

**CENTRO DE INVESTIGACION Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL**

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE BIOMEDICINA MOLECULAR

**“Establecimiento de un modelo para el análisis de la
regulación de TNF- α en líneas celulares”**

T E S I S

Presenta:

Alejandra Guadalupe Parra Martínez

Para obtener el grado de

Maestra en Ciencias

En la especialidad de

Biomedicina molecular

Director de tesis:

Dr. Nicolás Villegas Sepúlveda

Ciudad de México

Agosto, 2021

Agradecimientos

Agradezco principalmente a CONACYT por el apoyo económico que me ha brindado a lo largo de este proyecto. Al CINVESTAV, a mi director de tesis el Dr. Nicolas Villegas Sepúlveda y a mis asesores, que me han dado todo su apoyo y comprensión, a Iván Bautista y Raúl Bonilla que realizaron el trabajo experimental.

Mi familia ha sido un gran impulso, desde que inicié la maestría ellos han estado para mí, para darme ánimos, para hacerme sentir mejor, muchas veces les dije que ya no podía, pero ellos encontraban la manera de decirme que todo estaba bien, para seguir. Cada día se preocupaban por el avance y el desarrollo de esta tesis; En serio muchas gracias, por confiar y creer en mí, aun cuando yo no lo hacía, los amo.

A mi prometido, mi amosito, muchas gracias bebé por estar siempre conmigo aun en mis días de estrés y de tristeza. Me has apoyado muchísimo, inclusive sin saber mucho del tema haces todo por ayudarme, por hacerme sentir mejor, te amo.

Compañeros de maestría, se volvieron mi familia preocupándose y viendo por mi cuando estaba enferma que fueron muchas veces, jaja. Muchas gracias, plebes.

Por último, quiero dedicar esta tesis con todo mi amor y cariño a mi familia y a mi hachito bebé, aunque ya no está físicamente conmigo lo llevo siempre en mi corazón. Un abrazo y un beso hasta el cielo de los perritos.

Índice

Agradecimientos	2
Índice.....	3
Índice de figuras	5
Índice de cuadros	6
Abstract	7
Resumen	8
Introducción.....	9
Cáncer	9
Cáncer cervical	11
Virus del papiloma humano.....	12
Genoma de VPH.....	13
Clasificación de VPH.....	15
Oncopatogénesis e historia natural	15
Clasificación clínica.....	17
Inflamación y cáncer	18
El Factor de necrosis tumoral.....	20
Función, expresión y estructura del TNF- α	20
Gen de <i>TNF-α</i>	23
Regulación transcripcional	25
Factores en cis y factores de transcripción.....	25
Regulación epigenética.....	26
Remodelación de la cromatina	26
Regulación post-transcripcional	27
Maduración del mRNA.	27
Estabilidad del mRNA.	28
Regulación por proteínas con unión al RNA.....	28
Regulación por microRNAs.	29
Regulación traduccional.....	29
Estructura y señalización de TNFR	32
Antecedentes directos TNF- α y cáncer	35
Justificación.....	41
Hipótesis.....	42
Objetivo general	42

Objetivos específicos.....	42
Estrategia Experimental.....	43
Materiales y métodos.....	44
Datos de GEO.....	44
Análisis diferencial GEO2R y TAC	44
GEPIA expresión de citocinas	44
Cultivos celulares	44
Extracción de RNA con TRIzol™ LS Reagent.....	45
RT-PCR	45
Construcción del plásmido reportero	47
Digestión enzimática	52
Transfección con lipofectamina	52
Extracción de proteínas con Ripa.....	52
Western blot.....	52
ELISA.....	54
Resultados.....	55
1.Análisis <i>in silico</i> del perfil de expresión en muestras de cáncer cervical.....	55
2. Determinación de citocinas (TNF- α e IL6) en líneas celulares de cáncer cérvico uterino.....	65
Discusión	69
Conclusión.....	73
Perspectivas	73
Anexo I	74
Bibliografía.....	76

Índice de figuras

Figura 1. Anatomía del útero.....	12
Figura 2. Organización genómica del VPH 16.	13
Figura 3. Oncopatogenesis del VPH.....	17
Figura 4. Procesamiento de la proteína de TNF- α	22
Figura 5. Gen de <i>TNF-α</i>	23
Figura 6. Regulación de la traducción del mRNA	30
Figura 7. Topología Jelly-roll de TNF- α	31
Figura 8. Estructura tridimensional de TNF- α	32
Figura 9. Vía de señalización de TNF- α	35
Figura 10. Expresión media de TNF- α	37
Figura 11. Gráfico de puntos del perfil de expresión de TNF- α	38
Figura 12. Expresión de TNF en HaCaT previamente transfectada con los oncogenes de VPH.....	39
Figura 13. Presencia de mtTNF- α en HaCaT.....	40
Figura 14. Vector pBluescript KS+.	48
Figura 15. Esquema del vector pEGFP-N1.	50
Figura 16. Ejemplo de transferencia del gel a la membrana de nitrocelulosa.....	53
Figura 17. Diagrama de Venn de las 3 comparaciones de los grupos de muestras.....	56
Figura 18. Análisis de componentes de los tres grupos de muestras	57
Figura 19. Expresión diferencial de genes en las 3 comparativas.	57
Figura 20. Expresión diferencial de CACU vs el control.	58
Figura 21. Expresión diferencial de CACU vs HSIL.	59
Figura 22. Expresión diferencial de HSIL vs el control.	60
Figura 23. Mapa de calor de los transcritos en los 3 grupos de muestras.	61
Figura 24. Mapa de calor de los genes relacionados a la vía de TNF- α	62
Figura 25. Expresión diferencial de los transcritos de TNF- α , IL-6, TRAF3, TRAF4, ADAM17, CASP3, CASP8, BIRC2 Y BIRC3.	64
Figura 26. Expresión media de citocinas en el carcinoma de células escamosas de cuello uterino y adenocarcinoma endocervical.	65
Figura 27. Determinación de citocinas (TNF- α e IL6) en líneas celulares de CACU.....	67
Figura 28. Construcción fusión del amino de TNF- α y la proteína GFP.	69

Índice de cuadros

Cuadro 1. Proteínas virales de VPH con la descripción de sus funciones.....	14
Cuadro 2. Oligonucleótidos para amplificar el amino terminal de TNF- α , fragmento de 242 pb.....	46

Abstract

Cervical cancer (CC) is the second lead of women's death worldwide; infection with high-risk human papillomavirus (HPV) is the major risk agent for this cancer. In women with HPV-positive cancer and premalignant lesions, high serum cytokine levels such as IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-6, and TNF- α have been detected. TNF- α is one of the main pro-inflammatory pleiotropic cytokines of the immune system; besides the well-recognized functions, its expression mechanisms are not well established. Our objective is to establish a model to investigate the regulation of TNF- α in epithelial cells (HaCaT cell line). Through in silico analysis, PCR, ELISA, Western blot, and genetic engineering, we find that level of TNF- α regulation is not at the level of the processing by TACE but probably it is the level post-translational or the level post-transcriptional further studies are needed to understand deep the regulation of this cytokine.

Resumen

El cáncer de cuello uterino (CaCu) es la segunda causa más importante de muerte relacionada con el cáncer en mujeres de todo el mundo y su principal factor de riesgo asociado es la infección por genotipos de alto riesgo de VPH. En mujeres con CaCu y con lesiones premalignas se ha detectado niveles séricos elevados de citocinas, entre otras: IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-6 y TNF- α . Además, entre los genes sobre expresados en este cáncer con VPH16 se encuentra el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α). El TNF- α es una de las principales citocinas proinflamatorias pleiotrópicas del sistema inmunológico, y no se conoce con exactitud los mecanismos de regulación de su expresión post-transcripcional y post-traducciona. Por lo tanto, el objetivo del presente trabajo, es establecer un modelo experimental que nos permita investigar y comprender la regulación de TNF- α en células epiteliales de piel (línea celular HaCaT). Mediante análisis *in silico*, PCR, ELISA, Western blot e ingeniería genética, encontramos que el nivel de la regulación de TNF- α no es a nivel del procesamiento por TACE, pero probablemente puede ser a nivel post-traducciona o post-transcripcional, sin embargo, hacen falta más estudios para entender mejor la regulación de esta citocina.

Introducción

El cáncer cérvico uterino es la segunda causa de muerte en mujeres a nivel mundial. No existe un tratamiento eficaz para pacientes con cáncer de cuello uterino avanzado, este se origina en las células que revisten el cuello uterino. Los factores de riesgo asociados a CaCu incluyen: microbiota, relaciones sexuales a temprana edad, múltiples parejas, inmunosupresión, infecciones de transmisión sexual, tabaquismo y la infección por genotipos de alto riesgo del VPH los más frecuentes son 16 y 18; Este virus representa una de las infecciones de transmisión sexual más frecuente en la población mundial con vida sexual activa. En CaCu y en las lesiones premalignas se ha encontrado expresión sérica de citocinas como: IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-6 y TNF- α ; Además entre los genes sobre expresados en este cáncer con VPH16 se encuentra el del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α). Se desconocen con exactitud los mecanismos de regulación de la expresión post-transcripcional y post-traducciona del TNF- α , por lo cual nuestro objetivo es establecer un modelo para investigar la regulación de TNF- α en células HaCaT y tratar de establecer un mecanismo de regulación.

Cáncer

El cáncer se caracteriza por el crecimiento no controlado de un conjunto de células mediante mitosis repetida y anómala, extendiéndose e invadiendo más allá de los límites normales [1, 2]. En la actualidad, se reconoce el cáncer como el resultado de anomalías genéticas en el ámbito celular que implica la mutación o el silenciamiento de genes [3], y en consecuencia suprimen o favorecen la continuidad del ciclo celular, por lo que su alteración conlleva a una división celular descontrolada y a la formación de tumores [1, 4]. Además, el proceso está sujeto a diversas señales como factores de crecimiento, citocinas, estímulos quimiotácticos y modificaciones de la matriz extracelular [3]. El mecanismo de carcinogénesis se desarrolla en tres etapas: iniciación, promoción y progresión [1].

La iniciación ocurre cuando la célula es afectada por algún agente genotóxico y ocasiona una o más mutaciones en los genes supresores de tumores o los protooncogenes. Los protooncogenes son genes dominantes codificantes de proteínas involucradas positivamente en la proliferación celular y se clasifican en: factores de crecimiento, receptores de factores de crecimiento, transductores intracelulares, factores de transcripción nuclear y proteínas de control del ciclo celular. Un protooncogén es un gene normal que al mutar puntualmente o por translocación de un alelo, puede ser activado o sobre expresado para promover el desarrollo tumoral. A diferencia de los protooncogenes, los genes supresores de tumores son genes recesivos que codifican proteínas involucradas negativamente en la proliferación celular incontrolada asociada a cáncer, se requiere mutación de los 2 alelos y por tanto la pérdida de su actividad [1].

La célula transformada va acumulando mutaciones que afectan el control del ciclo celular, defectos en la reparación y replicación del DNA, segregación anormal de cromosomas, termina perdiendo gradualmente su estabilidad genómica [3]. Con el paso del tiempo se produce "heterogeneidad tumoral" que hace alusión a la aparición de subclonas con diferentes fenotipos de la célula primera, originando una gran variedad de tipos celulares [5]. Durante la promoción hay un incremento de mutaciones en una célula, mediado por la acción de los carcinógenos; cabe señalar que ni el agente promotor ni sus metabolitos producen mutaciones. Cuando la célula se divide sin control en contacto con agentes de daño, mutagénicos o carcinógenos pueden producirse un mayor número de mutaciones, por lo que, la célula puede tener cambios en su genoma y ganar autonomía; al no depender de las señales de factores de crecimiento para proliferar, se desarrolla un tumor. La acumulación de las células transformadas forma un tumor primario in situ [1].

En la progresión, algunas de las células del tumor penetran en los tejidos cercanos, fenómeno conocido como invasión. Estas células

transformadas alteran el patrón de expresión de las proteínas de adhesión, lo cual favorece la separación con las células vecinas y su migración a la membrana basal. Las células tumorales son capaces de sintetizar enzimas proteolíticas, que degradan la membrana basal, pasando a circulación a través de los vasos sanguíneos o vía linfática hasta ser fijadas en una red capilar, durante este proceso más del 99% de las células mueren, las que sobreviven pasan a través de las células endoteliales, que revisten el interior de la pared capilar, penetran en la matriz extracelular (ECM) para invadir hasta alcanzar una nueva ubicación y establecer un tumor secundario; el proceso anterior se denomina metástasis [1].

El proceso de metástasis implica cambios en el fenotipo biofísico de las células y el tejido, como la mecánica de la fuerza adhesiva responsable de las interacciones matriz célula-célula y célula-extracelular [3]. En particular, el virus del papiloma humano (VPH) se ha relacionado con diferentes tipos de cáncer en el humano, como el cáncer anal, de cérvix, de pene y bucofaríngeo [5, 6]. Estos tejidos tienen propiedades similares: una zona de transformación celular y epitelios mucosos. La OMS reporta que el 95% de los casos de cáncer cervicouterino presentan infección por VPH, en 2009 se estableció como agente causal del cáncer cervicouterino a la infección recurrente de VPH [6].

Cáncer cervical

El cáncer de cuello uterino es la segunda causa más importante de muerte relacionada con el cáncer en mujeres en todo el mundo [7] y la cuarta más común [8]. Anualmente se registran a nivel mundial, casi 50 millones de pacientes nuevos con cáncer de cuello uterino. En la actualidad, no existe un tratamiento eficaz para pacientes con cáncer de cuello uterino avanzado [9]. El cuello uterino conecta el cuerpo del útero con la vagina (Fig. 1) y está compuesto por dos partes (endocérvix y exocérvix). El endocérvix es la abertura del cuello uterino que lleva hasta el útero, y está cubierto de células glandulares; Y el exocérvix es la parte externa del cuello uterino y

está cubierto de células escamosas [10]. El cáncer se origina en las células que revisten el cuello uterino, la parte inferior del útero (matriz). El punto en el que estos dos tipos de células se encuentran en el cuello uterino, se llama zona de transformación; la mayoría de los cánceres de cuello uterino (cervicales) se originan en las células de la zona de transformación [10].

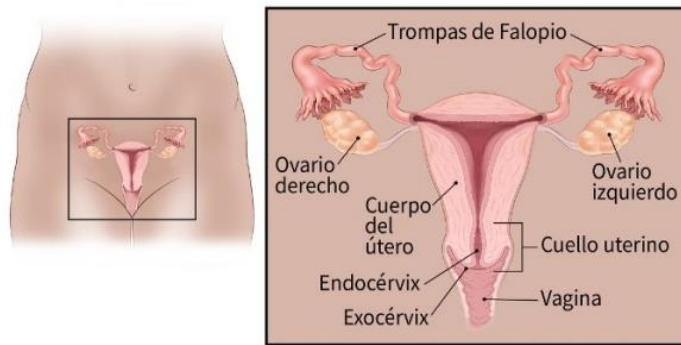


Figura 1. Anatomía del sistema reproductor femenino. Se compone por trompas de Falopio, ovarios (derecho e izquierdo), cuerpo del útero, endocérnix, exocérnix y vagina.

Los factores de riesgo asociados a el cáncer cervical incluyen: microbiota cervical [11], las relaciones sexuales a temprana edad, múltiples parejas sexuales, inmunosupresión, antecedentes de infecciones de transmisión sexual, tabaquismo, y la infección crónica por genotipos de alto riesgo del VPH [7].

Virus del papiloma humano

El VPH es el causante de una de las infecciones de transmisión sexual más frecuente en la población mundial con vida sexual activa. Alrededor del mundo, la prevalencia de infección por VPH en mujeres oscila de un 2% hasta 44%, presentándose en mujeres jóvenes principalmente. Se han identificado más de 150 genotipos de VPH que se clasifican por su tropismo cutáneo o mucoso [12].

En cérvix, la infección por VPH puede ser incidental o persistente. La infección incidental se detecta por coilocitos (células con anomalías nucleares y presencia de vacuola perinuclear) escamosos, tiene un tiempo de persistencia entre 3 y 6 meses, el 85% de las infecciones se eliminan por

el sistema inmune del huésped. La infección persistente no se elimina, dura más de 12 meses y se relaciona con mayor riesgo de desarrollar una lesión intraepitelial cervical [13].

Genoma de VPH

El genoma del VPH es un DNA de doble cadena circular de aproximadamente 8,000 pb y tiene 10 marcos abiertos de lectura (ORF), su estructura consiste en tres regiones: región reguladora, región temprana (*Early*) y región tardía (*Later*) [14].

Región reguladora: O región de control, no codifica par a ninguna proteína, su función es regular la transcripción y replicación del genoma viral, corresponde al 10% del genoma (Fig. 2) [14]. Región temprana (E): Cubre alrededor del 50% del genoma total del virus y está constituido por los genes de expresión temprana. Región tardía (L): Ocupa alrededor del 40% del genoma y contiene los genes de expresión tardía (L1 y L2) [14]. Como ya se mencionó el genoma de VPH codifica 8 proteínas, 6 de la región temprana (E1, E2, E4, E5, E6 y E7) y 2 de la región tardía (L1 y L2), su función se explica en el cuadro 1.

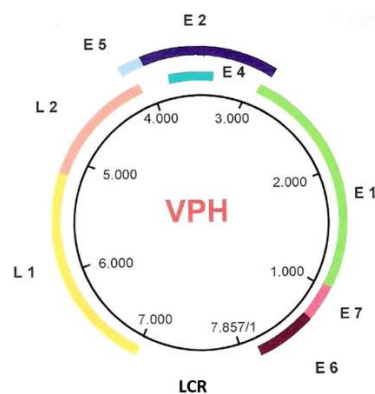


Figura 2. Organización genómica del VPH 16. El genoma se divide en tres regiones de genes tempranos E (E1, E2, E4, E5, E6 y E7), tardíos L (L1 y L2) y reguladores (LCR). Modificado de: [15].

Cuadro 1. Proteínas virales de VPH con la descripción de sus funciones

Proteínas virales	Función
E1	Proteína con actividad de ATPasa y DNA helicasa, tiene un tamaño de 68 a 85 kDa, se une al origen de replicación del DNA viral.
E2	Proteína reguladora de la transcripción de los genes virales, tiene un tamaño de 45 kDa, se une a E1, además reprime los promotores p97 y p105.
E4	Se fusiona con regiones de E1 formando una proteína mixta de 10-44 kDa. Interviene en el ciclo celular en G2, alterando el soporte estructural del citoesqueleto produciendo daño mitocondrial y apoptosis.
E5	Se localiza principalmente en la membrana citoplasmática de la célula huésped, tiene un tamaño de 14 kDa. Inhibe la apoptosis y la migración del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) a la superficie celular.
E6	Induce la síntesis de DNA, activa la actividad de la telomerasa, interactúa e interfiere con la función de proteínas celulares. La unión de E6 a p53 conduce a la degradación de p53; en ausencia de p53 los reguladores negativos del ciclo celular no se expresan y la proliferación celular sigue incluso en condiciones inadecuadas, tiene un tamaño de 17 kDa.
E7	Induce la proliferación celular no programada; interactúa con factores de transcripción, enzimas y remodeladores de cromatina; activa los reguladores positivos del ciclo celular e inhibe reguladores negativos y supresores de tumores, tiene un tamaño de 10 kDa.
L1	Es la proteína mayor de la cápside viral, se auto-ensambla en capsómeros y cápside, interactúa con L2 y los receptores de la célula, su tamaño es de 57 kDa.
L2	Es la proteína menor de la cápside viral, interactúa con el DNA y su tamaño es de 43-53 kDa.

Clasificación de VPH

Los virus de papiloma componen una familia denominada Papillomaviridae, la cual contiene 170 integrantes reconocidos como papilomavirus humanos. Los cuales están agrupados en 16 géneros, los cuales son llamados con una letra griega como prefijo y con la terminación papillomavirus. Los dos géneros de VPH con mayor relevancia son los papilomavirus alpha (α) y beta (β), gran parte de los virus que infectan el área genital pertenecen al género α , por sus características clínicas son clasificados de alto riesgo oncogénico [16, 17].

Oncopatogénesis e historia natural

Las células basales del epitelio cervical descansan sobre la membrana basal, que está sostenida por la dermis (Fig. 3). Se cree que el virus del papiloma humano infecta a las células basales a través de microtraumatismos en el epitelio cervical [18, 7]. Después de la infección, los genes del virus del papiloma humano temprano E1, E2, E4, E5, E6 y E7 se expresan y el DNA viral se replica a partir del DNA episomal [18]. El VPH depende de la maquinaria de replicación del DNA celular para completar su programa de replicación [7]. En las capas superiores del epitelio (la zona media y la zona superficial) el genoma viral se replica más allá, y los genes tardíos L1 y L2, se expresan. L1 y L2 encapsulan los genomas virales para formar viriones de progenie en el núcleo e iniciar nuevas infecciones [18].

La progresión de las lesiones intraepiteliales a cáncer se asocia con la integración del genoma del virus del papiloma humano de alto riesgo oncogénico en los cromosomas del huésped, con la pérdida o alteración asociada de E1 o E2. Los genes E6 y E7 son regulados negativamente por los genes virales E1 y E2, los cuales pueden fragmentarse ocasionalmente durante la integración al genoma del huésped, lo cual produce la pérdida de control de la transcripción de las oncoproteínas E6 y E7 [7, 18, 19]. Los 2 principales virus de alto riesgo oncogénico son VPH-16 y VPH-18.

Clásicamente se han agrupado los genotipos virales de VPH en bajo riesgo (BR) y alto riesgo (AR), dependiendo de la frecuencia con que se encuentran en lesiones benignas, LBG, LAG y carcinomas invasores [20].

Las proteínas virales E6 y E7 de estos virus, desempeñan un papel esencial en la transformación maligna de células huésped infectadas. E6 puede revocar funciones de p53, una proteína supresora de tumores que prohíbe la erosión de los telómeros. Estos resultados conducen a un crecimiento ilimitado, a la inestabilidad genómica y la progresión hacia la malignidad de las células huésped infectadas con VPH. La proteína E7 puede competir con el factor de transcripción E2F para unirse a la proteína retinoblastoma (Rb), otra proteína supresora de tumores, lo que favorece a la progresión del ciclo celular. La pérdida del complejo Rb-E2F da como resultado una sobreexpresión de la proteína p16, un inhibidor del ciclo celular. Bajo circunstancias normales, la proteína p16 puede inhibir la progresión del ciclo celular restringiendo la fosforilación de Rb durante las fases G1 y S del ciclo celular. Por otra parte, la pérdida de la función de p16 puede encontrarse en trastornos potencialmente malignos, como la leucoplasia oral y la eritroplasia [12, 21, 22].

La integración de las múltiples copias del virus al DNA de las células del huésped favorece la persistencia viral, mecanismo que opera principalmente en genotipos de alto riesgo. Sin embargo, el DNA del VPH puede estar dentro de la célula humana de tres formas: integrado al genoma celular; libre en el núcleo celular (en forma episómica), y de forma mixta, es decir, integrada y episómica [22, 19].

