



Benemérita Universidad Autónoma de Puebla



Facultad de Medicina

“Estudio de la Proencefalina nuclear y su efecto en el perfil de proliferación celular en líneas celulares Cancerígenas MDA-MB-231 y MCF-7”.

Tesis para obtener el grado de:

Licenciatura en Biomedicina

Presenta:

Lawrence Christopher López Méndez

Directores expertos y Metodológicos

D. en C. Eduardo Monjaraz Guzmán

D. en C. María Rosa Padrós Semorile

Puebla, Pue., 2018



Benemérita Universidad Autónoma de Puebla



Facultad de Medicina

“Estudio de la Proencefalina nuclear y su efecto en el perfil de proliferación celular en líneas celulares Cancerígenas MDA-MB-231 y MCF-7”.

Tesis para obtener el grado de:

Licenciatura en Biomedicina

Presenta:

Lawrence Christopher López Méndez

Directores expertos y Metodológicos

D. en C. Eduardo Monjaraz Guzmán *Eduardo Monjaraz G*

D. en C. María Rosa Padrós Semorile



Puebla, Pue., 2018



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA.

FACULTAD DE MEDICINA. COORDINACIÓN DE TITULACION EN PREGRADO

FORMATO "C" DE AUTORIZACIÓN DE TESIS. LICENCIATURA EN BIOMEDICINA

DATOS DEL SOLICITANTE.

Nombre Completo: Lawrence Christopher López Méndez

Matrícula: 201224071

Correo Electrónico: conkerwex@gmail.com

Teléfono: 222504093

Firma: 

Folio otorgado por el comité de investigación FMBUAP: 012/2016

TÍTULO DE LA TESIS: "Estudio de la Proencefalina nuclear y su efecto en el perfil de proliferación celular en líneas celulares Cancerígenas MDA-MB-231 y MCF-7"

ÁREA DEL ESTUDIO: Bioquímica y Biología Celular

Presentarla la tesis elaborada en computadora, con letra arial, numero 12 a espacio y medio firmada por los asesores de la Tesis y coordinación de titulación (original y cuatro portadas).

Director Experto de la Tesis: Eduardo Monjaraz Guzmán

No. de Trabajador: **100294122**

Teléfono: +52 (222) 229 55 00 Ext. 7311

Correo Electrónico: emgzman360@hotmail.com

Firma de autorización: Eduardo Monjaraz G

Director Metodológico de la Tesis: Eduardo Monjaraz Guzmán

No. de Trabajador: **100294122**

Teléfono: +52 (222) 229 55 00 Ext. 7311

Correo Electrónico: emgzman360@hotmail.com

Firma de autorización: Eduardo Monjaraz G

Visto bueno y se autorizará la impresión de la Tesis.


**COORDINADORA DE TITULACION
MASS IRMA ORTEGA SANCHEZ**



Este trabajo de tesis se desarrolló en el laboratorio de bioquímica celular y fue financiado mediante fondos institucionales del Instituto de Fisiología BUAP.

“Keep with you only this much: your mount, your blade, and your wits. The rest you can find, build, or take.” -Horse Clans’ wisdom

Agradecimientos

En tan poco espacio no puedo colocar todo lo que hay en mi corazón, pero debe intentarse.

Primero que nada, quiero agradecer por todo a mi familia, principalmente a mis padres y a mis abuelas por su apoyo, sus consejos y sus regaños que me han ayudado a ser quien soy; a mis hermanos y mis primos quienes me han llenado de alegría, suspenso y diversión a mi vida; a Elizabeth por soportarme tanto tiempo y apoyar mis locuras.

Agradezco a la Dra. Padrós por su enseñanza y la oportunidad que me brindo, a Silvia por su apoyo y sus historias, a Sandra por sus ideas y a Lili por escuchar mi parte menos cuerda y estar ahí...

Agradezco también a los doctores que estuvieron a lo largo de mi formación, a Amira, Berra, Celso, Everardo, Fabián, Monjaraz y algunos otros que me infundieron ideas, me tuvieron paciencia y me ayudaron montones con su consejo...

