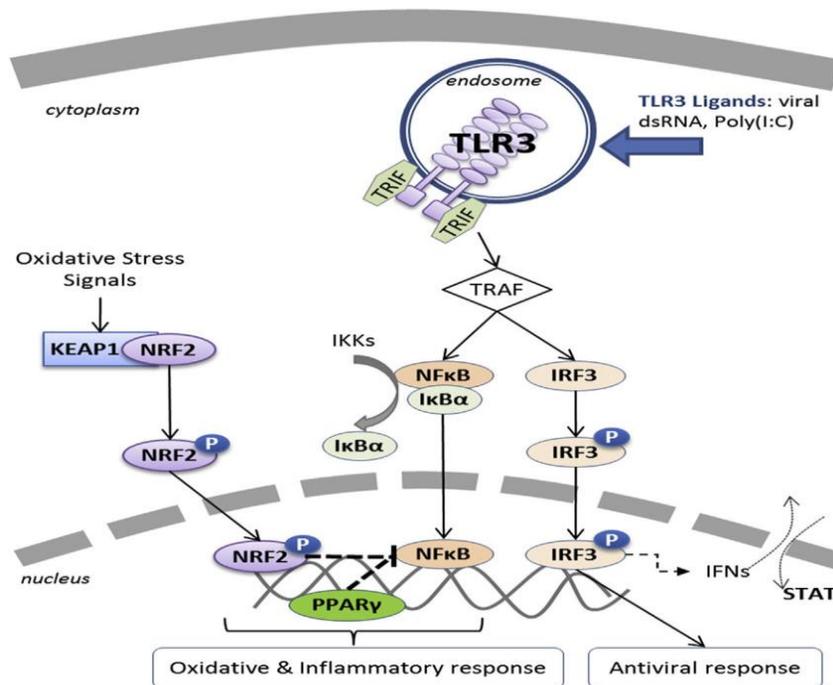


Figura 5. Vía de señalización TLR3. (MacDowell KS, et al., 2017).

1.4.2 Función antitumoral de los agonistas de TLR3.

Las respuestas antitumorales inducidas por los agonistas de TLR3 se atribuyen, por un lado, a su capacidad para estimular las células presentadoras de antígenos (APC,

por sus siglas en inglés), así como a las células dendríticas, que a su vez activan las respuestas de las células T específicas del tumor y su capacidad para cambiar el fenotipo de las células supresoras mieloides y macrófagos asociados a tumores, de un fenotipo inmunosupresor hacia uno inmuno-adyuvante.

Sin embargo, la activación de TLR3 mediante PIC a través de una vía dependiente de caspasas, de la regulación de quimiocinas y de la inducción de expresión de moléculas inflamatorias, conlleva principalmente a apoptosis y muerte celular (*Zhao, et al., 2014*). Cabe destacar que, la activación de TLR3 mediada por PIC además aumenta la expresión del propio TLR3 (*Zhao, et al., 2014*), incrementado de esta manera la respuesta pro-apoptótica de la activación de TLR3 tras la unión a PIC.

Apoiando estos hallazgos *in vitro*, estudios preclínicos y clínicos revelan que la activación de TLR3 dirige directamente hacia apoptosis a células de cáncer de próstata humano, por lo cual, agonistas de este receptor poseen un gran potencial para ser utilizados como agentes terapéuticos antitumorales (*Zhao, et al., 2014*).

El ácido retinoico (RA) y sus derivados han sido utilizados con éxito como terapia para el tratamiento del cáncer ya que juega un papel importante ejerciendo funciones antiproliferativas, basadas en la regulación de muchos procesos biológicos, incluida la diferenciación, la proliferación celular y la apoptosis. El mecanismo de acción de los retinoides, involucra su unión con sus receptores nucleares y su subsecuente unión a elementos de respuesta (RARE), activando la transcripción de genes relacionados a la inhibición de la proliferación celular, la activación de la apoptosis y la diferenciación de células madre cancerosas. Uno de los más relevantes receptores del RA es el RAR β , el cual heterodimeriza con el receptor RXR para unirse a los RARE y activar la transcripción de sus genes blanco (*Bernardo, et al., 2017*).

Sin embargo, en muchos tipos de cáncer, la expresión de RAR β se encuentra silenciada por metilación de su promotor, haciendo inefectiva la terapia con RA.

Interesantemente, *Galli et al, (2010)*, utilizando dos líneas celulares de cáncer de próstata agresivas que no expresan RAR β , describieron que la activación del TLR3

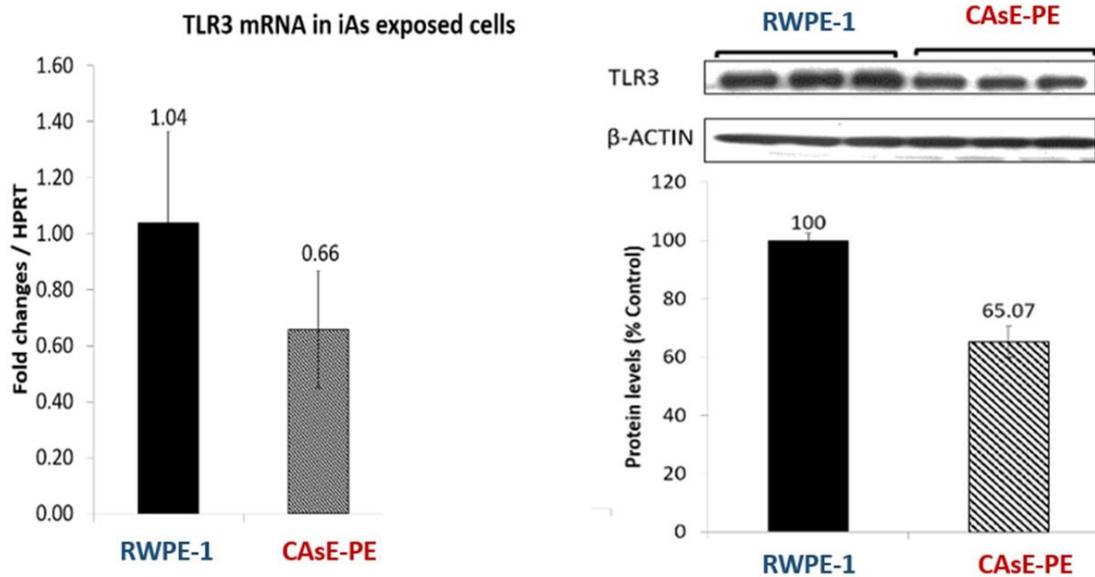
con PIC da lugar a la sobre-expresión de 4 miRNAs (microRNA-29b, -29^c, -148b y -152) que regulan los mRNA que codifican para las DNA metil transferasas (DNMT3a, DNMT3b y DNMT1) impidiendo su traducción, induciendo así la re-expresión de RAR β y con ello, re-estableciendo la sensibilidad al tratamiento con RA, llevando a las células a apoptosis. (*Galli et al., 2013*).

Las observaciones anteriores sugieren fuertemente que la activación de TLR3 a través del uso de sus agonistas, en conjunto con una terapia convencional puede constituir una opción terapéutica para el CaP en estados avanzados o en individuos no respondedores a las terapias (*Menendez, et al., 2016*).

2. ANTECEDENTES

2.1 Efecto de la exposición de las células RWPE-1 a arsenito de sodio sobre la expresión de TLR3 y su activación con PIC.

Aunque la activación de TLR3 mediante el uso del ligando sintético PIC parece brindar una opción terapéutica anti-tumoral efectiva alentadora, en el caso del CaP inducido por exposición humana a iAs el caso podría ser diferente. *Escudero-Lourdes y Tokar en el año 2015* demostraron que las células epiteliales prostáticas transformadas malignamente con 5 μ M de arsenito de sodio (CAsE-PE) mostraron una disminución significativa en la expresión del TLR3, respecto a las células epiteliales no transformadas (RWPE-1) tanto a nivel de mRNA como de la proteína (Figura 6).



Nota: Los datos representan el promedio de $N=3 \pm DS$.

Figura 6. Expresión de TLR3 en las líneas celulares RWPE-1 y CAsE-PE. (Escudero-Lourdes y Tokar, 2015).

Consistentemente con la observación de la disminución en la expresión de TLR3, en resultados preliminares se observó que la activación con PIC no induce el incremento en la expresión de TLR3 ni la expresión de RAR β en las células CAsE-PE, en comparación con lo que sucede en las células epiteliales prostáticas no transformadas, RWPE-1. Estas observaciones sugieren que la exposición al iAs da lugar a una alteración en las vías que regulan la expresión de TLR3 en estas células, volviéndolas irresponsivas a la activación con PIC, (Figura 7 y 8).

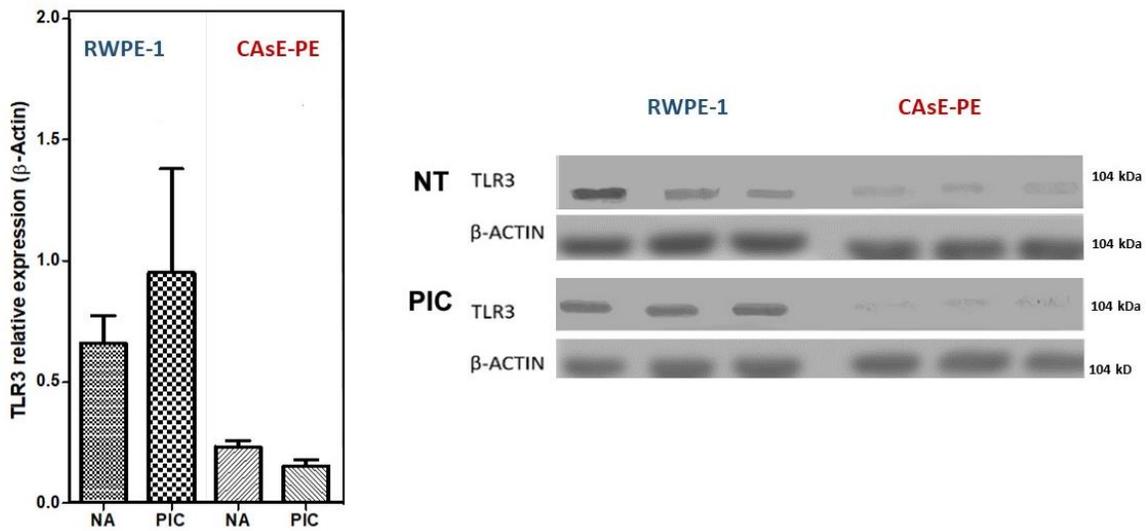


Figura 7. Expresión de TLR3 con y sin Tratamiento (Tesis de Doctorado Alvarado-Morales).

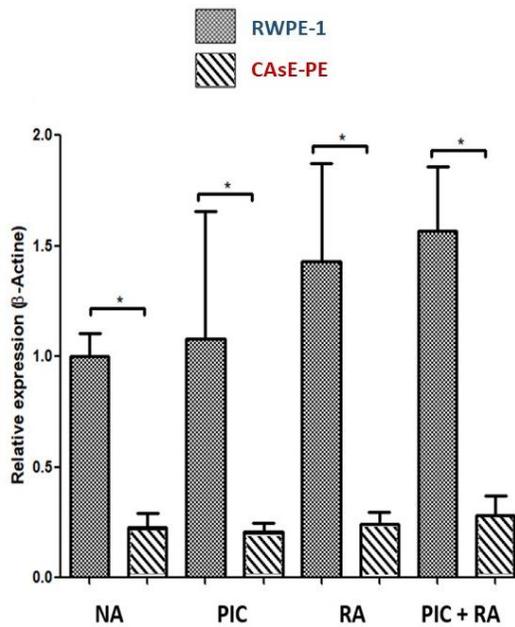


Figura 8. Expresión de RARβ en las líneas celulares RWPE-1 y CAsE-PE. (Tesis de Doctorado Alvarado).

2.2 Reguladores de la expresión de TLR3.

En base a los resultados descritos anteriormente, en células epiteliales prostáticas transformadas malignamente con iAs, surge la incógnita de cuáles factores

encargados de regular positiva o negativamente la expresión de TLR3 que pudieran estar afectados por la exposición a As en estas células.

A la fecha, se han descrito diversos reguladores de la expresión de TLR3, entre ellos la proteína p53 es considerado como el principal regulador positivo de la expresión de la mayoría de los TLRs (Taura, et al., 2008).

Estudios realizados por Taura M. y cols en el año, 2008 describieron que el estatus de este factor de transcripción es el determinante fundamental de la expresión de diferentes TLRs, entre ellos TLR3, así como de la respuesta terapéutica PIC.

En años posteriores, la regulación de los TLRs por parte de p53 fue demostrada a través de diferentes experimentos realizados por Menéndez y colaboradores (2011), en linfocitos humanos primarios y macrófagos alveolares. En estos experimentos, tanto Nutlin, un activador de p53, como tres diferentes estímulos de daño al DNA, incluida entre ellos la doxorubicina (Doxo) dieron lugar a la activación de p53 en asociación con un aumento de la expresión de la mayoría de los TLRs, a excepción de TLR1, TLR7 y TLR9 (Figura 9).

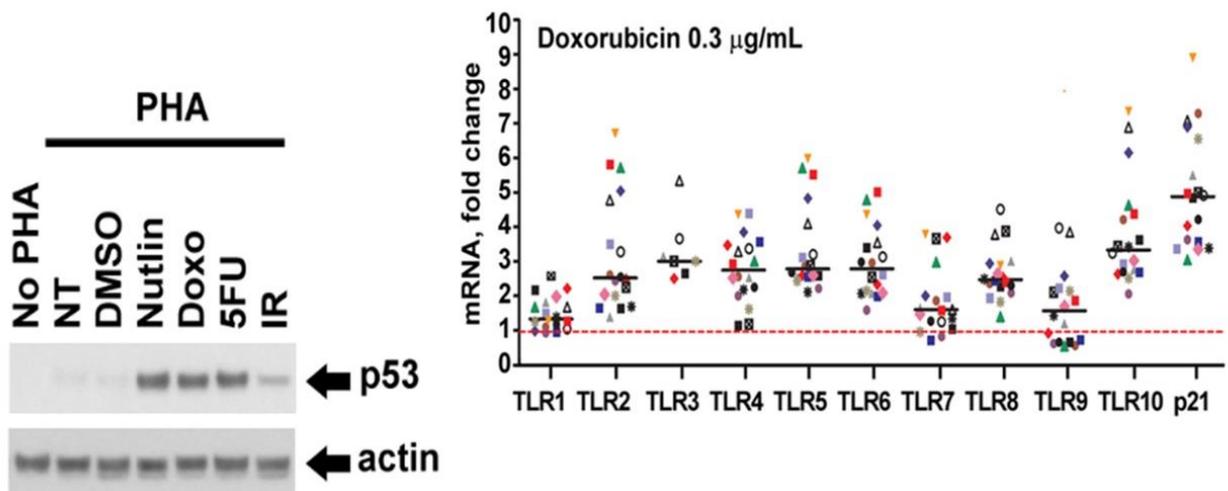


Figura 9. p53 Como regulador importante de TLR3 (Menéndez, et al., 2011).

2.3 Supresor de tumores p53 y sus mecanismos anti-tumorales.

Tras ser descubierta como un supresor tumoral hace poco más de 30 años, la proteína p53, se ha reconocido como un factor clave de las vías en respuesta al estrés celular. Ésta proteína permite la reparación y supervivencia celular o la eliminación de células que se encuentran gravemente dañadas, siendo por lo tanto su objetivo principal proteger al organismo del crecimiento de un tumor canceroso (Hofseth, et al., 2004).

La estructura de la proteína p53 incluye dos dominios de activación transcripcional amino-terminal (TAD1 y TAD2), un dominio rico en prolina (PRD), un dominio de unión al DNA (DBD), un dominio de tetramerización (TET) y una región carboxi-terminal rica en residuos básicos. (Figura 10).

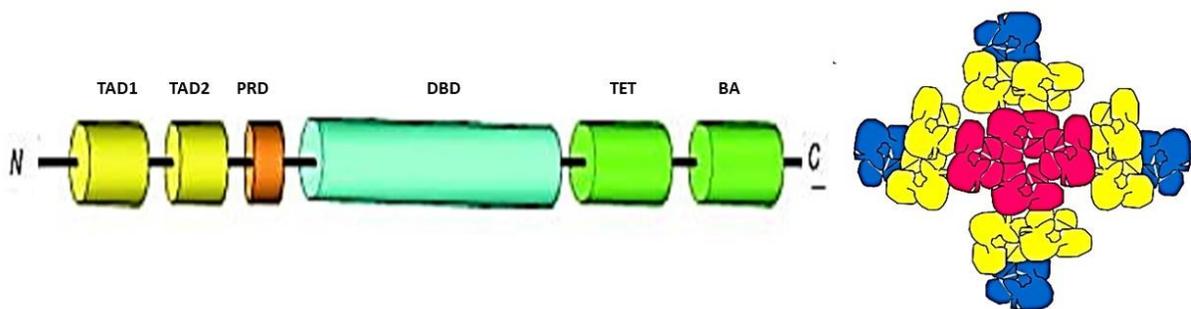


Figura 10. Estructura y Forma globular (activa) de p53 (Tomada y modificada de: Orozco M, et al., 2017).

P53 es activado en respuesta a diversas formas de estrés celular, como daño al DNA, hipoxia, infección viral, choque térmico y estrés mitogénico u oncogénico, entre otros, (Figura 11) los cuales inducen la tetramerización de la proteína, que es su forma activa (Figura 10).

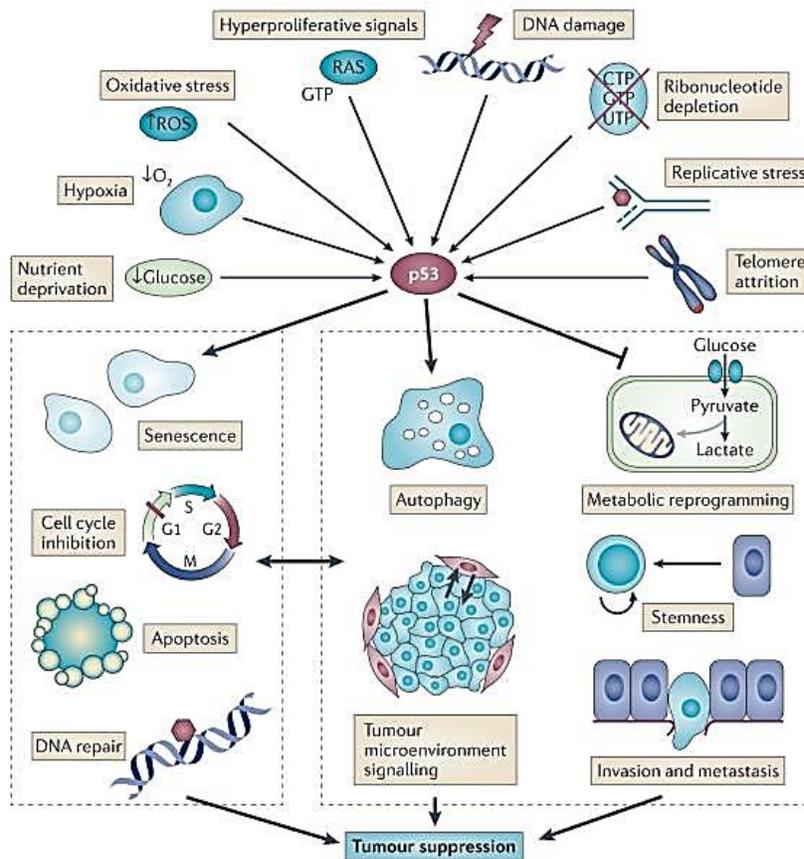


Figura 11. Activación de p53 (Kathryn T. et al., Rev. Cáncer, 2014).

Los genes que son regulados por la proteína p53 incluyen los asociados al arresto del ciclo celular, a la muerte celular programada, la senescencia, la inhibición de la angiogénesis, así como genes asociados a la regulación del ambiente tumoral como los genes que codifican para los TLRs, incluido el gen que codifica para TLR3, como se mencionó anteriormente.