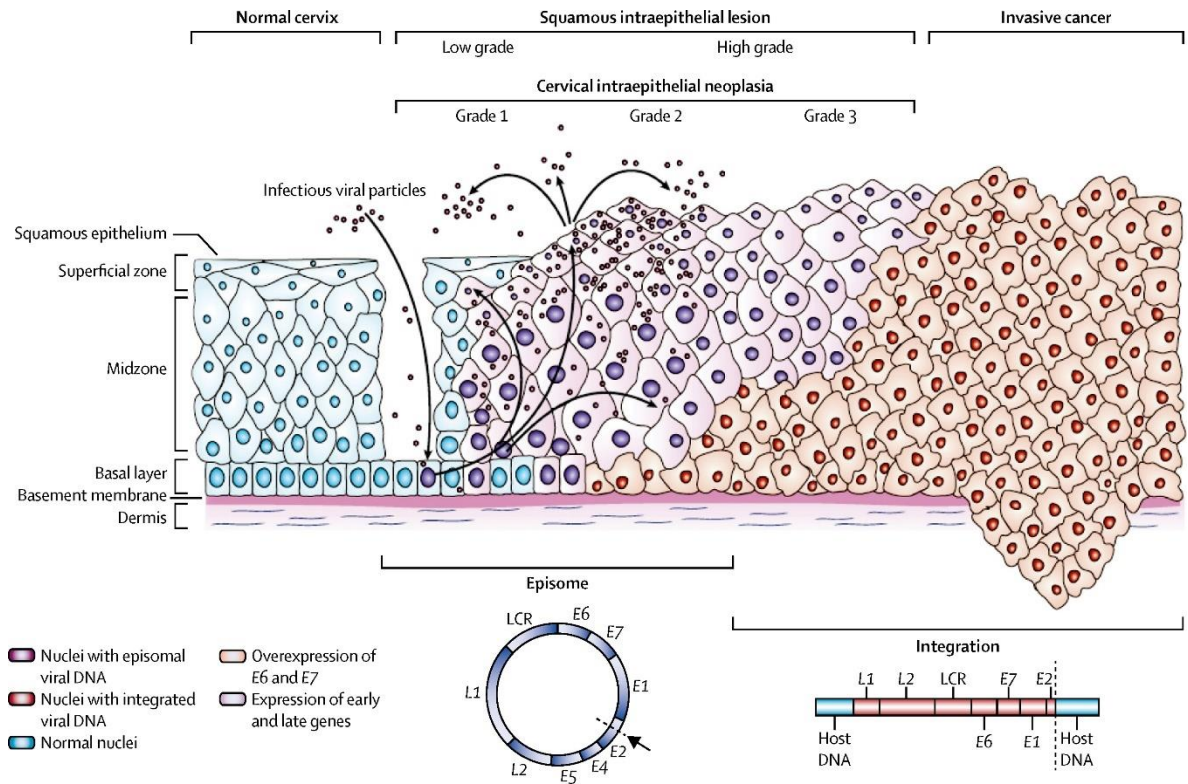


Figura 3. Oncopatogenesis del VPH. El virus entra a las células de la membrana basal por una lesión del tejido. Se replica de forma episomal e infecta a las células de la zona media, la zona superficial y el epitelio escamoso estas son neoplasias intraepiteliales cervicales (NIC) 1 y 2. Cuando las células integran el genoma viral a su genoma es la NIC 3, se sobre expresan las proteínas oncogénicas E6 y E7. Una vez que todas las células sobre expresan las oncoproteínas y pierden el respeto por la membrana basal se desarrolla un cáncer invasivo.

Clasificación clínica

La neoplasia intraepitelial cervical (NIC) es una lesión precursora de cáncer del cuello uterino, se caracteriza por alteraciones de la maduración y anomalías nucleares y se han subdividido en tres grados según su transformación neoplásica y gravedad: NIC I, II y III [20, 23], son más frecuentes en mujeres jóvenes, con una mayor incidencia entre los 25 y 40 años [19]. Si la displasia está confinada al tercio inferior del epitelio estamos en presencia de una NIC I también conocida como lesión intraepitelial de bajo grado (LSIL); si implica los dos tercios inferiores se denomina NIC II y si las anomalías nucleares afectan a más de dos tercios de todo el espesor del

epitelio están en presencia de una NIC III. Estas dos últimas denominaciones en conjunto se conocen también como: lesiones intraepiteliales de alto grado (HSIL) [23].

Inflamación y cáncer

La inflamación consiste en la activación y la migración dirigida de leucocitos desde el sistema circulatorio a los sitios de daño, en respuesta a una lesión causada por una herida, daño químico o lesión. Se inicia y mantiene una red multifactorial de señales químicas en respuesta a una lesión tisular para reparar el tejido afectado [24]. El microambiente tumoral es un sistema complejo que consta de varios tipos de células, como células de músculo liso, células supresoras derivadas de mieloides y leucocitos [25], las interacciones complejas entre los tipos de células en este microambiente regulan el crecimiento, la progresión, la metástasis y la angiogénesis del tumor [26], produciendo diversas citocinas, quimiocinas, mediadores citotóxicos que incluyen especies reactivas de oxígeno, serina y cisteína proteasas y mediadores solubles de la muerte celular, como TNF- α , interleucinas e interferones (IFN) [24, 27, 26]. Estas proteínas están involucradas en la remodelación de la matriz extracelular, la transición epitelial-mesenquimatosa, la angiogénesis, la invasión tumoral, la creación de nichos premetastásicos, la extravasación, el restablecimiento de células tumorales en órganos secundarios y la remodelación del microambiente tumoral metastásico [28, 29].

Durante el cáncer de estómago, colon, piel, hígado, mama, pulmón y cabeza / cuello se han reportado citocinas inflamatorias como IL-1B, IL-2, IL-6, IL-8 e IL-12 y TNF- α [30, 29, 31]. En el cáncer de próstata se ha reportado la elevación de citocinas y quimiocinas las cuales ejercen funciones moduladoras en la metástasis como: TGF β , VEGF, IL-1, IL-6 e IL-7 [28, 32]. El crecimiento y la progresión del cáncer de mama y ovario se ha asociado con niveles elevados de citocinas: IL-1, IL-6, IL-8, CXCL1, CCL2, CXCL5 y TNF- α [33]. Se ha estudiado la expresión de citocinas en las células del

cáncer cérvico uterino y con lesiones premalignas, obteniendo expresión de interferón γ (IFN- γ), IL-2, IL-4, IL-6 y TNF- α [34, 35].

El TNF- α es producido por muchas células tumorales incluidas las del linfoma de células B, el linfoma cutáneo de células T, la leucemia megacarioblástica, leucemia de células T adultas, AML, CLL, ALL, carcinoma de mama, carcinoma de colon, carcinoma de pulmón, carcinoma de células escamosas, cáncer de páncreas, carcinoma de ovario, epitelio cervical, glioblastoma y neuroblastoma; en gran parte de estas células el TNF- α actúa como factor de crecimiento autocrino, sin embargo, en algunos tipos de células la citocina induce expresión de otros factores de crecimiento, que favorecen la proliferación de tumores [36].

Se identificaron varios genes sobre expresados en cáncer cérvico uterino positivos para VPH genotipo 16 (VPH16), entre ellos el gen de *TNF- α* [34]. En las NIC se encontró la expresión de *TNF- α* incrementada con respecto al grupo control; Y en las NIC 1, 2 y 3 fue constante la expresión de TNF- α [35]. La expresión alterada de miRNA se correlaciona con la proliferación, apoptosis y migración de las células de cáncer de cuello uterino, y se ha identificado que ciertos miRNA, incluidos miR-27b, miR-24 y miR-21, se sobre expresan en el cáncer de cuello uterino. En células de cáncer de cuello uterino HeLa (VPH18) se ha encontrado una asociación entre el miR-21 y el TNF- α , donde miR-21 regula la proliferación de células mediante la regulación a la baja del TNF- α [37].

Se ha reportado la expresión de citocinas en líneas celulares de cáncer cervical por lo cual es probable que no solo las células inmunes secreten citocinas, sino también otras células del microambiente tumoral [38]. Se ha reportado niveles plasmáticos elevados de IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-15, TNF- α , MIP-1 α , GM-CSF e IL-1 α en mujeres con cáncer cervical VPH positivo, donde concluyeron que la infección por VPH persistente se asocia con niveles altos de esas citocinas [39, 38]. El mecanismo de producción de TNF- α por las células tumorales no se comprende completamente [36]. El

TNF- α producido por células tumorales o células inflamatorias en el microambiente tumoral puede promover la supervivencia de las células tumorales mediante la inducción de genes que codifican moléculas antiapoptóticas dependientes de NF- κ B [36].

El Factor de necrosis tumoral

El factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) se identificó en 1975 [40] como un factor capaz de inducir la necrosis de tumores murinos *in vitro* e *in vivo* previamente inoculados con lipopolisacáridos (LPS). Posteriormente, una proteína sérica denominada caquexina aislada de conejos infectados crónicamente con *Trypanosoma brucei* fue encontrada en el año 1984 [41], resultando ser el TNF- α por lo cual también se le conoce como caquexina [42, 43, 44].

Función, expresión y estructura del TNF- α

El Factor de necrosis tumoral α (TNF- α) es una citocina proinflamatoria pleiotrópica esencial para la regulación del desarrollo embrionario, el ciclo del sueño, el folículo de los ganglios linfáticos y la formación del centro germinal; No solo promueve la producción de citocinas inflamatorias, sino que también mejora la adhesión y la permeabilidad de las células endoteliales además promueve el reclutamiento de células inmunes como neutrófilos, monocitos y linfocitos a los sitios de inflamación. El TNF- α causa apoptosis y necrosis celular a partir de la inducción de programas de expresión génica. Los niveles altos de esta citosina causan caquexia y choque séptico [45, 46, 47, 48]. El TNF- α es producido por muchos tipos de células, incluidos macrófagos activados, monocitos, linfocitos T y B, queratinocitos, células endoteliales, células epiteliales, osteoclastos, neutrófilos y fibroblastos [49, 50, 51].

El TNF- α es una proteína transmembranal de tipo II. El mTNF- α tiene un peso molecular aproximado de 26 kDa. El mTNF- α se puede procesar en TNF- α soluble de 17 kDa (sTNF- α) mediante la acción de la metaloproteinasa

de matriz conocida como enzima convertidora de TNF- α (TACE: ADAM17) en la región que separa el dominio de homología característica de TNF (THD) del dominio transmembranal y el dominio intracelular (Fig. 4). El mTNF- α tiene la capacidad de procesar señales externas como receptor y sTNF- α circula por todo el cuerpo confiriendo a TNF- α su función endocrina, lejos del sitio de su síntesis. Tanto sTNF- α como mTNF- α son activos como homotrimeros unidos no covalentemente a través de la fracción THD [45, 47].

La mayoría de las funciones efectoras de TNF se han atribuido a sTNF- α , pero muchas también están mediadas por mtTNF- α , especialmente cuando está involucrada la interacción de contacto de célula a célula. Se ha observado que mtTNF- α y sTNF- α poseen bioactividad cuando se estructuran como homotrimeros [49]. Las actividades biológicas mediadas por sTNF- α , incluyen la proliferación celular, la apoptosis, la producción de citocinas en las respuestas inmunes e inflamatorias, activación y migración de linfocitos y leucocitos, fiebre y diferenciación. Por su parte el mtTNF- α actúa como ligando que activa la señalización y como un receptor para transmitir señales inversas a las células portadoras de mtTNF- α , esta señalización induce la expresión de E-selectina en células T CD4 humanas activadas [49, 52].

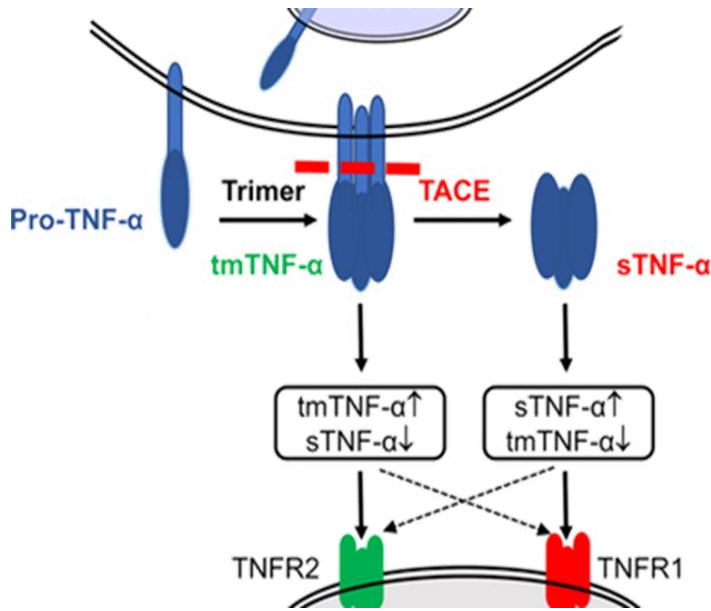


Figura 4. Procesamiento de la proteína de TNF- α . El pro-TNF- α que llega a la membrana se trimeriza para formar el tmTNF- α . Esta proteína puede ser escindida por la enzima TACE y liberar el sTNF- α . tmTNF- α y sTNF- α interaccionan con los receptores 1 y 2 de TNFR1 y TNFR2.

Las funciones de TNF- α dependen de su unión a dos receptores de membrana distintos en las células blanco: TNFR1 (también conocido como p55 y TNFRSF1A) y TNFR2 (también conocido como p75 y TNFRSF1B). TNFR1 se expresa ubicuamente en el sistema linfoide y casi todas las células del cuerpo, lo que probablemente explica las funciones de amplio alcance de TNF- α . El TNFR2 se expresa de una manera más limitada en ciertas poblaciones de linfocitos, incluidas las células T reguladoras [45], células endoteliales, microglía, subtipos de neuronas, oligodendrocitos, miocitos cardíacos, timocitos, islotes de Langerhans y células madre mesenquimales humanas [53].

Las células capaces de producir TNF- α son principalmente capaces de estimularse a sí mismas y no entrar en la vía apoptótica [54]. En el caso de un estímulo prolongado sobre las células, mediado por tmTNF- α , son más sensibles a la inducción de apoptosis [52, 55]. El TNF- α es necesario para la defensa del huésped contra los patógenos [47, 56, 57], la vigilancia inmune contra los tumores malignos, así como la proliferación y supervivencia

celular. Esta citocina es ampliamente considerada como un importante mediador inflamatorio de varias enfermedades, como las enfermedades autoinmunes, enfermedad de Crohn [58], artritis reumatoide [59], osteoartritis [56], cáncer [51], enfermedades cardiovasculares [60], enfermedades neurodegenerativas [61] y fibrosis [62].

Gen de *TNF- α*

El gen del *TNF- α* se localiza en el brazo corto del cromosoma 6, en la región 21 banda 3 (6p21.3) (Fig. 5), se localiza dentro del MHC, que es el sistema más polimórfico descrito en mamíferos. El locus del *TNF- α* está formado por 2.76 kilobases (kb) el cual está conformado por su promotor, cuatro exones, tres intrones y sus regiones no traducidas 5' y 3' (5'-UTR y 3'-UTR). La región 5' UTR está formada por aproximadamente 180 pb (pares de bases) y la 3' UTR, por 793 pb. De esta manera, la unión de los UTR (tanto de 5' como de 3'), más los cuatro exones, origina un transcrito maduro de 1,772 nucleótidos [42, 63].

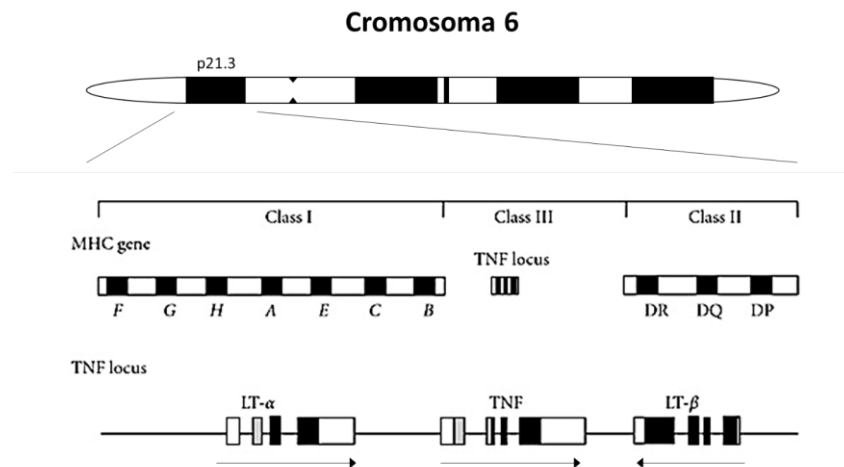


Figura 5. Gen de *TNF- α* . El gen de *TNF- α* se ubica en el cromosoma 6, tiene 2.76 kb el cual está conformado por un promotor, cuatro exones, tres intrones y sus regiones no traducidas 5' y 3' (5'-UTR y 3'-UTR).

Sus cuatro exones codifican el RNA para una proteína precursora de 230 aminoácidos (aa), el último exón codifica para el 80% de la proteína secretada [64]. La molécula se sintetiza en ribosomas unidos al retículo

endoplásmico, tiene un péptido señal que mantiene a la proteína unida a la membrana obteniendo el pro-TNF- α , que posee una orientación de proteína tipo II, es decir el extremo amino-terminal es intracelular, el segmento transmembranal está cerca del extremo amino-terminal y el gran segmento carboxilo-terminal es extracelular. La proteína es escindida en el extremo amino-terminal por la enzima TACE liberando el TNF- α soluble (sTNF- α) de 17 kDa con 157 aa. [49, 50, 63, 65].

Variación en la secuencia del DNA en la región reguladora podría interferir con la transcripción del gen, influyendo en el nivel circulante de TNF- α y por lo tanto aumenta la susceptibilidad a enfermedades infecciosas, cancer, enfermedades autoinmunes, neurodegenerativas y otras [66]. Se han identificado varios polimorfismos de *TNF- α* dentro del promotor, en las posiciones, relativas al sitio de inicio de la transcripción, -1031 (timina (T) / citocina(C)), -863 (C / adenina (A)), -857 (C / A), - 851 (C / T), -419 (guanina (G) / C), -376 (G / A), -308 (G / A), -238 (G / A), -162 (G / A) y -49 (G / A) [67]. Una sustitución de G a A en la región promotora (-308) del gen (*TNF- α -308G> A*) regula al alza la expresión de *TNF- α* y se asocia con muchas enfermedades [68], como el síndrome metabólico, resistencia a la insulina, apnea del sueño, infertilidad masculina [69], abortos [70] cardiopatía [71], tuberculosis, cáncer de mama [72], cáncer colorrectal [73], cáncer cervical [74] y enfermedad de Alzheimer [75].

Las proteínas inducidas por TNF- α (TNFAIP) incluyen principalmente TNFAIP1, TNFAIP2, TNFAIP3, TNFAIP4, TNFAIP5, TNFAIP6, TNFAIP8 [76] y TNFAIP9. Todos los miembros de la familia pueden ser inducidos por TNF, pero tienen menos del 15% de similitud de secuencia de aminoácidos entre sí, lo que indica que pueden tener diferentes características biológicas [64]. La expresión de TNFAIPs puede regular la diferenciación celular, apoptosis, respuesta inmune, respuesta inflamatoria y transducción de señales. También juegan un papel importante en enfermedades, especialmente tumores malignos [64, 76]. La expresión de TNFAIP8 está

asociada con el desarrollo de múltiples tipos de cáncer que incluyen cáncer de próstata, hígado, pulmón, mama, colon, esófago, ovario, cuello uterino, páncreas y otros. En cáncer TNFAIP8 promueve la proliferación celular, invasión, metástasis, resistencia a fármacos, autofagia y tumorigénesis mediante la inhibición de la apoptosis celular [77, 78].

Regulación transcripcional

La transcripción de *TNF- α* se activa en respuesta a diversos estímulos específicos como: la señalización de calcio, patógenos, mitógenos, estrés químico y radiación [79]. Dentro de los inductores de la transcripción del gen también se incluyen ligandos para varias clases de receptores, incluyendo receptores de antígenos, tales como el receptor de células T; receptores de reconocimiento de patrones moleculares, los tipo Toll y receptores para citocinas; incluidos los 2 receptores afines para el propio *TNF- α* . La inducción de la transcripción del gen de *TNF- α* después de la exposición a estímulos es temprana inmediata, independiente de la síntesis de proteínas de novo [80]. La expresión de *TNF- α* está altamente regulada a nivel transcripcional por una red de factores de transcripción, epigenética y modificaciones de la cromatina [81].

Factores en cis y factores de transcripción

La transcripción de *TNF- α* se regula de manera específica de tejido y de estímulo. Si bien muchas células pueden producir *TNF- α* , los productores dominantes son las células mieloides y las células T. La transcripción de *TNF- α* está regulada por enhanceosomas, conjuntos de factores de transcripción y coactivadores que se asocian en una estructura de orden superior actuando en sinergia para impulsar la transcripción; la zona UTR 5' del gen *TNF- α* contiene una región promotora proximal de aproximadamente 200 nucleótidos (nt) río arriba del sitio de la adición de cap del mRNA, el cual está compuesto por una caja TATA y múltiples elementos que actúan en cis, que contiene motivos de unión para factores de transcripción. Se han identificado 5 sitios de unión del factor nuclear de células T activadas

(NFAT), 4 sitios de unión de Ets / Elk y 2 sitios de unión de Sp1. Tres de los sitios NFAT se superponen con los sitios Ets / Elk, mientras que un sitio NFAT se superpone con el sitio Sp1 río abajo. También hay 1 sitio de unión de Egr, adyacente al sitio Sp1 río arriba, y un elemento de respuesta AMP cíclico (CRE) [44, 80, 82, 81].

En la zona UTR 5' de *TNF- α* se encuentran motivos de unión a NF- κ B: κ 1, κ 2, κ 3, κ B1, κ B2 y ζ ; estos sitios excepto el κ 3, se encuentran en un promotor distal [80]. Las proteínas del factor nuclear κ B (NF- κ B) son una familia importante de factores de transcripción de *TNF- α* . Esta familia incluye p50, p65 (RelA), c-Rel, p52 y RelB, que se unen al DNA como homo- o heterodímeros. Los co-reguladores son reguladores de la transcripción que, carecen de propiedades de unión al DNA. Modulan la transcripción de genes de varias formas, por ejemplo, mediante actividades de modificación de histonas y promoviendo el ensamblaje de un complejo transactivador [81].

Regulación epigenética

Los genes transcripcionalmente activos están marcados por una serie de modificaciones de histonas y DNA. La transcripción de *TNF- α* está asociada con múltiples histonas acetiltransferasas, incluyendo ATF-2, CBP/p300, p/CAF y GCN5 y SWI/SNF, un componente del complejo remodelador de cromatina que interactúa con las histonas acetiladas. La inducción de la transcripción del *TNF- α* mediada por LPS y glucosa en concentraciones altas; que se observa en monocitos humanos primarios, se ha asociado a un aumento de la acetilación de las histonas H3 y H4, y la mono-, di- y tri-metilación de lisina 4 de histona H3 (H3K4) en la región promotora del *TNF- α* [44, 80].

Remodelación de la cromatina

La posición que ocupa la cromatina dentro del núcleo es también importante para la regulación; la cromatina que se localiza en el nucleolo o la periferia nuclear es menos móvil que la que ocupa el interior del núcleo. Los telómeros están anclados en la periferia del núcleo, donde hay

heterocromatina anclada a la membrana nuclear y eucromatina adyacente al poro nuclear. Las regiones del genoma que no se transcriben están empaçadas en heterocromatina, que está muy condensada, por lo cual no es accesible a las proteínas que participan en la transcripción. Los genes que se transcriben están en la eucromatina, que es más accesible [83]. La eucromatina produce sitios hipersensibles a la DNAsa (HSS), el primer HSS identificado en el locus *TNF- α* fue el promotor proximal, esto refuerza la pertenencia a la categoría de genes de respuesta temprana, estos genes tienen una transcripción rápida, después de la estimulación [44, 80].