Finalmente, pero ni un poco menos importantes, a todas las personas que han interactuado conmigo en este proceso, esencialmente a mis queridos, Oso, Mijael, Nohemí, May y a todos los demás miembros del clan, A Cachuy y Josema quienes más tiempo ha estado aquí conmigo, a los Frikis, Mathuz, la Pequeña, Carmen, Lalito, Hugo, Lele y todos ellos que me llevaron a tan hermoso vicio y me compartieron tanto, a el alto, bronceado y guapo Jair, a la Trufa, a Los bizochos, Ivonne, Zaii, las gemelas y todos aquellos que no caben aquí pero están en mi alma....

Al universo, que con todas sus tiradas me ha traído hasta aquí...

Índice

1. Resumen	13
2. Introducción	15
3. Antecedentes	16
3.1. Proencefalina	16
3.1.1. Gen de proencefalina	18
3.1.2. Biosíntesis y Procesamiento de proencefalina	20
3.1.3. Distribución tisular	23
3.1.4. Proencefalina nuclear	26
3.2. Antecedentes en el Laboratorio	29
3.3. RNAs de interferencia	30
3.4. Características de las líneas celulares	33
3.4.1. MDA-MB-231.....	33
3.4.2. MCF-7	33
4. Planteamiento del Problema	34
5. Hipótesis	35
6. Objetivos	35
6.1. Objetivo General	35
6.2. Objetivos Específicos	35
7. Material y Métodos	36
7.1. Técnicas y procedimientos	36
7.1.1. Cultivo de las líneas celulares	36
7.1.2. Obtención de extractos celulares	36
7.1.3. Aislamiento de núcleos	37
7.1.4. Extracción de Proteínas celulares con Buffer Laemmli 2x	37
7.1.5. Western Blot	38

7.1.6.	Transfecciones transitorias con ARN de interferencia	40
7.1.7.	Ensayo de proliferación celular de MTT	42
7.2.	Análisis Informático	43
7.3.	Análisis de Datos	43
8.	Resultados	44
8.1.	Cultivos celulares	44
8.2.	Expresión de PENK en células Cancerígenas	45
8.2.1.	PENK en células MCF-7	46
8.2.2.	PENK en células MDA-MB-231	48
8.3.	Aislamientos de núcleos	49
8.4.	Expresión de PENK en núcleos aislados de células cancerígenas	50
8.4.1.	PENK en núcleos MCF-7	51
8.4.2.	PENK en núcleos MDA-MB-231	52
8.5.	Ensayo de la proliferación celular por MTT	53
8.6.	Análisis informático	55
9.	Discusión	60
10.	Conclusiones	67
11.	Bibliografía	68

1. Resumen

Desde hace mucho tiempo el estudio de las proteínas y sus funciones ha sido relevante para la comprensión de los seres vivos, múltiples motivos dentro de su estructura o cambios dentro de ésta pueden propiciar diversas funciones o alteraciones de estas. PENK es una prohormona cuyas principales funciones han sido descritas dentro del sistema nervioso central, sin embargo, es indudable pasar por alto sus funciones en otros tejidos, principalmente relacionadas con la proliferación y la diferenciación celular.

En este trabajo determinamos la presencia de PENK dentro de las células de las líneas celulares MCF-7 y MDA-MB-231 con pesos moleculares de 32-34 kDa y 44-46 kDa por medio de Western Blot. PENK de igual forma se encuentra presente dentro del núcleo de las células de las líneas MCF-7 y MDA-MB-231 en la forma correspondiente al peso molecular 32-34kDa. Tras una transfección con siRNA 2 específico para PENK, se demostró la eficiencia de éste al reducir prácticamente en su totalidad la presencia de PENK en los núcleos aislados de ambas líneas celulares. Asimismo, tras la realización de ensayos de MTT para medir la proliferación celular observamos una relación proporcional entre la tasa de proliferación celular y la disminución de PENK en ambas líneas celulares, efecto no atribuible a los receptores opioides. Finalmente, tras el análisis informático, se determinó la presencia de dos secuencias NLS las cuales parecen ser excelentes candidatas para dirigir el destino de PENK al núcleo. Además de esto, se determinó que el péptido señal que guía a PENK a través de la vía secretoria ejerce una gran influencia sobre la estructura de la proteína y tras su remoción favorece cambios estructurales, como el semiocultamiento de residuos de aminoácidos o la generación de puentes disulfuro, que activa las secuencias de localización nuclear (NLS) y permite su interacción con las importinas para su importe al núcleo.