El mecanismo a través del que p53 regula la expresión de sus genes blanco consiste en la tetramerización y unión a elementos de respuesta específicos (P53RE) los cuales se encuentran corriente arriba (upstream) de sus genes objetivo. (Herrero A. et al., 2003), (Figura 12).

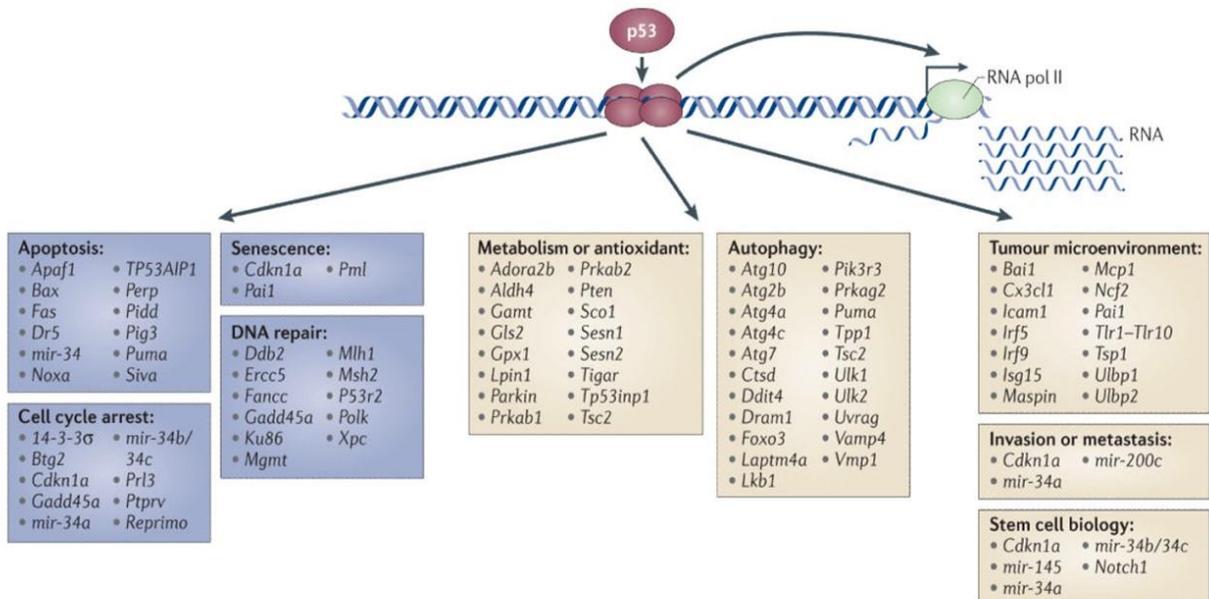


Figura 12. Expresión de genes al ser activado p53 (Kathryn T. et al., Rev. Cáncer, 2014)

2.4 Atenuación de la actividad de p53 en el CaP.

Siendo p53 el principal regulador de la expresión de TLR3, el estatus de p53 en las células tumorales, es un marcador de predicción de la respuesta celular a la activación con PIC y otros agonistas sintéticos en la práctica clínica (Taura M. et al., 2008).

2.4.1 Mutaciones.

De manera relevante, este supresor de tumores se encuentra mutado en más del 50% de los diferentes tipos de cáncer, siendo las mutaciones en el DBD (mutaciones hot-spot), las principalmente identificadas en cáncer (95%), y dando lugar a la incapacidad de p53 de unirse a sus elementos de respuesta en el DNA y con ello inactivando las vías antitumorales, incluyendo la expresión y transactivación del gen TLR3, (Figura 13) (Herrero A. et al., 2016).

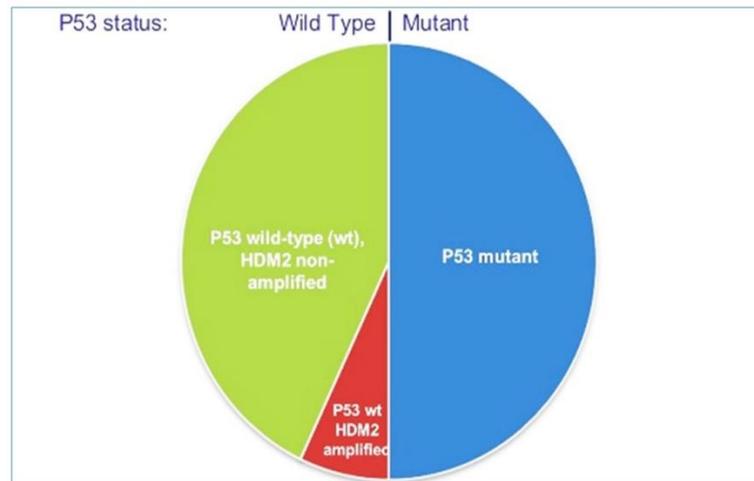


Figura 13. Estatus de p53 en células Wild Type (WT) y mutantes (Sanofi).

Las mutaciones hot-spot se localizan en los residuos R175, G245, R248, R249, R273 y R282 del DBD. Estas mutaciones *TP53* se pueden clasificar en dos categorías: 1) Mutaciones de contacto: las cuales afectan residuos de aminoácidos involucrados en el contacto directo de p53 con el DNA en sus elementos de respuesta. Sin embargo, no involucra modificaciones en el plegamiento de la proteína y 2) Mutaciones estructurales que involucran modificaciones en los aminoácidos asociados al plegamiento correcto de la proteína en el dominio de unión al DNA (Figura 14). Ambos tipos de mutaciones impiden la unión de p53 a sus elementos de respuesta en el DNA, dando lugar a la incapacidad de p53 de transactivar sus genes blanco, incluyendo la transactivación del gen TLR3. (Herrero A. et al., 2016).

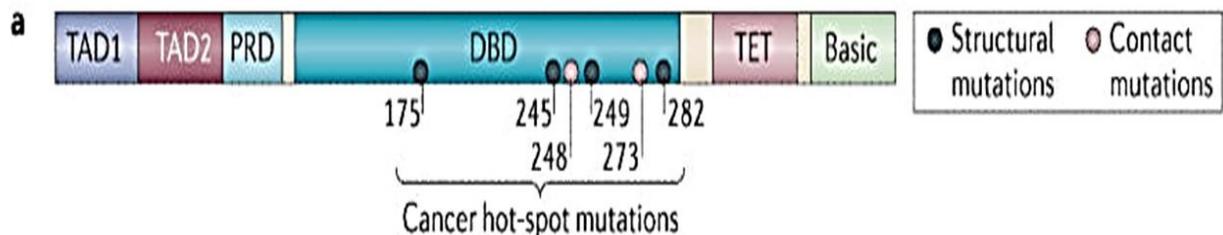


Figura 14. Mutaciones en el dominio de unión. (Herrero A. et al., 2016).

2.4.2 Incremento de sus reguladores negativos.

Otras formas de atenuación de p53 incluyen la sobre-expresión de sus reguladores negativos (principalmente MDM2), constituyendo un 10% de los casos, como se mostró en la Figura 11.

En las células, p53 y MDM2 se encuentran autorregulados estrictamente a través del circuito de retroalimentación negativa (Figura 15). Este circuito de retroalimentación auto-regulatorio trabaja a partir de la transcripción de MDM2 iniciada por el mismo p53 activado, lo cual lo conduce al incremento de la expresión de mRNA y de la proteína MDM2 (Herrero A. et al., 2016).

En condiciones fisiológicas normales, p53 tiene una vida media muy corta, debido a la degradación continua inducida por MDM2, siendo sus dos funciones la unión al dominio de transactivación de p53, su ubiquitinación y envío a degradación en el proteosoma, así como la exportación de la proteína desde el núcleo hacia el citoplasma (Herrero A. et al., 2016).

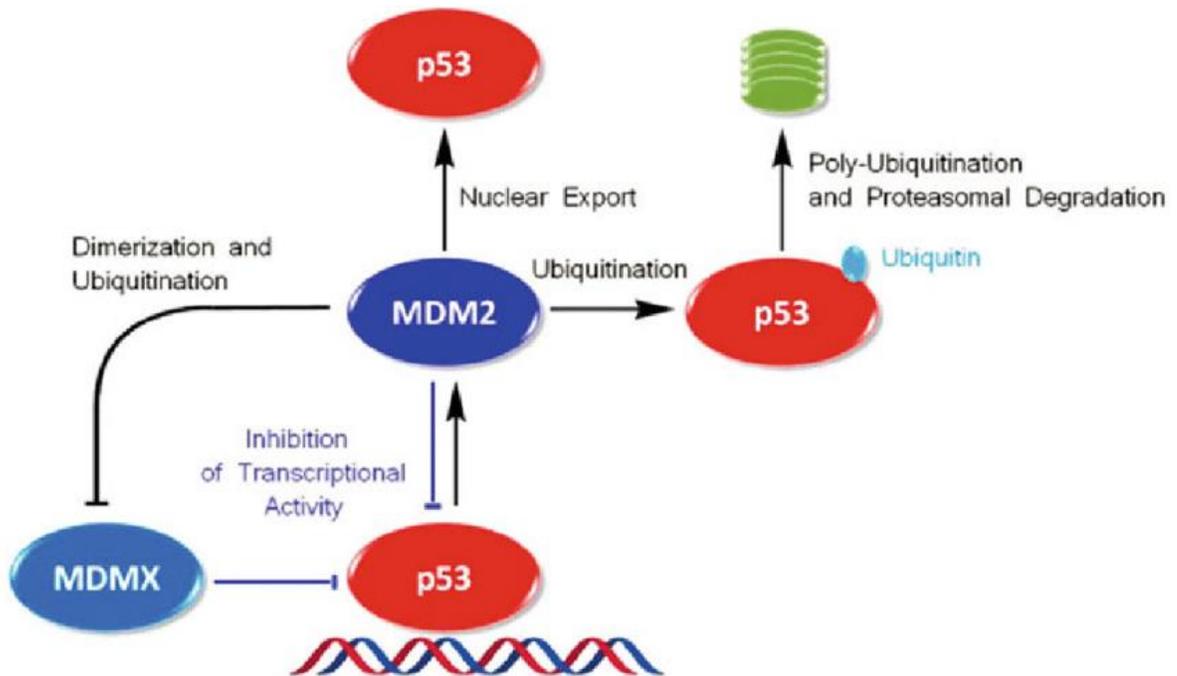


Figura 15. Autorregulación de p53/MDM2. (Yu B. et al., 2018).

2.4.3 Desbalance de isoformas de p53.

Una tercera forma de atenuación de p53 incluye el desbalance de las isoformas de esta proteína que se generan de manera normal a través de los siguientes mecanismos (Figura 16):

1. Uso de dos sitios de iniciación de la transcripción alternativos (P1 Y P2).
2. Uso de cuatro codones de inicio (ATG1, ATG40, ATG160, ATG133)
3. Splicing alternativo en los de intrones 2 y 9 (lo que genera las isoformas σ , β , y γ)

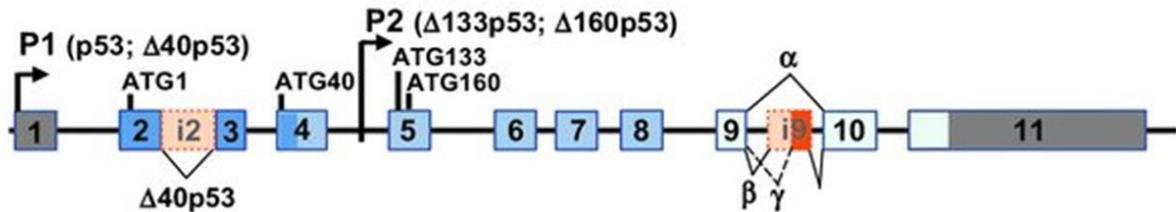


Figura 16. Mecanismos de generación de isoformas de p53 (Herrero A. et al., 2016).

Las 12 isoformas de la proteína p53 comparten una región común en el DBD (Figura 17), pero tienen diferentes dominios de transactivación y dominios C-terminales, que les permite regular de una manera diferencial la expresión de diferentes genes blanco de p53 al tetramerizarse (Herrero A. et al., 2003).

Las alteraciones en su expresión pueden dar lugar a una desregulación de la vía de p53 resultando en cáncer y otras enfermedades (Florijan, M. et al., 2019).



Figura 17. Estructura de las isoformas de p53 (Herrero A. et al., 2016).

En los últimos años, se ha demostrado que isoformas de p53 son diferencialmente expresadas en diferentes tipos de cáncer humano, como cáncer de mama, de colon, melanoma, carcinoma renal, tumores de cuello y cabeza, hepático, colocalcarinoma, leucemia mieloide aguda, cáncer de ovario, de pulmón y glioblastoma. De manera importante, se ha descrito una asociación entre la expresión de las isoformas de p53, la respuesta clínica y el pronóstico, (López F. et al., 2011).

En el presente trabajo, se propone que la expresión disminuída de TLR3 en células epiteliales transformadas con iAs se debe a una alteración en la función de p53 por cualquiera de los mecanismos aquí descritos.

3. JUSTIFICACIÓN

El cáncer de próstata (CaP) es la segunda causa de muerte por cáncer en varones alrededor del mundo y en México y la exposición crónica a iAs es considerada un factor de riesgo importante. En fases iniciales el CaP presenta una alta supervivencia, sin embargo, en etapas avanzadas la supervivencia disminuye drásticamente debido principalmente a la quimioresistencia del tumor y su invasión a otros tejidos.

La activación de TLR3 mediante su agonista sintético PIC, se ha propuesto como una terapia anti-cáncer prometedora en fases avanzadas y en tipos de cáncer que presentan resistencia a la quimioterapia, sin embargo, en células prostáticas transformadas con iAs este receptor se encuentra disminuido y no responde de manera normal a la activación con su agonista sintético PIC, por lo que se propone que los mecanismos que regulan la expresión de TLR3 se encuentra alterados en estas células. El factor de transcripción p53 se considera como el principal regulador de la expresión de TLR3, sin embargo, en el cáncer, la actividad de p53 como transactivador de sus genes blanco, puede estar alterada por diversos mecanismos que incluyen las mutaciones en el gen *TP53*, principalmente las hot-spot (que impiden su unión al DNA), así como una expresión alterada de sus isoformas o disminución de su actividad por sobre-expresión de sus reguladores negativos por lo que en este trabajo se investiga el estatus de p53 en las células transformadas con iAs. En este trabajo se estudiará el estatus de p53 haciendo énfasis en estos tres mecanismos de regulación negativa de la proteína.

4. HIPÓTESIS

Las células prostáticas epiteliales transformadas *in vitro* con arsenito de sodio muestran una alteración en la función/expresión de p53, lo que correlaciona con la disminución en la expresión de TLR3 en la línea celular CAsE-PE, (Figura 18).

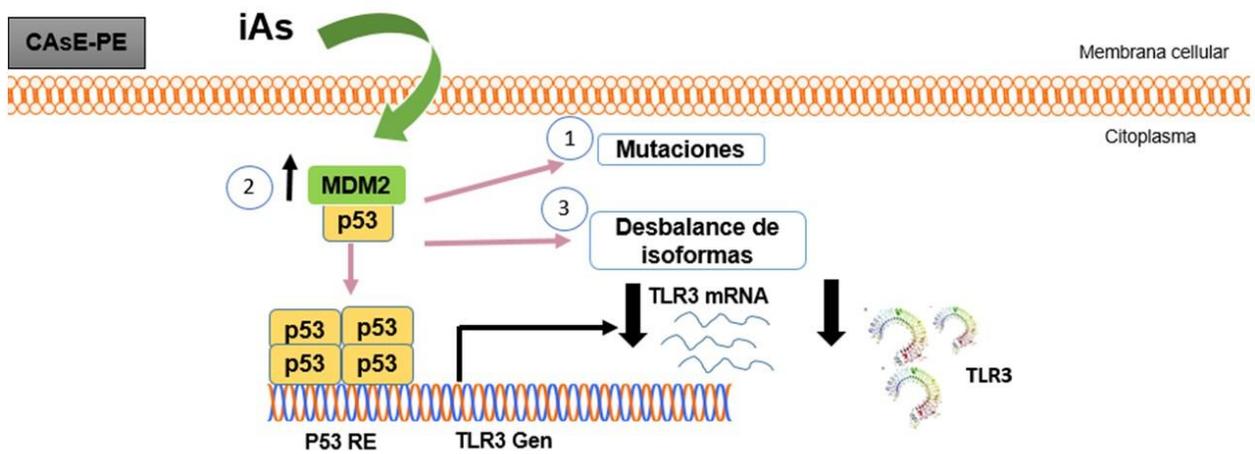


Figura 18. Hipótesis.

5. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el estatus de p53 y de su regulador negativo MDM2 en células prostáticas transformadas con arsenito de sodio CASe-PE, e identificar su asociación con los niveles de expresión de TLR3 en comparación con células prostáticas no transformadas RWPE-1.

6. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar el nivel de expresión de p53 tanto a nivel de mRNA mensajero como de la proteína y su relación con la expresión de TLR3 en células CASe-PE mediante RT-PCR y WB.
2. Evaluar el nivel de expresión de MDM2 (regulador negativo de p53), a nivel del mensajero como de la proteína mediante RT-PCR y WB.
3. Determinar la presencia de mutaciones de tipo hot-spot y otras en *TP53* mediante secuenciación basada en el método de Sanger.
4. Determinar la presencia de isoformas de p53 mediante WB usando diferentes anticuerpos.

7. ESTRATEGIA METODOLÓGICA GENERAL

Para cumplir con los objetivos se utilizaron las líneas celulares RWPE-1 (células epiteliales prostáticas no tumorigénicas) y CasE-PE (células diferenciadas transformadas en fenotipo maligno por exposición crónica al arsénico), las cuales fueron amablemente donadas por el Dr. Erik Tokar, investigador del National Institute of Environmental Health Sciences (NIEHS), en Durham, North Carolina, USA.

A partir de triplicados de estos cultivos RWPE-1 y CAsE-PE se realizó la extracción de RNA y proteínas. El RNA total se utilizó para dos diferentes propósitos: 1) realizar secuenciación de cDNA mediante el método de Sanger después de amplificar el gen de p53 con diferentes pares de oligonucleótidos y 2) determinar la expresión de los mensajeros que codifican para las proteínas p53, TLR3 y MDM2 con y sin exposición a Doxorubicina (Doxo). Por otro lado, las proteínas fueron utilizadas para la determinación de la expresión de p53, TLR3, MDM2 con y sin exposición a Doxo y para analizar la presencia de isoformas de p53 mediante WB, (Figura 19).