Regulación post-transcripcional

Los mecanismos reguladores que operan después de la transcripción también tienen un papel clave en el equilibrio de la producción del transcrito de *TNF- α* . La regulación post-transcripcional incluye la maduración del mRNA, estabilidad del mRNA, el transporte de mRNA del núcleo al citoplasma y la traducción, sin embargo, se conoce poco acerca de la regulación postranscripcional de *TNF- α* [81].

Maduración del mRNA.

El mRNA recién sintetizado, es precursor o pre-RNA, el cual debe pasar por un proceso de maduración que consiste en la adición del CAP en el UTR 5', adición de adeninas en el UTR 3', la remoción de los intrones (splicing) y en algunos casos un splicing alternativo produciendo diversidad de mRNA [84]. Se conoce poco de la regulación post-transcripcional del *TNF- α* .

En el 3' UTR del *TNF- α* humano, se ubica la secuencia reguladora, 2-APRE, es un elemento que actúa en cis y modula el splicing de los transcritos precursores mediante la activación de una cinasa Ser / Thr eIF2 α dependiente de dsRNA (PKR). La secuencia 2-APRE forma una estructura estable de tallo-bucle de 17 pb, que activa PKR e induce a la fosforilación del factor de iniciación 2 alfa (eIF2 α) bloquea el intercambio de GDP / GTP e impide el reciclaje de eIF2 entre las rondas de inicio de la traducción, por lo

tanto, la activación de PKR reprime la traducción del mRNA, pero conduce a un splicing eficiente del pre-RNA de *TNF- α* , por lo que PKR actúa en el control negativo de la traducción y control positivo del empalme. PKR se expresa de forma constitutiva en la mayoría de las células, pero es inducida por virus, dsRNA e interferones [85, 86].

Estabilidad del mRNA.

Regulación por proteínas con unión al RNA.

En la región 3'UTR del mRNA de *TNF- α* también se encuentra un elemento rico en adenosina y uridina (AU) o ARE; está implicado en el control de su transporte, traducción y estabilidad del mRNA [87, 88], este ARE es conservado y contiene siete u ocho copias de la secuencia AUUUA [89, 88]. La Triestraprolina (TTP) es una proteína con estructura dedo de zinc, que se une al ARE produciendo desestabilización del mRNA, disminución de la producción de la proteína y la degradación del mRNA por la remoción de la cola poliadenilada (deadenilación) [90, 91, 92, 93, 94, 81]. P38 es una cinasa que fosforila a TTP y promueve la separación de TTP y ARE, por tanto, promueve mayor estabilización del mRNA [95, 96, 88]. Alternativamente, la proteína HuR estabiliza el mRNA de *TNF- α* , al unirse al ARE en respuesta al LPS. La alimentación crónica con etanol aumenta la unión de HuR al ARE [91, 97, 98, 99]. Los ratones *knock-out* de Tristetraprolina, desarrollan un fenotipo inflamatorio complejo y presentan artritis inflamatoria, dermatitis, conjuntivitis e hiperplasia mieloide causada por un exceso crónico efectivo de *TNF- α* [81]. Las proteínas TIAR y TIA-1 se unen al ARE y secuestran el mRNA evitando su traducción, principalmente en momentos de estrés [100], se han identificado otras proteínas que se unen al ARE como AUF1 / hnRNP [98] sin embargo, no es claro el papel que juegan en la regulación del mRNA de *TNF- α* [101, 67, 102]. Los ratones mutantes que expresan un gen de *TNF- α* con delección de la región ARE de *TNF- α* mostraron niveles más altos de *TNF- α* circulante [81], además cuando se eliminó el ARE no se encontró unión de proteínas en la región 3'UTR, lo

que sugiere que estas proteínas de unión al ARE están regulando el nivel de expresión de *TNF- α* [87, 98].

El elemento de desintegración constitutiva (CDE), se encuentra en la UTR 3' de *TNF- α* , es un segmento de 80 nt río abajo de ARE, con una secuencia conservada de 15 nt que se requiere para la actividad de desestabilizadora del mRNA. No responde a las señales que estabilizan los mRNA que contienen ARE [103].

Regulación por microRNAs.

Los microRNA (miRNA) constituyen una gran familia de RNA no codificantes pequeños, de aproximadamente 21 nucleótidos de longitud. Los miRNA regulan diversos procesos celulares y moleculares, incluida la proliferación celular, la diferenciación y la apoptosis, y regulan más del 60% de todos los genes que codifican proteínas dentro del genoma humano [98]. Los miRNA median la represión de la traducción o la degradación del mRNA mediante su apareamiento con los mRNAs; miR-155 [98] y miR-369-3p [81] estabilizan y mejoran la vida media del mRNA de *TNF- α* , mientras que miR-125b [81] y miR-16 desestabilizan los mRNAs de *TNF- α* e *IL-8*, de una manera dependiente de ARE [104, 105, 106, 107, 108, 109].

Regulación traduccional.

La regulación de la expresión génica a nivel de traducción de mRNA es un mecanismo fundamental para moderar los eventos celulares. La unión de proteínas a elementos reguladores en la región UTR 3' del mRNA puede facilitar la represión de la traducción del mRNA (Fig. 6). El complejo de represión consta de proteínas que median una interacción entre las proteínas de unión a UTR 3' y proteínas de unión al cap 5' de mRNA, como el factor de inicio de la traducción eIF4E [110].

El nivel de poliadenilación en el extremo 3' del mensajero tiene un gran impacto en el estado de traducción de un mRNA; las longitudes variables de las regiones no traducidas 3' creadas por la poliadenilación

alternativa, son un objetivo reconocible para la regulación diferencial y afecta la traducción del mRNA [84]. Los elementos de mRNA que median la poliadenilación se pueden encontrar junto con los ARE. La disposición relativa de estos elementos puede tener un impacto en el perfil de poliadenilación del mRNA [110]. Un mecanismo conservado implica la fosforilación del factor de iniciación eIF2 α , que inhibe la formación de complejos ternarios e impide la traducción dependiente de cap de la mayoría de los mRNA en la célula, la traducción de mRNAs que contienen sitios de entrada de ribosomas internos (IRES). Numerosas proteína cinasas fosforilan específicamente al eIF2 α en diferentes etapas celulares o niveles de estrés [110]. La proteína GAPDH se une al UTR 3' del *TNF- α* , ocasionando la represión de la traducción, regula la expresión de *TNF- α* en función del estado metabólico celular, su unión aumenta cuando la célula está en un nivel bajo de glucosa y se puede revertir al anular la expresión de GAPDH o aumentando el proceso de glucólisis [111], pero se requiere más investigación para definir con certeza cuantos de estos mecanismos participan en la regulación de la traducción mRNA del *TNF- α* humano.

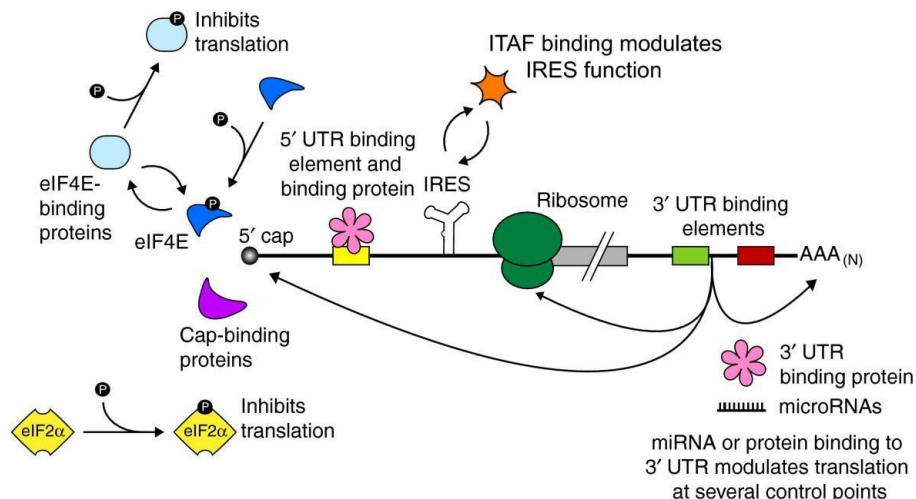


Figura 6. Regulación de la traducción del mRNA. Se puede regular evitando que el ribosoma encuentre el sitio de inicio de la traducción o desaminando el mensajero.

El TNF- α humano maduro se secreta después de la escisión de un péptido de 76 residuos de la prohormona. La proteína madura contiene un

solo puente disulfuro intramolecular [112]. Las diversas formas cristalinas en las que la molécula ha sido obtenida tiene simetría triple, lo que sugiere que la citocina forma trímeros también en estado sólido. La subunidad monomérica del TNF- α es un sándwich de hoja β de "jelly-roll" (Fig. 7) construido casi en su totalidad con hebras antiparalelas [112].

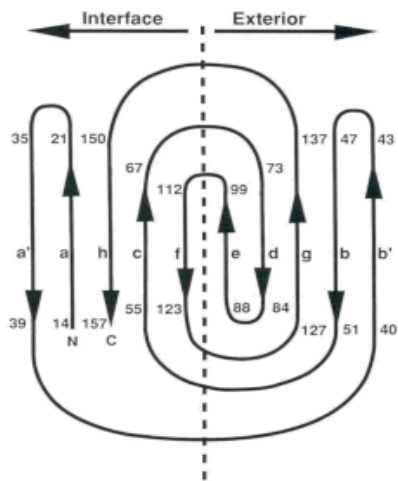


Figura 7. Topología Jelly-roll de TNF- α . Tiene dos hojas de cuatro hebras beta plegadas antiparalelas.

El núcleo del jelly-roll consta de dos hojas de cuatro hebras beta plegadas. La hoja "interna" (hebras a, h, c y f) está involucrada en los contactos del trímero mientras que las hojas opuestas (b, g, d y e) forman la superficie exterior del trímero. Las hebras amino y carboxilo terminales de la molécula se empaquetan juntas, formando las dos primeras hebras de la hoja interior. Los residuos 8-12 están extendidos e involucrados en interacciones de trímeros [112]. TNF- α tiene un segmento polipeptídico para flanquear y estabilizar el extremo amino. Por tanto, tanto la hoja interior como la exterior comprenden cinco hebras β cada una. La hoja interior que mira al eje del trímero es esencialmente plana mientras que la hoja exterior está muy curvada. Progresando desde el borde amino al carboxilo terminal en las hojas interior y exterior del sándwich, las hebras β son progresivamente más largas, lo que le da a la molécula una apariencia escalonada. El TNF- α tiene una longitud de aproximadamente 55Å a lo largo de la dirección de la hebra,

25A a lo largo de la hoja y 20 A de una hoja a otra [112]. Las tres subunidades del trímero de TNF- α son prácticamente idénticas en la estructura secundaria y terciaria (Fig. 8) [112].

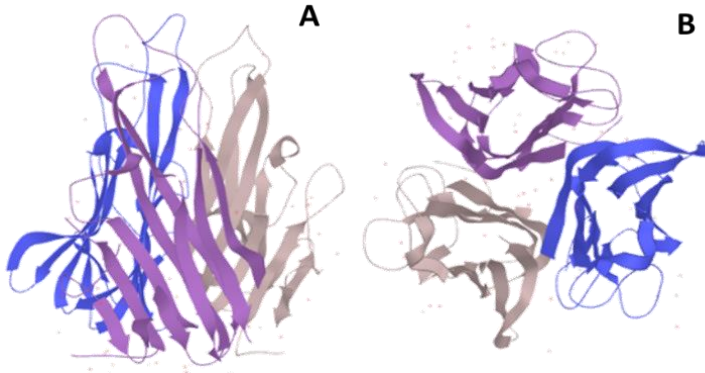


Figura 8. Estructura tridimensional de TNF- α . A. Vista de frente de la proteína, B. Vista de arriba de la proteína.

Estructura y señalización de TNFR

Cada receptor tiene un dominio extracelular característico, un segmento transmembrana y un dominio intracelular. Los dominios extracelulares de ambos receptores tienen un motivo rico en cisteína que se repite de dos a seis veces, estos receptores son activos como homodímeros [45, 46, 47, 53, 65]. Ambos receptores pueden activar la vía canónica NF- κ B y la vía de las MAP cinasas, lo que conduce a la generación de una respuesta antiapoptótica y proinflamatoria o a una vía apoptótica o necroptótica, según el entorno y el estado celular. TNFR2 puede activar la vía no canónica NF- κ B [42, 65]. Tanto el TNFR1 como el TNFR2 pueden unir sTNF- α monomérico o sTNF- α trimérico, aunque el TNF monomérico no induce señalización, y débil para TNFR2 [53, 113]. El equilibrio entre estas dos vías depende de muchos factores, como el tipo de célula, el estado de activación celular, un microambiente intracelular o extracelular, el reclutamiento de moléculas adaptadoras, la concentración de inhibidores celulares de proteínas de apoptosis (cIAP) o el nivel de expresión de NF- κ B [45, 48]

El sTNF- α puede unirse a ambos receptores, pero solo activa adecuadamente TNFR1. El TNF- α de membrana (mTNF- α) o transmembranal (mtTNF- α) es el primer ligando activador para el TNFR2. Sin embargo, puede activar ambos receptores [45, 55]. Los dos TNFR se expresan diferencialmente [55] y su expresión se regula de forma independiente [114]. Una vez que mTNF- α se une a TNFR2, la combinación es demasiado estable para disociarse. Este no es el caso de sTNF- α , que presenta una baja afinidad por TNFR2 e induce una señalización débil [65]. La expresión diferencial de TNFR1 y TNFR2 es regulada por la estructura de sus regiones promotoras respectivas [49, 50, 65, 45, 46]. El promotor de TNFR1 posee características de un promotor de gen de mantenimiento típico, mientras que la expresión del gen de TNFR2 depende de un elemento de respuesta a cAMP y elementos de consenso para múltiples factores de transcripción, como NF- κ B, AP1 e IFN- γ [81].

Los receptores de membrana también pueden convertirse en formas solubles (sTNFR1 y sTNFR2) a través de la actividad de la enzima TACE [45, 46]. Los sTNFR conservan la capacidad de unirse al TNF- α , por lo tanto, funcionan como inhibidores endógenos del mismo. Sin embargo, debido a la falta de cooperación en la unión del ligando, las afinidades de los sTNFR son bajas en comparación con sus formas unidas a la membrana (mTNFR). Ambos sTNFRs pueden interactuar con mTNF- α o sTNF- α [115]. El TNFR1 es un receptor de muerte (DR) contiene 434 aminoácidos. Su región intracelular de 221 aminoácidos contiene un dominio de la muerte (DD) que une TRADD o FADD [53, 55]. El proceso de señalización de TNFR1 empieza con la unión del TNF- α al dominio extracelular del receptor, con la consecuente liberación de la proteína inhibitoria silenciadora de los dominios de muerte (SODD) desde el dominio intracelular del receptor (ICD). Lo que conduce a la interacción con la proteína adaptadora del dominio de muerte asociado al TNFR tipo 1 (TRADD) (Fig. 9) [43, 63]. La cual recluta la proteína 1 que interactúa con el receptor (RIP-1) y el factor 2 asociado al receptor del TNF (TRAF-2) para formar el complejo de señales I. El complejo de señales I

puede desencadenar la activación de NF- κ B, que inicia las transcripciones de muchos genes diferentes, incluidos los asociados con la supervivencia celular, la producción de citocinas inflamatorias y las vías de los genes antiapoptóticos. El complejo de señales I también es capaz de activar cinasas reguladas por señales extracelulares, las MAP cinasas p38 activadas por estrés y la cinasa N-terminal c-Jun (JNK), que son importantes para AP-1, el importante promotor de la inflamación, la proliferación y otros factores de transcripción a través de las vías de señalización de MAPK3 [48, 65, 116].

La formación del complejo I es temporal y se disocia rápidamente de TNFR1, mediando la unión de la proteína del dominio de muerte asociada a Fas (FADD) para formar el complejo de señal II que coordina la señalización río abajo de la cascada de caspasa. Cuando las actividades cinasas de RIP-1 y RIP-3 inhiben la señalización de la apoptosis, se activa la necrosis. Recientemente, varios estudios han demostrado que TNFR2 promueve alto grado de activación, migración y proliferación celular. Cuando TNF- α se une a TNFR2, los dominios intracelulares reclutan complejos TRAF-2-clAP1-clAP2 citoplásmicos existentes. CIAP puede ejercer actividad de ubiquitin ligasa y puede inhibir las caspasas y otros factores inductores de la apoptosis, lo que resulta en la activación de ambas vías la canónica y no canónica de NF- κ B [45, 48]. TNFR2 a diferencia de TNFR1, no contiene DD, es un receptor que interactúa con los factores asociados al receptor de TNF (TRAF), por ejemplo, TRAF2 [65, 55]. TRAF2, a su vez, une TRAF1, TRAF3, clAP1 y clAP2 [65]. Estas proteínas activan otras proteínas de señalización, produciendo supervivencia celular. La supervivencia celular se asegura cuando el factor de transcripción NF- κ B se libera de su proteína inhibidora I κ B α en el citoplasma y se transloca al núcleo donde activa genes de pro-supervivencia [53].

TNFR2 no tiene actividad intrínseca de inducción de muerte celular, solo activa la señalización y activación de varias cinasas [48]. El receptor consiste en 439 aminoácidos. Su dominio extracelular está formado por los

primeros 235 aminoácidos, su dominio transmembrana está formado por 30 aminoácidos, mientras que su dominio citoplasmático tiene 174 aminoácidos [53]. Aunque TNFR2 desencadena NF- κ B de una manera más lenta que TNFR1, TNFR1 mantiene una mayor duración de la actividad de NF- κ B [55]. Sin embargo, aunque TNFR2 carece de un dominio de muerte, la activación de las caspasas y la apoptosis celular pueden iniciarse en condiciones de estrés o cuando el conjunto de cIAP se agota, o se secuestra por su la interacción con los dominios intracelulares con el complejo de señal II, por lo que la actividad de las cIAPs en los receptores TNFR es necesaria por la señal de supervivencia celular [45, 48].

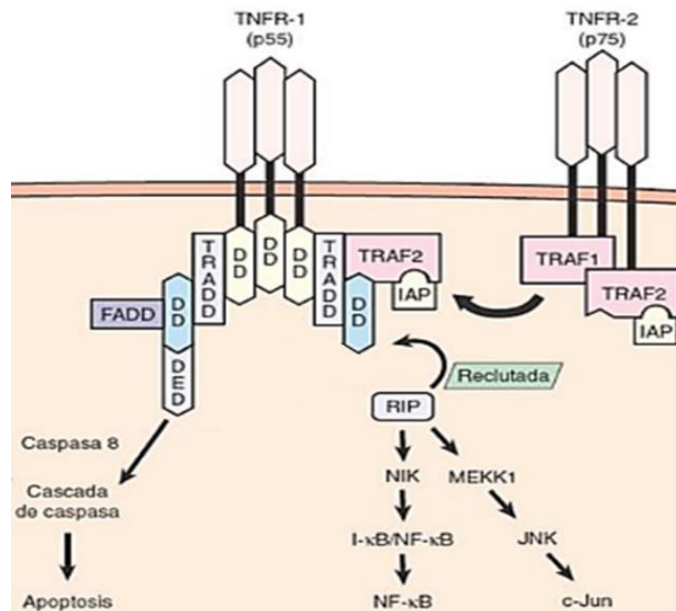


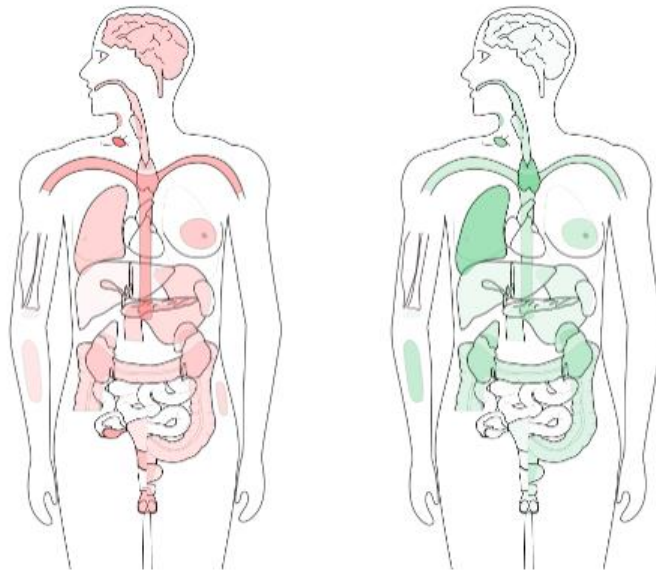
Figura 9. Vía de señalización de TNF- α . La cascada de señalización de TNF, se inicia con la interacción de el receptor con la molécula de TNF- α y dar lugar a muerte celular por la via de apoptosis o supervivencia e inflamación por las vías de map cinasas y NF- κ B.

Antecedentes directos TNF- α y cáncer

El TNF- α es una de las principales citocinas proinflamatorias del sistema inmunológico [117] tiene una gran cantidad de funciones e implicaciones, y esto también se aplica a las células cancerosas [118, 54] es uno de los mediadores clave de la inflamación relacionada con el cáncer [119] y se ha encontrado expresión alta en varios tipos de cáncer humanos

(Fig. 10), como mama [51, 120], leucemias y linfomas [54], gástrico, páncreas [121], de ovario [121], de útero [122], endometrial, renal [123], próstata, vejiga, colorrectal [121], oral e hígado [124]. Los efectos distintos y opuestos del TNF- α en el cáncer dependen de la concentración de citocinas y de las isoformas de sTNF- α o tmTNF- α , activación de diferentes caspasas, expresión variada de proteínas adaptadoras, diferentes niveles de expresión de miembros de la familia Bcl-2, entre otros [54, 51].

Se ha demostrado que los tejidos cancerosos están infiltrados con monocitos, células T y otras células capaces de producir TNF- α [120]. También se sabe que los tumores, así como las células del TME, producen receptores de TNF- α solubles [125]. El NF- κ B se considera crítico para la iniciación y progresión del tumor mediada por α - α [118]. Es bien sabido que el TNF- α participa en todos los pasos del desarrollo del tumor, incluida la tumorigénesis, la proliferación, la angiogénesis, la metástasis [56] y la subversión de las respuestas inmunitarias [120]. El TNF- α provoca la acumulación de células en la fase G2 y la citólisis en las últimas etapas de la mitosis. Los inhibidores de la síntesis de proteínas y la síntesis de RNA aumentan la citotoxicidad del TNF- α [117, 120]. La inestabilidad del DNA inducida por TNF- α es comparable a la de la radiación [56]. En un informe de 2013, se demostró que el TNF- α coopera con el IFN- γ para inducir la senescencia de las células tumorales, un estado celular caracterizado por la detención permanente del crecimiento [126]. Sin embargo, también ejerce mecanismos antitumorales, por ejemplo: mediación de la apoptosis celular, dirigir los macrófagos asociados a tumores al perfil M1, guiar a los neutrófilos y monocitos a los sitios del tumor, activando macrófagos e inhibiendo la diferenciación de monocitos a fenotipos inmunosupresores [54].



