



Universidad del Mar

Campus Puerto Escondido

“EFECTO DEL RESVERATROL SOBRE LA REACTIVACIÓN DE
LA PROTEÍNA p53 MUTANTE EN LÍNEAS CELULARES
DERIVADAS DEL CÁNCER”

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE
LICENCIADO EN BIOLOGÍA

PRESENTA:

SAIRA LISBETH CORNELIO ORTIZ

DIRECTOR:

Dr. PATRICIO GARIGLIO VIDAL

PUERTO ESCONDIDO, OAXACA, ENERO DE 2012



UNIVERSIDAD DEL MAR

Puerto Escondido - Puerto Ángel - Huatulco

O A X A C A

Puerto Escondido, Oaxaca, a 19 de diciembre del 2011

ASUNTO: Votos aprobatorios

Dr. José Luis Villarruel Ordaz
Jefe de la carrera de Biología
Universidad del Mar, campus Puerto Escondido

Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito: **Efecto del resveratrol sobre la reactivación de la proteína p53 mutante en líneas celulares derivadas del cáncer**, realizado por la pasante de Biología **Saira Lisbeth Cornelio Ortiz** con número de matrícula **05080019**, quién cubrió los créditos de la carrera de Biología.

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio

Atentamente

Dr. Patricio Gariglio Vidal
M. en C. Rodolfo Benjamín Ocadiz Delgado
M. en C. Julieta Karina Cruz Vázquez
M. en C. Ana Claudia Sánchez Espinosa
Dr. José Arturo de Nova Vázquez

c.c.p. M. en C. Gerardo E. Leyte Morales. Vice-rector Académico. Universidad del Mar
c.c.p. Ing. Ruth Cruz Ríos. Jefa del Departamento de Servicios Escolares. Universidad del Mar



El trabajo de tesis se desarrolló en el Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, en el Departamento de Genética y Biología Molecular, a cargo del Dr. Patricio Gariglio Vidal. Mis revisores M. en C. Rodolfo Ocádiz Delgado y Biol. Enrique García Villa me guiaron durante el trabajo experimental que se realizó en los laboratorios 24 y 25 del mismo Departamento.

DEDICATORIA

Este trabajo de tesis se lo dedico principalmente a mi familia: mi madre, mi padre y mis hermanos, que siempre han estado apoyándome en las buenas y en las malas, en cada una de las decisiones que he tomado para que mi vida se dirigiera hacia un rumbo correcto.

Al gran esfuerzo que mis padres han hecho para lograr darme este nivel de educación académica que es la Licenciatura, ya que en ocasiones esto no era fácil, pero sin embargo, me apoyaron hasta el final, estas personas magnificas a las cuales no les importaba sufrir con tal de ver mi sueño realizado.

Estos seres maravillosos a los que quiero mucho, que me brindaron su amor, cariño y comprensión, que durante estos últimos meses de arduo trabajo estuvieron apoyándome y sobretodo confiaron en mí, ya que a pesar de la distancia me tendieron la mano cuando lo necesitaba.

Dedico este trabajo a los seres que por algún motivo ahora ya no están a mi lado pero que los llevo en mi corazón y en mis pensamientos, que me apoyaron y me daban ánimos para salir adelante cuando mi camino se nublabo y no creía encontrar el camino adecuado... abuelos donde quiera que se encuentren este logro también es por ustedes.

"Los amo son lo más valioso que la vida me pudo haber dado... y si volviera a nacer no dudaría ni un segundo en volver a compartir toda una vida con ustedes".

AGRADECIMIENTOS

- A mi madre:

Gracias por apoyarme y por brindarme tu más grande esfuerzo para poder alcanzar esta meta en mi vida, te amo, eres la mejor madre del mundo, mi ejemplo a seguir, te estaré eternamente agradecida.

- A mi padre:

Agradezco los momentos de desvelo y las horas extras de trabajo que tuviste que cumplir; con tal de apoyarme y darme todo lo que te he pedido sin un no por respuesta, te amo y siempre estaré agradecida contigo. Gracias por confiar en mí.