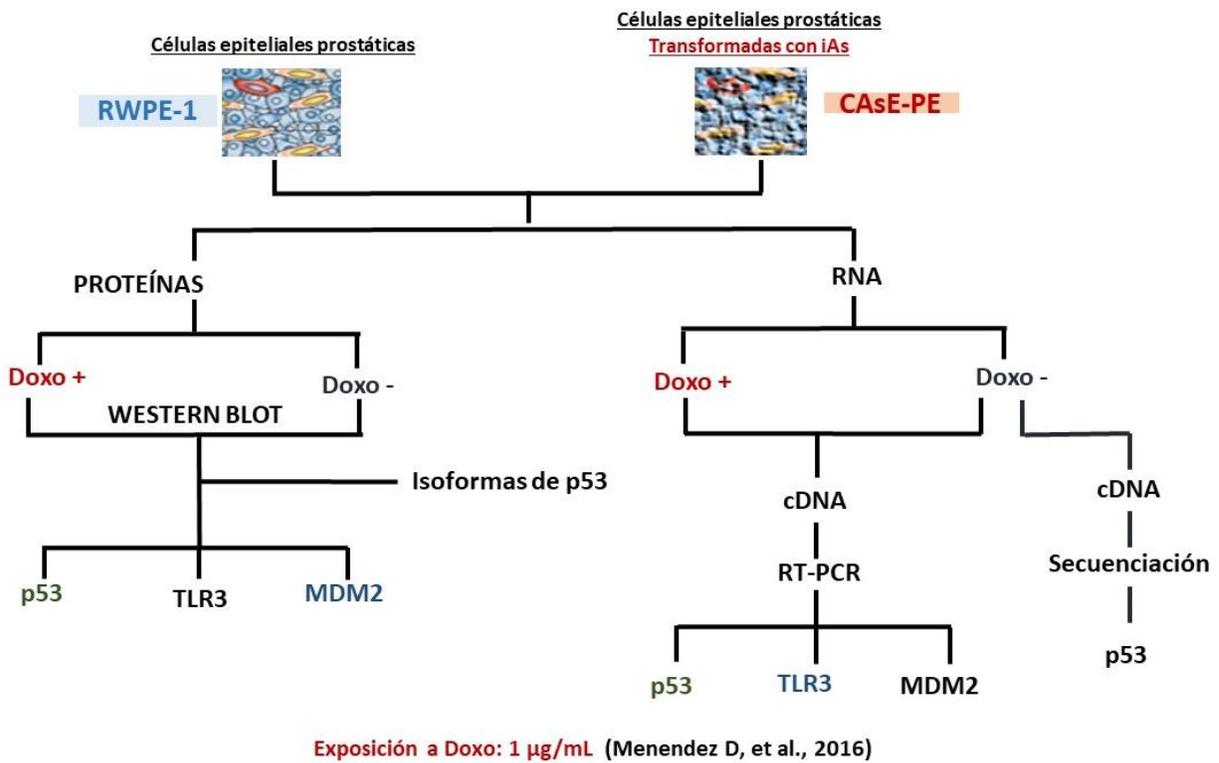


Figura 19. Estrategia metodológica general.

7.1 Análisis estadístico.

El análisis estadístico que se realizó fue a través de Anova para comparar todos los grupos entre sí, considerando significativo un valor de $p < 0.05$.

8. MATERIALES Y MÉTODOS

8.1 Líneas celulares y reactivos.

En este trabajo se utilizaron células epiteliales prostáticas no tumorigénicas (RWPE-1), así como células diferenciadas transformadas al fenotipo maligno por exposición crónica al arsénico (CAsE-PE), las cuales fueron amablemente donadas por el Dr. Erik Tokar del National Institute of Environmental Health (NIEHS), North Carolina, USA.

Las Líneas celulares RWPE-1 y CAsE-PE fueron cultivadas por triplicado en medio KSFM (Keratinocyte Serum Free Medium) suplementado con 50 µg/mL de Extracto de Pituitaria Bovina (BPE) y 5 ng/mL de Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF), adquirido por GIBCO®, se incubaron a 37 ° C en una atmósfera humidificada que contenía 5% de dióxido de carbono.

En otro set de experimentos, las dos líneas celulares fueron cultivadas en las condiciones descritas y expuestas por triplicado a doxorubicina (Doxo) 1 µg/mL (Menéndez D, et al., 2016), fármaco anti-tumoral que induce la expresión de p53 al provocar daño al DNA.

A partir de grupos de triplicados de estos cultivos, se realizó la extracción de RNA (ANEXO 4) y proteínas totales (ANEXO 1), para realizar los diferentes experimentos propuestos:

- 1) realizar secuenciación del gen *TP53* a partir de RNA a través del uso de con tres diferentes pares de oligonucleótidos.
- 2) determinar la expresión de los mensajeros que codifican para las proteínas p53, TLR3 y MDM2 y para analizar la presencia de isoformas de p53 mediante WB.

8.2 Expresión de las proteínas p53, MDM2 y TLR3.

8.2.1 Extracción de proteínas.

Para ambas líneas celulares (RWPE-1/ CAsE-PE), a un 80% de confluencia, expuestas o no a Doxo, se retiró el medio de cultivo, se lisó a las células con 3920 μL de RIPA buffer (Radio Inmuno Precipitation buffer), complementado con 40 μL de coctel inhibidor de proteasas 10 $\mu\text{L}/\text{mL}$ (HALT, aprotinina, bestatina, E-64, Leupeptin, Orthovanadato de sodio, pirofosfato de sodio, β -Glicerofosfato y EDTA) y 40 μL de PMSF o fluoruro de fenilmetanosulfonilo (Thermofisher). Posteriormente, cada muestra fue sonicada 10 veces con pulsos de 5 segundos, a una intensidad de 3, siempre se mantuvo el extracto en hielo (ANEXO 1).

8.2.2 Cuantificación de proteínas.

La concentración de las proteínas se determinó a través del método de Bradford (SIGMA-ALDRICH, USA), se preparó una solución que contenía 10 mg de albúmina sérica bovina (BSA) en 1mL de RIPA Buffer, se ajustó la muestra a 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ para la curva de calibración la cual requiere 6 puntos con 0, 2, 4, 6, 8 y 20 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de BSA (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) y 1 mL de reactivo de Bradford, su lectura se realizó en el equipo Nanodrop (ANEXO2).

8.3 Western blot (WB).

Las proteínas se ajustaron a una concentración de 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ para cargar 30 μg de muestra al gel, se corrieron en geles de acrilamida al 10%. Para ello, se preparó una solución de 10 mL conteniendo 4 mL de agua; 3,3 mL de acrilamida/bis-acrilamida (30%) (Bio-Rad); 2,5 mL de Tris (pH 8,8) (1,5 M); 0,1 mL de SDS (10%), 0,1 mL de APS (10%), 0,004 mL de TEMED (Thermofisher).

Para la preparación del gel concentrador se prepararon 5 mL de una solución que contenía 3.4 mL de agua; 0.85 mL de acrilamida (30%) de Biorad; 0,625 mL de Tris (pH 6,8) (1,0 M) (Bio-Rad); 0.05 mL SDS (10%) de Thermofisher, 0.05 mL APS (10%)

de Thermofisher, 0.005 mL TEMED Thermo Scientific™ Tetrametiletilendiamina (TEMED) Pierce™.

En el gel ya solidificado se cargó 30 o 60 µg de cada muestra de proteína, se separaron en base a su peso molecular y carga mediante electroforesis a 80 Volts durante 2 horas en buffer de corrida. Se realizó la transferencia de la proteína a una membrana de difluoruro de polivinileno (PVDF) 90 minutos a 100 Volts. Al término de la transferencia, se tiñeron las membranas con solución de rojo Ponceau y se cortaron de acuerdo a los pesos moleculares de las proteínas de interés, TLR3 (102 kDa), MDM2 (100 kDa), β-actina (43 kDa) y p53 (53 kDa), cada fracción se incubó con el anticuerpo primario correspondiente, anti-TLR3, anti-MDM2 (adquirido en Santa Cruz), con DO1 (adquirido en Santa Cruz) durante toda la noche, utilizando una técnica de cámara húmeda (ANEXO 3). La detección de la proteína β-actina fue utilizada como control para normalizar la carga. Para su detección, el anticuerpo correspondiente, se incubó solamente durante una hora dado el nivel alto de expresión y dado a que este anticuerpo está acoplado a la peroxidasa de rábano, no se requiere el uso de un anticuerpo secundario para su detección.

Tras su incubación con el anticuerpo primario, las membranas fueron lavadas con TBS 1X+ Tween (TBST) 1X por tres ocasiones, durante 10 minutos en agitación.

Las membranas se incubaron con el anticuerpo secundario (p53 y MDM2) α-Mouse y (TLR3) anti-rabbit con 2 horas en agitación y lavados con TBS 1X+ Tween 1X. Las bandas de interés de las proteínas se visualizaron incubando las membranas con el sustrato de HRP quimioluminiscente (Luminol®) adquirido en GE Healthcare y exposición a una película fotográfica en la oscuridad. El análisis de densitometría de las bandas se realizó utilizando el software ImageJ.

8.4 Expresión de mRNA de *p53*, *MDM2* y *TLR3*.

8.4.1 Extracción de RNA.

Para ambas líneas celulares (RWPE-1/ CAsE-PE), las cuales se encontraban a una confluencia de 80%, se retiró el medio de cultivo y las células se lisaron añadiendo

1000 μL de Trizol®, el cual se recuperó en un tubo eppendorff de 1.5 ml. Posteriormente, se añadió cloroformo (200 μL) a cada vial, se agitó vigorosamente y se incubó 2-3 minutos y luego se centrifugó a 12000 G durante 15 minutos a 4°C. La fase acuosa se recuperó en un tubo eppendorff de 1.5 mL y se agregó el isopropanol (500 μL) para precipitar el RNA. El RNA se precipitó durante toda la noche a -20°C, y luego se centrifugó a 12000 G 10 minutos a 4°C y se descartó el sobrenadante. Posteriormente se hizo un lavado con una solución de etanol al 70% con 500 o 1000 μl para centrifugar a 7500 g durante 5 minutos. Se eliminó el etanol y el RNA aislado se resuspendió con agua libre de RNAasas (DEPC). La concentración y pureza de RNA se determinó en el equipo Nanodrop a una λ de 260 y 280nm. La concentración de RNA se ajustó a 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y se determinó una buena pureza de la relación de las absorbancias a 260/280 en el rango de 1.8 a 2.0, si la pureza de la muestra no se encontraba dentro de este rango, se procedió a la purificación del RNA (ANEXO 4).

8.4.2 Purificación de RNA.

Para cada reacción de 50 μL , se añadió 85 μL de agua DEPC más 15 μL de acetato de sodio 3M, posteriormente se adicionó a esta mezcla en relación 1:1 fenol/cloroformo y dos volúmenes de cloroformo, se centrifugó a 12000 g durante 15 minutos a 4°C y se recolectó la fase acuosa en un nuevo tubo eppendorff de 1.5 ml. Para precipitar el RNA se adicionaron dos volúmenes de etanol (100%) y se incubó a -20°C por 30 minutos y se centrifugó a 12000 G 10 minutos a 4°C, se descartó el sobrenadante y se lavó el pellet con 500 μL de etanol frío al 70%. Posteriormente se centrifugó nuevamente a 7500 g 5 minutos, se eliminó el etanol y se resuspendió el RNA purificado en 20 μL de agua DEPC. La concentración y pureza de RNA se determinó en Nanodrop con mediciones a 260/280nm. La concentración de cada muestra de RNA se ajustó a 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y se determinó una buena pureza con un cociente 260/280 en el rango de 1.8 a 2.0 (ANEXO 5).

8.5 Transcripción reversa (RT) del RNA.

La RT se realizó para obtener cDNA a partir del RNA de ambas líneas celulares, RWPE-1 y CASe-PE. La reacción fue preparada de acuerdo a lo que se describe en las Tablas 1, 2 y 3. En la Tabla 3 se muestran las temperaturas y tiempos de reacción.

Tabla 1. Componentes de la Reacción de Retrotranscripción.

Reactivo	Volumen (μL)
RNA	10
Random Primers (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	0.2
Agua DEPC 0.1%	0.8
Volumen final	11
Calentamiento a 65°C por 5 min	

Tabla 2. Reacción de Retrotranscripción.

Reactivo	Volumen (μL)
dNTP's (10 mM)	1
Buffer RT 5X	4
DTT	2
Rnasa OUT	1
Super Script II	1

Volumen final 20 μL .

Tabla 3. Condiciones de temperatura y tiempo de la Retrotranscripción.

Paso	Tiempo (min)	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)
Hibridación	10	25
Polimerización de cDNA	50	42
Desactivación de la enzima	15	70

Finalizada la retrotranscripción se cuantificó el producto (cDNA) en Nanodrop y se determinó una buena pureza con un cociente 260/280 en el rango de 1.8 a 2.0 (ANEXO 6).

8.6 Secuenciación del gen *TP53*.

El cDNA obtenido de la Retrotranscripción se utilizó para amplificar secciones específicas del gen de interés con oligonucleótidos que abarcan diferentes dominios del gen *TP53*, utilizando la enzima PFU (Thermo Scientific™ DNA polimerasa), esta enzima es una DNA polimerasa que optimiza la PCR, posee alta fidelidad y es altamente termoestable (ANEXO 7).

Las secuencias de los oligonucleótidos fueron las siguientes:

Tabla 4. Secuencia de los oligos.

Oligos	Secuencia
182 Forward	GGGGGATCCATGGAGGAGCCGCAG
183 Reverse	CCCTCAACGGAAACCGTATTCGAA
206 Forward	AACGGATCCATGCTGGGCTTCTT
207 Reverse	CCCAAGCTTTCATTCCTCTGTGCGC
208 Forward	AAGGGATCCATGGAGAATCTCCGCAAGAAAG
209 Reverse	TTTAAAGCTTTCAGTCTGAGTCAGGCCCTTCTG

Para cada reacción se prepararon 25 µL en volumen final: enzima PFU 1,5 µL, DNA (RWPE-1/ CAsE-PE) 0,5 µL, primer FW 0,5 µL, primer RV 0,5 µL, Buffer 5X 2,5 µL,

H₂O 16,25 µL, dNTP's 0,5 µL y DMSO 5% 1.25 µL, (High way- Biología Molecular), el programa que se utilizó en el termociclador fue: 95°C 5 minutos, 50°C 30 segundos, 72°C 2 minutos, 72°C 10 minutos y 10°C infinito, este ciclo se repitió 30 veces.

Al finalizar la PCR, fue necesario ver el producto como una banda única en un gel de agarosa (0.4 g de agarosa, 40 mL de TAE 1X y 1 µL de Bromuro de etidio), cuyo orden de carga es: 4 µL de Marcador de peso molecular (1er carril), posteriormente las muestras, en conjunto con buffer de carga carriles 2 en adelante (Gel Loading Dye, Purple (6X)- New England BioLabs). Las muestras se corrieron a 80 volts durante 20 minutos.

Las bandas obtenidas correspondientes a los productos de amplificación esperados, se purificaron utilizando un sistema de purificación comercial (Jena Bioscience). Para ello, las bandas se recortaron y pesaron, se adicionaron 2 volúmenes de buffer de unión, más dos volúmenes de isopropanol; se calentó en un baño a 70°C hasta disolver el gel. Se añadieron 100 µL buffer de activación a las columnas de purificación, centrifugando durante 30 segundos a 1000 g. Posteriormente se adicionó la mezcla que contenía la muestra, se centrifugó nuevamente 30 segundos a 1000 g, se descartó el sobrenadante y se adicionó 700 µL de buffer de lavado, se centrifugó 30 segundos a 1000 g seguida de otra centrifugación durante 2 minutos a 1000 g. A continuación, se descartó el vial junto con el resto de buffer de lavado, sin descartar la columna y en un nuevo tubo eppendorf (1.5 mL) rotulado, se adicionó a la columna 25 µL de buffer de elución, se dejó reposar 1 minuto para centrifugar 1 minuto a 10, 000 g. El cDNA purificado se obtuvo en el tubo eppendorf. Purificado el cDNA, se cuantificó en un espectrofotómetro UV Nanodrop (ANEXO 9).

Para determinar la integridad de la muestra se preparó un gel de agarosa al 1%, se cargaron 4 µL del cDNA purificado y, observándose una sola banda. Una vez comprobada la integridad de todas las muestras, éstas se enviaron al Laboratorio Nacional de Biotecnología Agrícola, Medica y Ambiental (LANBAMA), cuyos requisitos de envío se pueden revisar en el ANEXO 8.

A continuación, se muestran las regiones de *TP53* amplificadas por los diferentes oligonucleótidos utilizados para la secuenciación del gen.

Tabla 5. Secuencia amplificada de p53 por los oligonucleótidos.

Oligonucleótidos	Sección amplificada de gen p53
182 Forward (Fw)	<p>CAsE-PE</p> <p>CACCCACCGGTGAGCCCTCTGAGTCAGGAACATTTTCAGACCTATGGAACTACTTCCTGAAAACAACGTTCTGTCCCCCTTGCCGTCCCAAGCAATGGATGATTTGATGCTGTCCCCGGA CGATATTGAACAATGGTTCCTGAAGACCCAGGTCCAGATGAAGCTCCCAGAATGCCAGAGGCTGCTCCCCCGTGGCC CCTGCACCAGCAGCTCCTACACCGGCGGCCCTGCACCA GCCCCCTCCTGGCCCCTGTCATCTTCTGTCCCTTCCCAGAAACCTACCAGGGCAGCTACGGTTTCCGTTGAAAGCTTCC CCCA</p> <hr/> <p>RWPE-1</p> <p>GACTTACGTGAGCCCTCTGAGTCAGGAACATTTTCAGACCTATGGAACTACTTCCTGAAAACAACGTTCTGTCCCCCTTGCCGTCCCAAGCAATGGATGATTTGATGCTGTCCCCGGAC GATATTGAACAATGGTTCCTGAAGACCCAGGTCCAGATGAAGCTCCCAGAATGCCAGAGGCTGCTCCCCCGTGGCCC CTGCACCAGCAGCTCCTACACCGGCGGCCCTGCACCAG CCCCCTCCTGGCCCCTGTCATCTTCTGTCCCTTCCCAGAAACCTACCAGGGCAGCTACGGTTTCCGTTGAAAGCTTCC CCAATA</p>
183 Reverse (Rv)	<p>CAsE-PE</p>

	<p>ATCGTGGTAGTTTCTGGGAGGGACAGAAGATGACAGGGG CCAGGAGGGGGCTGGTGCAGGGGCGCCGGTGTAGGAG CTGCTGGTGCAGGGGCCACGGGGGGAGCAGCCTCTGGC ATTCTGGGAGCTTCATCTGGACCTGGGTCTTCAGTGAACC ATTGTTCAATATCGTCCGGGGACAGCATCAAATCATCCATT GCTTGGGACGGCAAGGGGGACAGAACGTTGTTTTTCAGGA AGTAGTTTCCATAGGTCTGAAAATGTTTCCTGACTCAGAGG GGGCTCGACGCTAGGATCTGACTGCGGCTCCTCCATGGA TCCGTAAA</p>
	<p>RWPE-1</p> <p>ATCAGTTAGCTTCTGGGAGGGACAGAAGATGACAGGGGC CAGGAGGGGGCTGGTGCAGGGGCGCCGGTGTAGGAGC TGCTGGTGCAGGGGCCACGGGGGGAGCAGCCTCTGGCAT TCTGGGAGCTTCATCTGGACCTGGGTCTTCAGTGAACCAT TGTTCAATATCGTCCGGGGACAGCATCAAATCATCCATTGC TTGGGACGGCAAGGGGGACAGAACGTTGTTTTTCAGGAAGT AGTTTCCATAGGTCTGAAAATGTTTCCTGACTCAGAGGGG GCTCGACGCTAGGATCTGACTGCGGCTCCTCCATGGATCC GTAAA</p>
206 Fw	<p>CAsE-PE</p> <p>GGCAACAGTCTGTGACTTGCACGTA CTCCCCTGCCCTCAA CAAGATGTTTTGCCAACTGGCCAAGACCTGCCCTGTGCAG CTGTGGGTTGATTCCACACCCCGCCCGGCACCCGCGTC CGCGCCATGGCCATCTACAAGCAGTCACAGCACATGACG GAGGTTGTGAGGCGCTGCCCCCACCATGAGCGCTGCTCA GATAGCGATGGTCTGGCCCCTCCTCAGCATCTTATCCGAG</p>