Escala de registro $_2$ (TPM + 1)

Figura 10. Expresión media de TNF- α . En rojo se muestra en cáncer y en verde tejidos normales.

Se encontró una sobreexpresión estadísticamente significativa del gen de TNF- α en diferentes tipos de cáncer (Fig. 11), el carcinoma de células escamosas de cuello uterino y adenocarcinoma endocervical (CESC), en la neoplasia linfode linfoma difuso de células B grandes (DLBC), en la leucemia mieloide aguda (LAML), en el cistadenocarcinoma seroso de ovario (OV), en tumores de células germinales testiculares (TGCT) y en el carcinoma endometrial del cuerpo uterino (UCEC). Esta sobreexpresión es a comparación de tejidos sanos como control.

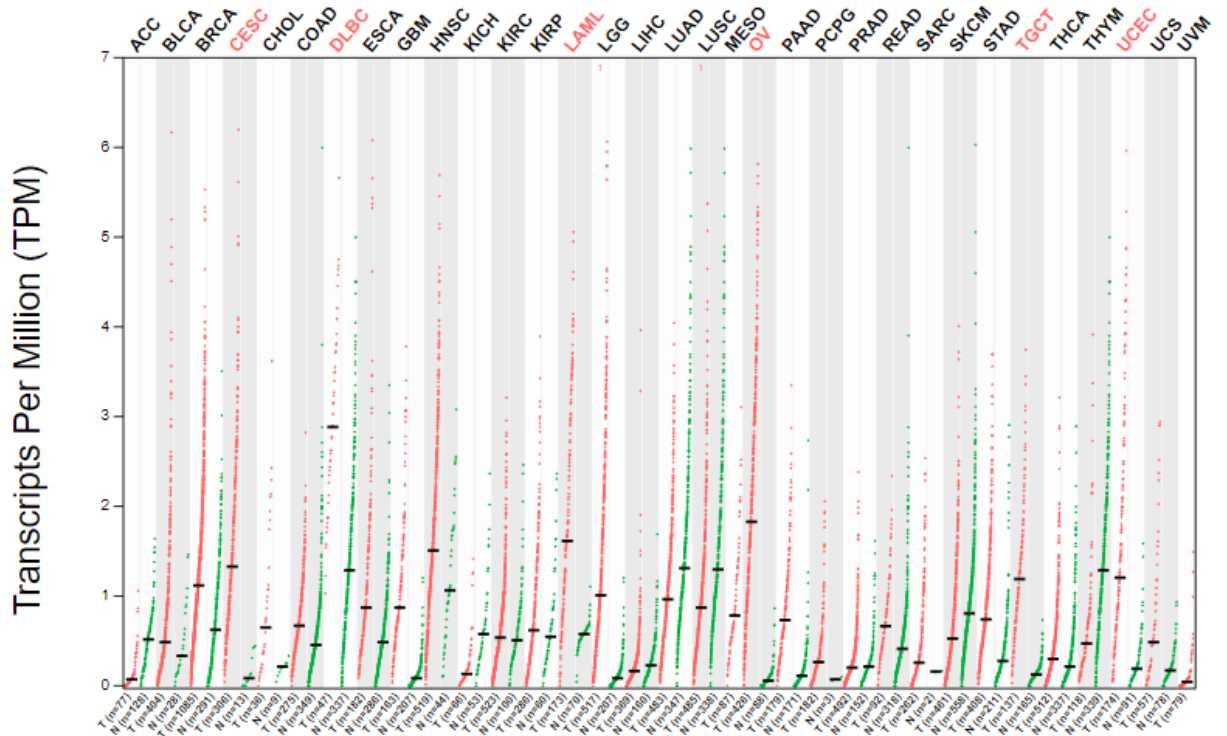


Figura 11. Gráfico de puntos del perfil de expresión de TNF- α en muestras de tumores y tejidos normales, normalizados. Letras rojas los tumores donde hay una sobre expresión del gen.

Como se comentó antes las líneas celulares de cáncer cérvico uterino secretan citocinas, en el laboratorio se ha investigado la presencia del mensajero de TNF- α en la línea celular HaCaT, la cual son queratinocitos inmortalizados no malignos previamente transfectada con el bisitron de los oncogenes E6/E7 con el vector constitutivo de sleep beauty. En presencia de doxiciclina se obtuvo una alta expresión del mensajero de TNF- α (Iván Bautista, datos no publicados). Por lo tanto, la presencia del mensajero de los oncogenes de VPH de alguna forma está modulando la expresión de TNF- α . Se utilizó la expresión de GAPDH como control (Fig. 12).

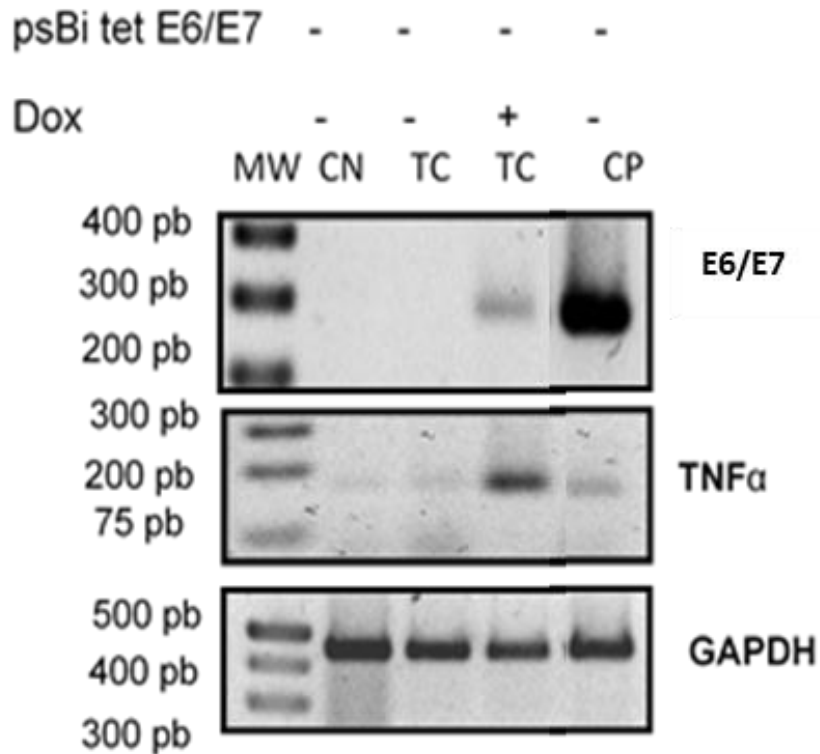


Figura 12. Expresión de TNF en HaCaT previamente transfectada con los oncogenes de VPH. MW: Marcador de peso molecular, CN: Control negativo se utilizó HaCaT sin transfectar. TC: Constitutivo, CP: Control positivo se utilizó la línea celular CaSki (VPH16), Dox: Doxiciolina.

Se investigo la presencia de la proteína membranal de TNF- α en la línea celular HaCaT en presencia del inhibidor de las proteínas antiapoptóticas (IAP) a 1 y 5 μ M, como control de carga se utilizó TACE, se encontró una acumulación de mtTNF- α cuando las células estaban con el inhibidor independiente de la concentración de este, a comparación de cuando no lo tenían, a pesar de tener la misma presencia de TACE (Fig. 13), esto nos sugiere que las IAP podrían estar influyendo en la regulación de TNF- α favoreciendo de alguna manera el corte de la proteína.

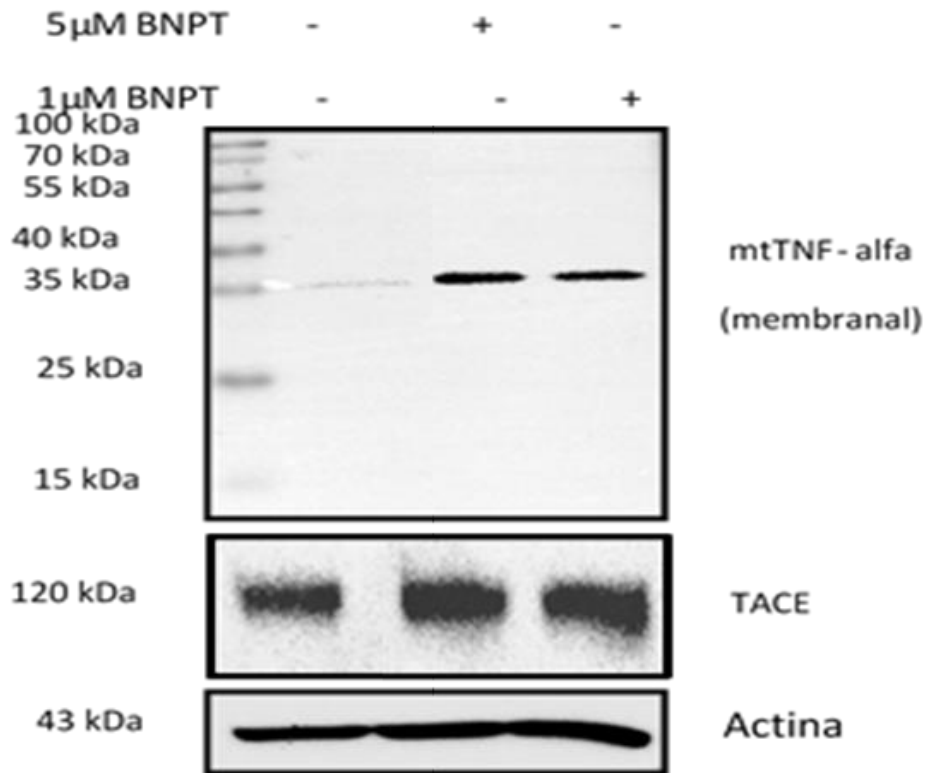


Figura 13. Presencia de mtTNF- α en HaCaT. BNPT: Birinapant inhibidor de las proteínas antiapoptóticas (IAP), TACE: enzima convertidora de TNF- α .

Justificación

Hay expresión de citocinas en tumores de CaCu, es poco claro si todas las expresan las células inmunes, pero algunas pueden ser expresadas por células tumorales (TNF- α). Es importante conocer cuál podría ser la función de las citocinas para la célula tumoral, por lo que es vital estudiar su expresión en las líneas celulares.

El conocimiento de la expresión y las funciones de estas citocinas en las células tumorales será un avance fundamental para tener un panorama más amplio de su regulación y del papel que ejercen en cáncer y en células epiteliales.

Se desconocen con exactitud los mecanismos de regulación de la expresión post-transcripcional y post-traducciona del TNF- α , tanto en las células del sistema inmune, como de las células epiteliales.

Hipótesis

Hay mecanismos no identificados que controlan a nivel post-transcripcional o post-traduccional la producción de TNF- α en células epiteliales y epitelioides de cáncer cérvico uterino.

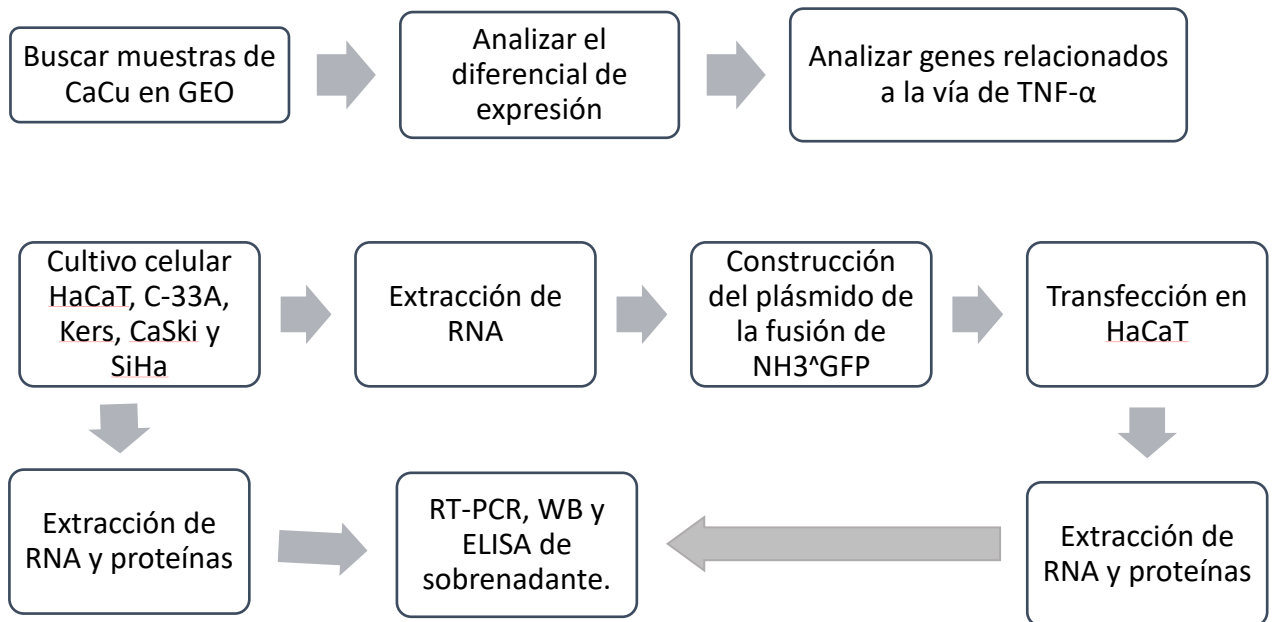
Objetivo general

Establecer un modelo para investigar los mecanismos de la regulación de TNF- α en células HaCaT.

Objetivos específicos

- 1) Análisis *in silico* del perfil de expresión diferencial de transcritos en muestras de cáncer cérvico uterino.
- 2) Determinación de citocinas (TNF- α e IL6) en líneas celulares de cáncer cérvico uterino y células HaCaT.
- 3) Construir células HaCaT que expresen establemente un reportero de TNF- α ^{GFP}.
 - a) Clonación del NH3 de TNF- α .
 - b) Construir la fusión del NH3^{GFP}
 - c) Transfectar establemente células HaCaT con el plásmido codificante de la fusión del NH3^{GFP}.

Estrategia Experimental



Se realizó una búsqueda en Gene Expression Omnibus (GEO) de muestras de cáncer cérvico uterino, para analizar el diferencial de expresión de RNA y se analizaron los genes relacionados a la vía de TNF- α . A partir del cultivo celular HaCaT, C-33A, Kers, CaSki y SiHa se realizó una extracción de RNA y proteínas totales y se analizó el mensajero de TNF- α , IL-2, IL-6 y E7 de VPH 16 por RT-PCR y las proteínas TNF-A e IL-6 se analizaron por ELISA de sobrenadante. A partir del cultivo de células HaCaT previamente transfectadas con los oncogenes de VPH E6/E7, se extrajo el RNA total para hacer la construcción del vector pEGF.N1 con la fusión del amino de la proteína TNF- α con la proteína verde fluorescente (GFP). Las células HaCaT se transfectaron con la construcción se realizaron extracciones de RNA y proteínas totales, para su posterior análisis por RT-PCR y western blot.

Materiales y métodos

Datos de GEO

El conjunto de datos de expresión GPL23126 son microarreglos de RNA total de Affymetrix Human Clariom D Assay que contiene 20 muestras de 3 grupos de epidermis de cérvix de las cuales, 7 son de cáncer cérvico uterino VPH 16 (CaCu), 6 pertenecen a de lesiones cervicales de alto grado VPH 16 y 7 son de epitelio normal. Sin embargo, no todas las muestras tuvieron la calidad deseada, al final nos quedamos con 4 de CaCu, 6 de HSIL y 3 control.

Análisis diferencial GEO2R y TAC

El análisis diferencial de genes se realizó por GEO2R [http:// www.Ncbi.nlm.nih.gov/geo/geo2r/](http://www.Ncbi.nlm.nih.gov/geo/geo2r/) y por Transcriptome Analysis Console versión 4.0.2.15, donde se seleccionaron los genes relacionados a la ruta de señalización de TNF- α que estaban expresados diferencial mente con un *fold change* <2 y >2 y un valor ajustado de p de <.05, se realizó un mapa de calor con las tres poblaciones y la expresión de los genes TNF- α , IL-6, TNFRSF1A, TRAF3, TRAF4, TRAF5, ADAM17, NF-KB1, REL, CASP8, CASP3, BIRC2 Y BIRC3 se visualizaron individualmente.

GEPIA expresión de citocinas

Se ingreso a la página en línea de GEPIA (<http://gepia.cancer-pku.cn/>) se buscó la expresión media de TNF- α en todos los tejidos, en un gráfico de puntos se visualizó la expresión diferencial de TNF- α en los casos de cáncer de la base de datos. Se observo la expresión de TNF- α , IL-2, IL-4, IL-6, IL-8 e IL-10 en el carcinoma de células escamosas de cuello uterino y adernocarcinoma endocervical.

Cultivos celulares

La línea celular HaCaT, exhibe remarcada estabilidad genética al ser cultivadas por largos periodos y con un fenotipo tumorogenico [127]. Se cultivará en el medio DMEM alto en glucosa, Glutamax 0.05%, adicionado con suero fetal bovino (FBS) al 10%, Penicilina/Streptomicina 0.05%, a 37°C

y 5% de CO₂. El medio DMEM, una vez preparado, suplementara con 2g de NaHCO₃, 2.4 de HEPES. Se ajustará pH a 7.4 y se filtrará con Millipore 0.22µm. Finalmente se hará una prueba de esterilidad.

Extracción de RNA con TRIzol™ LS Reagent

La extracción de RNA se realizó con el reactivo Trizol, siguiendo las instrucciones del fabricante. Para la preparación de la muestra, se agregó 0.75 mL de reactivo TRIzol™ LS por 0.25 mL de células y se homogenizo la muestra subiendo y bajando con la pipeta varias veces. Para la precipitación del RNA, se agregó 0.5 mL de isopropanol a la fase acuosa, por 0.75 mL de reactivo TRIzol™ LS utilizado para la lisis, se incubo por 10 min, se centrifugo durante 10 min a 12,000 × g a 4°C el precipitado de RNA total formo un gránulo blanco similar a un gel en la parte inferior del tubo y se desechó el sobrenadante con la micropipeta. Para el lavado del RNA se resuspendió el sedimento en 1 ml de etanol al 75% por 0,75 ml de reactivo TRIzol™ LS utilizado para la lisis, se utilizó el vortex y luego se centrifugo durante 5 min. a 7500 × g a 4° C. Se desechó el sobrenadante con una micropipeta y se secó al aire el sedimento de RNA durante 10 min.

Se resuspendió el sedimento en 50 µL de agua libre de RNasa, EDTA 0.1 mM, o solución SDS al 0.5%, pipeteando de arriba y abajo. Se incubo en un baño maría o bloque de calor a 55°C durante 15 min. El RNA se almaceno a -70°C.

RT-PCR

Es una técnica que permite amplificar in vitro un fragmento específico de DNA y obtener millones de copias del fragmento de interés. Se utilizan ciclos que incluyen las etapas de desnaturalización, alineamiento y extensión. Para ello se diseñaron los oligonucleótidos a los cuales se introdujo los sitios de corte para enzimas de restricción apropiados en la secuencia de tipo wild type durante de la amplificación, para facilitar la posterior construcción de un vector.

Se delimito la región de interés dentro de la secuencia codificante del RNA mensajero de TNF- α , la cual corresponde a la región amino de la proteína, que incluye el sitio de corte para la proteasa Adam17 (TACE) y la región transmembranal, se diseñaron los oligos que se utilizaron para la amplificación por PCR generando un amplicon de 242 pb (Tabla 2).

Oligo Sentido

atg agcactgaaa gcatgatccg ggacgtggag ctggccgagg aggcgctccc caagaagaca
 ggggggcccc agggctccag gcggtgcttg ttctcagcc tcttctcctt cctgatcgtg
 gcagggcgcca ccacgctctt ctgcctgctg cacttggag tgatcggccc ccagagggaa
 gaggccccca gggacctctc tctaatacag cctctggccc aggcagtcag atcatcttct cgaaccccga
 gtgacaagcc ttagacccat gtttagcaa accctcaagc tgaggggag ctccagtggc tgaaccgccc
 ggccaatgcc ctctggcca atggcgtgga gctgagagat aaccagctgg tggtgccatc agagggctg
 tacctcatct actcccaggt cctctcaag ggccaaggct gccctccac ccatgtgctc ctcaccaca
 ccatcagccg catcgccgtc tctaccaga ccaaggtcaa cctcctctc gccatcaaga gccctgcca
 gagggagacc ccagaggggg ctgaggccaa gcctggtat gagcccatct atctgggagg ggtctccag
 ctggagaagg gtgaccgact cagcgtgag atcaatcggc ccgactatct cgacttggc gactctggg
 aggtctactt tgggatcatt gccctgtga

Oligo Antisentido

Se muestra la secuencia en aminoácidos de la proteína completa TNF- α (en negrita la región que se amplificó):

MSTESMIRDVELAEEALPKKTGGPQGSRRCLFLSLFSFLIVAGATTLFCLLHFGVI
GPQREEFPRDLSLISPLAQAVRSSSRTPSDKPVAVHVVANPQAEGQLQWLNRRAN
 ALLANGVELRDNQLVVPSEGLYLIYSQVLFKGGQCPSTHVLLTHTISRIAVSYQTKV
 NLLSAIKSPCQRETPEGAEAKPWYEPYILGGVFQLEKGDRLSAEINRPDYLDFAESG
 QVYFGIIAL

Cuadro 2. Oligonucleótidos para amplificar el amino terminal de TNF- α , fragmento de 242 pb.

	Secuencia	Condiciones de PCR
Forward	5'-ctcgagatgagcactgaaagcatgatccggg	94°C; 1min, 55°C; 30", 72°C; 45", 72°C;7min
Reverse	5'-ggatccagatgatgtgactgcctgggccag	

Con azul las secuencias de corte para las enzimas de restricción XhoI y BamHI

Con los oligonucleotidos se llevó a cabo la amplificación por PCR del amino de TNF- α (242pb) lo cual permitió la incorporación de los sitios de restricción XhoI y BamHI que fueron los sitios seleccionados para ligar el amplicon al vector pEGFP-N1.

Se muestra la secuencia teórica del producto amplificado con los sitios de restricción XhoI-BamHI incorporados:

(XhoI) **ctc gag atg** agc act gaa agc atg atc cgg gac gtg gag ctg gcc gag gag gcg ctc
ccc aag aag aça ggg ggg ccc cag ggc tcc agg cgg tgc ttg ttc ctc agc ctc ttc tcc ttc ctg
atc gtg gca ggc gcc acc acg ctc ttc tgc ctg ctg cac ttt gga gtg atc ggc ccc cag agg
gaa gag ttc ccc agg gac ctc **tct cta atc agc cct ctg gcc cag gca** gtc aga tca tct tcg
gat cc (Bam HI)

Construcción del plásmido reportero

El producto de PCR amplificado se incorporó en un vector intermedio llamado pBluescript KS+ (Fig. 14), el cual previamente se manipulo para darle la capacidad de incorporar productos de PCR y posteriormente permitir la amplificación y subclonación del producto en el vector final pEGFP-N1.