El control de proliferación y diferenciación es de suma importancia para el desarrollo y mantenimiento de los organismos, pero estos mecanismos toman mayor relevancia al tratarse del cáncer, dado que es una de las principales causas de mortalidad a nivel mundial, ocupando el primer puesto tanto de morbilidad como de incidencia el cáncer de mama. Por otra parte, dilucidar los mecanismos del tráfico de las proteínas a través de los diversos organelos y compartimentos dentro de éstos nos permite tener un mayor entendimiento sobre diversos procesos que se llevan a cabo, además de poder determinar las funciones de las proteínas con relación al sitio donde se encuentran, aunado al estudio de sus estructuras.

El estudio de PENK, aunque realizado ya por décadas, aún presenta interrogantes por resolver, que función tiene PENK nuclear, si sigue la misma vía para su importe y posterior asociación con p53 u otras proteínas para el control de la proliferación celular son solo algunas de las incógnitas no solucionadas.

2. Introducción

Las proteínas son biomoléculas que son largas cadenas de diversos aminoácidos unidos por enlaces covalentes, con una identidad determinada por la secuencia de aminoácidos presente en ella y es esta misma secuencia la que determina su función. Los organismos vivientes que habitan este mundo realizan funciones sumamente complejas gracias a las proteínas, lo cual les permite adaptarse a un sin fin de condiciones presentes a lo largo de su existencia. Los seres humanos no somos la excepción y dentro de nosotros un gran número de proteínas realizan su función a diario para la mantención de nuestra propia vida; la albúmina la cual se encarga del transporte de otras moléculas y el mantenimiento de la presión osmótica o el colágeno que forma gran parte de las estructuras corporales, son solo ejemplos de las proteínas presentes en nuestro organismo.

Entre una de las muchas clases de proteínas se encuentran las prohormonas, conocidas también como precursores peptídicos, moléculas cuya función canónica es almacenar dentro de su estructura secuencias peptídicas efectoras, ejemplo de ello tenemos la Proencefalina, Pro-Opiomelanocortina, Proinsulina entre otras; estos precursores de sus péptidos efectoras sirven principalmente como moléculas de señalización y comunicación. (Hook et al 2010, Blackader 1993)

Aunque cada prohormona tiene en su estructura secuencias únicas, también comparten características estructurales, sintetizadas como pre-pro-proteínas, la secuencia pre- contiene una secuencia señal para su ingreso al retículo endoplásmico rugoso, sitio designado para la maduración de la prohormona con el corte de la secuencia señal por una enzima llamada señal-peptidasa, liberando el pro-péptido de su extremo amino terminal (N-terminal) y la molécula precursora. Esta molécula precursora puede contener múltiples copias de la misma secuencia de aminoácidos. Así dicha molécula actúa como precursora de múltiples productos finales los cuales serán liberados tras un procesamiento proteolítico ocurrido en el TGN, las vesículas secretorias y algunas veces en el espacio extracelular después de ser secretadas. (Blackader 1993)

3. Antecedentes

3.1. Proencefalina

La proencefalina (PENK) es una pro-proteína o proteína precursora, la cual es sintetizada por diversas células del organismo y requiere de un procesamiento proteolítico para dar origen a sus productos derivados. Este procesamiento ocurre en el TGN y en vesículas secretorias. (Alberts et al 2015).

Los productos de la PENK, las encefalinas, descubiertas antes que su precursor, fueron caracterizadas por primera vez por John Hughes en 1945, en búsqueda de análogos no adictivos de la morfina. Sin embargo, se demostró que la principal propiedad la cual dotaba de sus características a estas moléculas era su estructura, formando así péptidos opioides: las encefalinas.