	<p>TGGAAGGAAATTTGCGTGTGGAGTATTTGGATGACAGAAA CACTTTTCGACATAGTGTGGTGGTGCCCTATGAGCCGCCT GAGGTTGGCTCTGACTGTACCACCATCCACTACAACACTACA TGTGTAACAGTTCCTGCATGGGCGGCATGAACCGGAGGC CCATCCTCACCATCATCACACTGGAAGACTCCAGTGGTAA TCTACTGGGACGGAACAGCTTTGAGGTGCGTGTTTGTGCC TGTCCCTGGGAGAGACCGGCGCACAGAGGAATGAAAGCTT GGGA</p>
	<p>RWPE-1</p> <p>CGGGGCACCAAGTCTGTGACTTGACGTACTIONCCCCTGCCC TCAACAAGATGTTTTGCCAACTGGCCAAGACCTGCCCTGT GCAGCTGTGGGTTGATTCCACACCCCCGCCCGGCACCCG CGTCCGCGCCATGGCCATCTACAAGCAGTCACAGCACATG ACGGAGGTTGTGAGGCGCTGCCCCCACCATGAGCGCTGC TCAGATAGCGATGGTCTGGCCCCCTCCTCAGCATCTTATCC GAGTGGAAGGAAATTTGCGTGTGGAGTATTTGGATGACAG AAACACTTTTCGACATAGTGTGGTGGTGCCCTATGAGCCG CCTGAGGTTGGCTCTGACTGTACCACCATCCACTACAAC ACATGTGTAACAGTTCCTGCATGGGCGGCATGAACCGGAG GCCATCCTCACCATCATCACACTGGAAGACTCCAGTGGT AATCTACTGGGACGGAACAGCTTTGAGGTGCGTGTTTGTG CCTGTCCTGGGAGAGACCGGCGCACAGAGGAATGAAAGC TTGGGAA</p>
<p>207 Rv</p>	<p>CAsE-PE</p> <p>GCCTTCATGCGGCACAAACACGCACCTCAAGCTGTTCCGT CCCAGTAGATTACCACTGGAGTCTTCCAGTGTGATGATGG TGAGGATGGGCCTCCGTTTCATGCCGCCCATGCAGGAAC</p>

	<p>TGTTACACATGTAGTTGTAGTGGATGGTGGTACAGTCAGA GCCAACCTCAGGCGGCTCATAGGGCACCACCACACTATGT CGAAAAGTGTTTCTGTCATCCAAATACTCCACACGCAAATT TCCTTCCACTCGGATAAGATGCTGAGGAGGGGCCAGACCA TCGCTATCTGAGCAGCGCTCATGGTGGGGGCAGCGCCTC ACAACCTCCGTCATGTGCTGTGACTGCTTGTAGATGGCCA TGGCGCGGACGCGGGTGCCGGGCGGGGGTGTGGAATCA ACCCACAGCTGCACAGGGCAGGTCTTGGCCAGTTGGCAA AACATCTTGTTGAGGGCAGGGGAGTACGTGCAAGTCACAG ACTTGGCTGTCCCAGAATGCAAGAAGCCCAGCATGGGATC CGTATTA AAA</p>
	<p>RWPE-1</p> <p>GCCTTCAGCAGGCACAACACGCACCTCAAGCTGTTCCGTC CCAGTAGATTACCACTGGAGTCTTCCAGTGTGATGATGGT GAGGATGGGCTCCGGTTCATGCCGCCCATGCAGGA ACT GTTACACATGTAGTTGTAGTGGATGGTGGTACAGTCAGAG CCAACCTCAGGCGGCTCATAGGGCACCACCACACTATGTC GAAAAGTGTTTCTGTCATCCAAATACTCCACACGCAAATTT CCTTCCACTCGGATAAGATGCTGAGGAGGGGCCAGACCAT CGCTATCTGAGCAGCGCTCATGGTGGGGGCAGCGCCTCA CAACCTCCGTCATGTGCTGTGACTGCTTGTAGATGGCCAT GGCGCGGACGCGGGTGCCGGGCGGGGGTGTGGAATCAA CCCACAGCTGCACAGGGCAGGTCTTGGCCAGTTGGCAA ACATCTTGTTGAGGGCAGGGGAGTACGTGCAAGTCACAGA CTTGGCTGTCCCAGAATGCAAGAAGCCCAGCATGGATCCG TTTAAAA</p>
<p>208 Fw</p>	<p>CAsE-PE</p>

	<p>GGAGCCATCACCACGAGCTGCCCCCAGGGAGCACTAAGC GAGCACTGCCCAACAACACCAGCTCCTCTCCCCAGCCAAA GAAGAAACCACTGGATGGAGAATATTTACCCCTTCAGATC CGTGGGCGTGAGCGCTTCGAGATGTTCCGAGAGCTGAAT GAGGCCTTGGA ACTCAAGGATGCCCAGGCTGGGAAGGAG CCAGGGGGGAGCAGGGCTCACTCCAGCCACCTGAAGTCC AAAAAGGGTCAGTCTACCTCCCGCCATAAAAAACTCATGTT CAAGACAGAAGGGCCTGACTCAGACTGAAAGCTTAAAAA</p> <p>RWPE-1</p> <p>GGGACATCAACACGAGCTGCCCCCAGGGAGCACTAAGCG AGCACTGCCCAACAACACCAGCTCCTCTCCCCAGCCAAAG AAGAAACCACTGGATGGAGAATATTTACCCCTTCAGATCC GTGGGCGTGAGCGCTTCGAGATGTTCCGAGAGCTGAATG AGGCCTTGGA ACTCAAGGATGCCCAGGCTGGGAAGGAGC CAGGGGGGAGCAGGGCTCACTCCAGCCACCTGAAGTCCA AAAAGGGTCAGTCTACCTCCCGCCATAAAAAACTCATGTTC AAGACAGAAGGGCCTGACTCAGACTGAAAGCTTAAAAA</p>
209 Rv	<p>CAsE-PE</p> <p>TAAAAATGGAGTTTTTTATGGCGGGAGGTAGACTGACCCTT TTTGGACTTCAGGTGGCTGGAGTGAGCCCTGCTCCCCCT GGCTCCTTCCCAGCCTGGGCATCCTTGAGTTCCAAGGCCT CATTCAGCTCTCGGAACATCTCGAAGCGCTCACGCCACG GATCTGAAGGGTGAAATATTCTCCATCCAGTGGTTTCTTCT TTGGCTGGGGAGAGGAGCTGGTGTGTTGGGCAGTGCTC GCTTAGTGCTCCCTGGGGGCAGCTCGTGGTGAGGCTCCC CTTTCTTGCGGAGATTCTCCATGGATCCCTTAAA</p> <p>RWPE-1</p>

```

CTACCCTGAAATGAGTTTTTTTATGGCGGGAGGTAGACTGA
CCCTTTTTGGACTTCAGGTGGCTGGAGTGAGCCCTGCTCC
CCCCTGGCTCCTTCCCAGCCTGGGCATCCTTGAGTTCCAA
GGCCTCATTGAGCTCTCGGAACATCTCGAAGCGCTCACGC
CCACGGATCTGAAGGGTGAAATATTCTCCATCCAGTGGTT
TCTTCTTTGGCTGGGGAGAGGAGCTGGTGTGTTGGGCAG
TGCTCGCTTAGTGCTCCCTGGGGGCAGCTCGTGGTGAGG
CTCCCCTTTCTTGCGGAGATTCTCCATGGATCCCTTATAA

```

8.7 PCR en tiempo real.

Las reacciones de amplificación del cDNA de las muestras se prepararon de acuerdo con la Tabla 6. En cada caso se añadió 1 µL de muestra a una concentración de (100 ng/µL) a cada tubo de reacción conteniendo el master-mix (Sybr-Green, Thermo) y los oligonucleótidos Fw y Rv. La programación del termociclador se describe en la Tabla 7. El análisis de expresión se realizó en el equipo 7500 System Software de Applied Biosystems para determinar las curvas de disociación y los resultados de las Cts para cada condición incluida. Los cambios de expresión relativa (B-actina) de cada uno de los genes con respecto a su control se calcularon mediante el método de $e^{-\Delta\Delta Ct}$.

Tabla 6. Preparación de la reacción.

Reactivo	Volumen (µL)
Agua	3
SyBr-Green	5
Oligo Fw	0.5
Oligo Rv	0.5
cDNA	1

Tabla 7. Condiciones de termociclado.

Paso	Tiempo (min)	Temperatura (°C)
Desnaturalización inicial	10	95
Desnaturalización	2	95
Alineamiento	0.25	40
Elongación	1	60

Como control de carga de cDNA de las muestras se incluyó la determinación de diferentes HouseKeeping (GADPH, actina, 18s, HPRT, B2M, RN 18s, RPL y TBP) quedando la actina como el HouseKeeping electo para la PCR, la expresión de actina se determinó en una PCR punto final y analizando el producto obtenido en un gel de agarosa al 1%.

9. RESULTADOS

Debido a que p53 es el principal regulador de la expresión de TLR3, el objetivo del presente trabajo fue determinar el estatus de p53 y su asociación con el nivel de expresión de TLR3 en células prostáticas normales (RWPE-1) y transformadas malignamente con arsenito de sodio (CAsE-PE) que muestran una expresión disminuida de TLR3 en comparación con las células RWPE-1

Los resultados que se presentan en este documento, incluyen el análisis de la expresión de la proteína y mensajero de p53, MDM2 y TLR3, solo en los casos donde se identificó.

Así mismo se investigó la presencia de mutaciones en el gen *TP53* en ambas líneas celulares (RWPE-1 y CAsE-PE) mediante secuenciación basada en el método de Sanger. Igualmente, las isoformas de p53 fueron exploradas mediante un análisis de WB preliminar utilizando el anticuerpo policlonal CM-1.

9.1 Nivel de expresión de p53 en RWPE-1 y CAsE-PE.

9.1.1 Expresión de p53 a nivel de proteína.

Para determinar la expresión de la proteína p53 en las líneas celulares RWPE-1 y CAsE-PE, se realizó un análisis por WB. Como se describió en la sección de metodología, triplicados de cultivos de ambas líneas celulares fueron expuestos a 1µg/mL de Doxo de acuerdo a Menéndez D. et al., 2016 durante 24 horas como inductor de la expresión de p53 en ambas líneas celulares.

Este análisis nos permitió determinar la expresión basal de la proteína de interés y evaluar si las líneas celulares responden al estímulo con Doxo.

En la Figura 20 A se muestra el WB de p53. Los resultados del análisis de las imágenes del WB mostraron que, las células CAsE-PE parecen expresar una mayor cantidad de la proteína p53 en comparación con las RWPE-1 en su estado basal (Figura 20 B), Sin embargo, a diferencia de las células RWPE-1, la exposición a Doxo por 24 h, no indujo

un incremento significativo en la expresión de esta proteína en CAsE-PE, pero si se observa un incremento significativo entre RWPE-1 en su estado basal con respecto a las RWPE-1 expuestas a Doxo.

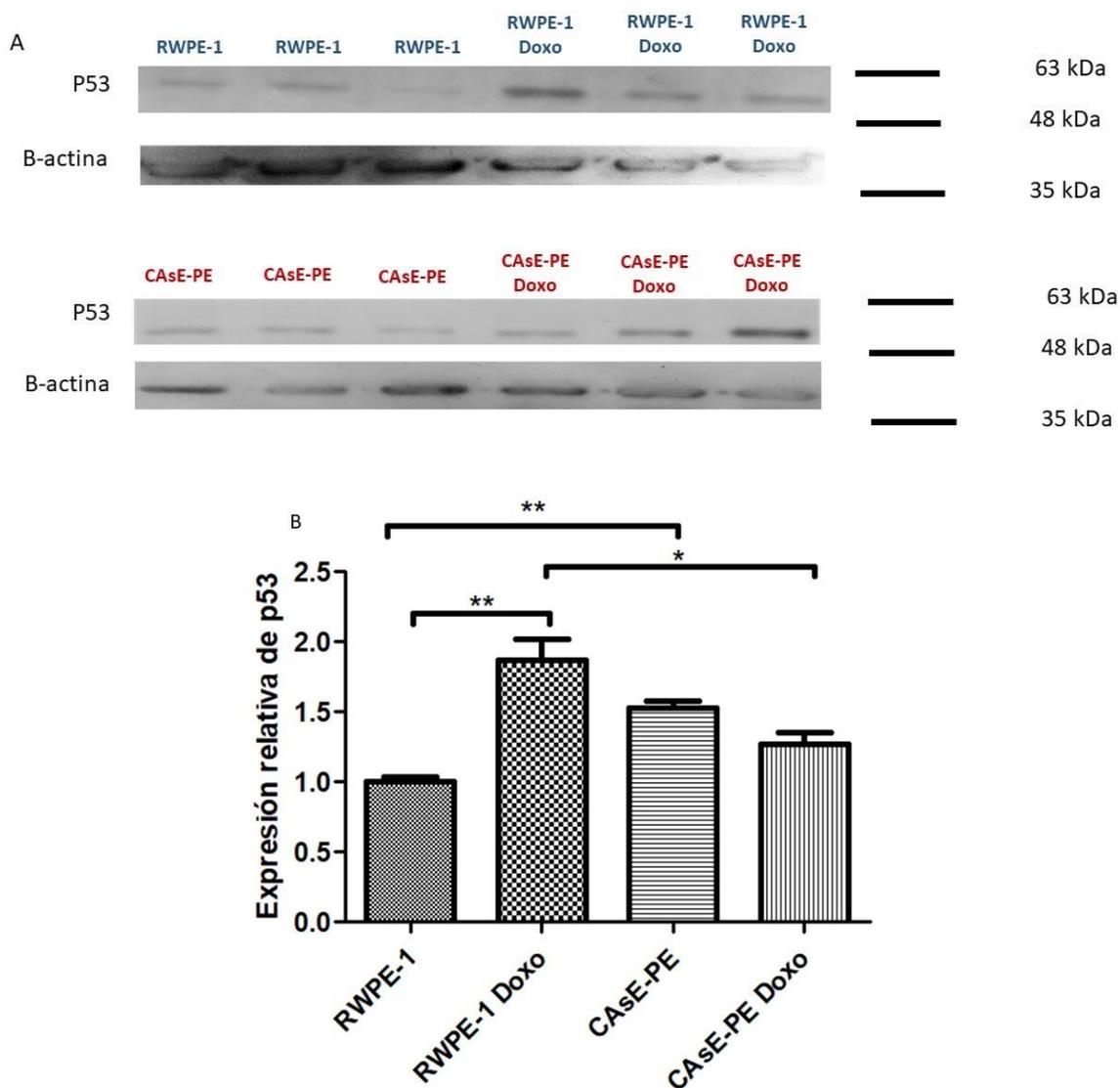


Figura 20. Expresión de la proteína p53 en RWPE-1, CAsE-PE A) WB de RWPE-1 y CAsE-PE en su estado basal y expuestas a 1 μ g/ml de Doxo. B) Expresión p53 en RWPE-1 y CAsE-PE (RWPE-1 & CAsE-PE n=3, **p=0.0011); (RWPE-1 Doxo & CAsE-PE Doxo n=3, *p=0.0212); (RWPE-1 & RWPE-1 Doxo n=3, **p=0.042) y (CAsE-PE & CAsE-PE Doxo n=3, p=0.0530).

9.1.2 Expresión de TLR3 a nivel de proteína.

Los resultados del análisis de las imágenes del WB para el caso de TLR3 no mostraron expresión a nivel de proteína en las líneas celulares en estudio.

9.1.3 Expresión de *p53* y *TLR3* a nivel de RNA mensajero.

A fin de evaluar el nivel de expresión de *p53* a nivel de mRNA se extrajo RNA total (ANEXO 4) a partir de cultivos de células RWPE-1 y CAsE-PE expuestas o no a 1 µg/mL de Doxo a un 90% de confluencia. El RNA total se cuantificó y verificó su pureza; se purificó cuando fue necesario (ANEXO 5) y por último se retrotranscribió a cDNA, el cual fue utilizado para realizar la PCR en tiempo real.

Respecto a la expresión de *p53* y *TLR3*, debido a que los datos arrojados en el análisis de PCR en tiempo real no fueron consistentes, a causa de problemas con la calibración de los detectores del equipo, se tomaron los productos de la PCR de las microplacas y se corrieron en un gel de agarosa al 1%, donde se utilizó un marcador de peso molecular de 1 kb, y un buffer de carga 6X DyE para cargar las muestras. Al término de la corrida, el gel de agarosa fue transiluminado en el equipo de fotodocumentación Gel-Doc 2000 y la imagen fue capturada y procesada a través del software GelDoc. El análisis densitométrico de las bandas se realizó con el programa Image J. Los datos fueron luego analizados con ANOVA de dos vías, para la comparación entre todos los grupos: expresión basal de RWPE-1 y CAsE-PE o tras la exposición a Doxo, usando el programa GraphPad Prism 5.

En la Figura 21 A se muestra el análisis electroforético de los productos de amplificación de *p53*. Los resultados del análisis estadístico mostraron que, tras normalizar con la expresión de actina y bajo las condiciones utilizadas, no se observaron diferencias significativas en la expresión basal del gen *TP53*, a nivel de mensajero entre las líneas celulares RWPE-1 y CAsE-PE, pero tampoco en las mismas líneas celulares después de ser expuestas a Doxo en comparación con la expresión basal (Figura 21 B).

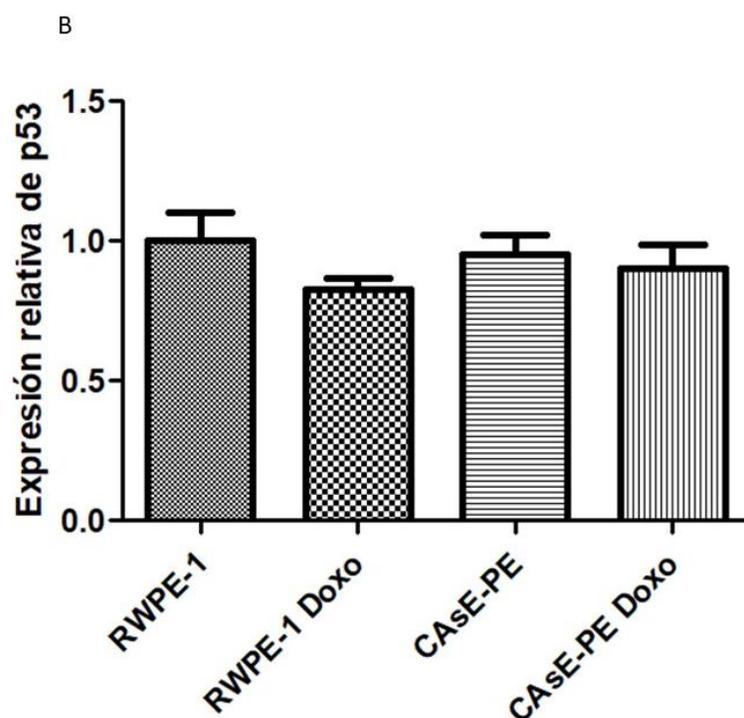
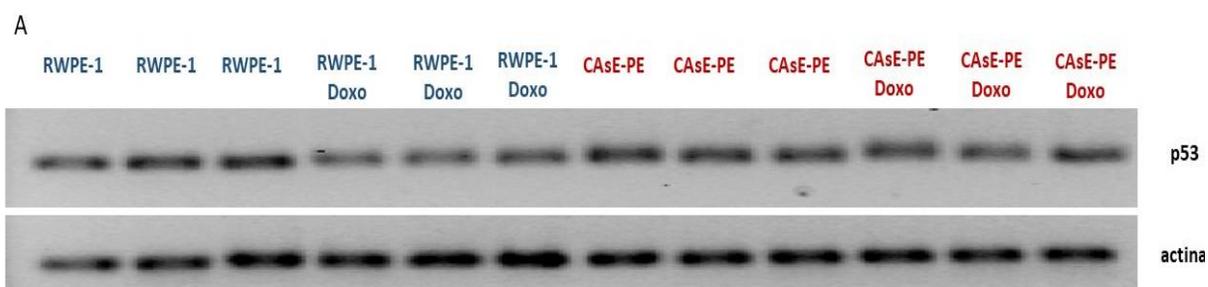


Figura 21. Análisis de, expresión de p53 en RWPE-1 y CAsE-PE con y sin Doxo. A) Electroforesis en gel de Agarosa 1% de RWPE-1 y CAsE-PE en su estado basal y expuestas a Doxo B) Análisis densitométrico y estadístico RWPE-1 y CAsE-PE (RWPE-1 & CAsE-PE n=3, p=0.7110); (RWPE-1 Doxo & CAsE-PE Doxo n=3, p=0.4805); (RWPE-1 & RWPE-1 Doxo n=3, p=0.1830) y (CAsE-PE & CAsE-PE Doxo n=3, p=0.6700).