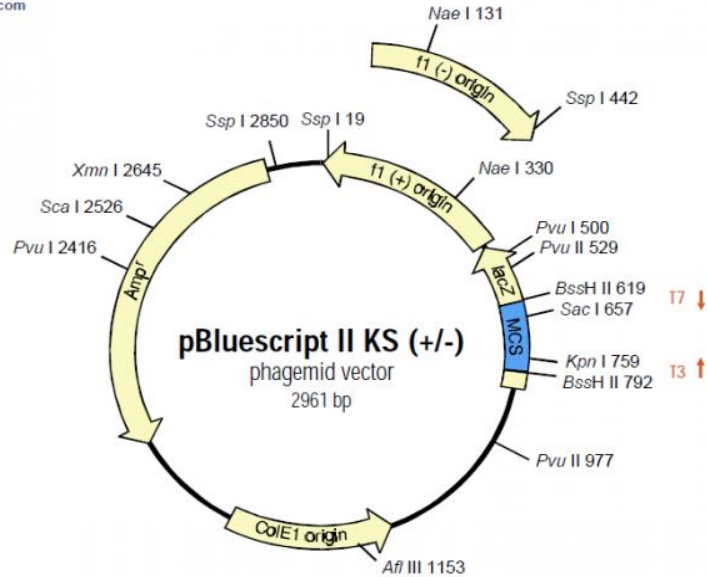


Figura 14. Vector pBluescript KS+ que se utilizó para incorporar el producto de PCR.

Se incorporo el producto de PCR dentro del vector pBluescript KS+, se obtuvieron clonas y se verifico la incorporación del fragmento de DNA de dos maneras, por PCR y por digestión enzimática usando las enzimas de restricción XhoI y BamHI, una vez verificada la presencia del inserto se preparó la muestra para su secuenciación.

Se muestra la secuencia obtenida para el plásmido pBluescript KS+ intermedio que contiene el amplicon (clona 7) secuenciada con los oligos T3 y T7, que permitió verificar que no hay cambios en la secuencia de nucleótidos con respecto a la secuencia de referencia (en amarillo se muestran los nucleótidos correspondientes amino de TNF- α y en azul la secuencia de corte para las enzimas XhoI y Bam HI):

pBS-TNF(7).T3

CATGGGGTTCGGGGACCCCTCGAGGTCGACGGTATCGATAAGCTTGATT**GGAT**

CC

GAAGATGATCTGACTGCCTGGGCCAGAGGGCTGATTAGAGAGAGGGTCCCTGG

GGA

ACTCTTCCCTCTGGGGGCCGATCACTCCAAAGTGCAGCAGGCAGAAGAGCGTG

GT

GGCGCCTGCCACGATCAGGAAGGAGAAGAGGCTGAGGAACAAGCACCGCCTG

GA

GCCCTGGGGCCCCCCTGTCTTCTTGGGGAGCGCCTCCTCGGCCAGCTCCACG

TC

CCGGATCATGCTTTTCAAGTGCTCATCTCGAGAATCGAATTCCTGCAGCCCCGGG

GAT

CCACTAGTTCTAGAGCGGCCGCCACCGCGGTGGAGCTCCAATTCGCCCTATAG

TG

AGTCGTATTACGCGCGCTCACTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTGACTGGGAA

AAC

CCTGGCGTTACCCAACCTTAATCGCCTTGCAGCACATCCCCCTTTCGCCAGCTG

GCG

TAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGA

AT

GGCGAATGGGACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAAGCGCGGGGGTGTGGTG

GTA

CGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTCGCTT

CT

TCCCTTCCTTTCTCGCCACGTTGCGCCGGCTTCCCGTCAGTTCTAATCGGGGCT

TC

CTTTAGGTTCAATTATTGCTTACGGGCCTCACCCAAAACTTGATAGGTGAGGT

TACT

AAGGGCCTCGCCTATAACGGGTTTCGCCCTTGACGGGGATCCAGTTCTTAAAA

G

pBS-TNF (7). T7

CGAGCCCCGGGCGGGGGGCGGCCGCTCTAGACTAGTGGATCCCCGGGCTGC

AGGAATTCGATTCTCGAGCTCTAGCACTGAAAGCATGATCCGGGACGTGGAGC

TGGCCGAGGAGGCGCTCCCCAAGAAGACAGGGGGGCCCCAGGGCTCCAGGC

GGTGCTTGTTCTCAGCCTCTTCTCCTTCTGATCGTGGCAGGCGCCACCACG

CTCTTCTGCCTGCTGCACTTTGGAGTGATCGGCCCCAGAGGGAAGAGTTCCC

CAGGGACCTCTCTAATCAGCCCTCTGGCCAGGCAGTCAGATCATCTTCGG

ATCCAATCAAGCTTATCGATACCGTCGACCTCGAGGGGGGGCCCGGTACCCAG

CTTTTGTTCCTTTAGTGAGGGTTAATTGCGCGCTTGGCGTAATCATGGTCATA

GCTGTTTCCTGTGTGAATTGTTATCCGCTCACAATTCCACACATCATACGAGCC
 GGGAGCATAAAGTGGAAAACCCGGGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAAATTCAC
 ATTAATTGCGTTGCGCTCACTGGCCCGCTTTTCCAGTCGGGAAACCTTGTCTGG
 CAGCTGCTTTAATGGAATCGGCCAACGCGCGGGGAAGAGGGCGTTTGGGTATT
 GGGGGGCTTCTTCGCTTTCCCTCGCTCATGAATCCGCTGGGCTTGG

Se procedió a digerir con las enzimas XhoI y BamHI para subclonar en el vector pEGFPN1 (Fig. 15).

pEGFP-N1 Vector Information
 GenBank Accession #U55762

PT3027-5
 Catalog #6085-1

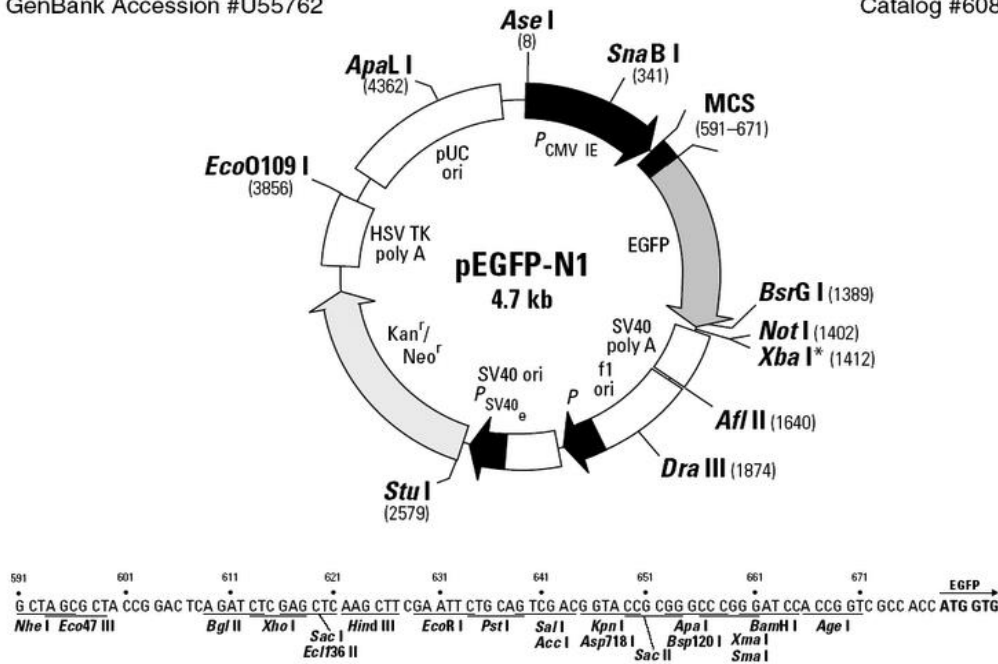


Figura 15. Esquema del vector pEGFP-N1 que se utiliza como aceptor final del amplicón que será expresado como proteína de fusión junto con la proteína verde fluorescente.

Se muestra la fusión esperada del amino de TNF- α con la proteína reportera GFP en el vector pEGFP-N1 (solo se muestra el codón de inicio de la GFP):

ctc gag atg agc act gaa agc atg atc cgg gac gtg gag ctg gcc gag gag gcg ctc ccc aag
 aag aça ggg ggg ccc cag ggc tcc agg cgg tgc ttg ttc ctc agc ctc ttc tcc ttc ctg atc gtg

gca ggc gcc acc acg ctc ttc tgc ctg ctg cac ttt gga gtg atc ggc ccc cag agg gaa gag
ttc ccc agg gac ctc tct cta atc agc cct ctg gcc cag gca gtc aga tca tct tct gat cca
ccg gtc gcc acc atg

Secuencia de corte para XhoI y Bam HI con azul, amino de TNF- α amarillo y el primer codon (atg) de GFP en verde.

Se muestra la secuencia (antisentido) obtenida para la clona que se utilizara en los ensayos de transfeccion, la cual muestra la correcta incorporación del fragmento en los sitios XhoI y BamHI sin alteraciones en la secuencia de nucleótidos, además se mantiene el marco de lectura con respecto a la GFP.

GGCGGGCGGGGCAGCTTGCCGGTGGTGCAGATGAACTTCAGGGTCAGCTTGC
CGTAGGTGGCATCGCCCTCGCCCTCGCCGGACACGCTGAACTTGTGGCCGTTT
ACGTCGCCGTCCAGCTCGACCAGGATGGGCACCACCCCGGTGAACAGCTCCT
CGCCCTTGCTCAC CATGGTGGCGACCGGT GGATCCGAAGATGATCTGACTGCC
TGGGCCAGAGGGCTGATTAGAGAGAGGTCCCTGGGGAACTCTTCCCTCTGGG
GGCCGATCACTCCAAAGTGCAGCAGGCAGAAGAGCGTGGTGGCGCCTGCCAC
GATCAGGAAGGAGAAGAGGCTGAGGAACAAGCACCCGCTGGAGCCCTGGGGC
CCCCCTGTCTTCTTGGGGAGCGCCTCCTCGGCCAGCTCCACGTCCCGGATCAT
GCTTTCAGTGCTCAT CTCGAGATCTGAGTCCGGTAGCGCTAGCGGATCTGACG
GTTCACTAAACCAGCTCTGCTTATATAGACCTCCCACCGTACACGCCTACCGCC
CATTTGCGTCAATGGGGCGGAGTTGTTACGACATTTTGGAAAGTCCCGTTGATT
TTGGTGCCAAAACAACTCCCATTGACGTCAATGGGGTGGAGACTTGGAAATCC
CCGTGAGTCAAACCGCTATCCACGCCATTGATGTACTGCCAAAACCGCATCAC
CATGGTAATAGCGATGACTAATACGTAGATGTACTGCCAAGTAGGAAAGTCCCA
TAAGGTCATGTACTGGGGCATAAT

Secuencia de corte para XhoI y Bam HI con azul, amino de TNF- α amarillo y el primer codon (atg) de GFP en verde.

Digestión enzimática

Se tomo el producto de PCR y se llevó a un volumen de 20 μ L con agua estéril. Se agrego 2 μ L de buffer 10X y 1 μ L de las enzimas XhoI-BamHI. Se incubo por 1 h, la reacción se detuvo incubando a 75°C por 15 min y adicionando 0.5 M de EDTA (pH 8.0) a una concentración final de 10 mM.

Transfección con lipofectamina

Se colocaron las células en una placa con 95% de confluencia en el momento de la transfección. Se diluyo la lipofectamina en Opti-MEM™ Medium, por separado se diluyo el DNA en Opti-MEM™ Medium, luego se agregó el reactivo P3000™ Reagent y se agito. Se agrego el DNA diluido a cada tubo de lipofectamina (para formar el complejo DNA-lipido), relación 1:1 y se incubo por 15 min. a temperatura ambiente. Por último, se agregó el complejo DNA-lipido a las células. 3 días después las células se seleccionaron con G418.

Extracción de proteínas con Ripa

RIPA es un reactivo que permite la extracción de proteínas membranales, del citoplasma y el núcleo, Su uso fue de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Para concentrar las células se centrifugaron a 2500 \times g durante 5 min, se desechó el sobrenadante. Las células se lavaron 2 veces con PBS frío y se centrifugaron a 2500 \times g durante 5 min. Se agrego 1ml del tampón RIPA al sedimento celular, se agito suavemente por 15 min en hielo y se centrifugo la mezcla a \sim 14.000 \times g durante 15 min para sedimentar los restos celulares y se transfirió el sobrenadante (las proteínas) a un tubo nuevo.

Western blot

El western blot se inicia con una electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) que es una técnica analítica empleada para separar proteínas. SDS-PAGE permite separar las proteínas en función de su peso molecular. Ya separadas las proteínas serán transferidas a una membrana de nilón

mediante electrotransferencia. De esta forma las proteínas quedarán adheridas en la membrana en la misma posición y orden que ocupaban en el gel de poliacrilamida. Para revelar la presencia de proteínas en la membrana se utilizarán anticuerpos específicos para la proteína de interés en nuestro caso GFP.

Lisis de la muestra

Se colocó el cultivo celular en hielo y se lavaron las células con PBS frío. Se retiró el PBS y se agregó 1 ml de tampón de lisis frío. Se rasparon las células adherentes y se transfirieron a un tubo de microcentrífuga. Se mantuvieron en agitación constante durante 30 min a 4°C. Se centrifugaron en una microcentrífuga a 4°C 20 min a 12.000 rpm. Los tubos se colocaron el hielo, con una micropipera se tomó el sobrenadante y se puso en un tubo nuevo mantenido en hielo. Se determinó la cantidad de proteína para la carga y se añadió un tampón de muestra Laemmli 2X igual volumen. Para reducir y desnaturalizar las muestras, se hirvió cada lisado celular en tampón de muestra a 100°C durante 5 min. Se cargó cantidades iguales de proteína en los pocillos del gel 20% SDS-PAGE, junto con el marcador de peso molecular y se corrió el gel durante 1 h a 100 V. Se transfirió el gel SDS-PAGE a una membrana de nitrocelulosa (Fig. 16).



Figura 16. Ejemplo de transferencia del gel a la membrana de nitrocelulosa.

Inmunodetección

La membrana se bloqueó durante 1h a temperatura ambiente y se incubo durante la noche a 4°C con el anticuerpo primario a la dilución establecida en tampón de bloqueo. Se lavo la membrana tres veces en TBST, durante 5 min cada lavado y se incubo el anticuerpo secundario conjugado diluido en tampón de bloqueo a temperatura ambiente durante 1h. Se lavo la membrana tres veces en TBST, durante 5 min cada uno.

ELISA

La placa de ELISA se sensibilizo con 50µL del anticuerpo de captura a una concentración de 2µg/mL en PBS en cada pocillo. La placa se selló y se incubó a 4°C durante una noche. Al día siguiente se la placa se lava 3 veces con 300µL de tampón de lavado 3 veces, y se bloquea la placa agregando 300µL de tampón de bloqueo con albumina en cada pocillo y se incubaba a temperatura ambiente por 2h. Se lavo la placa con 300µL de tampón de lavado cada pocillo 5 veces. Se agrego 50µL/pocillo de solución de antígeno y 50µL/pocillo de tampón de bloqueo con albumina. Se selló la placa y se incubó durante la noche a 4°C. Se lavo la placa con 300µL de tampón de lavado/pocillo 5 veces.

Se agregaron las muestras, estándares y controles (50µl/pocillo), se selló la placa y se incubo 1h a temperatura ambiente. Las muestras y controles se diluyeron en tampón de bloqueo 1/100 y la curva estándar se preparó obteniendo un volumen final de 250µL cada uno incubándose con o sin antígeno por duplicado. Se lavó la placa con 300 µL/pocillo de tampón de lavado 5 veces. Se añadió 50µL/pocillo del anticuerpo de detección diluido en tampón de bloqueo. Y es incubo durante 30 min a temperatura ambiente. Se lavó la placa con 300 µL/pocillo de tampón de lavado 5 veces, se agregó 50µL de solución de sustrato a cada pocillo y se incubo a temperatura ambiente en oscuridad. Se agrego 50µL de solución de parada a cada pocillo. Y se golpeó suavemente la placa para asegurarnos de mezclarlo. Se determino la densidad óptica de cada pocillo inmediatamente, utilizando un lector de microplacas ajustado a 492 nm. La concentración de proteínas de

sobrenadante de cultivo. Se realizó mediante spin diálisis usando Centriprep® con un tamaño de filtro de 10 kDa se tomaron 2 ml del sobrenadante del medio de cultivo y se concentraron a 20 µl.

Resultados

1. Análisis *in silico* del perfil de expresión en muestras de cáncer cervical.

En las bases de datos GEO2R y TAC se analizaron un total de 135,750 transcritos del microarreglo de RNA total de 13 muestras de células de epidermis 4 de CaCu VPH 16, 6 HSIL VPH 16 y 3 son de epitelio normal, de los cuales 20,414 tienen un valor $p < 0.05$ y un *fold change* > 2 o < 2 . Se realizó un análisis comparativo entre las muestras de células de CaCu vs CONTROL, CaCu vs HSIL y HSIL vs CONTROL, obteniendo 17,857, 4,756 y 7,204 transcritos respectivamente, para saber cuántos mensajeros se comparten se hizo un diagrama de Venn (Fig. 17). Los 3 análisis comparativos de las muestras comparten el 2.1% de transcritos (432), el 14.4% (2,937) de los mensajeros son exclusivos de CaCu, el 0.41% (83) de HSIL y el 27% (5,519) del control. Entre CaCu y control se comparte el 43.9% (8,969) del total de transcritos, CaCu y HSIL el 6.4% (1,304) y HSIL y control el 5.79% (1,170).

El conjunto de datos de expresión GPL23126 son microarreglos de RNA total de Affymetrix Human Clariom D Assay que contiene 20 muestras de 3 grupos de epidermis de cérvix de las cuales, 7 son de cáncer cérvico uterino VPH 16 (CaCu), 6 pertenecen a de lesiones cervicales de alto grado VPH 16 y 7 son de epitelio normal. Sin embargo, no todas las muestras tuvieron la calidad deseada, al final nos quedamos con 4 de CaCu, 6 de HSIL y 3 control.

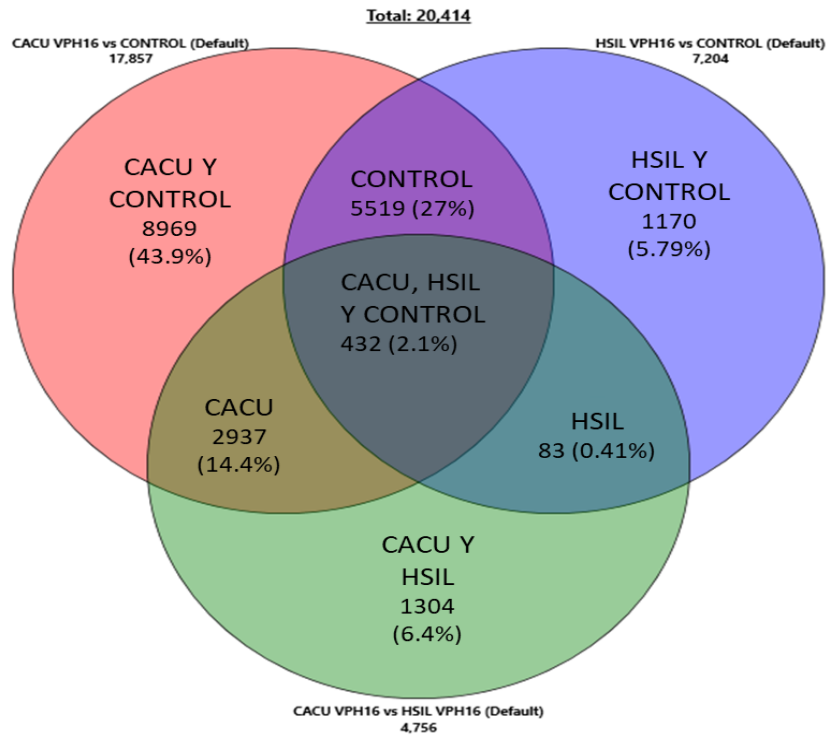


Figura 17. Diagrama de Venn de las 3 comparaciones de los grupos de muestras. Cáncer cérvico uterino (CaCu), lesiones intraepiteliales de alto grado (HSIL).

Se realizó un PCA de los 3 grupos de muestras tomando en cuenta su expresión (Fig. 18). En el primer componente las muestras se separaron teniendo un 54.6% de varianza, con el segundo se alcanzó un 19.3% de varianza y con el tercero un 7.1%. La proyección de los datos en los 3 componentes muestra que el PCA ha sido capaz de encontrar un claro patrón que diferencia los 3 tipos de tumores en 81%. Se observa que el *cluster* de las muestras control y CaCu está separado y el *cluster* de HSIL comparte semejanza con los otros dos grupos de muestras.

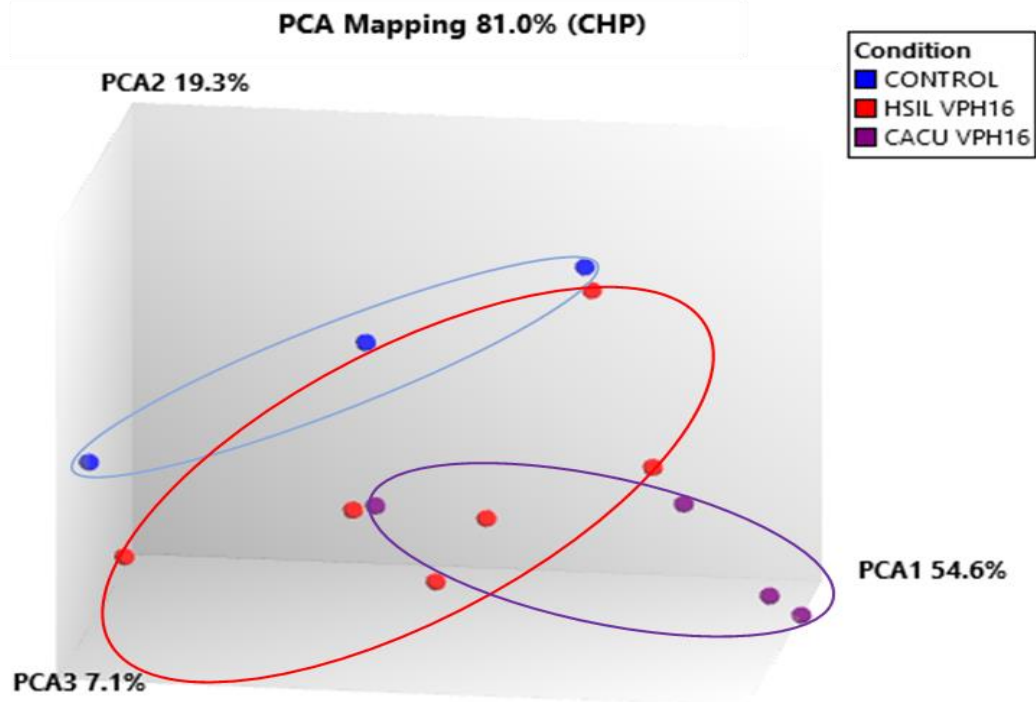


Figura 18. Análisis de componentes del transcriptoma de los tres grupos de muestras. Puntos de color azul, en rojo HSIL y morado CaCu. Cáncer cérvico uterino (CaCu), lesiones intraepiteliales de alto grado (HSIL).

La primera comparación la cual fue entre las muestras de células de CaCu y de células control, se obtuvieron 17,857 transcritos de los cuales 7,075 (39.62%) están siendo sobre expresados y 10,782 (60.38%) sub expresados (Fig. 19).