Proneuropeptidos

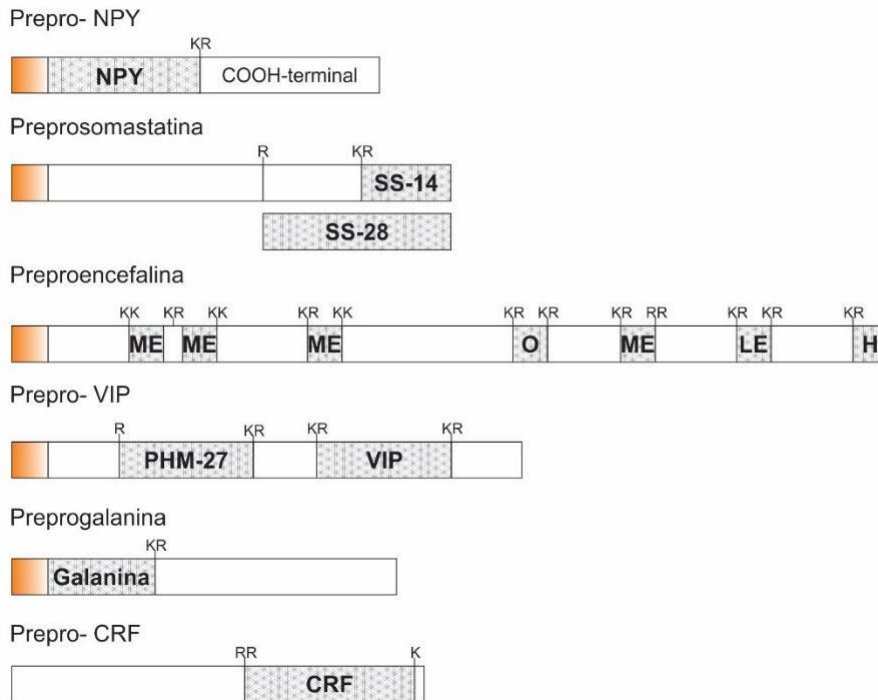


Figura 1 **Ejemplo de Proneuropéptidos**, también conocidos como Prohormonas, moléculas las cuales generalmente sufren un procesamiento catalítico para liberar neuropéptidos activos. (Modificado de Hook et al 2010)

La proteína precursora PENK fue localizada por primera vez en médula adrenal por Lewis y colaboradores en 1979. Mientras que al mismo tiempo tres grupos de investigadores demostraron que el material opioide era almacenado y co-secretado con catecolaminas en los gránulos secretorios de las células cromafines de la glándula adrenal (Viveros et al, 1979; Livett et al, 1981; Rossier et al, 1981). Posteriormente se realizaron las primeras investigaciones para identificar a la molécula precursora PENK y sus productos intermediarios en células cromafines de glándula suprarrenal bovina, por medio de purificaciones cromatográficas seguida de digestiones enzimáticas y radioinmunoensayos (Lewis et al, 1979; Stern et al, 1979; Rossier et al, 1980; Kilpatrick et al, 1981; Beaumont et al, 1985). A partir de entonces, la PENK y sus péptidos derivados han sido relacionados con diversas actividades en diferentes sistemas, incluyendo en sistema nervioso, endócrino y el sistema inmune humoral y celular e incluso su participación en el proceso de génesis tumoral (Brar y Lowry, 1999).

Pero a partir de 1995, varios trabajos demuestran, en células no neurales, que la molécula precursora de PENK completa, sin procesarse, puede viajar al núcleo y participa en el control del crecimiento celular (Böttger y Spruce, 1995, Vindrola et al, 1998, McTavish et al, 2007).

3.1.1. Gen de proencefalina

El gen de la proencefalina (PENK) ha sido descrito tanto en mamíferos como en organismos invertebrados, animales que divergen evolutivamente más de 500 millones de años, lo cual indica que presenta un origen filogenético más antiguo, y se le considera una de las primeras moléculas del sistema inmune (Stefano y Kream, 2008).

El gen de la PENK humana está ubicado en la región q22 a q24 cromosoma número 8 y corresponde a un transcrito de 20 Kb. (Litt et al, 1988; Stefano y Kream 2008). Dicho gen se encuentra organizado por cuatro exones separados por tres intrones. Los exones son transcritos en un mRNA de 1248 bases con un extremo de poliadenilación en su extremo 3' (Noda et al, 1982).