- A mis hermanos:

Gracias por su comprensión y paciencia en determinados momentos, sé que no fue fácil sin embargo, han hecho un gran esfuerzo los quiero mucho.

- A mis tios:

Rosa Elena y Humberto agradezco el apoyo brindado durante mi estancia en este maravilloso Puerto.

- A mi director y revisores:

Agradezco a mi Director la oportunidad que me brindaron al asignarme este tema de tesis, el apoyo en reactivos, equipo e instalaciones de laboratorio ya que sin ellos este trabajo de tesis no se habría realizado.

A mis revisores que estuvieron conmigo desde el inicio del trabajo experimental agradezco sus enseñanzas y su apoyo en la realización de cada uno de los experimentos, a todos ustedes agradezco sus revisiones, correcciones y aclaraciones de dudas.

- Al Biol. Enrique García Villa:

Agradezco el tiempo de enseñanza y manejo de técnicas aplicadas durante el trabajo de tesis, así como sus explicaciones, aclaraciones de dudas, sugerencias, ideas y apoyo brindado durante la redacción.

- A mis compañeros de laboratorio:

Agradezco el tiempo y la confianza que me brindaron al enseñarme las técnicas y la preparación de los reactivos en mi proyecto de tesis durante mi estancia en los laboratorios. Gracias Janini, Marco, Roberto, Sihomara, Yazmin, Jorge, Alejandra, Jesús, Elizabeth e Ismael.

- A mi generación de la Universidad:

Agradezco a Lucia, Oscar, Esmeralda, Epifanio, Caín, Dora, Addy, Valeria, Francisco, Carlos y Adolfo por su amistad y apoyo durante los años que compartimos juntos en la Universidad. También agradezco a mis amigas que se rindieron en el camino pero que estuvieron conmigo siempre gracias Enimia y Zuleyma.

- A mis catedráticos de la Universidad:

Agradezco las enseñanzas y conocimientos compartidos durante los cinco años de la Licenciatura porque gracias a ellos adquirí las herramientas necesarias que me han permitido desempeñarme en el medio.

- *Por todo esto y mucho más agradezco a cada uno de ustedes su ayuda y apoyo incondicional, espero seguir contando con todos ustedes donde quiera que se encuentren* -

Mil gracias.

ÍNDICE GENERAL

Temas	Página
I.- Índice de figuras.....	I
II.- Índice de gráficas.....	II
III.- Índice de tablas.....	III
IV.- Abreviaturas.....	IV
Resumen.....	V
1.- Introducción.....	1
2.- Fundamento Teórico.....	2
2.1. El cáncer.....	2
2.2. Incidencia del cáncer.....	3
2.3. El ciclo celular.....	4
2.4. Genes involucrados en la carcinogénesis.....	5
2.4.1. Oncogenes.....	6
2.4.2. Genes supresores de tumor.....	6
2.4.2.1. Familia de p53: El guardián del genoma.....	7
2.5. Mutaciones y mutantes de p53.....	11
2.6. Reactivación de la mutante p53.....	14
2.7. Agentes quimiopreventivos.....	16
2.7.1. Resveratrol (3,5,4'-trihidroxiestilbeno).....	17
3.- Justificación.....	21
3.1. Problemática.....	22
4.- Hipótesis.....	24
5.- Objetivos.....	24
5.1. Objetivo general.....	24
5.2. Objetivos específicos.....	24
6.- Materiales y método.....	25
6.1. Cultivo celular y tratamiento.....	25
6.2. Extracción de proteínas totales.....	25
6.2.1. Análisis de Western blot.....	25
6.3. Extracción de RNA y síntesis de cDNA.....	26
6.4. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	26