Por otra parte, los resultados de la densitometría de TLR3, mostraron que la expresión de este receptor tras el tratamiento con Doxo, presenta una tendencia clara a disminuir, sin embargo, el análisis estadístico no mostró una diferencia significativa entre ambas líneas celulares. (Figura 22 A y B).

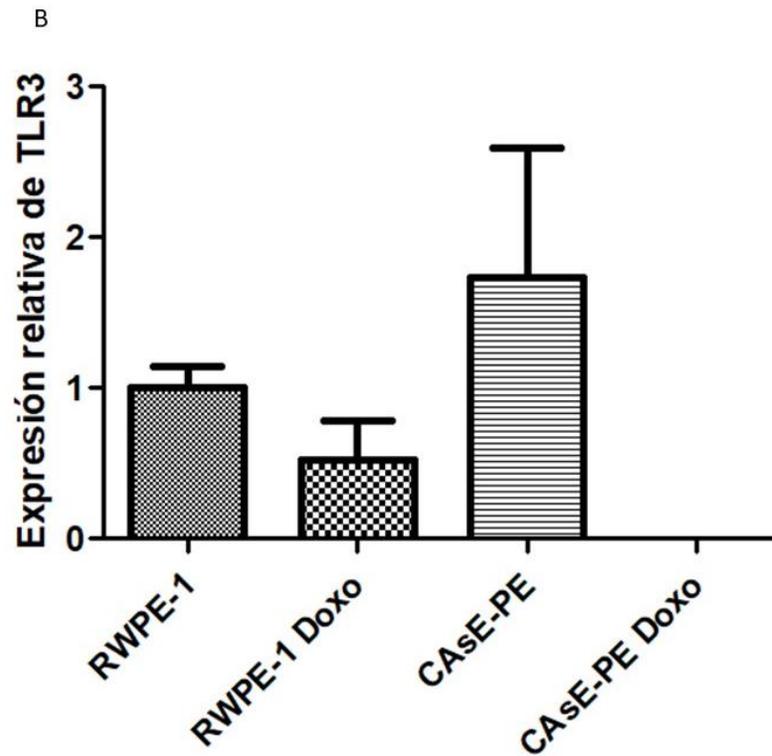
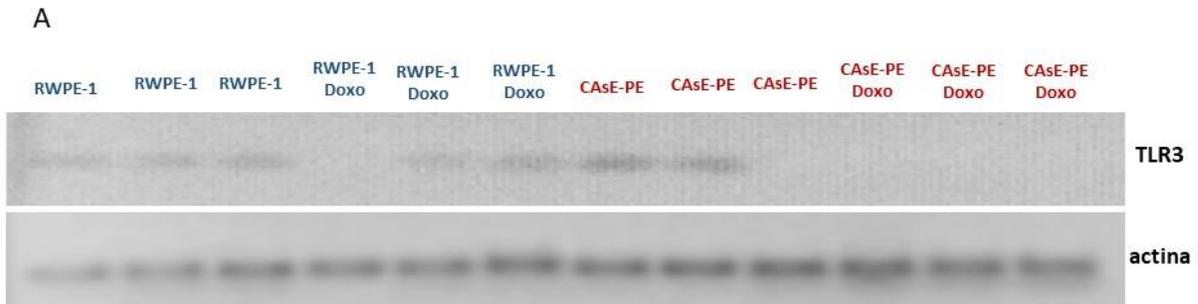


Figura 22. Análisis de la expresión de TLR3 en RWPE-1 y CAsE-PE con y sin Doxo. A) Electroforesis en gel de Agarosa 1% de RWPE-1 y CAsE-PE en su estado basal y expuestas a Doxo B) Análisis densitométrico RWPE-1 y CAsE-PE (RWPE-1 & CAsE-PE n=3, $p=0.4524$); (RWPE-1 Doxo & CAsE-PE Doxo n=3, $p>0.05$); (RWPE-1 & RWPE-1 Doxo n=3, $P=0.179$) y (CAsE-PE & CAsE-PE Doxo n=3, $p>0.05$).

9.2 Expresión de MDM2 en células RWPE-1 y CAsE-PE

9.2.1 Expresión de MDM2 a nivel de proteína.

Para evaluar la expresión de (MDM2) se extrajo proteína total de las cuatro líneas celulares de acuerdo a lo descrito en la sección de metodología y ANEXO 1, y se realizó un ensayo de WB.

En un análisis preliminar utilizando una sola muestra biológica de las células RWPE y CAsE-PE no fue posible observar la banda correspondiente a MDM2 (Figura 23), y se cuestionó sobre la cantidad de proteína cargada (30 µg), decidiendo cargar mayor cantidad de proteína para los siguientes ensayos.

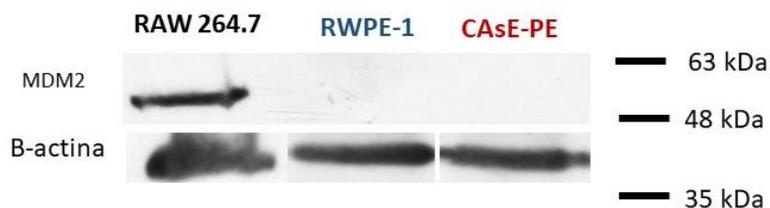


Figura 23. Expresión de MDM2 en RWPE-1 y CAsE-PE (Preliminar). Raw 264.7=Control positivo.

En ensayos posteriores, tras aumentar la cantidad de proteína cargada de cada muestra para la electroforesis a 60µg por pozo, nuevamente la inmunodetección no permitió identificar la banda correspondiente a este regulador, tanto a nivel basal como tras la estimulación con Doxo.

9.2.2 Expresión del mensajero de MDM2.

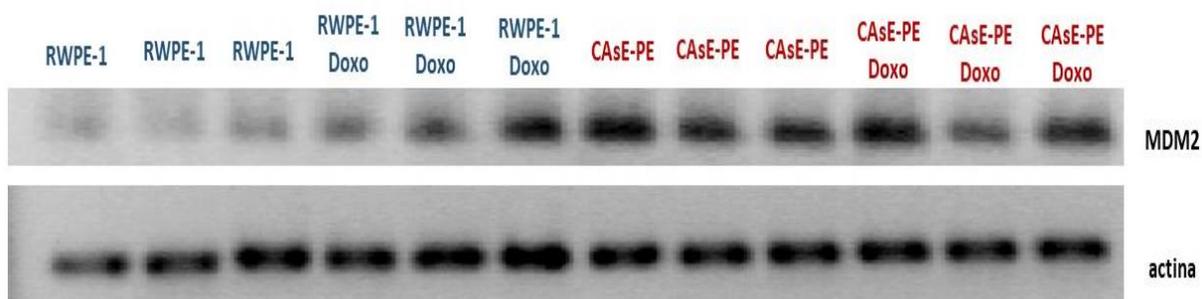
A fin de evaluar la expresión de MDM2 a nivel de mRNA se extrajo RNA total de acuerdo a lo descrito en la sección de metodología y ANEXO 4 a partir de cultivos de células RWPE-1 y CAsE-PE expuestas o no a Doxo a una concentración de 1 µg/mL y a un 90% de confluencia y se retrotranscribió a cDNA el cual fue utilizado para realizar la PCR en tiempo real.

Al igual que lo realizado para los genes TP53 y TLR3, debido a problemas técnicos con la calibración del equipo de tiempo real, los productos de amplificación de la PCR

fueron corridos en genes de agarosa al 1%. Las imágenes fueron analizadas mediante el programa Image J y se hicieron los análisis estadísticos correspondientes. En la Figura 24 A y B se muestra el análisis electroforético y su correspondiente gráfica del análisis densitométrico.

Los resultados de un solo ensayo de triplicados biológicos, mostraron que la expresión basal de MDM2 en las células CAsE-PE es significativamente superior que en las RWPE-1 no transformadas malignamente con iAs. Estos resultados también indican que la exposición a Doxo incrementa la expresión de MDM2 en las células RWPE-1, pero no así en las células CAsE-PE, las cuales, parecen no responder a la activación por este fármaco, al igual a que lo observado para la expresión de p53.

A



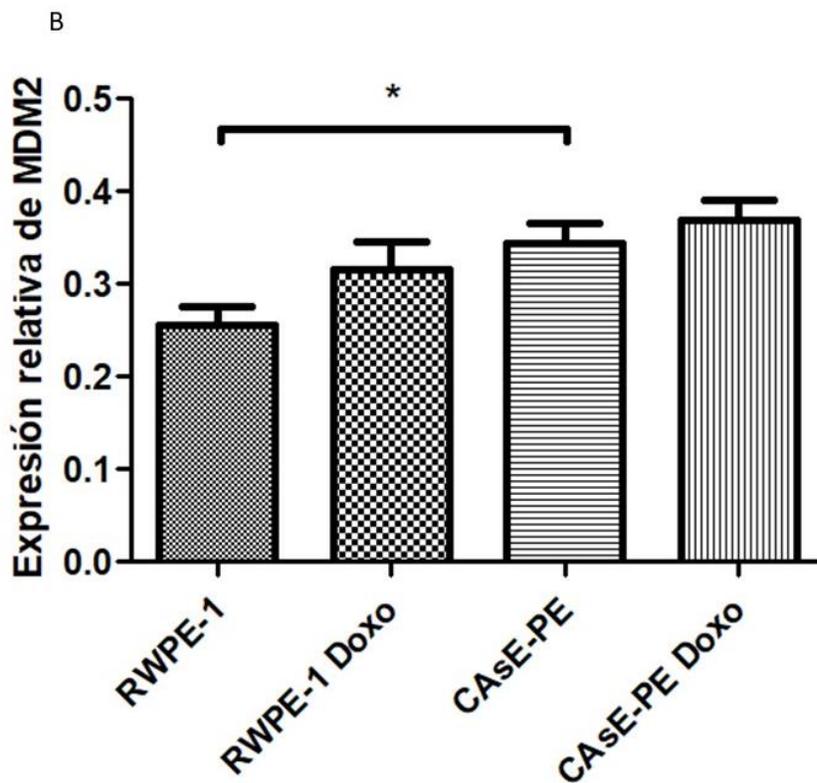


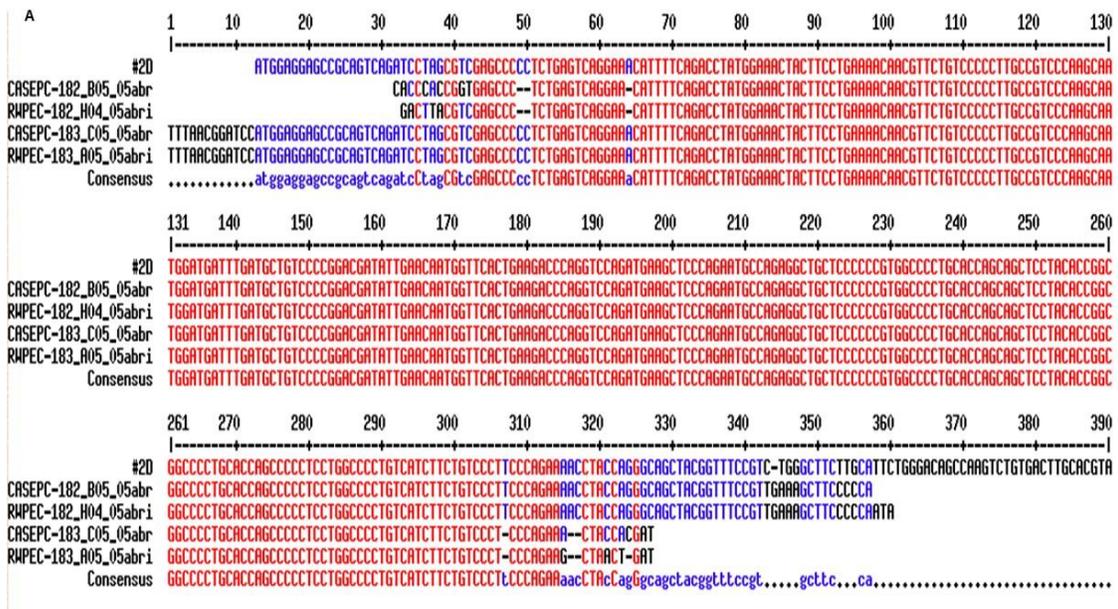
Figura 24. Expresión de MDM2 en RWPE-1, CAse-PE con y sin Doxo. A) Electroforesis en gel de Agarosa 1% de RWPE-1 y CAse-PE en su estado basal y expuestas a Doxo B) Análisis densitométrico (RWPE-1 & CAse-PE $n=3$, $*p= 0.0368$); (RWPE-1 Doxo & CAse-PE Doxo $n=3$, $p= 0.2099$); (RWPE-1 & RWPE-1 Doxo $n=3$, $p= 0.1689$) y (CAse-PE & CAse-PE Doxo $n=3$, $p= 0.4471$).

9.3 Secuenciación del gen de *TP53* para la detección de mutaciones

Para este análisis fue necesario estandarizar condiciones como la temperatura y cantidad de muestra, entre otras (ANEXO 9).

Para determinar la presencia de mutaciones en el gen *TP53*, se trabajó con el cDNA obtenido por retrotranscripción de una muestra de RNA total de cada una de las líneas celulares, RWPE-1 y CAse-PE, cuya pureza y cantidad correspondía a 1.8 y 100 ng como corresponde, según lo solicitado por el laboratorio LANBAMA de IPICYT (ANEXO 8).

Los resultados obtenidos, se analizaron en el programa Multialin, en el cual se introdujeron las secuencias y se comparó con p53 de *homo sapiens* obtenida de la base de datos de NCBI. Los resultados de los alineamientos de cada una de las secuencias obtenidas de la amplificación del gen *TP53* con 3 diferentes pares de oligonucleótidos se muestran en la Figura 25, se determinó que no existen mutaciones en el gen de *TP53* en las CAsE-PE con respecto a la secuencia usada como referencia o con la línea celular RWPE-1 no transformada con iAs.



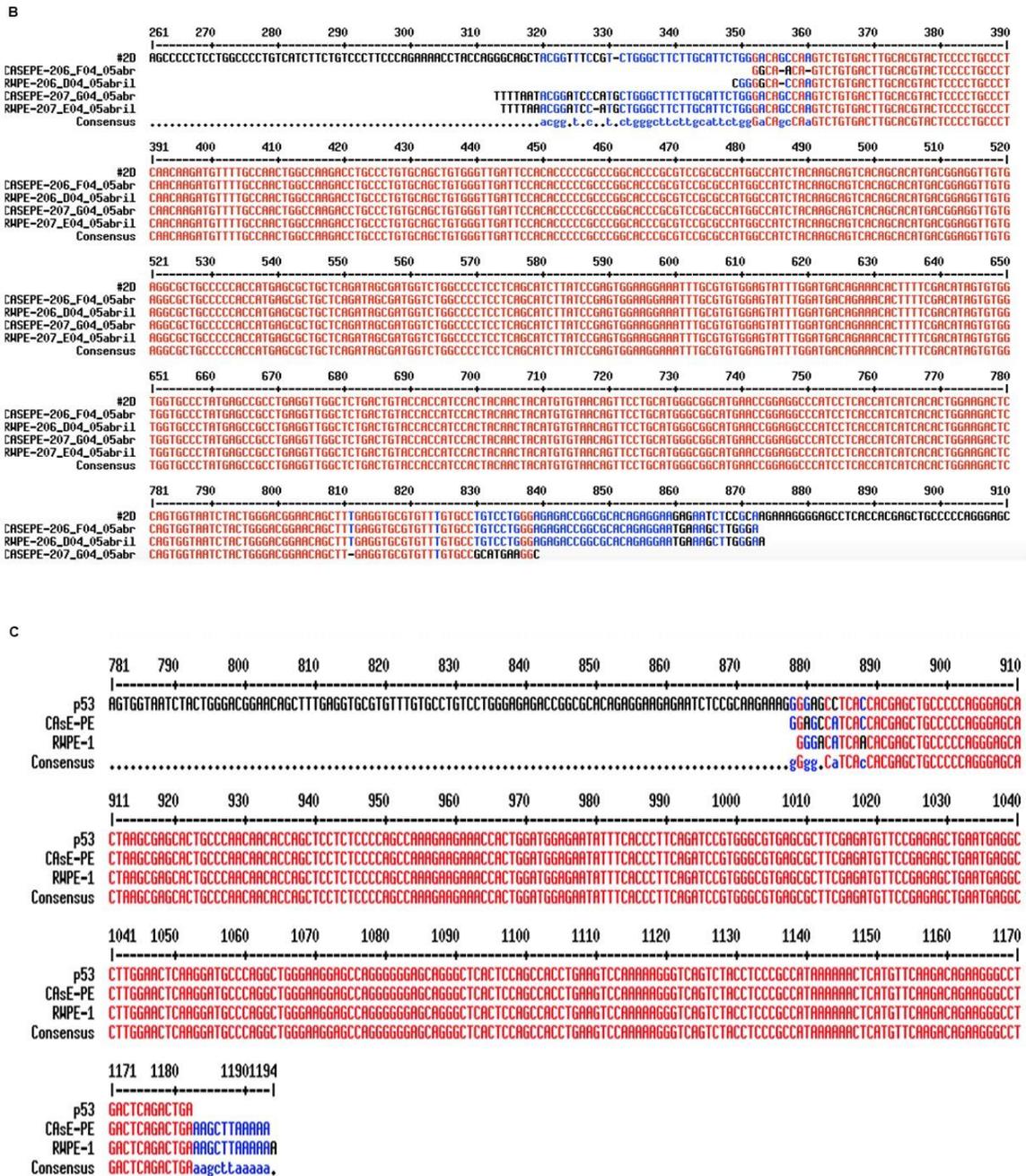


Figura 25. Análisis “Multialin” secuencia Wild Type, RWPE-1 y CAsE-PE. alineamiento de los productos de secuenciación, en donde se observa en rojo los nucleótidos iguales. A) RWPE-1 y CAsE-PE secuenciados con los oligonucleótidos 182-183. B) RWPE-1 y CAsE-PE secuenciados con los oligonucleótidos 206-207. C) RWPE-1 y CAsE-PE secuenciados con los oligonucleótidos 208-209.

En la Figura 26 se muestra un esquema representativo de la secuencia utilizada como referencia, p53 y los fragmentos amplificados de ambas líneas celulares RWPE-1 y CAsE-PE.

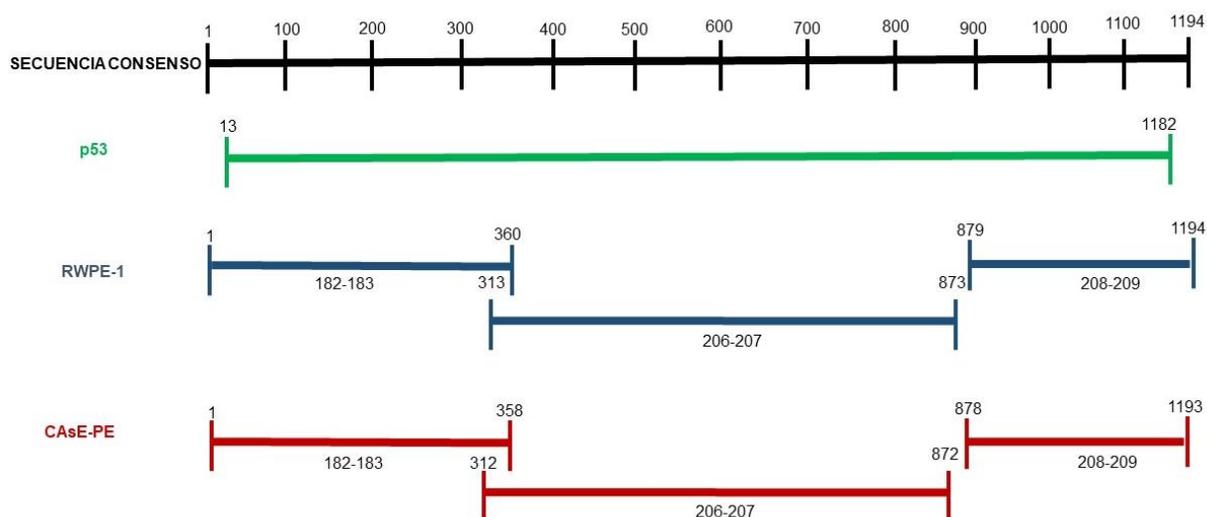


Figura 26. Esquema de secuencia consenso, p53 y alineamiento de los oligonucleótidos amplificados de RWPE-1 y CAsE-PE. En color negro se presenta la secuencia consenso, en color verde p53, en color azul RWPE-1 y en color rojo CAsE-PE.