El gen de la preproencefalina humana y el de rata presentan una alta homología en cuanto a la secuencia de nucleótidos y en los sitios de traducción. En la rata el exón 1 tiene 191 pares de bases (pb) y está separado del exón 2 por 511 pb que forman el intrón A, la traducción de la prohormona comienza en el cuarto nucleótido del exón 2 que codifica para 24 aminoácidos de la proencefalina. Los exones 2 y 3 están separados por una secuencia de 3500 pb que constituye el intrón B. El exón 3 aunque tiene 978 nucleótidos solo codifica para 223 aminoácidos de la proencefalina. Las últimas 310 pb del exón 3, así como el primer exón, son transcritas, pero no son traducidas; mientras que en humano la transcripción del gen de la preproencefalina inicia en el exón 3, los cuatro exones son transcritos en un ARNm de 1248 bases de largo con un extremo de poliadenilación en la extremidad 3', y una región de 130 bases que provienen de los exones 1 y 2 en la extremidad 5' y de 317 bases en la extremidad 3' que no codifica para la síntesis de preproencefalina. (Rossier, 1993). De tal forma que la principal diferencia entre las dos especies es: en la rata, el gen de la preproencefalina se compone de 3 exones y 2 intrones, mientras que, en humano, como se ha mencionado, está compuesto por cuatro exones correspondiendo los exones 1 y 2 del humano al exón 1 de la rata (Rosen et al, 1984) (Ver Figura 2).

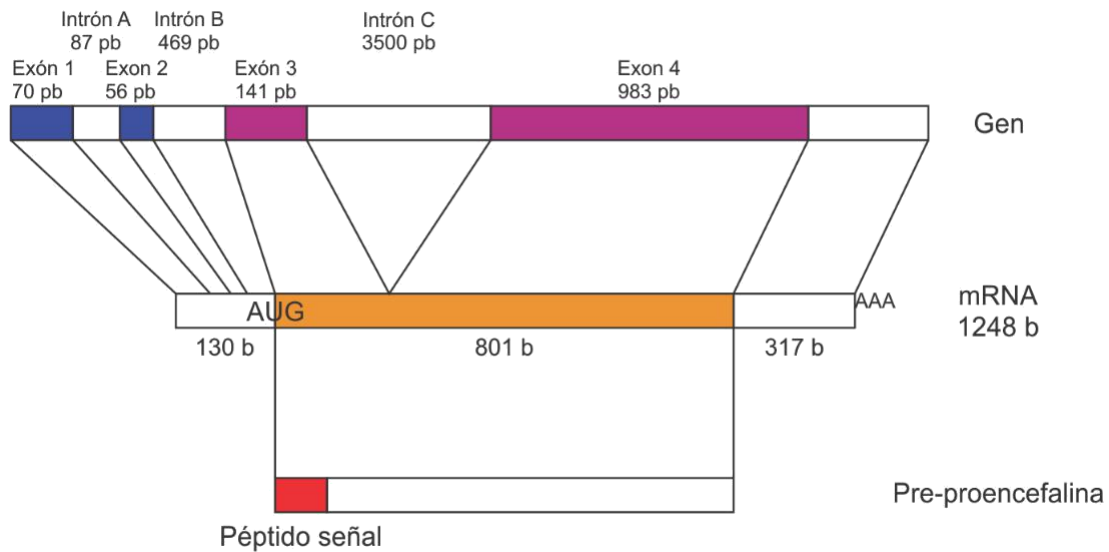


Figura 2 Estructura primaria del gen de la PENK humana. (Modificado de Weisinger, 1995)

La expresión del gen de PENK está ligada a la actividad eléctrica celular, además de estar estrechamente relacionada con eventos secretorios. La entrada de calcio es suficiente para desencadenar la inducción del gen, neurotransmisores y hormonas que incrementan la actividad eléctrica y el metabolismo del calcio pueden potenciar la expresión del gen. La unión de acetilcolina a los receptores nicotínicos causa una entrada de sodio, la despolarización de la membrana y una subsecuente apertura de canales de calcio voltaje dependientes desencadenando la inducción de PENK. (Blackader, 1993)

El incremento de cAMP también promueve el aumento de mRNA de PENK. El cAMP se une a la subunidad reguladora de la Proteincinasa A promoviendo la liberación de la subunidad catalítica en su forma activa, translocándola al núcleo y activando proteínas regulatorias con motivos de unión a DNA. Sin embargo, este parece ser un mecanismo independiente de calcio y de naturaleza transitoria, puesto que al estimular receptores histamínicos para medir el efecto del fosfoinositol y su hidrólisis por parte de la fosfolipasa C aumenta los niveles del mRNA de PENK, mecanismo al parecer mediado por la modulación de diacilglicerol y inositoltrifosfato sobre los canales de calcio. No obstante, la activación de la fosfolipasa C directamente, e inclusive mediada por calcio, induce un

aumento en la expresión del gen de PENK, lo cual sugiere un rol más directo en la regulación. (Kley N., 1988).