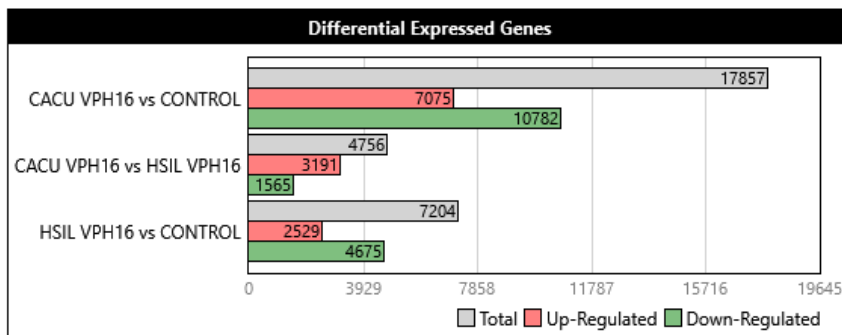
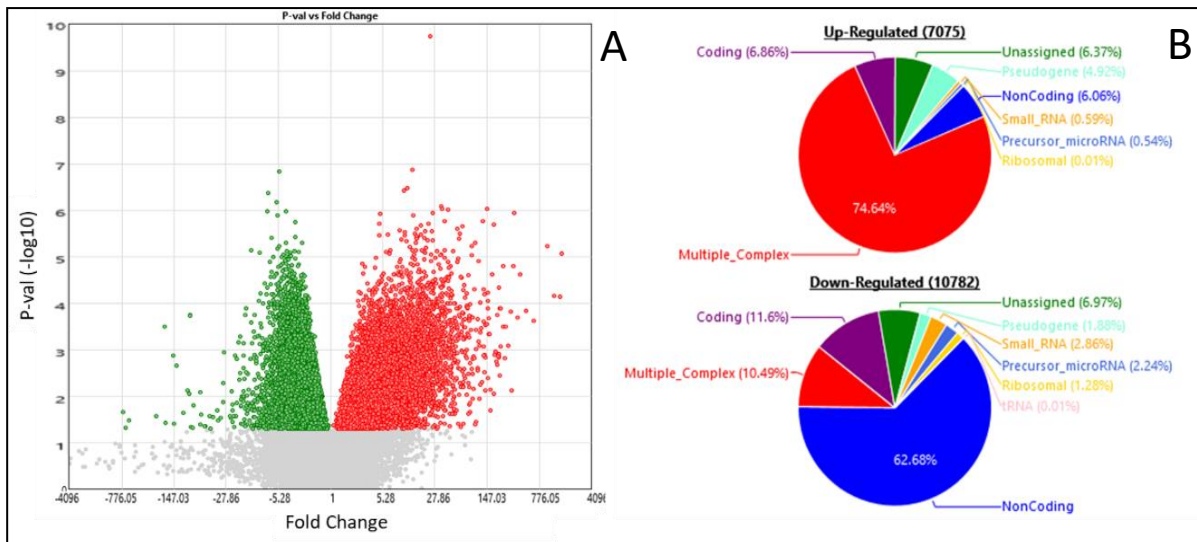


Figura 19. Expresión diferencial de transcritos en los 3 análisis comparativos. Las barras rojas indican los transcritos sobre expresados y las verdes los sub expresados. Cáncer cérvico uterino (CaCu), lesiones intraepiteliales de alto grado (HSIL).

Un *volcano plot* (Fig. 20 parte A.) muestra que los transcritos con mayores veces de cambio (*fold change*) (puntos rojos) o sobre expresados, están mayormente distribuidos que los sub expresados, de los mensajeros sobre expresados el 74.64% pertenecen a complejos múltiples, el 6.86% a codificantes, el 6.06 a no codificantes, el 4.92 a pseudogenes y otros. A diferencia de esos transcritos, la mayoría de los transcritos sub expresados pertenecen a los no codificantes con el 62.68% le siguen los múltiples complejos con el 10.49%, los codificantes con el 11.6% y otros (Fig. 20 parte B).

Figura 20. Expresión diferencial de los transcritos de CaCu vs los del control. A. *Volcano plot* de la comparación de transcritos entre CaCu y control y B. Grafico tipo pastel que muestra la



distribución de los transcritos desregulados. Cáncer cérvico uterino (CaCu), lesiones intraepiteliales de alto grado (HSIL).

La segunda comparación que se hizo fue entre las muestras de CaCu y las HSIL solo 4,756 (3.5%) transcritos pasaron los filtros de criterio, con un valor $p < 0.05$ y un *fold change* > 2 o < 2 . En el análisis comparativo se obtuvieron 3,191 (67.09%) mensajeros sobre expresados y 1,565 (32.91%) sub expresados (Fig. 19). En el *volcano plot* de esta comparación encontramos un bajo *fold change* y una baja significancia, ósea una menor distribución de los puntos en el gráfico, se observa una concentración cercana al origen (Fig. 21 parte A). Los transcritos sobre expresados

pertencen a múltiples complejos el 75.68%, el 7.99% a codificantes, el 6.14% a los no codificantes y otros. Los transcritos no codificantes son la mayoría, con el 43.9% de los mensajeros sub expresados, siguiendo los codificantes con 23.83%, los de múltiples complejos con el 17.57% y otros (Fig. 21 parte B).

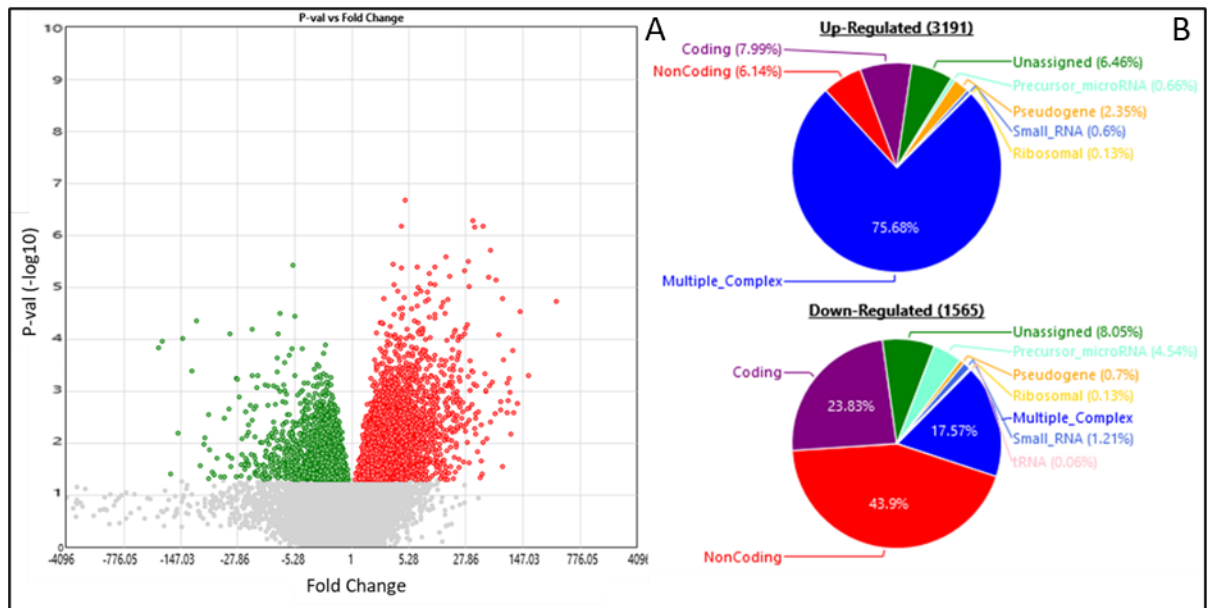


Figura 21. Expresión diferencial de los transcritos de CaCu vs los de HSIL. A. *Volcano plot* de la comparación de transcritos entre CaCu y HSIL y B. Grafico tipo pastel de la distribución de los transcritos desregulados.

La última comparación fue entre las HSIL y el control se obtuvieron 7,204 (5.31%) transcritos que pasaron los filtros de criterio, los cuales son un valor $p < 0.05$ y un *fold change* > 2 o < 2 . En esta comparación se obtuvieron 2,529 (35.11%) mensajeros están sobre expresados y 4,675 (64.89%) sub expresados (Fig. 19). El *volcano plot* nos ayudó a conocer la menor distribución de los transcritos que están sub expresados (puntos verdes) pero con alta significancia y los transcritos sobre expresados (puntos rojos) tienen un mayor *fold change* que los sub expresados, pero la mayoría tiene una menor significancia (Fig. 22. Parte A). De los mensajeros sobre expresados el 69.99% son de múltiples complejos, el 7.83% genes no codificantes, el 7.83% pseudogenes, el 6.84 a codificantes y otros. De los transcritos sub

expresados el 61.39% de ellos pertenecen a la clasificación de no codificantes, el 10.42% a los codificantes, el 10.61% a múltiples complejos y otros (Fig. 22 parte B).

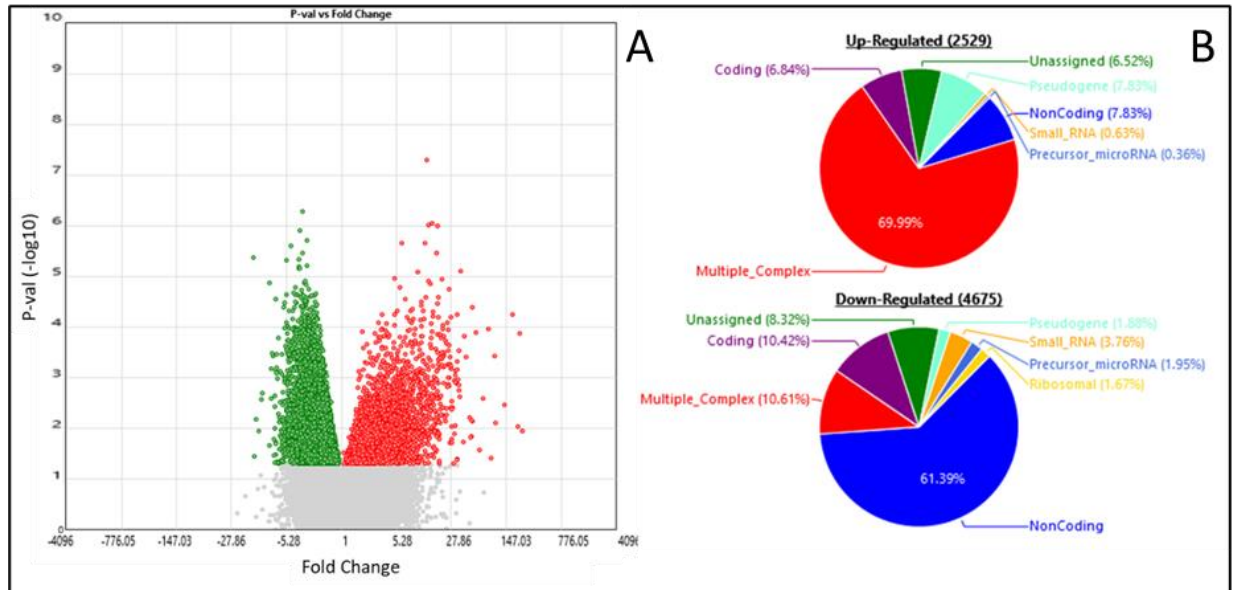


Figura 22. Expresión diferencial de transcritos HSIL vs el control. A. *Volcano plot* de la comparación de transcritos entre HSIL y control y B. Grafica tipo pastel de la distribución de los transcritos desregulados.

Se realizó un mapa de calor en la plataforma TAC de los transcritos de los 3 grupos de muestras, CaCu morado, HSIL rojo y control azul. Donde se puede observar que hay una sobreexpresión de algunos genes en CaCu, además en medio del gráfico se obtuvo un degradado de azul a rojo, mostrando la expresión progresiva dependiendo el grado de severidad de la muestra (CaCu>HSIL>Control) (Fig. 23). Los transcritos que están mayormente expresados pertenecen a los genes del ciclo celular, procesos metabólicos y regulación biológica.

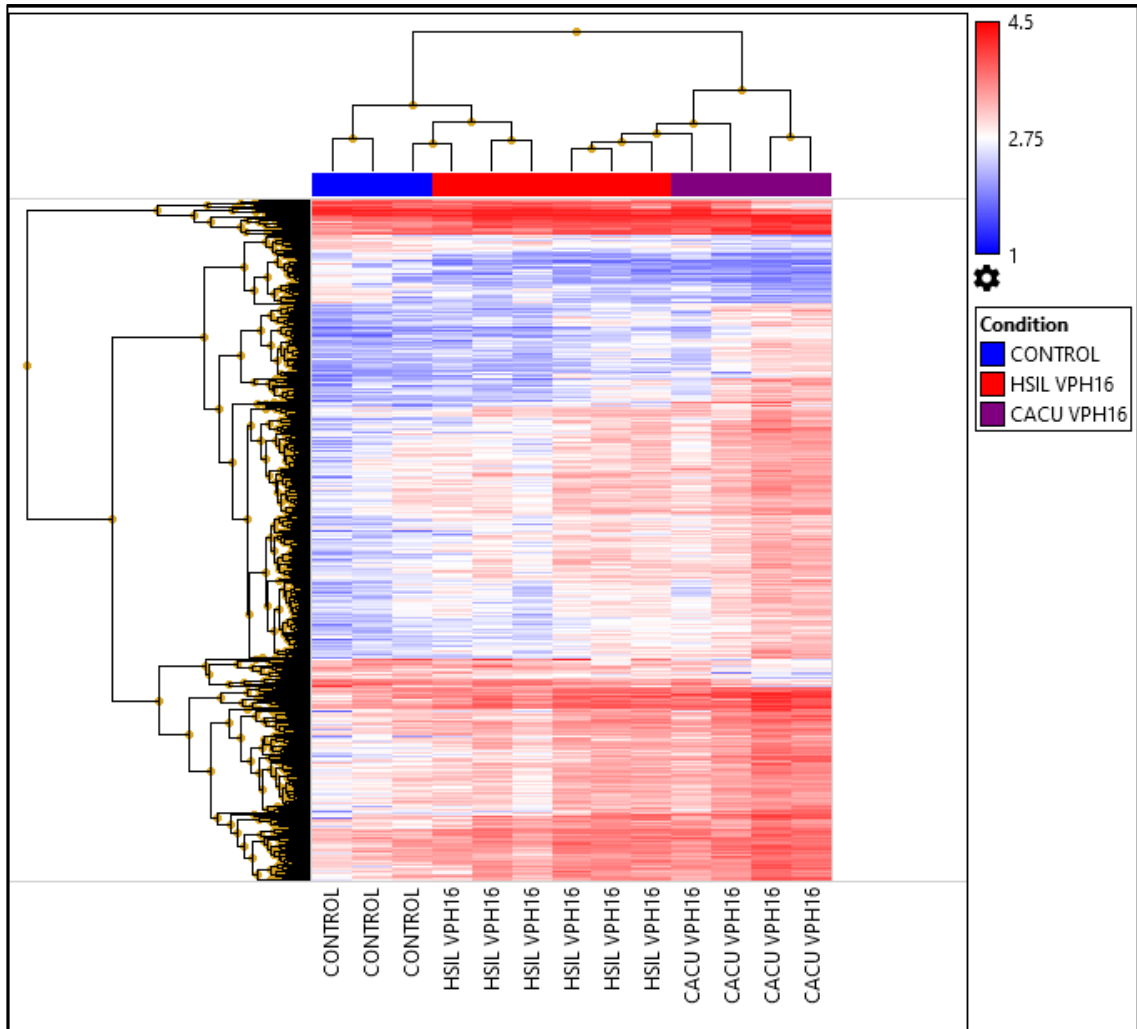


Figura 23. Mapa de calor de los transcritos en los 3 grupos de muestras. El control se marca con azul, HSIL con rojo y CaCu con morado. La expresión va de menos a más, de azul a rojo. Cáncer cérvico uterino (CaCu), lesiones intraepiteliales de alto grado (HSIL).

Se seleccionaron los genes relacionados a la vía de TNF- α y se realizó un mapa de calor. La mayoría de los transcritos estaban sobre expresados en CaCu, dejándonos suponer que la vía de TNF- α esta activa en estas muestras. En algunos transcritos se observa un *switch* de expresión de sub expresados a sobre expresados de HSIL a CaCu, sin embargo, en otros transcritos hay una expresión progresiva de control a CaCu (Fig. 24).

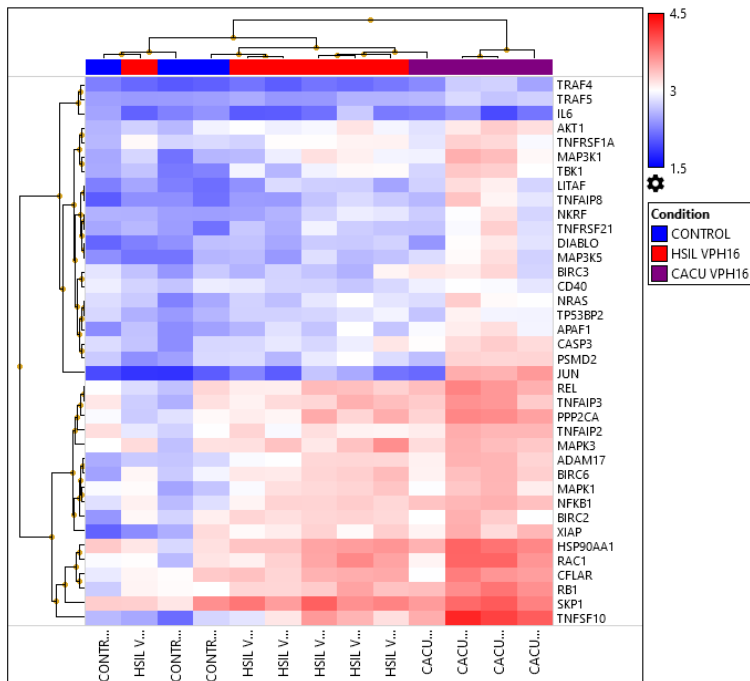


Figura 24. Mapa de calor de los genes relacionados con la vía de TNF- α , en los 3 grupos de muestras control, HSIL y CaCu (azul, rojo y morado respectivamente). La expresión va de menos a más, de azul a rojo. Cáncer cérvico uterino (CaCu), lesiones intraepiteliales de alto grado (HSIL).

La expresión individual de genes en los tres grupos. La barra azul es el promedio de la expresión de las 4 muestras con cáncer cérvico uterino, la barra rosa es el promedio de la expresión de 3 muestras control y la barra morada es el promedio de 6 muestras con lesión intraepitelial de alto grado. La expresión de TNF- α se ve incrementada en las muestras con CaCu y con HSIL a comparación con el control (Fig. 25 parte A). La diferencia de expresión de IL-6 no es estadísticamente significativa entre las muestras (Fig. 25 parte B). Para TRAF 4 y 5 (Fig. 25 parte C y D) no se encontró una diferencia estadísticamente significativa, pero se vio un ligero incremento de la expresión en CaCu a comparación del control, en ADAM 17 se encontró un incremento proporcional a el grado de lesión de las muestras, la expresión más baja se observó en el control, después HSIL y por último CaCu (Fig. 25 parte E). La expresión de CASP3 se encuentra incrementada en las muestras con CaCu en comparación con el control y en CASP8 no se ve

mucha diferencia entre los grupos de células analizadas (Fig. 25. parte F y G). Para BIRC3 y BIRC2 no se encontró una diferencia estadísticamente significativa, pero si un aumento de la expresión en células CaCu en comparación a las células control y HSIL en BIRC3 y en BIRC2 un aumento en CaCu en comparación del control (Fig. 25. parte H e I).

Los principales 18 transcritos desregulados que encontramos en nuestro análisis *in silico* son PTMA, ITM2B, TSPAN6, F11R, DEK, SMC4, H2BFS, ATP1B3, HIST1H4C, CLEC2B, HMGB2, HNRNPU, STMN1, ACKR3, CXCL10, PARP14, MUC4 Y TNFSFS10. Estos genes en su mayoría se encuentran involucrados principalmente en procesos biológicos, de regulación de localización y metabólicos.

Se investigo la expresión media de citocinas en el carcinoma de células escamosas de cuello uterino y adenocarcinoma endocervical (CESC) (306 tumores, 13 controles) en GEPIA, se encontró una alta expresión de TNF- α (1.25), IL-6 (1.4) e IL-10 (0.5) (Fig. 26).

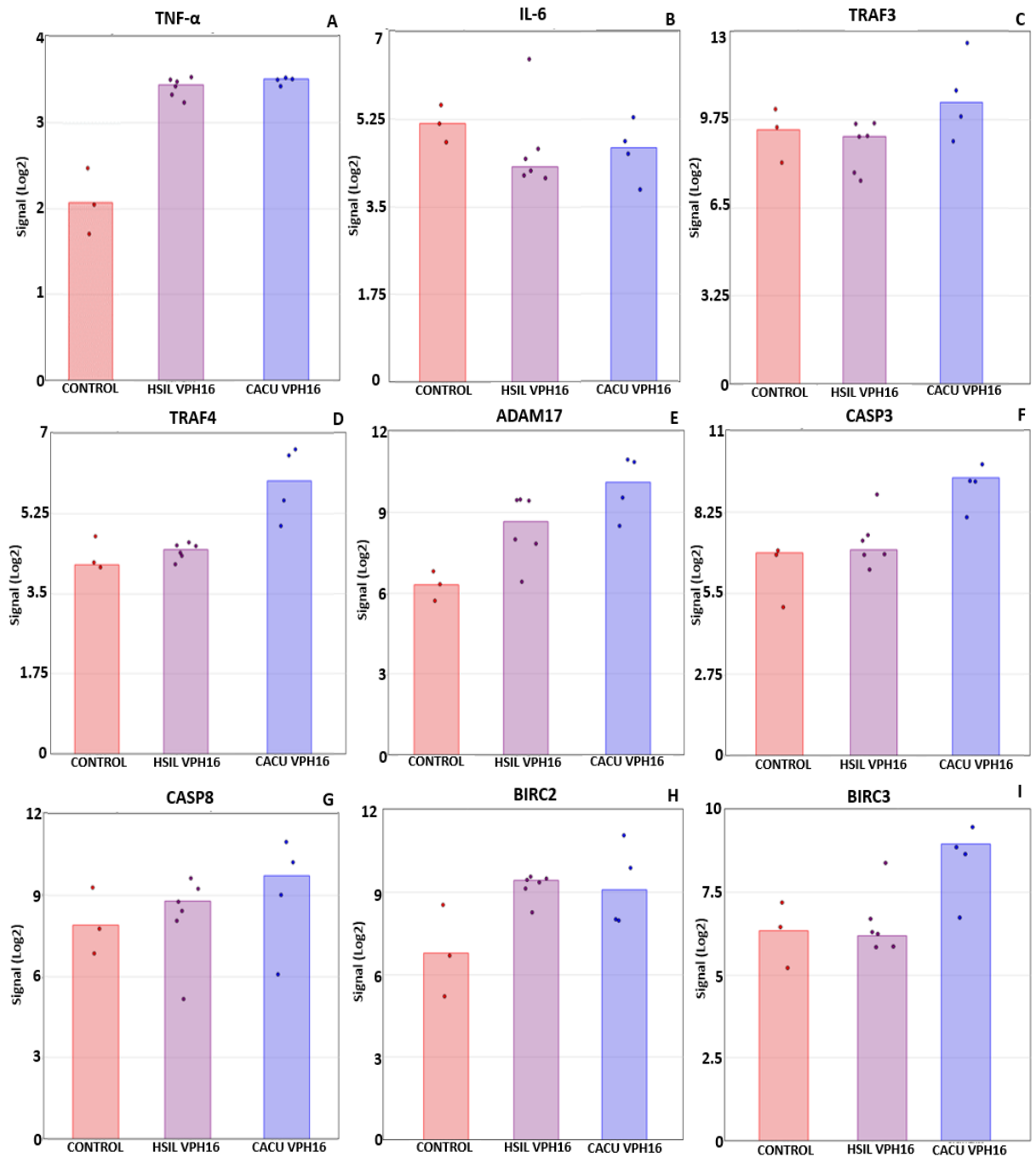


Figura 25. Expresión diferencial de los transcritos de TNF- α , IL-6, TRAF3, TRAF4, ADAM17, CASP3, CASP8, BIRC2 Y BIRC3. En CaCu (azul), HSIL (morado) y control (rojo). Cáncer cérvico uterino (CaCu), lesiones intraepiteliales de alto grado (HSIL).