9.4 Determinación de la presencia de isoformas de p53 mediante WB.

Para identificar diferentes isoformas de p53 se extrajeron las proteínas de cultivos las líneas celulares RWPE y CAsE-PE en condiciones basales y con una confluencia igual o menor al 90%.

Para determinar la expresión de la isoformas en las líneas celulares RWPE-1 y CAsE-PE, se realizó un análisis por WB, utilizando el anticuerpo CM1 (Santa Cruz Biotechnology) el cual permite visualizar las isoformas de p53 ya que es un Ac policlonal, (Figura 27). En un ensayo preliminar, se observó un par de bandas de tamaños correspondientes a p53 y una banda inferior cercana a los 47 kDa de acuerdo con el marcador de peso molecular. Estas observaciones nos sugirieron la presencia de una

isoforma de p53 en ambas líneas celulares que no parece diferir en intensidad entre ellas.

Este análisis fue realizado en una sola ocasión y con una sola muestra biológica de cada línea celular.



Figura 27. WB preliminar para la detección de isoformas de p53 en RWPE-1 y CAse-PE. RAW 264.7=Control positivo.

10.DISCUSIÓN

El CaP es la segunda causa de muerte por cáncer en hombres a nivel mundial (GLOBOCAN 2012); dentro de los factores de riesgo, la exposición crónica a iAs a través de diversas fuentes, tanto naturales como antropogénicas está bien reconocido (Ferris I et al., 2011).

En las primeras etapas de la enfermedad, el CaP tiene un alto índice de supervivencia si, se otorga al paciente el tratamiento y seguimiento adecuado (American Cancer Society and National Center Institute, 2019), sin embargo, en etapas avanzadas, el CaP suele hacer metástasis y generar resistencia a las terapias convencionales, actualmente, son utilizadas como alternativas, diferentes estrategias que se basan en la activación de la respuesta inmune anti-tumoral. Una estrategia inmunoterapéutica incluye la activación de receptores tipo toll (TLRs), una familia de proteínas transmembrana encargadas de reconocer patrones moleculares de micro-organismos o asociados a daño celular, los PAMPS y DAMPS (Zhao et al., 2014). Específicamente, la activación del TLR3, que reconoce y se activa con dsRNA, ha sido utilizado como terapia anti-tumoral ya que induce la activación tanto de respuestas inflamatorias como apoptóticas (Bianchi, et al., 2017).

Específicamente en el caso del CaP asociado a la exposición a iAs, se han utilizado diversos modelos in vitro para determinar los mecanismos de carcinogenicidad del As sobre el epitelio prostático. Tokar y cols en 2010 lograron la transformación maligna de la línea celular prostática epitelial inmortalizada RWPE-1, en células cancerosas capaces de formar tumores en ratones inmunocomprometidos (CAsE-PE) a través de la exposición in vitro a arsenito de sodio durante 30 semanas (Tokar et al., 2010). En estas células se encontró que la expresión de TLR3 se encuentra significativamente disminuida con respecto a las células epiteliales normales no transformadas (RWPE-1) (datos no publicados). Siendo la proteína p53, el regulador maestro de la expresión de la mayoría de los TLRs, incluyendo el TLR3 (Taura M. et al., 2008; Menendez, et al., 2016) en este proyecto, se determinó el estatus de esta proteína y su gen, así como de su principal regulador negativo, la proteína MDM2 (Herrero A. et al., 2016)

para determinar su papel en la desregulación de la expresión de este receptor en las células CAsE-PE.

A través de elegantes experimentos que incluyeron la inducción de la expresión de p53 a través del uso del fármaco anti-tumoral doxorrubicina (Doxo) y, la fusión del promotor de diferentes TLRs con la región estructural de la luciferasa, Menendez y cols utilizando linfocitos humanos primarios y macrófagos alveolares, demostraron que, es a través de la unión a la región promotora de los genes que codifican a los diferentes TLRs, que el supresor tumoral p53 es capaz de regular positivamente la expresión de los diferentes TLRs, especialmente TLR3 (Menéndez, et al., 2011).

La literatura indica que este supresor de tumores se encuentra mutado en más del 50% de los tipos de cáncer existentes, siendo las mutaciones más comunes las encontradas en el dominio de unión al DNA a las que se les denomina mutaciones de punto caliente o “hot-spot mutations”, específicamente en los residuos R175, G245, R248, R249, R273 y R282 (Herrero A. et al., 2016). En este trabajo, uno de los objetivos propuestos fue realizar la secuenciación del gen *TP53* para la búsqueda de éstas y cualquier otro tipo de mutación en este gen, que pudiera explicar la desregulación en la expresión de TLR3. Los resultados de secuenciación, no mostró evidencias de mutaciones en células CAsE-PE y RWPE-1.

A la fecha, no existe evidencia de que el iAs esté asociado a la inducción de mutaciones en el gen p53. Sin embargo, en un estudio realizado en la india, se encontró que el genotipo homocigoto del codón 72 Arg de p53 (Arg/Arg), se asocia al desarrollo de keratosis inducida por arsénico y a un riesgo incrementado a desarrollar otras afectaciones en la salud (Chaudhuri Sujata de, 2007).

Herrero A. y cols en 2003, mencionan como segunda causa de la desregulación de la función de p53 la sobreexpresión de su regulador negativo, MDM2, que al unirse al dominio de transactivación de p53, induce su poli-ubiquitinación y consecuente degradación por el proteosoma (Herrero A. et al., 2003). En este trabajo se realizaron WB y RT-qPCR para determinar los niveles de expresión de MDM2 tanto a nivel de

proteína como de mRNA, con o sin exposición a Doxo. La proteína MDM2 no se logró detectar en los ensayos de WB, sin embargo, los ensayos de expresión de mRNA de MDM2 mostraron claramente que las células transformadas malignamente con iAs, las CAsE-PE, expresan significativamente mayor cantidad de mensajero en comparación con las células RWPE-1 no transformadas. Adicionalmente, se observó que la exposición a Doxo no tuvo efecto sobre la expresión de esta proteína en las células CAsE-PE. A este respecto, diversos estudios han mostrado que el iAs altera la expresión de p53 y su regulador MDM2. Ya en 1999 Hamadeh y colaboradores habían demostrado que el iAs disminuye la expresión de p53 mientras que aumenta la de MDM2 cuando expusieron keratinocitos humanos (HaCAT) a 200 $\mu\text{g/L}$ concentración de arsenito de sodio (Hamadeh, H., et al 1999).

Sin embargo, recientemente en el año 2017, otro autor reportó que la exposición a concentraciones bajas de arsenito de sodio, dio lugar a una disminución en la expresión de MDM2 y un incremento en la proteína p53 en keratinocitos humanos inmortalizados. Sin embargo, estos mismos autores midieron luego la expresión de p53 en ratas Sprague Dawly expuestas a arsenito de sodio durante 6 meses, así como en muestras procedentes de pacientes con keratosis, encontrando en ambos casos que la expresión de p53 se encontraba disminuída (Zhuo Y et al, 2017).

En un estudio más reciente, Zhao T y cols (2020), expusieron in vitro a keratinocitos HCaT-T a 1 μM de arsenito de sodio por espacio de 5 meses, encontrando interesantemente que p53 reduce su actividad en estas células, ya que se reduce su fosforilación y acetilación y aumenta la velocidad de su exportación hacia el citoplasma. Los autores demostraron en este interesante trabajo que los efectos del iAs sobre p53 están mediados por la metilación del mRNA en la adenosina 6 (m6A) de los reguladores negativos MDM2 y YY1 estimulando su traducción. Estas observaciones fueron comprobadas, ya que al inhibir la metil transferasa efectora, METTL3, se logró restaurar la activación de p53 e inhibir la transformación maligna de los keratinocitos (Zhao T y cols, 2020).

En el presente estudio, los niveles de la proteína p53 se encontraron significativamente incrementados en las células CAsE-PE en comparación con las células no transformadas RWPE-1, sin embargo, una observación interesante fue que, tras el tratamiento con Doxo, sólo las células RWPE-1 mostraron un incremento significativo en la proteína p53, sugiriendo que las células CAsE-PE transformadas con iAs no responden al tratamiento con Doxo produciendo más p53. Por otro lado, la evaluación de la expresión de los transcritos de p53 basal e inducida por Doxo no mostraron diferencia significativa entre las células RWPE-1 y CAsE-PE, pero, a diferencia de lo observado a nivel de la proteína, en los ensayos de RWPE-1 se observó una tendencia a la disminución en los transcritos de p53 en las RWPE-1 tras la exposición a Doxo, lo cual fue consistente con los resultados de PCR en los que se evaluaron los transcritos de TLR3. La concentración de Doxo utilizada en este estudio (1 µg/mL) fue decidida en base a Menendez y cols, (Menendez D. et al., 2016) quien, utilizando células HCT116 demostró que la exposición in vitro a DRX por 24 horas, induce un incremento significativo en la expresión de p53, que fue consistente con el incremento también significativo en la expresión de TLR3. Este grupo de investigación, como se mencionó anteriormente, proporcionó suficiente evidencia para soportar que la proteína p53 directamente incrementa la expresión de diferentes TLRs al unirse directamente a una región consenso dentro de la región promotora de los genes respectivos (Menéndez D. et al., 2016; Menéndez, et al., 2011)

Al igual que Escudero-Lourdes en colaboración con Tokar E. y posteriormente Alvarado-Morales quienes habían demostrado que tanto la proteína como el transcrito de TLR3 se encontraban significativamente disminuidos en las células CAsE-PE en comparación con las células no transformadas con iAs, las RWPE-1, en este trabajo los resultados de la evaluación de la expresión basal de los transcritos en ambas líneas celulares fue consistente con los reportado anteriormente por nuestro grupo de investigación, encontrando que las células CAsE-PE expresan menores niveles de los mRNA de TLR3 comparado con las RWPE-1.

Por otro lado, se ha descrito una asociación entre la expresión de las diferentes isoformas de p53 y la respuesta clínica y el pronóstico de cáncer, así, por ejemplo, se ha observado una asociación entre el desarrollo del adenocarcinoma colorectal con el aumento en la expresión de la isoforma $\Delta 133p53\alpha$ y disminución de p53 β (Pedraza S. et al., 2020). En este trabajo, uno de los objetivos fue evaluar alguna alteración en isoformas de p53, en un estudio preliminar se logró identificar que, en ambas líneas celulares, CAsE-PE y RWPE-1 se expresa una isoforma de tamaño aproximado a 47 kDa, sugiriendo que se trata de la isoforma $\Delta 40p53\alpha$ también llamada p47/p53 de 47 kDa. Sin embargo, no se encontró diferencia significativa en el nivel de expresión de esta isoforma y no se realizaron estudios posteriores al respecto.

A la fecha, no existen registros en la literatura que evalúen el efecto de iAs sobre la expresión de p53 y su regulador negativo MDM2 en células prostáticas humanas, y no se podría explicar el motivo del comportamiento de estas proteínas en estos modelos celulares con los datos obtenidos en este estudio. Pero aun cuando los niveles de la proteína p53 se observan significativamente elevados en las células CAsE-PE en comparación con las células RWPE-1, el hecho de haber encontrado que el regulador negativo de p53, MDM2 se sobre-expresa significativamente a nivel de transcrito en las células CAsE-PE, sugiere que, en estas células la proteína MDM2 es responsable de disminuir la actividad de p53.

Por lo tanto, los resultados del presente estudio nos sugieren fuertemente que la disminución en la expresión de TLR3 tanto a nivel del transcrito como de la proteína, observada en células epiteliales prostáticas transformadas por iAs (CAsE-PE), se pudiera deber a un incremento en la expresión de la proteína MDM2, inhibiendo la actividad transactivadora de p53 sobre el gen que codifica para TLR3.

Aunque todavía se requiere la realización de una serie de repeticiones de estos estudios y realizar algunos estudios adicionales, creemos que estas observaciones pueden tener repercusiones en el entendimiento del desarrollo y manejo clínico del cáncer de próstata inducido por exposición humano a iAs.

En la actualidad existen poco más de 100 millones de personas de todas las edades y niveles socio-económicos alrededor del mundo expuestas a iAs, a través de agua, aire, tierra y alimentos, incluso sin estar conscientes de ellos. Muchos casos de cáncer de próstata u otros tipos de cáncer como de piel, vejiga, pulmón e hígado pueden ser consecuencia de la exposición humana a este tóxico y son tratados clínicamente de la misma manera que el resto de los tumores. Sin embargo, este y otros estudios reportados en la literatura, justifican la realización de más estudios enfocados a entender los efectos que este tóxico puede tener sobre las vías moleculares que actualmente se consideran como blanco terapéutico para el tratamiento de cáncer, a fin de encontrar alternativas de terapéuticas más específicas para cánceres relacionados a la exposición a iAs.

11. CONCLUSIONES

1. Las células epiteliales prostáticas transformadas malignamente *in vitro* con arsenito sodio, llamadas CAsE-PE muestran una disminución en la expresión de TLR3 que se asocia con un incremento en la sobre-expresión de transcritos de la proteína MDM2, principal regulador de p53.
2. Encontramos evidencia de que en las células CAsE-PE para p53 no responde al estrés genotóxico.
3. No se encontraron evidencias de la presencia de mutaciones en el gen *TP53*, ni en la presencia diferencial de isoformas de la proteína p53 en las células CAsE-PE, con respecto a las RWPE-1, que pudiera explicar la disminución de la expresión de TLR3.
4. Se requieren más estudios para confirmar estas observaciones y conocer el papel de MDM2 en la disminución de la expresión de TLR3.

11.1 Aspectos éticos y de bioseguridad

En este trabajo de investigación se emplearán líneas celulares inmortalizadas, por lo que no se requiere de un análisis con inclusión pacientes o el empleo de animales de experimentación, lo cual implica que no se requiere de la aprobación de un comité de ética.

Los desechos generados serán desactivados con hipoclorito de sodio y posteriormente desechados en la basura común.

12. BIBLIOGRAFÍA

IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, World Health Organization, & International Agency for Research on Cancer. (2004). *Some drinking-water disinfectants and contaminants, including arsenic* (Vol. 84). IARC. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK402251/>

Asamblea Mundial de la Salud, 71. (2018). Informe sobre los resultados de la OMS: presupuesto por programas 2016-2017. Recuperado de <https://apps.who.int/iris/handle/10665/276530>

Benbrahim-Tallaa, L., & Waalkes, M. P. (2008). Inorganic arsenic and human prostate cancer. *Environmental health perspectives*, 116 (2), 158-164. doi: 10.1289/ehp.10423 Cited by: 75

Bello, D., Webber, M. M., Kleinman, H. K., Wartinger, D. D., & Rhim, J. S. (1997). Androgen responsive adult human prostatic epithelial cell lines immortalized by human papillomavirus 18. *Carcinogenesis*, 18(6), 1215-1223. doi: 10.1093/carcin/18.6.1215

Akira, S., & Takeda, K. (2004). Toll-like receptor signalling. *Nature reviews immunology*, 4(7), 499-511. Recuperado de <https://www.nature.com/articles/nri1391>

Dowling, J. K., & Mansell, A. (2016). Toll-like receptors: the swiss army knife of immunity and vaccine development. *Clinical & translational immunology*, 5(5). doi: 10.1038/cti.2016.22

Bianchi, F., Pretto, S., Tagliabue, E., Balsari, A., & Sfondrini, L. (2017). Exploiting poly (I: C) to induce cancer cell apoptosis. *Cancer biology & therapy*, 18(10), 747-756. Doi: 10.1080/15384047.2017.1373220

Bernardo, A. R., Cosgaya, J. M., Aranda, A., & Jiménez-Lara, A. M. (2013). Synergy between RA and TLR3 promotes type I IFN-dependent apoptosis through upregulation of TRAIL pathway in breast cancer cells. *Cell death & disease*, 4(1). Recuperado de <https://www.nature.com/articles/cddis20135>

Ferrís i., Tortajada, J., García-i-Castell, J., Berbel-Tornero, O., & Ortega-García, J. A. (2011). Factores de riesgo constitucionales en el cáncer de próstata. *Actas Urológicas Españolas*, 35(5), 282-288. doi: 10.1016/j.acuro.2010.12.009

Galli R, Paone A, Fabbri M, Zanesi N, Calore F, Cascione L. (2013). Toll-like receptor 3 (TLR3) activation induces microRNA-dependent reexpression of functional RAR β and tumor regression. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110(24):9812-7. doi: 10.1073/pnas.1304610110

Herrero, A., Rojas, E., Misiewicz-Krzeminska, I., Krzeminski, P., & Gutiérrez, N. (2016). Molecular mechanisms of p53 deregulation in cancer: an overview in multiple myeloma. *International journal of molecular sciences*, 17(12). Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5187803/>

Hernández, J. C., Montoya, C. J., & Urcuqui-Inchima, S. (2007). Papel de los receptores tipo toll en las infecciones virales: el VIH-1 como modelo. *Biomédica*, 27(2), 280-293. doi:10.7705/biomedica.v27i2.225

Kawai T, Akira S. Toll like receptor and RIG-I-like receptor signaling. (2008). *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1143:1-20. Recuperado de <https://nyaspubs.onlinelibrary.wiley.com/journal/17496632>

Barettino Luengo, E. (2016). Uso de agonistas de TLRs para mejorar la respuesta inmune en vacunas. Recuperado de <https://eprints.ucm.es/48706/>

Menendez, D., Lowe, J. M., Snipe, J., & Resnick, M. A. (2016). Ligand dependent restoration of human TLR3 signaling and death in p53 mutant cells. *Oncotarget*, 7(38), 61630. doi: 10.18632/oncotarget.11210

Muñoz Gámez, J. A. (2006). Papel de Parp-1 en procesos de muerte celular inducida por el tratamiento con el antineoplásico Doxorubicina. (Tesis doctoral, Universidad de Granada). Recuperado de <https://dialnet.unirioja.es/servlet/dctes?codigo=107130>

Qin, J. J., Li, X., Wang, W., Zi, X., & Zhang, R. (2017). Targeting the NFAT1-MDM2-MDMX network inhibits the proliferation and invasion of prostate cancer cells,

independent of p53 and androgen. *Frontiers in pharmacology*, 8, 917. doi: 10.3389/fphar.2017.00917

Paone, A., Galli, R., Gabellini, C., Lukashev, D., Starace, D., Gorlach, A., & Filippini, A. (2010). Toll-like receptor 3 regulates angiogenesis and apoptosis in prostate cancer cell lines through hypoxia-inducible factor 1 α . *Neoplasia* (New York, NY), 12(7), 539. doi: 10.1593/neo.92106

Tokar, E. J., Diwan, B. A., & Waalkes, M. P. (2010). Arsenic exposure transforms human epithelial stem/progenitor cells into a cancer stem-like phenotype. *Environmental health perspectives*, 118(1), 108-115. doi: 10.1289/ehp.0901059

Tokar, E. J., Qu, W., Liu, J., Liu, W., Webber, M. M., Phang, J. M., & Waalkes, M. P. (2010). Arsenic-specific stem cell selection during malignant transformation. *Journal of the National Cancer Institute*, 102(9), 638-649. doi: 10.1093/jnci/djq093

Zhao, S., Zhang, Y., Zhang, Q., Wang, F., & Zhang, D. (2014). Toll-like receptors and prostate cancer. *Frontiers in immunology*, 5, 352. doi: 10.3389/fimmu.2014.00352