Otros mecanismos de control se encuentran presentes en la estructura del gen, uno de ellos son diferentes sitios de iniciación de la transcripción que sugieren que el uso de alguno de ellos, de manera selectiva, desencadena estímulos para generar RNAs específicos y es propio de cada tejido, lo cual provee de mecanismos separados mediante los cuales la expresión de los genes es controlada anatómicamente. (Weisinger et al 1990).

Además, diversos análisis han definido dos elementos funcionales distintos, ENKCRE1 (TGGCGTA) y ENKCRE2 (TGCGTCA), ambos solo separados por una vuelta de hélice dentro del enhancer de PENK. Estos sitios parecen tener una interacción competitiva que ocurre a nivel de uniones a DNA o interacciones proteína-proteína, AP1(Jun-A), AP2, AP4 y ENKTF-1; los factores de transcripción asociados al aumento de cAMP, interactúan con ENKCRE1, mientras que ENKCRE2 muestra interacciones con AP1, AP2, AP4, VIP, CRE y factores de transcripción ATF/CREB. Mas allá de estos elementos de respuesta a cAMP, también existe, además del NF-kB, un elemento que se une a las mismas secuencias y parece ser un activador específico, es llamado BETA, encontrado en grandes concentraciones en tejido cerebral y es importante para la regulación de PENK en estas estructuras. (Comb et al 1988).

3.1.2. Biosíntesis y Procesamiento de proencefalina

PENK es sintetizada por la parte codificable del mRNA constituida por 801 bases el cual conforma una proteína completa de 267 aminoácidos. Posee un extremo N-Terminal de 24 aminoácidos que corresponden al péptido señal, y permite su ingreso al retículo endoplásmico, donde éste se elimina por acción de una señal-peptidasa simultáneamente con el proceso de traducción (cotraducción) dando origen a la proproteína. La PENK es transportada desde el retículo endoplásmico a la región *cis* del aparato de Golgi, atraviesa la región media y llega a la región trans, específicamente al compartimiento denominado *Trans* Golgi Network (TGN). En esta última región comienza la endoproteólisis y la exoproteólisis de la molécula precursora. Los péptidos resultantes se incorporan a las vesículas que se transformarán en los gránulos secretorios maduros, donde finaliza la ruptura de PENK dando lugar a la formación de péptidos biológicamente activos (Rossier, 1993; Alberts et al 2015;

Mains et al 1983; Nelson y Cox 2013). A lo largo del transporte a través de las cisternas del aparato de Golgi ocurren otros cambios post-traduccionales tales como: glicosilación, sulfatación, metilación, fosforilación y N-acetilación (Nelson y Cox, 2013).

Estructuralmente, la PENK contiene, en su secuencia primaria, en todas las especies estudiadas, cuatro copias de Met-enkefalina, una copia de Leu-enkefalina, una copia de Heptapéptido (Met-enkefalina-Arg⁶-Phe⁷) y una copia de Octapéptido (Met-enkefalina-Arg⁶-Gly⁷-Leu), esta porción se encuentra unida a una región no opioide rica en residuos de cisteína denominada sinencefalina (Syn) y es exclusiva de la PENK (Liston et al., 1984) (Figura 3).

Para la ruptura proteolítica de la proteína a péptidos de diferente peso molecular se requieren dos tipos de actividad enzimática por medio de la cual los péptidos derivados de PENK son liberados: una con actividad parecida a la tripsina que reconoce y corta aminoácidos dibásicos, y una con actividad de carboxipeptidasa B que remueve aminoácidos básicos en el extremo carboxilo terminal (Wilson, 1991).