Figura 26. Expresión media de citocinas en el carcinoma de células escamosas de cuello uterino y adenocarcinoma endocervical.

2. Determinación de citocinas (TNF- α e IL6) en líneas celulares de cáncer cérvico uterino.

Para cumplir este objetivo se realizó una RT-PCR de los mensajeros de TNF- α , IL2, IL6, el bisstron E6-E7 y como referencia MAD3, usando RNA total de queratinocitos primarios (kers) tomados de prepucio, de la línea celular C-33A cáncer cervical negativo para VPH y las líneas celulares de cancer cervical (SiHa y CaSki), positivas a VPH-16 (Panel A de la fig. 27), véase la metodología para más detalle. Se obtuvo expresión de RNA de TNF- α en Kers, C-33A y CaSki, con mayor abundancia del mensajero en las primeras dos. El mensajero de IL-2 solo se encontró en C-33A, la presencia de la expresión de IL-6 se observó en Kers, SiHa y CaSki.

Se detecto la proteína soluble de TNF- α e IL-6 a las 24, 48, 72 y 96 h. en las líneas celulares HaCaT, C-33A, CaSki y SiHa (Panel B fig. 27). No se encontró secreción de TNF- α en la línea celular HaCaT y C-33A. Se obtuvo secreción en la línea celular CaSki desde las 24h, siendo las 48h cuando se obtuvo más citocina con 32.5 pg/ml, también se detectó en SiHa pero más tardíamente, hasta las 72h y su máximo a 96h con 31.1 pg/ml. Para IL-6 se encontró secreción en HaCaT desde las 24h y su máxima secreción a las 96h con 1,336 pg/ml, en la línea C-33A no se observó la citocina, en CaSki se obtuvo una alta secreción de IL-6 desde las 24h con 1,056 pg/ml y su

máximo fue a las 72h con 37,906 pg/ml. En la línea celular SiHa se encontró secreción de IL-6 desde las 24h y la mayor secreción fue a las 72h con 12,155 pg/ml.

En conclusión, se detectó la presencia del mensajero de TNF- α en la línea celular HaCaT, sin embargo, pero no se observó la secreción de la citocina. Esto nos sugiere que hay una regulación a nivel post-transcripcional o post-traducciona de la proteína y también sugiere que las células HaCaT son un buen modelo para estudiar su regulación postraducciona. Se observó la secreción de TNF- α e IL-6 en las líneas celulares VPH positivas (CaSki y SiHa) mientras que la línea celular C-33A VPH negativa, no tiene secreción de ninguna de las citocinas, a pesar de que las 3 líneas celulares provienen de carcinomas cervicales; por lo que es posible que la expresión de las citocinas se altere por la presencia de las proteínas virales, más que por el proceso oncológico, ya que C-33A, proviene de un tumor libre de HPV, esto se podría comprobar al transfectar la línea celular C-33A con las concoproteínas virales de VPH. La presencia del HPV podría estar influyendo positivamente en la secreción de las citocinas.

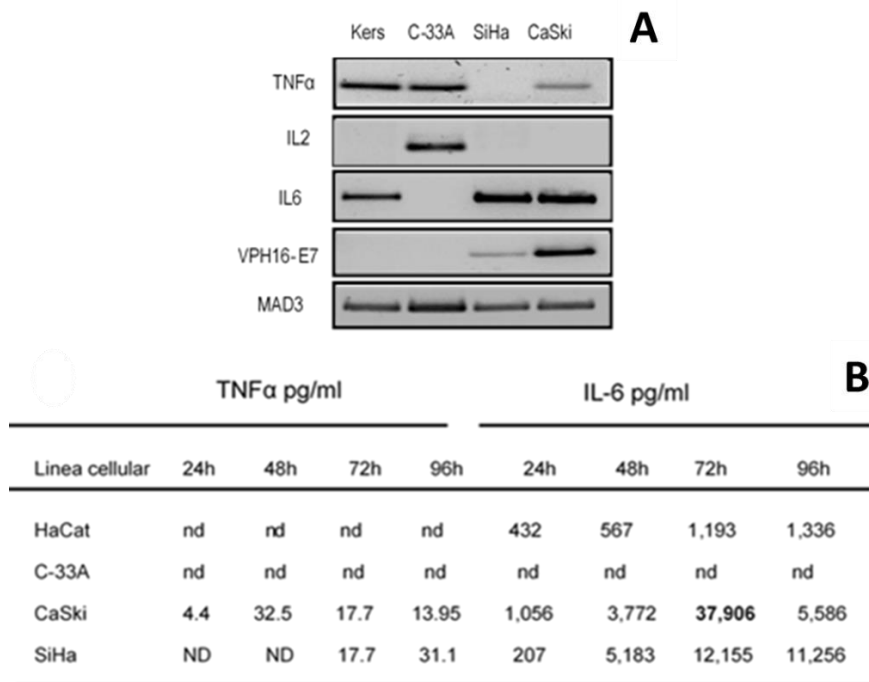


Figura 27. Determinación de citocinas (TNF- α e IL6) en líneas celulares de cáncer cérvico uterino. A. RT-PCR de TNF- α , IL-2, IL-6, VPH 16-E7 en Kers (queratinocitos primarios de prepucio), C-33A carcinoma cervical VPH negativo, SiHa y CaSki líneas celulares de carcinomas cervicales VPH positivas. B. ELISA de TNF- α soluble e IL-6 en la línea celular HaCat queratinocitos inmortalizados no malignos, C-33A, CaSki y SiHa.

3. Construcción de células HaCaT que expresen un reportero de TNF- α ^GFP.

La construcción del vector EGFPN1 con la secuencia codificante para la proteína reportera (amino de TNF- α con GFP) nos ayudó a estudiar si la regulación de la secreción TNF- α está ocurriendo a nivel post-traducciona. La construcción contiene la secuencia de la región transmembrana y el sitio de corte por TACE de la proteína. Se analizó la expresión de GFP en las células transfectadas con EGFP.N1 (control positivo de transfección) y en las células transfectadas con la construcción de la fusión del amino de TNF- α , usando un anticuerpo comercial anti GFP. Mediante análisis de western blot se observó la presencia de GFP con su peso de 27 kDa, en las células transfectadas con el vector, mientras que en las células transfectadas con la fusión, se obtuvo la proteína con el peso esperado de 36.6 kDa (Panel A de

la fig. 28). Sin embargo, no se observó expresión por microscopia de fluorescencia, por lo que una posibilidad era que la proteína se estuviera procesando y liberando al medio de cultivo. Si las células fueron correctamente transfectadas y el gen de la neomicina se estaba transcribiendo, las células serían resistentes a G418, como se observó, por lo tanto, como un control del éxito de la transfección se buscó mediante análisis PCR, la presencia del gen NEO (neomicina) que se encuentra en el plásmido. Se encontró el plásmido, comprobando que las células fueron transfectadas correctamente, tal como se observó, además se detectaron niveles semejantes de NEO en control y las células transfectadas con la fusión, comprobándose que la transfección era similarmente eficiente y estable (Panel B de la figura 28).

Una vez que confirmamos que la transfección fue estable, se concentró el sobrenadante del medio de cultivo aproximadamente 100 veces y se hizo un western blot, obteniendo la proteína TNF fusionada a GFP (Panel C figura 31). Esto nos confirma que la proteína GFP, se está procesando por TACE en la membrana y liberando, este dato nos sugiere que la regulación de la fusión de TNF- α -GFP no es a nivel de TACE en las células HaCaT, ya que se obtiene la proteína GFP. Debido a que esta construcción solo contiene la porción Amino Terminal de la proteína TNF, y no contiene secuencias no codificantes del RNA mensajero, para lograr comprender más sobre su regulación, se requieren construcciones reporteras que contengan las regiones 5' UTR y 3' UTR, para una investigación más profunda.

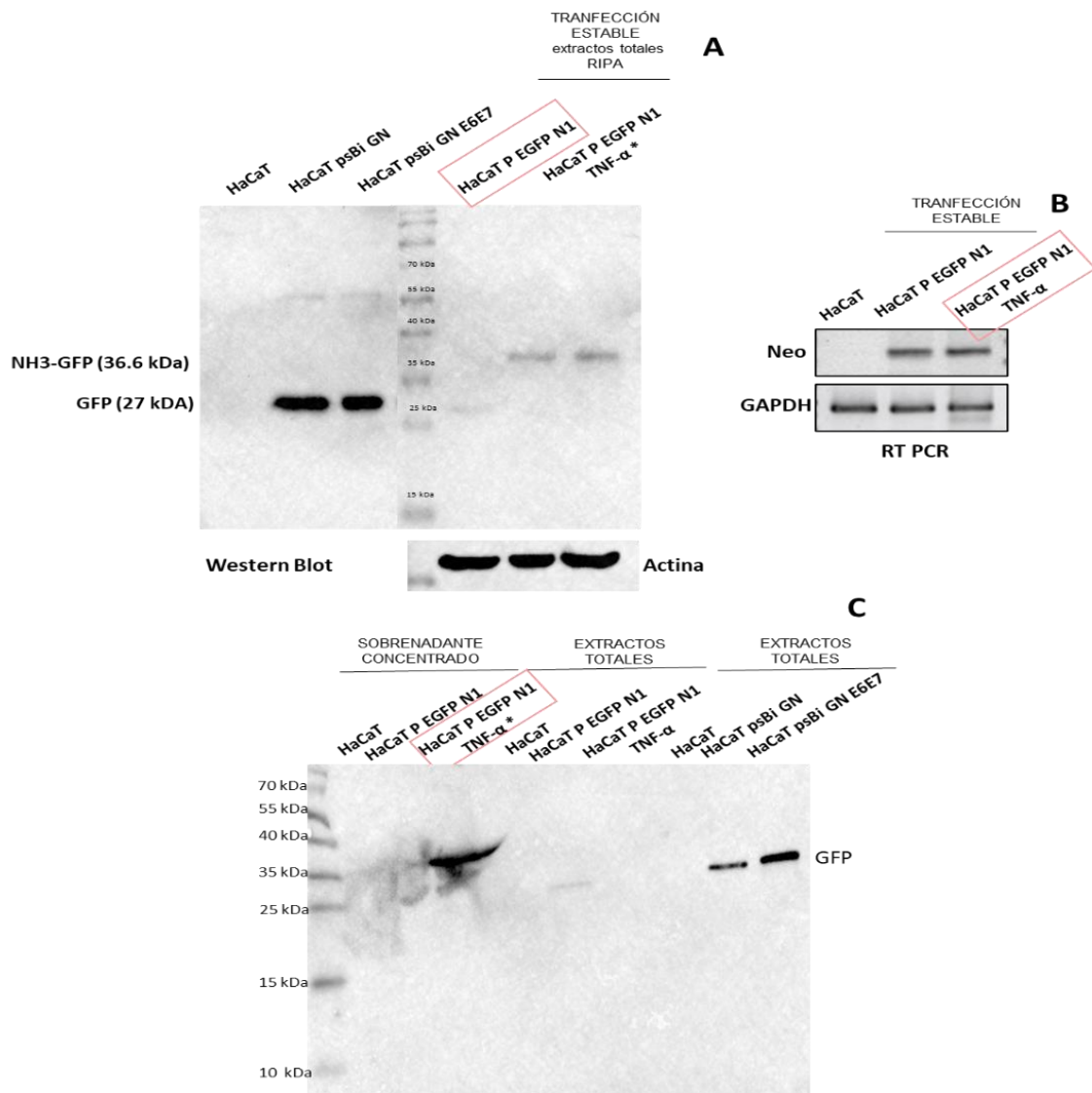


Figura 28. Construcción fusión del amino de TNF- α y la proteína GFP. A. Western blot de GFP, obtención de la proteína fusión de 36.6 kDa. B. RT-PCR de NEO para verificar una transfección estable. C. Western blot de GFP en sobrenadante concentrado.

Discusión

El cáncer de cérvico uterino es la segunda causa de muerte relacionada con cáncer en mujeres en todo el mundo [7, 8], no existe un tratamiento eficaz para pacientes con este cáncer avanzado [9].

Se realizó un análisis *in silico* con biopsias de tejido de cáncer cervicouterino (CaCu) VPH positivas, lesiones intraepiteliales de alto grado (HSIL) VPH positivas y tejido cervical normal; para ello hicimos 3 comparaciones, 1. CaCu contra el control, 2. CaCu contra HSIL y 3. HSIL contra el control. La primera comparación fue la que tuvo mayor número de transcritos desregulados y la segunda la que tuvo menos transcritos desregulados, este último resultado lo esperábamos al ser ambos grupos de muestras VPH positivos y por consiguiente su transcriptoma pudiera ser semejante y porque la lesión de alto grado puede evolucionar a CaCu.

Se obtuvo que la expresión del gen TNF- α se incrementa en células cervicales con cáncer VPH positivas y en líneas celulares oncogénicas VPH positivas en comparación de los controles, coincide con lo reportado por Audirac y colaboradores en 2016 su estudio consistió en evaluar los niveles de expresión cervical de ARNm de IL-4, IL-6, IL-10, TGF- β 1, TNF- α e IFN- γ de mujeres mexicanas, reportando una diferencia significativa entre el mensajero de TNF- α en muestras con cáncer cervical VPH positivo y el control [11], Szlosarek y colaboradores también reportaron un aumento de la expresión de ARNm de TNF- α en tumores de cuello uterino [128]. Nuestro estudio revela que la expresión elevada de TNF- α en cáncer cervicouterino VPH positivo se presenta *in vivo* como *in vitro* en líneas celulares, por lo tanto, la célula cancerosa está induciendo la producción de esta citocina, quizá para inducir mayor proliferación al activar la vía de las map cinasas y/o la vía de NF- κ B. Se ha reportado niveles plasmáticos elevados de IL-6, IL-8, TNF- α , MIP-1 α , GM-CSF e IL-1 α en mujeres con cáncer cervical VPH positivo, donde concluyeron que la infección por VPH persistente se asocia con niveles altos de esas citocinas [39].

En el laboratorio encontramos una expresión de TNF- α en la línea celular CaSki y en SiHa (VPH+), pero la secreción en ambas es diferente en el tiempo, aunque alcanzan niveles similares al 4to día. La expresión fue prácticamente nula en la línea C-33A, carcinoma cervical negativa para VPH

y en kers transformados de la Linea celular HaCaT, al contrario de lo encontrado en IL-6 ya que obtuvimos presencia del mensajero en CaSki, SiHa y en HaCaT, pero no en C-33A. Este proyecto revelo la detección del mensajero de TNF- α pero no su secreción en la línea celular HaCaT, sin embargo, en las líneas celulares VPH positivas CaSki y SiHa se obtuvo una alta secreción de la citocina, concuerda con lo reportado en 2012 por Ali, K. y col. su estudio consistía en 80 mujeres de 25 a 70 años con lesiones cervicales de los cuales 14 fueron VPH positivos y 20 individuos sanos. Obteniendo una secreción en los pacientes VPH positivos de 12,18 (\pm 3,49) pg/ml [129], este resultado nos sugiere que la presencia de las proteínas de VPH E6 y E7 o el proceso oncogénico per se están modificando la expresión y/o el procesamiento de TNF- α .

Esto contrasta con lo reportado en, 2001 por Hazelbag y col. realizaron un estudio donde median 20 citocinas en 10 líneas celulares diferentes, entre ellas SiHa, HeLa, y CaSki, carcinomas cervicales VPH positivos en donde encontraron la presencia de los RNA mensajeros de TGF- β 1, IL-5, IL-2, IL-15, IL-12p35, IL-1, IL-6, IL-8 y MCP1, sin encontrar el mensajero de TNF- α [38]. Alcocer y colaboradores en 2006, obtuvieron el mismo resultado ya que no encontraron expresión de TNF- α en las líneas celulares HeLa, SiHa y CaSki [130].

Como vimos en los resultados la regulación de TNF- α en la línea celular HaCaT es compleja tanto a nivel de proteína como de mensajero, ya que se detecta el mRNA, pero no la secreción de la proteína. Con ayuda de la construcción de la fusión del amino de TNF- α que contiene el sitio de corte para TACE y la región transmembrana, con la proteína reportera GFP en el vector EGFP N1, encontramos que la regulación de la citocina no es a nivel del procesamiento por TACE, pero pueden ocurrir a nivel post-transcripcional en la línea celular HaCat ya que la proteína fusión llegaba a membrana y era cortada por TACE, liberando la proteína GFP al medio de cultivo; para comprobar si hay algún mecanismo de regulación a nivel post-

transcripcional o de la traducción, se deben hacer construcciones que contengan también las secuencias UTR 3' y 5', debido a que la construcción que usamos no contiene secuencias no traducidas del mRNA. Además, a futuro, para conocer a fondo la regulación se puede hacer mutagénesis dirigida de las secuencias regulatorias ya reportadas o secuencias putativas por identificar, para tener más información y conocer mejor el mecanismo de la regulación [131]. Será interesante usar la construcción de este proyecto en presencia del inhibidor de TACE, TAPI, ya que así podemos estudiar otros procesos biológicos como el transporte del TNF- α a la membrana lipídica, la ubicación de la proteína dentro de vesículas u organelos membranosos de la proteína fusión, y las consecuencias biológicas de su retención como TNF- α membranal.

Como ya se mencionó el TNF- α es una citocina altamente pleiotrópica actúa por los receptores TNFR1 y TNFR2 desencadenando respuestas celulares que llegan a partir de la inducción de programas de expresión génica inflamatoria y la activación de programas de muerte celular como la apoptosis y la necroptosis [48, 132]. Conocer la regulación de esta citocina es muy importante ya que es un mediador clave de la inflamación en muchas enfermedades entre ellas el cáncer al participar en la proliferación, la angiogénesis y la metástasis, un modulador de la producción de citocinas que pueden promover la tumorigénesis y puede producir un efecto antitumoral [133, 120]. Además, se puede profundizar en el conocimiento de la función de esta citocina en los queratinocitos.

Se sabe muy poco acerca de la regulación de TNF- α , una mayor comprensión de la regulación post-transcripcional, puede conducir a diseñar en el futuro fármacos nuevos, más potentes que pueden ayudar a controlar la expresión de alterada del TNF- α en enfermedades inflamatorias como cáncer o artritis, por ejemplo [128, 134].

Conclusión

Los resultados obtenidos en este proyecto sugieren que la regulación de TNF- α no ocurre a nivel de procesamiento por TACE, pero puede ocurrir a nivel post-transcripcional o post-traducciona, en las células epiteliales de la línea celular HaCaT, nos hacen falta más estudios para entender mejor la regulación de esta citocina. Además, la expresión elevada de TNF- α esta ocurriendo in vivo como in vitro en células con cáncer cérvico uterino VPH positivas.

Perspectivas

- ➔ Volver a realizar los experimentos de ELISA, Western blot y fluorescencias en presencia de TAPI, inhibidor de TACE.
- ➔ Generar más construcciones con herramientas de ingeniería genética para diseñar experimentos en los que se evalué el papel de las UTRs 5' y 3' en la regulación post-transcripcional de TNF- α .
- ➔ Evaluar esas construcciones para la línea celular HaCaT y líneas de cáncer cervical.

Anexo I

Soluciones y reactivos para Western Blot

Tampón Triton X-100

- NaCl 150 mM
- 0.1% Triton X-100
- Tris-HCl 50 mM, pH 8.0
- Inhibidores de la proteasa

Tampón RIPA

- NaCl 150 mM
- IGEPAL CA-630 al 1%
- Desoxicolato de sodio al 0.5%
- SDS al 0.1% (dodecilsulfato de sodio)
- Tris-HCl 50 mM, pH 8.0
- inhibidores de la proteasa

Tris-HCl

- Tris-HCl 20 mM
- Inhibidores de la proteasa

Búfer / búfer de carga Laemmli 2X

- SDS al 4%
- 2-mercaptoetanol al 10%
- 20% de glicerol
- 0,004% de azul de bromofenol
- Tris-HCl 0.125 M
- Se ajusto el pH a 6.8

Tampón de funcionamiento (Tris-Glycine / SDS)

- Base Tris de 25 mM
- 190 mM de glicina
- SDS al 0,1%
- pH ajustado a 8.3

Tampón de transferencia (húmedo)

- Base Tris de 25 mM
- 190 mM de glicina
- 20% de metanol
- pH ajustado a 8.3.

Tampón de transferencia (semiseco)

- Tris de 48 mM
- Glicina 39 mM
- 20% de metanol
- 0.04% de SDS

Búfer de bloqueo

- BSA (albúmina de suero bovino) al 3-5%.
- Agregar al búfer TBST, mezclar bien y filtrar.

Bibliografía

- [1] Cova, A. (2006). Alteraciones en la expresión de TNF-alfa, en un modelo tipo monocito, inducidas por líneas de carcinoma pulmonar. (Tesis de Licenciatura). *Universidad Autónoma de México, México D.F.*
- [2] Hahn, W. y. (2002). Rules for making human tumor cells. *The New England Journal Medica*, 347, 1593-1603.
- [3] Emon, B. B. (2018). Biophysics of Tumor Microenvironment and Cancer Metastasis - A Mini Review. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 16, 279-287.
- [4] Nouri, Z. F. (2020). Targeting Multiple Signaling Pathways in Cancer: The Rutin Therapeutic Approach. *Cancers*, 12(8), 2276.
- [5] Rodríguez, J. (2007). cancer oral. *Inibsa y Fundación Central Española*, 20, 8-10.
- [6] ZurHausen, H. (2009). Papillomaviruses in the causation of human cancers. *Virology*, 384, 260-265.
- [7] Thomas, M. N. (2008). Human papillomaviruses, cervical cancer and cell polarity. *Oncogene*, 27, 7018-7030.
- [8] Cohem, P. J. (2019). Cervical cancer. *The Lancet*, 393, 169-182.
- [9] Wang, Y. Z. (2019). MicroRNA-21 and its impact on signaling pathways in cervical cancer. *Oncology Letters*, 3, 3066-3070.
- [10] Society, A. C. (30 de Julio de 2020). *What Is Cervical Cancer?* (American Cancer Society) Recuperado el 12 de Febrero de 2020, de https://www.cancer.org/es/cancer/cancer-de-cuello-uterino/acerca/que-es-cancer-de-cuello-uterino.html#escrito_por
- [11] Audirac, A. T. (2016). Cervical Microbiome and Cytokine Profile at Various Stages of Cervical Cancer: A Pilot Study. *PloS one*, 11(4).
- [12] Moreno, A. (2014). Infección por el virus de papiloma humano en mujeres con lesión intraepitelial cervical: aspectos virológicos y clinicopatológicos. . *Laboratorio Actual. Tesis de doctorado. Universidad de Murcia*, 12-18.