6.5. RT-PCR cuantitativo en tiempo real (RT-qPCR).....	27
7.- Resultados y análisis de resultados.....	28
7.1. Niveles de expresión de la proteína p53 después del tratamiento con resveratrol.....	28
7.2. Extracción de RNA y síntesis de cDNA.....	29
7.3. Cambios en los niveles de expresión relativa del mRNA de los genes blanco de p53 en cada línea celular tratada con resveratrol.....	33
7.3.1. Línea celular de cáncer cervical: C33A.....	33
7.3.2. Línea celular de cáncer de mama: MDA-MB-231.....	34
7.3.3. Línea celular de carcinoma adrenocortical: SW13.....	35
7.3.4. Línea celular de cáncer colorectal: SW480.....	37
8.- Discusión.....	39
9.- Conclusiones.....	43
10.- Perspectiva.....	44
11.- Glosario.....	45
12.- Bibliografía.....	48
13.- Anexos.....	54
13.1 Cáncer y líneas celulares derivadas del cáncer.....	54
13.1.1. Cáncer cervical.....	54
13.1.2. Cáncer de mama.....	54
13.1.3. Carcinoma adrenocortical.....	55
13.1.4. Cáncer colorectal.....	56
14. Reactivos y soluciones.....	59

I. ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Capacidades adquiridas en la fisiología de las células cancerígenas.....	3
Figura 2. Componentes del ciclo celular.....	5
Figura 3. Estructura de la proteína p53.....	8
Figura 4. Representación de la ruta p53 destacando las diferencias entre wt-p53 y mutp53.....	10
Figura 5. Genes blanco de la ruta de p53 que participan en apoptosis, arresto del ciclo celular y reparación del DNA.....	10
Figura 6. Mutaciones sin sentido del gen p53 están agrupadas en el dominio de unión al DNA.....	12
Figura 7. Evidencias actuales para el estudio de los genes blanco de p53.....	15
Figura 8. Mecanismo bioquímico responsable del potencial quimio-preventivo y quimio-terapéutico del resveratrol.....	18
Figura 9. Blancos moleculares del resveratrol.....	19
Figura 10. Niveles de expresión de la proteína p53 (53 KDa).....	28
Figura 11. Análisis de la integridad del RNA total extraído de las líneas celulares.....	30
Figura 12. Gen constitutivo β -2-microglobulina (β 2M) y sus niveles de expresión relativa en las líneas derivadas del cáncer.....	31
Figura 13. Células C33A.....	54
Figura 14. Células MDA-MB-231.....	55
Figura 15. Células SW13.....	56
Figura 16. Modo clásico de la progresión en múltiples etapas.....	57
Figura 17. Células SW480.....	57

II. ÍNDICE DE GRÁFICAS

	Página
Gráfica 1. Análisis densitométrico de los niveles de expresión de la proteína p53 en las líneas derivadas del cáncer.....	29
Gráfica 2. Cambios en los niveles de expresión relativa del mRNA de los genes blanco de p53 en la línea celular de cáncer cervical C33A.....	34
Gráfica 3. Cambios en los niveles de expresión relativa del mRNA de los genes blanco de p53 en la línea celular de cáncer de mama MDA-MB-231.....	35
Gráfica 4. Cambios en los niveles de expresión relativa del mRNA de los genes blanco de p53 en la línea celular de cáncer adrenocortical SW13.....	36
Gráfica 5. Cambios en los niveles de expresión relativa del mRNA de los genes blanco de p53 en la línea celular de cáncer colorectal SW480.....	38

III. ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Porcentajes de defunciones por neoplasias más comunes en México en 2007.....	4
Tabla 2. Mutantes de p53 "hotspot" con fenotipos de ganancia de función.....	13
Tabla 3. Estrategias y mecanismos de acción de las moléculas con blancos en la vía p53 utilizadas para la reactivación de la mutp53 y la activación de wt-p53.....	15
Tabla 4. Actividades asignadas al resveratrol.....	20
Tabla 5. Efecto del resveratrol en células tumorales y su mecanismo de acción.....	21
Tabla 6. Niveles de expresión relativa de la proteína p53.....	29
Tabla 7. Concentración de RNA en cada una de las muestras.....	30
Tabla 8. Niveles de expresión de β 2M en las líneas celulares.....	32
Tabla 9. Secuencia sentido y antisentido de los oligonucleótidos.....	32
Tabla 10. Niveles de expresión de los genes blanco de p53 en C33A.....	33
Tabla 11. Niveles de expresión de los genes blanco de p53 en MDA-MB-231.....	35
Tabla 12. Niveles de expresión de los genes blanco de p53 en SW13.....	36
Tabla 13. Niveles de expresión de los genes blanco de p53 en SW480.....	37
Tabla 14. Líneas celulares derivadas del cáncer y mutaciones en el gen p53.....	58

IV. ABREVIATURAS

- AP-1: Activator protein 1.
- APC: adenomatosis polyposis coli.
- Bax: BCL2-associated X protein.
- BRCA1, BRCA2 (breast cancer 1, early onset): genes de susceptibilidad al cáncer de mama.
- cIAPs: Cellular Inhibitors of Apoptosis Proteins.
- E2F-1: E2F transcription factor 1.
- Egf-1: epidermal growth factor I.
- GADD45 β : Growth arrest and DNA-damage-inducible beta.
- MDM2: Mouse double minute 2, p53 binding protein homolog.
- MDM4: Mdm4 p53 binding protein homolog.
- MDR1: multidrug-resistance transporte.
- Myc: myelocytomatosis oncogene.
- NF-kB: nuclear factor kappa B.
- p21 (Cdkn1a): cyclin-dependent kinase inhibitor 1A.
- PCNA: proliferating cell nuclear antigen.
- PIG3 (TP53I3): tumor protein p53 inducible protein 3.
- Puma: p53 up-regulated modulator apoptosis.
- siRNAs: Small interfering RNA.
- TERT: telomerase reverse transcriptase.
- TNF: tumor necrosis factor.
- TP53INP1: tumor protein p53 inducible nuclear protein 1.
- VEGF: vascular endothelial growth factor.

RESUMEN

El cáncer actualmente es un problema de salud a nivel mundial, se caracteriza por alterar los mecanismos de proliferación y diferenciación celular, alterando los genes supresores de tumor y oncogenes.

Se ha demostrado que los compuestos naturales como el resveratrol podrían ser empleados en terapias contra el cáncer; particularmente el resveratrol tiene la capacidad de bloquear la proliferación celular, favorecer la diferenciación celular y la apoptosis en diversos tejidos. Este tipo de terapias serviría para incrementar la sobrevivencia y aumentar la calidad de vida de los pacientes así como para reducir los índices de citotoxicidad que se tienen con los tratamientos actuales para esta enfermedad.

Debido a que el gen p53 se encuentra mutado en más del 50% de todos los cánceres, es de suma importancia encontrar tratamientos dirigidos a este gen y sus genes blanco. Por lo tanto en este trabajo el objetivo fue demostrar si el resveratrol es capaz de activar la ruta de p53 en células con expresión de p53 mutante (C33A, MDA-MB-231, SW13 y SW480), mediante los niveles de expresión de la proteína y de los genes blanco de p53. En este trabajo se demuestra que las líneas celulares derivadas del cáncer C33A, MDA-MB-231, SW13 y SW480, que expresan proteínas p53 mutantes, respondieron favorablemente al tratamiento con resveratrol, aumentando los niveles de expresión de los genes blanco de la ruta de p53, siendo los genes Puma y p21^{WAF1} los que tuvieron cambios significativos, mientras que los genes Bax y PIG3 presentaron niveles de expresión muy variables; esto probablemente se debe a la capacidad de unión de sus promotores al dominio de unión a p53, sin embargo se demostró que con el tratamiento de resveratrol se activan genes con promotores con alta y baja afinidad al dominio de unión de p53.