Las secuencias de los péptidos opioides se encuentran agrupadas en la porción carboxiterminal de PENK, proteína de 267 aa de largo, se localizan entre pares de aminoácidos básicos, tales como: Lys-Arg y Arg-Arg y en menor expresión Lys-Lys y Arg-Lys, que son conocidos como sitios consenso de ruptura proteolítica (Johanning et al, 1998) para miembros de la familia de convertasas de proproteínas PC1, PC2 y Furina (Breslin et al, 1993). Estas enzimas se han encontrado en los tejidos nervioso y neuroendocrino y en cultivos celulares derivados de ellos. Sus sitios de corte están ubicados en residuos dibásicos que flanquean los neuropéptidos, generalmente Lys-Lys, Arg-Arg y Arg,Lys. Por su parte, el procesamiento catalítico de PC1 es eficiente para la liberación del Péptido B de PENK, pero no lleva a cabo más cortes para liberar Metionina-Enkefalina (Met-enk). Los mayores productos producidos por estos son el Péptido B, el Péptido E y Leucina-enkefalina (Leu-enk) libre. PC2 es capaz de generar productos más pequeños que PC1. Entre los productos observados por el procesamiento de PC2 incluyen Met-enk RF, Met-enk RGL, Leu-enk y Met-enk. Furina a diferencia de PC1 y PC2 requiere de un sitio consenso específico con la estructura de R-Xaa-K/R-R. Furina es capaz de cortar en los sitios Lys-Lys de PENK para producir fragmentos de 5.3kDa, además de ser capaz de liberar el Péptido B de PENK al

realizar cortes en la región Lys-Arg. (Hook y Bandeira, 2015; Breslin et al, 1993; Brar y Lowry, 1999). Además, se han demostrado sitios de corte con un solo aminoácido básico, reacción catalizada por la Catepsina L, la cual demuestra ser de suma importancia para el procesamiento de PENK, lo que abre una nueva vía de procesamiento catalítico de la proteína, favoreciendo así la generación de muchas más variantes en los productos de PENK (Hook et al 2010).

Tras los procesamientos catalíticos de PENK por parte de alguna de los tipos de enzimas mencionados anteriormente son creados péptidos intermedios de diferentes pesos moleculares, dependiendo del sitio en el cual se lleve a cabo el corte de la Prohormona. En la Figura 3 se muestran algunos de los diferentes péptidos encontrados hasta la fecha, tanto en sistema nervioso central, en donde el procesamiento es completo dando lugar a péptidos pequeños con actividad opioide, como en la médula adrenal en la cual se han identificado péptidos más grandes de distinto peso molecular de los cuales algunos contienen una o más de las secuencias de encefalina y tienen actividad opioide, e incluso se ha reportado que la estimulación de ciertos receptores opioides por parte de estas moléculas, muestran mayor actividad que el pentapéptido libre (Dillen et al, 1993) entre ellos la met-encefalina, leu-encefalina, el octa-péptido, hepta-péptido, los péptidos E, F y BAM P22, 20 y 12; y otros carentes de actividad opioide como la sinencefalina, el péptido I y el péptido F, los cuales carecen de la secuencia Tyr-Gly-Gly-Phe en el extremo amino terminal (Rossier, 1993). Dependiendo de los sitios de producción de este precursor o de las células blanco los péptidos derivados de PENK pueden actuar de manera parácrina o autócrina, afectando así actividades celulares como puede ser la modulación de la actividad del tejido nervioso, actuando de manera directa como agente antimicrobiano, regulando la proliferación y diferenciación celular o jugando un rol crucial para el desarrollo del cerebro (Brar y Lowry, 1999; Slominski et al 2011; Denning et al 2008).