Xu, Y., Tokar, E. J., Sun, Y., & Waalkes, M. P. (2012). Arsenic-transformed malignant prostate epithelia can convert noncontiguous normal stem cells into an oncogenic phenotype. *Environmental health perspectives*, 120(6), 865-871. doi: 10.1289/ehp.1204987

Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., & Bray, F. (2015). Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International journal of cancer*, 136(5). doi: 10.1002/ijc.29210

Hofseth, L. J., Hussain, S. P., & Harris, C. C. (2004). p53: 25 years after its discovery. *Trends in pharmacological sciences*, 25(4), 177-181. doi: 10.1016/j.tips.2004.02.009

Menendez, D., Shatz, M., Azzam, K., Garantziotis, S., Fessler, M. B., & Resnick, M. A. (2011). The Toll-like receptor gene family is integrated into human DNA damage and p53 networks. *PLoS Genet*, 7(3). doi: 10.1371/journal.pgen.1001360

López Ferreira, L. I. (2011). Identificación y análisis del efecto de mutaciones *TP53* asociadas a la patología tumoral. Recuperado de <https://www.colibri.udelar.edu.uy/jspui/handle/20.500.12008/3887>

Florijan, M. K., Ozretić, P., Bujak, M., Pezzè, L., Ciribilli, Y., Kaštelan, Ž., & Hudolin, T. (2019). The role of p53 isoforms' expression and p53 mutation status in renal cell cancer prognosis. In *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations* 37 (578). doi: 10.1016/j.urolonc.2019.03.007

Shi, D., & Gu, W. (2012). Dual roles of MDM2 in the regulation of p53: ubiquitination dependent and ubiquitination independent mechanisms of MDM2 repression of p53 activity. *Genes & cancer*, 3(3-4), 240-248. doi: 10.1177/1947601912455199

Berman, H., Henrick, K., Nakamura, H., & Markley, J. L. (2007). The worldwide Protein Data Bank (wwPDB): ensuring a single, uniform archive of PDB data. *Nucleic acids research*, 35(1). doi: 10.1093/nar/gkl971

Du, B., Jiang, Q. L., Cleveland, J., Liu, B. R., & Zhang, D. (2016). Targeting Toll-like receptors against cancer. *Journal of Cancer Metastasis and Treatment*, 2 (12). doi: 10.1007/s11523-018-0589-7

MacDowell, K. S., Munarriz-Cuezva, E., Caso, J. R., Madrigal, J. L., Zabala, A., Meana, J. J., ... & Leza, J. C. (2017). Paliperidone reverts Toll-like receptor 3 signaling pathway activation and cognitive deficits in a maternal immune activation mouse model of schizophrenia. *Neuropharmacology*, 116, 196-207. doi: 10.1016/j.neuropharm.2016.12.025

Biegging, K. T., Mello, S. S., & Attardi, L. D. (2014). Unravelling mechanisms of p53-mediated tumour suppression. *Nature Reviews Cancer*, 14(5), 359-370. Recuperado de <https://www.nature.com/articles/nrc3711>

Orozco Méndez, D. A., Castillo Beltrán, J. D., & Tovar Garrido, L. C. D. (2017). Desarrollo de software para identificación de anomalías no comunes en la proteína P53 y casos de hepatocarcinoma celular (Doctoral dissertation, Universidad de Cartagena). Recuperado de <http://hdl.handle.net/11227/5934>

Yu, B., & Liu, H. M. (2018). The Development of New Spirooxindoles Targeting the p53–MDM2 Protein-Protein Interactions for Cancer Therapy. In Targeting Protein-Protein Interactions by Small Molecules (213-237). doi: 10.1007/978-981-13-0773-7_8

12.1 Páginas Web:

Cancer Facts. (2019). 2019 Special Section: Cancer in the Oldest Old. Recuperado de <https://www.cancer.org/research/cancer-facts-statistics/all-cancer-facts-figures/cancer-facts-figures-2019.html>

Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado (2017). Cáncer de próstata #Soy Hombre Y Me Cuido. Recuperado de <https://www.gob.mx/issste/articulos/cuidate-del-cancer-de-prostata-soyhombremecuido-95969?idiom=es>

National Cancer Institute at the National Institutes of Health. (2005). Prostate Cancer Treatment Patient Version. Recuperado de <https://www.cancer.gov/types/prostate/patient/prostate-treatment-pdq>

Instituto Nacional de Salud Pública, México. (2020). Mortalidad por cáncer de próstata en México a lo largo de tres décadas. Recuperado de <https://www.insp.mx/avisos/4189-cancer-prostata-mx.html>

13. ANEXOS

ANEXO 1:

Extracción de Proteínas

ESTA PARTE SE REALIZA EN CAMPANA DE BIOSEGURIDAD, USO: 10 min con luz UV, prender ventilador y limpiar con alcohol al 70%.

1. Eliminar el medio con pipeta Pasteur estéril (sin algodón) conectada a la bomba de vacío.
2. Enjuague las células con 4 mL de PBS, libre de calcio y magnesio, esto facilita el desprendimiento de células, (Retire el PBS antes de la tripsina), y agregue 2 mL de tripsina 1X lo más pronto posible.
3. Coloque el frasco de cultivo en la incubadora humidificada a 37 °C durante 5 minutos aproximadamente. Use cronómetro para evitar que las células se dañen por permanecer por tiempo prolongado en la tripsina.
4. Examine bajo el microscopio para confirmar que las células se han desprendido del sustrato (las células se observan redondas y flotando libres). Dar golpes suaves al frasco de cultivo como si fuera colador (2-3 veces) para despegar las células aún adheridas al frasco. El desprendimiento total de las células puede tomar un par de minutos.

(No retirar la tripsina)

5. Neutralice la tripsina añadiendo 2 mL PBS con el 2% de suero bovino fetal (FBS) con una pipeta serológica estéril.
6. Con la misma pipeta serológica, suba y baje la suspensión celular de 10 a 15 veces para disgregar los agregados celulares y obtener una suspensión unicelular.
7. Transfiera la suspensión celular a un tubo Falcon de 15 mL. Enjuague el frasco de cultivo con 1 mL de PBS-SBF y transfiera el líquido de lavado a la suspensión celular

que tiene en el tubo de 15 mL, cierre el tubo y mezcle (volumen final 5 mL). Colocar Parafilm alrededor de la taparrosca del tubo (antes de meter el Parafilm a la campana de bioseguridad, rociar con etanol al 70%).

8. Centrifugar a 1000 rpm durante 5 min en la centrífuga IEC Centra-HN. (asegurarse que la centrífuga no tiene encendido el botón de brake).

Siempre revisar la caja de la cual se levantaron las células, lo ideal es que la caja se observe sin células aún adheridas al fondo.

A PARTIR DE LA SIGUIENTE ETAPA DE EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS SE REALIZA FUERA DE LA CAMPANA DE BIOSEGURIDAD Y SOBRE UN RECIPIENTE CON HIELO MOLIDO, EN CADA PARTE DEL PROCESO.

Preparar suficiente RIPA BUFFER con el inhibidor de proteasas (100x) HALT en relación 1:100. El volumen requerido de RIPA BUFFER dependerá del número de cajas y del volumen final de proteínas deseado. Para evitar tener una muestra de proteínas muy diluida se sugiere que para un frasco t-25 se trate el paquete celular con 100 μ L, mientras que para una caja T25 o caja Petri de 100mm se recomienda utilizar 200 μ L de RIPA BUFFER +inhibidores de proteasas.

Por ejemplo, si se tienen 6 frascos T25, se les adicionarán 100 μ L de la solución de RIPA con HALT al botón celular obtenido después de lavar y centrifugar, por lo que se requerirán un total de 600 μ L, sin embargo, siempre se recomienda preparar un excedente, ya sean 800, 900 o 1000 μ L.

1.- Adicionar RIPA BUFFER 100 μ L. Con la pipeta de 100 μ L subir y bajar la suspensión celular 10 veces para facilitar la lisis celular.

2.- Mantener en frío (hielo triturado)

3.- Sonicar cada una de las muestras obtenidas en un sonicador de pistilo (10 pulsos/5 segundos) Intensidad 3 (NO SACAR DEL HIELO), verificar que el pistilo del sonicador quede dentro del volumen de la muestra con RIPA y evitar la formación de burbujas.

Al terminar de sonicar, cada muestra debe de centrifugarse a 10 000-12000- rpm 10 minutos a 4°C.

Cambiar los sobrenadantes a tubos eppendorff nuevos perfectamente marcados e identificados con los datos de las muestras.

4.- Congelar a -80°C. Las muestras podrán permanecer a -20°C por algunas horas en caso de que no se disponga en el momento de un ultracongelador, pero no deberán permanecer ahí por tiempo mayor para evitar su degradación.

5.- Cuando se requiera, las muestras de proteínas deberán cuantificarse por el método de Bradford o ácido bicinconínico (BCA). Para ello, las muestras se sacan del congelador de -80°C y se colocan sobre hielo molido.

ANEXO 2:

Determinación de proteínas: Método de Bradford

Introducción:

Existen varios métodos para determinar la concentración de proteínas de una muestra, tales como la determinación de la absorbancia a 280 nm, o mediante la formación de derivados coloreados de las proteínas, base de los métodos de BIURET o de LOWRY. En estos casos se forma un complejo coloreado de cobre con el enlace peptídico; en el método de Lowry, además del complejo anterior también se forma un derivado de las tirosinas que contribuye a la absorbancia total. El método que vamos a utilizar durante estas prácticas se basa en un principio diferente: se emplea un colorante hidrofóbico cuyas disoluciones acuosas en presencia de ac. fosfórico tienen un color pardo y que, al encontrarse en el entorno hidrofóbico del interior de una proteína, origina un color azul intenso que se puede medir fácilmente. Este método depende, pues de la interacción relativamente inespecífica entre un colorante hidrofóbico y las proteínas, por lo que es relativamente sensible a la presencia de contaminantes tales como restos de detergente y líquidos orgánicos como el metanol. Su principal ventaja es que resulta más rápido y fácil de emplear que otros métodos alternativos, y más sensible que la medida de absorbancia a 280 nm. Para determinar la concentración de proteína total presente en una muestra se requiere la preparación de una curva de calibrado empleando una proteína patrón, que generalmente suele ser la seroalbúmina bovina (BSA).

Método:

- 1.- Pesar 10 mg de BSA, disolver en 1 mL de Ripa Buffer (Se disuelve en Ripa Buffer puesto que nuestras proteínas se encuentran en esta solución).
- 2.- Dar Vortex durante 2 minutos para que se disuelva perfectamente el BSA.

3.- Hasta el momento se tiene una solución de 10mg/mL (Solución patrón), posterior a ello se preparará una solución de 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ = 1 mg/mL por lo que se toman 100 μL de solución patrón y se disuelve en 900 μL de Ripa Buffer.

4.-Preparar la curva patrón, de acuerdo con la siguiente tabla.

Estándar de curva	Bradford mL	BSA+ Ripa Buffer μL (1mg/mL)	Concentración final ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
1	1	0	0
2	1	2	2
3	1	4	4
4	1	6	6
5	1	8	8
6	1	10	10

Al adicionar reactivo de Bradford proteger de la luz. Esperar 5 minutos.

5.-Lectura de absorbancia en Bio Spectrometer eppendorff.

6.- La muestra se prepara con 2 μL + 1 mL de Bradford proteger de la luz, Esperar 5 min. El resultado de la lectura se dividirá entre 2 por los dos μL agregados.

Posterior a cuantificar las proteínas y conocer la concentración en $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ se ajustan todas a una concentración de 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ con ripa buffer, y se preparan para cargar, por lo que se adiciona Buffer de carga (en este caso Buffer 5x) del cual se mezclaran 30 μL de muestra y 10 μL de Buffer de Carga (Nota: se colocan 10 μL de Buffer a 30 μL de muestra para tener un exceso de Buffer y que la muestra quede pesada para que no se salga del gel).

Ejemplo de cálculos:

Concentración obtenida por el espectrómetro = 3.18 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$

Volumen=100 μ L- 2 μ L= 98 μ L

$$x = \frac{3.18 \mu\text{g}/\mu\text{L} * 98 \mu\text{L}}{1 \mu\text{g}/\mu\text{L}} = 311.64 \mu\text{L}-98 \mu\text{L (que ya tenemos)} = 213.64\mu\text{L de Ripa Buffer}$$

para llevar a una concentración de 1 μ g/ μ L.

Calentar baño a 90°C y hervir las muestras preparadas durante 5 minutos, de esta forma estarán listas para cargar o en su caso congelarse a -80°C sin que se degraden.

A continuación, se preparan los geles para comenzar el Western Blot al 10% Para cada gel se preparan 10 mL con las siguientes cantidades:

REACTIVO	mL
H2O	3.95
30% Acrylamide mix	3.35
1.5 M Tris (pH 8.8)	2.5
10%SDS	0.1
10% APS	0.1
TEMED	0.004

El APS y EL TEMED se agregan cuando ya se tiene armada la base para el gel ya que polimeriza rápidamente, agregar 3 milímetros antes de la marca verde y agregar inmediatamente etanol al 75% para evitar pérdida de gel, el gel restante se conserva para observar la polimerización del gel, mientras tanto se prepara el gel concentrador del cual se requieren 5 mL para cada uno.

REACTIVO	mL
H2O	3.4
30% Acrylamide mix	0.85
1.5 M Tris (pH 8.8)	0.625
10%SDS	0.05
10% APS	0.05
TEMED	0.005

Retirar el etanol, y agregar el gel concentrador, esperar hasta que polimerice, preparar cámara adicionando Buffer de corrida hasta la marca, cargar los 40 μ L de la muestra preparada, en el primer carril siempre cargar el marcador de peso molecular y correr a 80 volts durante 2 horas.

Antes de que termine la corrida, preparar material para la Transferencia, siendo el siguiente el acomodo correcto:

- 2 esponjas
- 2 Papel filtro
- Gel
- Membrana de Nitrocelulosa
- 2 Papel filtro
- 2 Esponja

Para realizar la transferencia el buffer correcto a utilizar es Buffer de Transferencia el cual se corre 90 minutos a 100 Volts.

Finalizada la transferencia, en un recipiente se coloca la membrana cuidadosamente y se adiciona Rojo de Ponceau durante 30 segundos, se recupera el colorante y se lava la membrana (Esto nos ayuda a identificar un barrido de proteínas que se encuentran en la membrana), se siguen realizando los lavados hasta retirar todo el colorante y se procede a bloquear la membrana con leche al 5% durante una hora en agitación, antes de terminar la hora se prepara el anticuerpo primario correspondiente en leche al 5%.

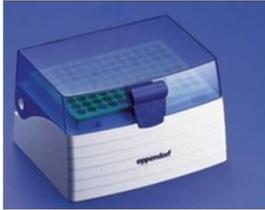
Nota: El anticuerpo primario se queda durante toda la noche.

Para evitar gasto excesivo de anticuerpo primario, se ha planteado el uso de Cámara húmeda:

ANEXO 3

Cámara Húmeda

Material:



- Caja de puntas eppendorff
- Vidrio Grueso (Para preparar geles)
- Parafilm
- H₂O

- 3 Papel filtro
-

1.- Adicionar agua del grifo, a 2/3 de su capacidad.



2.- Colocar base donde deberían ir las puntas.

3.- Acomodar alrededor de la base los papeles filtro y humedecerlos con agua destilada.

4.- Colocar vidrio Grueso con los bordes laterales hacia arriba y humedecerlo con agua destilada.

5.- Colocar un trozo del tamaño de la membrana y adherirlo cuidadosamente.

6.- Colocar 1 mL de anticuerpo primario (previamente preparado en leche al 5%).

7.- Colocar la membrana cuidadosamente boca abajo para que tenga contacto las proteínas de interés con el anticuerpo primario.

8.- Cerrar la caja y sellarla con Parafilm.

9.- Conservar durante toda la noche a 4°C.

Al día siguiente la membrana se lava con PBS 1x+ Tween 3 veces, 10 minutos por lavado, el anticuerpo primario se recupera, se rotula y se puede usar hasta tres veces más (se conserva a -20°C), se prepara el anticuerpo secundario en PBS 1x y se coloca la membrana con 5 mL de anticuerpo secundario en agitación durante una hora.

Terminada la Hora de revela la membrana en Films y se observa la presencia o no de las proteínas de interés.

Análisis por PCR

El RNA total será aislado mediante el método de Trizol®, cuantificado, ajustado y convertido a cDNA mediante transcripción reversa. Posteriormente se realizará PCR en tiempo real utilizando primers específicos para la determinación de la expresión de *TP53* y *MDM2* empleando como control un gen constitutivo GAPDH, 18sRNA, ó β -actina.

ANEXO 4:

Extracción de RNA

NOTA: ESTO SE REALIZA FUERA DE LA CAMPANA DE BIOSEGURIDAD, SOBRE UN RECIPIENTE CON HIELO TRITURADO.

(RNA)ST (RNA)ST (RNA)ST

- 1.- Retirar el medio de cultivo de los frascos T-25 con pipetas estériles o no pero tratadas con inhibidores de RNAsas.
- 2.- Adicionar 1 mL de Trizol a cada caja T-25
- 3.- Raspar las células de manera concienzuda y colocar la suspensión obtenida en tubos Eppendorff rotulados de la siguiente manera:

RWPE-1: (RNA)ST (RNA)ST (RNA)ST

- 4.- Agitar durante 1 minuto cada tubo con TRIzol®, previo a congelar.
- 5.- Conservar en el refrigerador de -20°C.

Se recomienda que posterior a la extracción del RNA se realice la cuantificación en Nanodrop con un μL de muestra, es ideal obtener una concentración mayor a 1000 ng/ μL , con pureza de 1.8-2.0.

ANEXO 5:
Purificación de RNA

Para proteínas y ácidos nucleicos: extracción con Fenol/cloroformo y precipitación del RNA con etanol.

- 1.- Para 50 μ L de reacción, adicionar 85 μ L de agua DEPC, adicionar 15 μ L de acetato de sodio 3M. Mezclar.
- 2.- Mezclar el extracto con volúmenes 1:1 de fenol/cloroformo y a esto adicionar dos volúmenes de cloroformo. Centrifugar 15 minutos a 12000 g a 4°C.
- 3.- Transferir a un nuevo tubo la fase acuosa.
- 4.- Precipitar RNA con dos volúmenes de etanol al 100% e incubar a -20°C durante 30 minutos. Centrifugar 15 minutos a 12000 g a 4°C.
- 5.- Remover el sobrenadante (Quedará un pelet en el fondo del tubo), lavar con 500 μ L de etanol al 70% frío. Centrifugar 10 minutos a 12000 g a 4°C.
- 6.- Descartar etanol, dejar secar el pelet durante 20-30 minutos.
- 7.- Resuspender RNA en 20 μ L de agua DEPC.
- 8.- Conservar RNA en temperaturas de -20°C A- 70°C
- 9.- Cuantificar nuevamente en Nanodrop.

ANEXO 6:

Reacción Transcriptasa Reversa

Utilizando Super Script II

REACTIVOS	CONCENTRACIÓN FINAL	CONTROL (μL)	MUESTRA (x) Se multiplica por las muestras que se tengan.
RNA libre de DNA		11	
Random Primers (1μg/μL)	16.6	0.2	
H ₂ O DEPC 0.1%		0.8	
Volumen final		12μl	

Incubar a 65°C en el termociclador 5 min.

REACTIVOS	CONCENTRACIÓN FINAL	CONTROL (μL)	MUESTRA (x) Se multiplica por las muestras que se tengan.
dNTP's 10mM	0.5 mM	1	
Buffer RT 5x	1	4	
DTT 100 mM	10	2	
RNAsa OUT (10μg/μL)	40	1	
Volumen final		20	

Homogenizar cuidadosamente.

Incubar a Temperatura ambiente 2 minutos.

REACTIVOS	CONCENTRACIÓN FINAL	CONTROL (μL)	MUESTRA (x) Se multiplica por las muestras que se tengan.
Transcriptasa II (200 μg/μL)	200	1	

Homogenizar

Iniciar la reacción de retrotranscripción en el termociclador.