- [13] Clifford, G. S. (2003). Human papillomavirus types in invasive cervical cancer worldwide: A meta-analysis. . *British Journal Cancer*, 88, 63-73.
- [14] Sastre, C. (2017). El virus del Papiloma Humano en cavidad oral y orofaríngea en estudiantes universitarios de 18 a 25 años en valencia. *Universidad de Valencia. Tesis de doctorado. Valencia*, 304.
- [15] Stanley, M. (2012). Epithelial Cell Responses to Infection with Human Papillomavirus. *American Society for Microbiology Journals*, 25, 215-222.
- [16] Lizano, S. C. (2009). Infección por virus del papiloma humano: epidemiología, historia natural y carcinogénesis. *Cancerología*, 4, 205-216.
- [17] Castillo, A. (2011). HPV infection and carcinogenesis in the upper aero-digestive tract. *Colombian Medical*, 42, 233-242.
- [18] Crosbie, E. E. (2013). Human papillomavirus and cervical cancer. *The Lancet*, 382, 889-899.
- [19] Trujillo, E. S. (2018). Integration, Viral Charge and E2 mRNA Levels in the Progresion of Intraepitelial Cervical Lesions. *Acta Biologica Colombiana*, 23(1), 80-86.
- [20] Suarez, C. M. (2006). Tipificación de VPH en cáncer de cuello uterino en la población venezolana. *Revista venezolana de oncología* , 18, 221-225.
- [21] Sritippho, T. P. (2016). p16 as a possible surrogate marker for high-risk human papillomaviruses in oral cancer. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 17, 4049-4057.
- [22] Hernandez, C. S. (2005). Prevalencia de infección por virus de papiloma humano (VPH) de alto riesgo y factores asociados en embarazadas del IMSS en el estado de Morelos. *Salud Publica Mexico*, 47, 423-429.
- [23] Sarduy, M. (2008). Neoplasia Intraepitelial Cervical. Preámbulo del cáncer cérvicouterino. *Revista Cubana de Obstetricia y Ginecología*, 34.
- [24] Coussens, L. y. (2002). Inflammation and cancer. *Nature*, 420, 860-867.

- [25] Mohebbi, B. A. (2019). Conditioned Medium from Cultured Colorectal Cancer Cells Affects Peripheral Blood Mononuclear Cells Inflammatory Phenotype in Vitro. . *Iranian Journal of Medical Sciences*, 44(4), 334-341.
- [26] Candido, J. y. (2013). Cancer-Related Inflammation. *Journal of Clinical Immunology* , 33, 79 - 84.
- [27] Galdiero, M. M. (2018). Cancer Inflammation and Cytokines. *Cold Spring Harb Perspectives in Biology*.
- [28] Adekoya, T. y. (2020). Cytokines and Chemokines as Mediators of Prostate Cancer Metastasis. *International Journal*.
- [29] Munn, L. (2017). Cancer and inflammation. . *Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine*.
- [30] Zhu, G. L. (2020). TRAF6-Mediated Inflammatory Cytokines Secretion in LPS-induced Colorectal Cancer Cells Is Regulated by miR-140. *Cancer Genomics Proteomics.*, 17(1), 23-33.
- [31] Tuomisto, A. M. (2019). Systemic inflammation in colorectal cancer: Underlying factors, effects, and prognostic significance. *World Journal of Gastroenterol*, 4383-4404.
- [32] Turnquist, C. R. (2020). Cytokine Storms in Cancer and COVID-19. *Cancer cell*, 38, 598-601.
- [33] Hartwig, T. M.-B. (2017). The TRAIL-Induced Cancer Secretome Promotes a Tumor-Supportive Immune Microenvironment via CCR2. *Molecular Cell*, 730-742.
- [34] Vazquez, G. P. (2005). Análisis de expresión global del cáncer cérvico uterino:. *Revista de Investigacion Clinica*, 57(3), 434-441.
- [35] Pardo, T. C. (2005). Expresión de interferón gamma (IFN-g), factor de necrosis tumoral alfa (TNF-a) e interleucinas 2, 4 y 6 (IL-2, IL-4, IL-6) en células de neoplasias intraepiteliales de cuello uterino: Reporte preliminar. . *Investigacion Clinica*, 46(1), 5-13.

- [36] Sethi, G. S. (2008). TNF- A master switch for inflammation to cancer. *Frontiers in Bioscience*, 5098 - 5107.
- [37] Xu, L. X. (2017). MicroRNA-21 regulates the proliferation and apoptosis of cervical cancer cells via tumor necrosis factor- α . *Molecular Medicine Reports*, 16(4), 4659-4663.
- [38] Hazelbag, S. F. (2001). Cytokine Profile of Cervical Cancer Cells. *Gynecologic Oncology*, 83, 235-243.
- [39] Prajakta, H. J. (2014). Role of Cytokines in Genesis, Progression and Prognosis of cervical cancer. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 15, 3851-3864.
- [40] Carswell, E. O. (1975). An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 72(9), 3666-3670.
- [41] Pennica, D. N. (1984). Human tumour necrosis factor: precursor structure, expression and homology to lymphotoxin. *Nature*, 312, 724-729.
- [42] Falfán. (2002). Factor de necrosis tumoral: Actividad biológica en neumopatías intersticiales. *Rev Inst Nal Enf Resp Mex*, 48-53.
- [43] Salamone, G. (2003). TNF-alfa y modulación del fenómeno apoptótico en neutrófilos humanos (tesis de doctorado). *Universidad de Buenos Aires*.
- [44] Sullivan y col. (2007). Regulación epigenética del factor de necrosis tumoral alfa. *Molecular and Cellular Biology*, 5147-5160.
- [45] Yang, S. W. (2018). Role of TNF–TNF Receptor 2 Signal in Regulatory T Cells and Its Therapeutic Implications. *Frontiers in immunology*, 9, Artículo 784.
- [46] Maney, N. R.-H. (2014). Dendritic Cell Maturation and Survival Are Differentially. *Journal of immunology*, 193, 4914-4923.
- [47] Uysal H, C.-G. L. (2018). Transmembrane TNF and Partially TNFR1 Regulate TNFR2 Expression and Control Inflammation in Mycobacterial-Induced Pleurisy. *Int J Mol Sci.*, 7, 4-19.

- [48] Wajant, H. y. (2019). TNFR1 and TNFR2 in the Control of the Life and Death Balance of Macrophages. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*.
- [49] Zhang y col. (2008). *Journal of Leukocyte Biolog*, 789-797.
- [50] Uysal y col. (2018). Transmembrane TNF and Partially TNFR1 Regulate TNFR2 Expression and Control Inflammation in Mycobacterial-Induced Pleurisy. *International Journal of Molecular Sciences*.
- [51] Shidrokh y col. (2013). Membrane versus soluble isoforms of TNF α exert opposing effects on tumor growth and survival of tumor-associated myeloid cells. *Cancer Res.*, 3938–3950.
- [52] Camussi, G. A. (1991). The molecular action of tumor necrosis factor-alpha. *European Journal of Biochemistry*, 202(1), 3-14.
- [53] Faustman D. y Davis, M. (2013). TNF receptor 2 and disease: autoimmunity and regenerative medicine. *frontiers in immunology*, 4, 478.
- [54] Mercogiano, M. B. (2021). Harnessing Tumor Necrosis Factor Alpha to Achieve Effective Cancer Immunotherapy. *Cancers*, 13(3), 564.
- [55] Haas, E. G. (1999). Continuous Autotropic Signaling by Membrane-expressed Tumor Necrosis Factor. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*, 274(25), 18107–18112.
- [56] Mahdavi, P. J.-F. (2020). Importance of TNF-alpha and its alterations in the development of cancers. *Cytikine*, 130.
- [57] Fiers, W. (1991). Tumor necrosis factor Characterization at the molecular, cellular and in vivo level. *FEBS PRESS*, 285(2), 199-212.
- [58] Han, Z. L. (2010). Meta-analysis: polymorphisms in TNF-alpha gene promoter and Crohn's disease. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 32, 159-170.
- [59] Fidler, H. S. (2013). Low rates of adherence for tumor necrosis factor- α inhibitors in Crohn's disease and rheumatoid arthritis: Results of a systematic review. *World Journal of Gastroenterology*, 19(27), 4344-4350.

- [60] Canault, M. P.-V. (2004). Exclusive expression of transmembrane TNF- α in mice reduces the inflammatory response in early lipid lesions of aortic sinus. *Atherosclerosis*, 172, 211-218.
- [61] Clark, A. y. (2018). Therapeutic implications of how TNF links apolipoprotein E, phosphorylated tau, α -synuclein, amyloid- β and insulin resistance in neurodegenerative diseases. *British Journal of Pharmacology*, 175(20), 3859-3875.
- [62] Ahmad, S. A. (2018). The Key Role of TNF-TNFR2 Interactions in the Modulation of Allergic Inflammation: A Review. *frontiers in Immunology*, 9, 2572.
- [63] Fragoso y col. (2014). El factor de necrosis tumoral α (TNF- α) en las enfermedades autoinmunes (EA): biología molecular y genética. *Gaceta Medica*, 334-344.
- [64] Guo, F. y. (2020). Tumor Necrosis Factor Alpha-Induced Proteins in Malignant Tumors: Progress and Prospects. *Onto Targets and Therapy*, 13, 3303-3318.
- [65] Borghi, A. V. (2016). TRAF2 multitasking in TNF receptor-induced signaling to NF-B, MAP kinases and cell death. *Biochemical Pharmacology*, 116, 1-10.
- [66] Qidwai, T. y. (2011). Tumour Necrosis Factor Gene Polymorphism and Disease Prevalence. *Scand journal Immunology*, 74(6), 522-547.
- [67] El-Tahan, R. G.-M. (2016). TNF- α gene polymorphisms and expression. *Springerplus*, 5(1):1508.
- [68] Yi, F. S. (2018). Tumor necrosis factor-alpha-308 gene promoter polymorphism associates with survival of cancer patients. *Medicine*, 45.
- [69] Mostafa, T. y. (2016). TNF- α -308 polymorphisms and male infertility risk: A meta-analysis and systematic review. *Journal of advanced research*, 7(2), 185-192.
- [70] Li, H. X. (2016). Association of TNF- α genetic polymorphisms with recurrent pregnancy loss risk: a systematic review and meta-analysis. *Reproductive biology and endocrinology*, 14(6).

- [71] Zhang, P. W. (2017). Tumor necrosis factor-alpha gene polymorphisms and susceptibility to ischemic heart disease: A systematic review and meta-analysis. *Medicine*, 96.
- [72] Gomez, L. E. (2013). Association of the tumor necrosis factor-alpha -308G>A polymorphism with breast cancer in Mexican women. *Genetics and Molecular Research*, 12, 5680-5693.
- [73] Gutierrez, I. P. (2016). Association between TNF- α -308G>A and -238G>A gene polymorphisms and TNF- α serum levels in Mexican colorectal cancer patients. *Genetics and Molecular Research*, 15.
- [74] Nivea, M. P. (2011). Characterization of Single-Nucleotide Polymorphisms in the Tumor Necrosis Factor α Promoter Region and in Lymphotoxin α in Squamous Intraepithelial Lesions, Precursors of Cervical Cancer. *Translational oncology*, 4(6), 336-344.
- [75] Rockstrom, M. C. (2017). Tumor necrosis factor alpha in sleep regulation. *Sleep Medicine Reviews*, 40, 69-78.
- [76] Gu, Z. C. (2020). Regulatory Roles of Tumor Necrosis Factor- α -Induced Protein 8 Like-Protein 2 in Inflammation, Immunity and Cancers: A Review. *Cancer management and research*, 12, 12735-12746.
- [77] Niture, S. D. (2019). Oncogenic Role of Tumor Necrosis Factor α -Induced Protein 8 (TNFAIP8). *Cells*, 8, 1-16.
- [78] Zhang, L. L. (2018). Tumor Necrosis Factor- α Induced Protein 8: Pathophysiology, Clinical Significance, and Regulatory Mechanism. *International Journal of Biological Sciences*, 14(4), 398-405.
- [79] Leverkus, M. Y. (1998). Post-transcriptional regulation of UV induced TNF-alpha expression. *The Journal of Investigative Dermatology*, 110, 353-357.
- [80] Falvo, J. T. (2010). Transcriptional Control of the TNF Gene. *Karger*, 27-60.
- [81] Moelants, E., M. A. (2013). Regulation of TNF- α with a focus on rheumatoid arthritis. *Immunology & Cell Biology*, 91(6), 393-401.

- [82] Yang, S. L. (1997). Obesity increase sensitivity to endotoxin liver injury: implications for the pathogenesis of steatohepatitis. *Proc Natl Acad Sei USA*, 2557-2562.
- [83] J., P. (2004). La estructura de la cromatina y la regulación de la transcripción. *Acta Universitaria*, 14(1), 59-66.
- [84] Curinha, A. O. (2014). Implications of polyadenylation in health and disease. *Nucleus*, 5, 508-519.
- [85] Namer, L. O. (2017). An Ancient Pseudoknot in TNF- α Pre-mRNA Activates PKR, Inducing eIF2 α Phosphorylation that Potently Enhances Splicing. *Cell Reports*, 188-200.
- [86] Osman, F. J.-A. (1995). A cis-acting element in the 3'-untranslated region of human TNF- α mRNA renders splicing dependent on the activation of protein kinase PKR. *Gones Development*, 3280-3293.
- [87] Wang, E. M. (1997). Posttranscriptional regulation of protein expression in human epithelial carcinoma cells by adenine-uridine-rich elements in the 3'-untranslated region of tumor necrosis factor-alpha messenger RNA. *Cancer Res.*, 57(23), 5426-5433.
- [88] Khabar, K. (2010). Post-transcriptional control during chronic inflammation and cancer: a focus on AU-rich elements. *Cellular and molecular life sciences*, 67(17), 2937-2955.
- [89] Clark, A. (2000). Post-transcriptional regulation of pro-inflammatory gene expression. *Arthritis Res.*, 2(3), 172-174.
- [90] Aslam, N. y. (2011). The Biosynthesis Characteristics of TTP and TNF Can Be Regulated through a Posttranscriptional Molecular Loop. *Journal of Bioquimical Chemistry*, 3767-3776.
- [91] Dean, J. W. (2001). The 3' Untranslated Region of Tumor Necrosis Factor Alpha mRNA Is a Target of the mRNA-Stabilizing Factor HuR. *Molecular and Cellular biology*, 721-730.
- [92] Mahtani, K. B. (2001). Mitogen-Activated Protein Kinase p38 Controls the Expression and Posttranslational Modification of Tristetraprolin, a Regulator

of Tumor Necrosis Factor Alpha mRNA Stability. *Molecular and Cellular Biology*, 6461-6469.

- [93] Lai, W. C. (1999). Evidence that Tristetraprolin Binds to AU-Rich Elements and Promotes the Deadenylation and Destabilization of Tumor Necrosis Factor Alpha mRNA. *Molecular and Cellular Biology*, 4311-4323.
- [94] Chen, Y. H. (2006). Differential regulation of ARE-mediated TNFalpha and IL-1beta mRNA stability by lipopolysaccharide in RAW264.7 cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 160-168.
- [95] Paulsen, M. V.-S. (2013). Coordinated regulation of synthesis and stability of RNA during the acute TNF-induced proinflammatory response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2240-2245.
- [96] Sun, L. S. (2006). Tristetraprolin (TTP)-14-3-3 Complex Formation Protects TTP from Dephosphorylation by Protein Phosphatase 2a and Stabilizes Tumor Necrosis Factor- α mRNA. *Journal of biological Chemistry*, 3766-3777.
- [97] McMullen, M. C. (2003). Chronic ethanol exposure increases the binding of HuR to the TNFalpha 3'-untranslated region in macrophages. *The Journal of biological Chemistry*.
- [98] Palanisamy, V. J. (2012). Control of cytokine mRNA expression by RNA-binding proteins and microRNAs. *Journal of dental research*, 91(7), 651-658.
- [99] Chae, M. Y. (2009). Chemical inhibitors destabilize HuR binding to the AU-rich element of TNF-alpha mRNA. *Experimental & molecular medicine*, 41(11), 824-831.
- [100] Anderson, P. (2000). Post-transcriptional regulation of tumour necrosis factor alpha production. *Ann Rheum Dis.*, 59(1), 3-5.
- [101] Andersson, K. y. (2006). Posttranscriptional regulation of TNF α expression via eukaryotic initiation factor 4E (eIF4E) phosphorylation in mouse macrophages. *Elsevier*, 52-57.

- [102] Wajant, H. y. (2019). Targeting Regulatory T Cells by Addressing Tumor Necrosis Factor and Its Receptors in Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation and Cancer. *Frontiers in immunology*.
- [103] Stoecklin, G. L. (2003). A Constitutive Decay Element Promotes Tumor Necrosis Factor Alpha mRNA Degradation via an AU-Rich Element-Independent Pathway. *Molecular and Cellular Biology*, 3506-3515.
- [104] Filipowicz, W. B. (2008). Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nature reviews genetics*, 102-114.
- [105] Stathopoulou, C. K. (2017). Long non-coding RNA SeT and miR-155 regulate the Tnfa gene allelic expression profile. *Plos one*.
- [106] Kim, J. J. (2015). Fascin regulates TLR4/PKC-mediated translational activation through miR-155 and miR-125b, which targets the 3' untranslated region of TNF- α mRNA. *Immunological investigations*, 309-320.
- [107] Luo, X. Z. (2017). Brucella Downregulates Tumor Necrosis Factor- α to Promote Intracellular Survival via Omp25 Regulation of Different MicroRNAs in Porcine and Murine Macrophages. *Frontiers in immunology*, 8:2013.
- [108] Guan, Y. Y. (2015). NF- κ B-DICER-miRs Axis Regulates TNF- α Expression in Responses to Endotoxin Stress. *International Journal of Biological Sciences*, 1257-1268.
- [109] Bala, S. M. (2011). Up-regulation of microRNA-155 in macrophages contributes to increased tumor necrosis factor {alpha} (TNF{alpha}) production via increased mRNA half-life in alcoholic liver disease. *The Journal of biological chemistry*, 1436-1444.
- [110] Baker, K. y. (2006). The many routes to regulating mRNA translation. *Genome Biology*, 7, 332.
- [111] Millet, P. V. (2016). GAPDH Binding to TNF- α mRNA Contributes to Posttranscriptional Repression in Monocytes: A Novel Mechanism of Communication between Inflammation and Metabolism. *Journal of Immunology*, 196(6), 2541-2551.

- [112] Eck, M. y Sprang, R. (1989). The Structure of Tumor Necrosis Factor- α at 2.6 Å Resolution. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*, 264(29), 17595-17605.
- [113] Mercogliano, M., B. S. (2020). Tumor Necrosis Factor α Blockade: An Opportunity to Tackle Breast Cancer. *Frontiers in oncology*, 10, 584.
- [114] Trefzer, U. B. (1993). The 55-kD tumor necrosis factor receptor on human keratinocytes is regulated by tumor necrosis factor- α and by ultraviolet B radiation. *The Journal of Clinical Investigation*, 92(1), 462-470.
- [115] Szondy, Z. y Pallai, A. (2017). Transmembrane TNF- α reverse signaling leading to TGF- β production is selectively activated by TNF targeting molecules: Therapeutic implications. *Pharmacological Research*, 115, 124-132.
- [116] Zhang y col. (2019). Ubiquitin ligases cIAP1 and cIAP limit cell death to prevent inflammation. *Cell Reports*, 2679-2689.
- [117] Spriggs, D. I. (1988). Tumor Necrosis Factor Expression in Human Epithelial Tumor Cell Lines . *The Journal of clinical investigation*, 81(2), 455-460.
- [118] Dash, S. S. (2021). Exploring the extensive crosstalk between the antagonistic cytokines- TGF- β and TNF- α in regulating cancer pathogenesis. *Cytokine*, 138, 1043-1066.
- [119] Chakraborty, C. R. (2020). The Interplay among miRNAs, Major Cytokines, and Cancer-Related Inflammation. *Molecular therapy nucleic acid*, 20, 606-620.
- [120] Zhang, Z. L. (2018). Transmembrane TNF- α promotes chemoresistance in breast cancer cells. *Oncogene*, 37, 3456-3470.
- [121] Derin, D. O. (2008). Serum levels of apoptosis biomarkers, survivin and TNF- α in nonsmall cell lung cancer. *Lung Cancer Journal*, 59(2), 240-245.
- [122] Ciebiera, M. W. (2018). The Role of Tumor Necrosis Factor α in the Biology of Uterine Fibroids and the Related Symptoms. *International Journal of molecular sciences*, 12, 3869.

- [123] Chuang, M. S. (2008). Tumor-derived tumor necrosis factor-alpha promotes progression and epithelial-mesenchymal transition in renal cell carcinoma cells. *Cancer Science*, 99(5), 905-913.
- [124] Kern, L. M. (2019). Obesity-Induced TNF α and IL-6 Signaling: The Missing Link between Obesity and Inflammation-Driven Liver and Colorectal Cancers. *Cancers*, 11(1), 24.
- [125] Josephs, S. I. (2018). Unleashing endogenous TNF-alpha as a cancer immunotherapeutic. *Journal of Translational Medicine*, 16(1), 242.
- [126] Kalliolias, G. y. (2016). TNF biology, pathogenic mechanisms and emerging therapeutic strategies. *Nature Reviews. Rheumatology*, 12(1), 49-62. [70] Li, H. X. (2016). Association of TNF- α genetic polymorphisms with recurrent pregnancy loss risk: a systematic review and meta-analysis. *Reproductive biology and endocrinology*, 14(6).
- [127] Mendoza y España. (2016). CYTOTOXIC AND GENOTOXIC ACTIVITY OF PHENOLIC FRACTIONS FROM *Ulomoides dermestoides* FAIRMAIRE, 1893 (COLEOPTERA, TENEBRIONIDAE), IN HACAT CELLS. *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 83-91.
- [128] Szlosarek, P. G. (2006). Expression and regulation of tumor necrosis factor α in normal and malignant ovarian epithelium. *Molecular Cancer Therapeutics*, 5(2), 382-390.
- [129] Ali, K. A. (2012). Concentration levels of IL-10 and TNF α cytokines in patients with human papilloma virus (HPV) DNA⁺ and DNA⁻ cervical lesions. *Journal of Immunotoxicology*, 9(2), 168-172.
- [130] Alcocer, J. B. (2006). In Vivo Expression of Immunosuppressive Cytokines in. *Viral Immunology*, 19(3), 481-491.
- [131] Vasudevan, S. T. (2007). Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation. *Science.*, 318, 1931-1934.
- [132] Varfolomeev, E. y. (2018). Intracellular regulation of TNF activity in health and disease. *Cytokine*, 101, 26-32.
- [133] Zhang, H. Y. (2008). El lkkjkljkjioj. *Journal of Leukocyte Biolog*, 789-797.

[134] Deleault, K. S. (2008). Tristetraprolin regulates TNF TNF-alpha mRNA stability via a proteasome dependent mechanism involving the combined action of the ERK and p38 pathways. *Molecular immunology*, 45(1), 13-24.