25°C 10 minutos

42°C 50 minutos

70°C 15 minutos

Guardar tubos a 4°C “o” a -20°C para periodos prolongados.

Cuantificar 1 μL de cDNA en Nanodrop.

Por ultimo procede realizar la PCR-Real Time para identificar el mensajero de p53, MDM2 y TLR3.

Análisis por secuenciación para la determinación de mutaciones.

Con el cDNA que se obtiene, se realiza una PCR normal en este caso para la encima PFU la cual nos permitirá levantar al gen de p53 en nuestras líneas celulares RWPE-1 como en CAsE-PE.

Para secuenciar p53 se utilizarán primers diseñados en el Laboratorio de Interacciones Biomoleculares y cáncer.

ANEXO 7:

PCR para p47 PFU

REACTIVOS	μL (Se realiza la mitad de la reacción para economizar reactivos) originalmente son 50 μL .
PFU	0.5
DNA	0.5
Oligo FW	0.5
Oligo Rv	0.5
Buffer 5x	2.5
H ₂ O	18.75
dNTP's	0.5
DMSO	1.25

Volumen final: **25 μL**

Al término de la PCR se cuantifica el DNA y se corre un gel de agarosa al 1% para ver la amplificación de p53, se realiza un nuevo gel con el resto de la muestra para posteriormente purificarlo por medio de Kit y se cuantifica nuevamente el DNA.

ANEXO 8:

Purificación del producto de PCR y formatos para enviar a secuenciar a LANBAMA

1. Preparación de la muestra:

Para fragmentos de DNA de tamaño pequeño 200 pb / 5 kpb.

*Adicionar 3 volúmenes de Binding Buffer y 2 volúmenes de Isopropanol al producto de PCR. En este caso como se tiene una banda proveniente del gel, se pesa y se adicionan los volúmenes correspondientes, ya adicionado lo anterior se calienta en un baño a 70°C durante 5/10 minutos para disolver la banda.

2. Activación de la columna:

Colocar la columna dentro del tubo que se incluye en el Kit.

*Adicionar 100 µL de Buffer de activación en la columna.

*Centrifugar a 10,000 g durante 30 segundos en micro centrifuga.

3. Columna en proceso:

*Agregar la muestra disuelta en la columna previamente activada.

* Centrifugar a 10,000 g durante 30 segundos en micro centrifuga.

*Descartar el líquido restante del tubo.

4. Lavado de la columna:

*Aplicar 700 µL de washing Buffer a la comuna.

* Centrifugar a 10,000 g durante 30 segundos en micro centrifuga.

*Descartar el líquido restante del tubo.

*Centrifugar nuevamente durante 2 minutos el DNA para eliminar exceso de solución de lavado.

OJO: TIRAR TUBO Y CAMBIAR A TUBO EPPENDORFF PERFECTAMENTE ROTULADO.

5. Elución:

*Adicionar 25 μ L de Elution Buffer a la membrana.

*Incubar a temperatura ambiente durante 1 minuto.

* Centrifugar a 10,000 g durante 1 minuto para que eluya completamente el DNA.

Un microlitro de esta purificación se cuantificará en Nanodrop, esperando una concentración mínima de 50 ng/ μ L, volumen de 20 μ L, con una pureza de 1.8 a 2.0.

Los 4 μ L se utilizarán para preparar un gel de agarosa al 1% en el cual se deberá observar una banda única del fragmento de PCR, al cual deberá tomarse una fotografía y anexarse a las hojas de Lanbama.

Al cumplir con todo esto se manda la secuencia amplificada al Laboratorio Lanbama ubicado en IPICYT cuyos requisitos para recibir la muestra son los siguientes:



SERVICIO DE SECUENCIACIÓN

LANBAMA ofrece a todo el Sector Académico, Industrial y Público el servicio de Secuenciación de ADN de cadena doble (cd), cadena sencilla (cs) y/o producto de PCR sin clonar. Sin edición. Para ello cuenta con el equipo AB 3130 que emplea la Técnica de Sanger y Tecnología capilar.

Es sumamente importante considerar que la asignación de bases depende de la Calidad, Integridad y cuantificación de la muestra proporcionada. Las muestras procesadas se cobrarán independientemente del resultado.

REQUISITOS DE LA MUESTRA:

- Muestras a procesar en tubo rotulados en la tapa y lateral. Utilizar el mismo nombre asignado en la Solicitud y en el tubo.
- ADN liofilizado o diluido en agua desionizada estéril.

CONCENTRACION MINIMA REQUERIDA:

MUESTRA A SECUENCIAR	CONCENTRACION	VOLUMEN MÍNIMO REQUERIDO	OLIGO*
Producto de PCR o clona	50 ng/µl	20 µl por muestra a secuenciar	1 µmolar

*En caso de utilizar oligos diferentes a los que tiene LANBAMA

NOTA 1: Las muestras que contengan una concentración menor a la indicada, no serán procesadas.

NOTA 2: Favor de incluir en la solicitud foto del gel de agarosa que muestre banda única de cada una de las muestras a procesar.

CUANTIFICACION: Se recomienda verificar Integridad de las muestras a procesar mediante la relación de Densidad Óptica 260/280 nm 1.8-2.0 y Gel de agarosa (ambas condiciones son importantes ya que el DNA puede tener contaminación de DNA genómico o RNA que afectan la A₂₆₀ por lo que la concentración de su muestra será sobrestimada).

CALIDAD DE LA MUESTRA: Es sumamente importante enviar ADN de buena calidad, lo que generará una mayor cantidad de bases secuenciadas. Para productos de PCR es necesario purificar su muestra para eliminar nucleótidos y oligos no incorporados (Recomendamos QIAquick de QIAGEN o Wizard de PROMEGA), así como verificar que el producto de amplificación sea único. La cuantificación debe hacerse una vez que la muestra fue purificada.

OLIGOS:

LANBAMA cuenta con los siguiente Oligos:

- | | |
|--|---------------------------|
| KS- TCGAGGTCGACGGTATCG | T7- GCTAGTTATTGCTCAGCGGTG |
| M13 directo- (-40) GTTTTCCAGTCACGTTGTA | T7- TAATACGACTCACTATAGGG |
| M13 reverso- TTGTGAGCGGATAACAATTTC | SK- CGCTCTAGAAGTGTGGATC |
| T3- CGCATTAAACCCTCACTAAAG | SP6- ATTTAGGTGACACTATAG |

NOTA: Si requiere secuenciar con un Oligo diferente a los arriba mencionados, el usuario deberá proporcionarlo.



SOLICITUD DE SECUENCIACIÓN

LLENADO POR LANBAMA	
Fecha y hora de recepción de muestras:	
No. de solicitud:	
DATOS DEL USUARIO	
Nombre:	
Institución:	
Número de muestras a secuenciar:	
Correo electrónico (a quien se enviarán los resultados):	
Tel. (Ext.):	
FORMAS DE PAGO	
Centro de costos:	
En caso de tener depósito en LANBAMA indicar el número de factura o de vale de transferencia de recursos fiscales.	

DATOS DE LAS MUESTRAS A SECUENCIAR

Muestra(s) a Secuenciar		Tipo de Muestra			Vector de Clonación		Origen del Cliente		Otro(s) organismo(s) de LANBAMA		Tamaño: Aprox. de la clona (pb)	Método de Purificación de la Muestra
		c	d	P	Nombre	Tamaño (pb)	Nombre	Concentración	pc	ps		
No.	Nombre: 4 a 8 caracteres (símbolo que aparece en el sitio)	Concentración (Volúmenes relativos respecto 20 ul)	1	2	3							
1												
2												
3												
4												
5												
6												
7												
8												
9												
10												
11												
12												

ca¹: DNA de cadena sencilla cd²: DNA de cadena doble PCR³: Producto de PCR sin donar

Nombre y firma del investigador:

CONDICIONES Y TÉRMINOS PARA SOLICITANTES:

- 1.- El horario para recepción de muestras es de 8 a 16:00 h.
- 2.- El usuario entregará sus muestras debidamente procesadas para su análisis.
- 3.- El usuario se compromete a identificar cada una de sus muestras.
- 4.- Concluido el análisis el usuario tendrá 5 días para recoger sus muestras, de lo contrario serán desechadas.
- 5.- Se enviarán resultados una vez efectuado el pago del servicio.

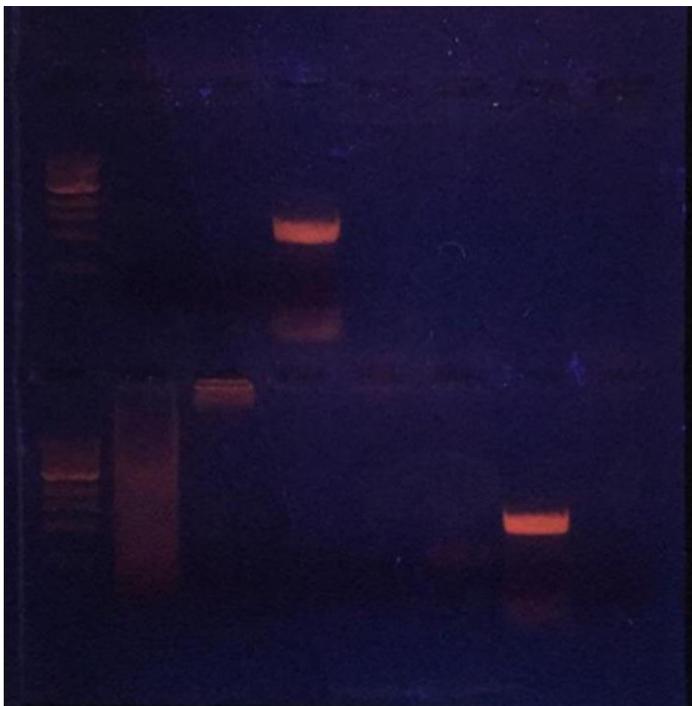
Los documentos los pueden encontrar vía internet con la siguiente ruta:
https://www.ipicyt.edu.mx/Lanbama/lanbama_servicios.php > Biología Molecular > Secuenciación de ácido desoxirribonucleico (DNA) y productos de PCR. Resolución de hasta 800 pares de bases. Resultados en dos días hábiles > Solicitud, Términos y Condiciones del servicio.

ANEXO 9

Secuenciación

Se realizó la PCR para P47 PFU para amplificar el gen de p53 en las líneas celulares RWPE-1 y CAsE-PE con los pares de Primers FW y RV como corresponde para cada par 182/183, 210/211, 206/207 y 261/261 (controles de actina)

Sin embargo, no funcionaron en estas líneas celulares, esto se comprobó por que los controles con actina se amplificaron perfectamente:



M	4	8	10				
M	5	6	1	2	7	9	3

1.-RWPE-1 (182/183)

2.-RWPE-1 (210/211)

3.- CAsE-PE (182/183)

4.- CAsE-PE (210/211)

5.- Control DNA p53 (182/183)

6.- Control DNA p53 (210/211)

7.-RWPE-1 (206/207)

8.- CAsE-PE (206/207)

9.-RWPE-1 (261/262) Actina

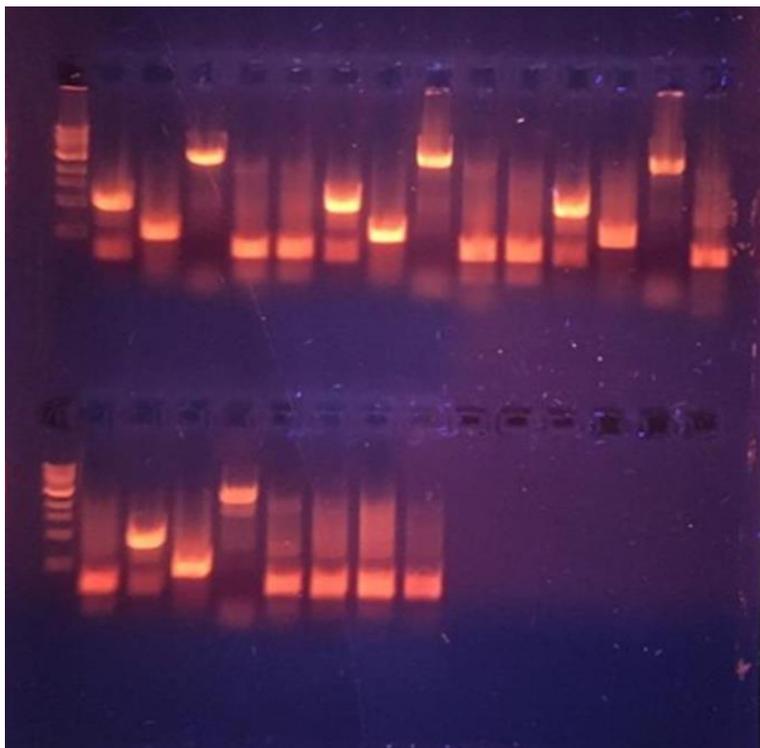
8.- CAsE-PE (261/262) Actina

Los controles de DNA de p53 tampoco se amplificaron como era lo esperado, así que se probaron los primers ahora a diferentes condiciones de temperatura en DNA de p53 control positivo, pero de un plásmido que se encuentra muy concentrado.

El termociclador se divide de la siguiente forma:

45°C	47°C	50°C
1 2	1 2	1 2
2 4	2 4	2 4
5	5	5
53°C	55°C	57°C
5	5	5
1 2		
2 4		

Se utilizó un programa de gradiente cuya ruta fue: GRADI>RUN>START



Primers FW y Rv utilizados:

- 1.- 150/151
- 2.- 206/207
- 3.- CP53 F/CP53 R
- 4.- 182/183
- 5.- N-p53 f /N-p53 R

Temperaturas:

45°C

47°C

50°C

53°C

55°C

57°C

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
M	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4
	(45	(45	(45	(45	(45	(47	(47	(47	(47	(47	(50	(50	(50	(50
	°C)													
1	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
6	5	1	2	3	4	5	5	5						
M	(50	(53	(53	(53	(53	(53	(55	(57						
	°C)													

De acuerdo a estos resultados se decidió utilizar dos pares de primers:

1.- 182/183 (cargar 2 μ L DNA)

2.- 206/207 (cargar 1.5 μ L DNA)

Estos a 50°C modificándola en el programa de PFU, y se ajustó la reacción en base a la cantidad de DNA en el agua, así como incrementando los ciclos a 30.

Gracias a estas modificaciones se amplificó adecuadamente el gen obteniendo los siguientes resultados:



1	2	3
M	R	C

Primers:

2.- 206/207



1	2	3
M	R	C

Primers:

1.- 182/183

(carga: 1.5 μ L DNA) (carga: 2 μ L DNA)

14. GLOSARIO

Ácido hialurónico: polisacárido del tipo de glucosaminoglucanos.

Adenocarcinoma: Tipo de cáncer que comienza en las células glandulares.

Agarosa: polisacárido conformado de galactosas alfa y beta, que es soluble en agua a temperaturas superiores a los 65 °C.

Agonista: sustancia que es capaz de unirse a un receptor celular y provocar una acción determinada en la célula generalmente similar a la producida por una sustancia fisiológica.

Angiogénesis: crecimiento de nuevos vasos sanguíneos.

Anticuerpo: glucoproteínas o proteínas de tipo gamma globulina, actúa en defensa la respuesta inmunitaria, secretadas por los linfocitos B.

Antropogénico: afección en el ambiente provocado por la acción del hombre.

α -Mouse: Anticuerpo secundario que se une a cadenas pesadas y ligeras para todas las subclases de IgG de ratón.

AP-1: factor de transcripción heterodimérico.

Apoptosis: proceso o vía de muerte celular programada.

Arsénico: Elemento químico que forma compuestos venenosos.

Arsénico inorgánico: Compuesto formado naturalmente, es más tóxico que el arsénico orgánico.

β -actina: proteínas altamente conservadas que están involucradas en la motilidad celular, estructura e integridad.

Cáncer de Próstata: crecimiento anormal que ocurre en la próstata.

Carcinoma: Tumor maligno que se forma a partir del tejido epitelial de los órganos.

CAse-PE: células epiteliales prostáticas transformadas malignamente con arsenito de sodio.

Caspasas: enzimas que intervienen en el proceso de apoptosis.

Células endoteliales: tipo de célula aplanada que recubre el interior de los vasos sanguíneos y sobre todo de los capilares, formando parte de su pared.

Células epiteliales: células que recubren las superficies del cuerpo, se encuentran en la piel, los vasos sanguíneos, el tracto urinario, entre otros.

Células Wild Type: o alelo silvestre de un gen es el alelo que se encuentra con más frecuencia en la población general.

Cinasas: tipo de enzima que modifica otras moléculas (sustratos), mediante fosforilación.

Citocinas: proteínas que regulan la función de las células que las producen sobre otros tipos celulares.

DAMPS: patrones moleculares asociados a daño.

DEPC: Pirocarbonato de dietilo. Es utilizado para inactivar las enzimas RNasa en el agua y en los utensilios de laboratorio.

Doxorrubicina: se usa en el laboratorio para inactivar las enzimas RNasa en el agua y en los utensilios de laboratorio.

dsRNA: RNA bicatenario o cadena doble.

Estrés genotóxico: agentes capaces de ocasionar toxicidad genética.

Fenotipo: Conjunto de caracteres visibles.

Fibroblastos: Tipo de célula presente en el tejido conectivo.

Flagelina: Proteína y componente principal del flagelo bacteriano.

Hipoxia: Deficiencia de oxígeno en sangre.

Homocigoto: cuando los dos alelos codifican la misma información para un carácter,

Inmunoterapéutica: terapia en las que se utilizan sustancias con el fin de estimular o inhibir el sistema inmunitario, para ayudar a combatir el cáncer.

Intrones: región del DNA que forma parte de la transcripción primaria de RNA, eliminados en el transcrito, previo a la traducción.

Isoformas: distintas formas de la misma proteína.

LANBAMA: Laboratorio Nacional de Biotecnología Agrícola, Médica y Ambiental.

Linfocitos: célula inmunitaria elaborada en la médula ósea, para elaborar anticuerpos, ayudar a las células tumorales y controlar la respuesta inmune.

Lipopolisacáridos: Estructura de la membrana externa de las bacterias gram-negativas, cuya función en la activación del sistema inmune.

Macrófagos Alveolares: indispensables durante el daño pulmonar y la respuesta a procesos inflamatorios e hipoxia.

Melanoma: causado por cambios (mutaciones) en las células llamadas melanocitos.

Metilación: adición de un grupo metilo (-CH₃) a una molécula.

Mitogénico u oncogénico: actores que actúan en el ciclo celular estimulando la división celular.

MDM2: proteína e importante regulador negativo del supresor tumoral p53.

Monocatenario: de cadena simple.

Necrosis: Muerte células causada por una lesión.

NF- κ B: factor de transcripción nuclear potenciador de la cadena ligera kappa de células B activadas.

Pro-apoptótico: propicia la apoptosis.

p53: gen supresor de tumores, "guardián del genoma.

Oligonucleótidos: secuencia corta de DNA o RNA.

PAMPS: patrones moleculares asociados a patógenos.

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.

Quimiocinas: pequeñas proteínas, secretadas por células, que modulan el sistema inmunitario.

q-PCR: PCR cuantitativa se utiliza para detectar, caracterizar y cuantificar ácidos nucleicos para numerosas aplicaciones.

RAR β : gen codifica el receptor beta del ácido retinoico.

Retrotranscripción: proceso en biología molecular que implica la generación de DNA de doble cadena denominado DNA complementario (cDNA) a partir de un ácido ribonucleico (RNA) de cadena simple.

RT-PCR: PCR de transcripción inversa, permite el uso de RNA como molde.

RWPE-1: Línea celular conformada por células epiteliales no transformadas.

Splicing: proceso co-transcripcional de corte y empalme de RNA.

Tetramerización: Proceso por el cual ocurre la formación del tetrámero.

TLR: Receptor tipo Toll, o Toll like receptor; familia de receptores que reconocen patrones específicos de diferentes componentes.

Western Blot: técnica de laboratorio que se utiliza para detectar una proteína específica.

Zipper: Es un dominio de dimerización común en proteínas involucradas en la expresión génica.