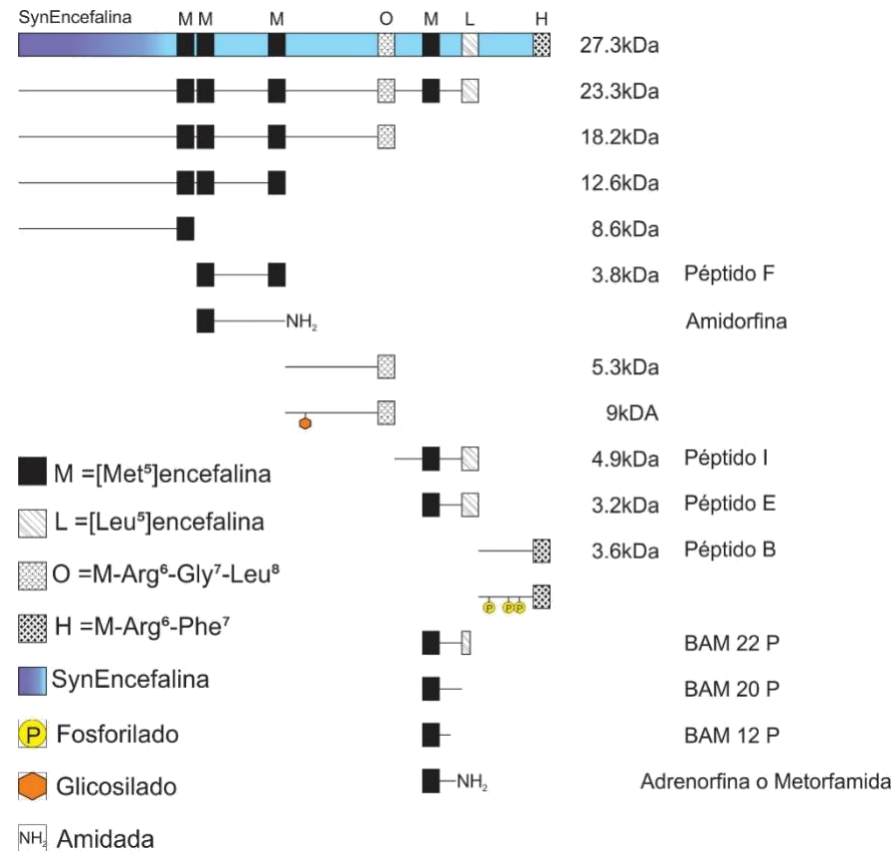


Figura 3 *Diferentes productos del Procesamiento de la Proencefalina en Glándula Adrenal y Sistema Nervioso Central. (Modificado de Rossier, 1993).*

3.1.3. Distribución tisular

La PENK ha sido ampliamente descrita tanto en tejidos nerviosos como en tejidos no nerviosos donde sus funciones son diversas dependiendo del tejido donde se encuentren.

En tejido nervioso ha sido descrita la función principal de los diversos péptidos opioides, generados por un procesamiento previo de PENK. Estos péptidos opioides actúan como neurotransmisores, neuromoduladores y neurohormonas y participan principalmente como moduladores con respecto al dolor, la analgesia y la nocicepción. Además, también se les ha relacionado con respuestas al estrés, la dependencia a sustancias adictivas y la regulación del apetito y el sueño (Slominski, et al 2011).

PENK también se ha encontrado expresada ampliamente por diferentes tejidos no neuronales. En células de la piel, se ha demostrado que su producción puede ser estimulada por agentes estresantes físicos (Radiación UV) y biológicos (Lipopolisacáridos) donde presenta un patrón específico de expresión y liberación el cual se le ha relacionado principalmente con la

nocicepción, además de estar relacionado con las respuestas locales al estrés y la inmunidad innata (Slominski et al 2011). Células cardíacas y musculares no sólo expresan el mRNA de PENK, sino que también presentan esta proteína precursora además de sus péptidos derivados en donde se sugiere que estos últimos actúan como pre-condicionantes para minimizar el estrés celular posterior a lesiones por isquemia (Denning et al 2008). En células de glándulas suprarrenales fue identificada la PENK y sus productos por espectrometría de masas. Posteriormente se pudo obtener información estructural acerca de su procesamiento en estas células con el fin de reconocer los patrones establecidos para la comunicación célula-célula requerida para mantener las funciones neuroendócrinas y en riñón, músculo e intestinos (Hook et al 2010).

Hacia finales de los años ochenta y principios de los noventa varios grupos reportaron la presencia del mRNA de la PENK y péptidos derivados de la misma en sistema inmune (linfocitos T y monocitos) en diferentes especies, incluyendo sangre periférica de origen humano, en donde se encuentra un bajo porcentaje de péptidos de bajo peso molecular y se demuestra que en estas células es necesaria la activación del procesamiento por medio de agentes mitogénicos con liberación de péptidos de alto peso molecular (Zurawski et al, 1986; Padrós et al, 1989; Roth et al, 1989; Kuis et al, 1991, Kamphuis et al, 1998). Asimismo, se ha demostrado en células B del sistema inmune que PENK presenta al igual que Met-Encefalina un rol inmunoregulador estimulando a ultra bajas concentraciones la producción de inmunoglobulinas M y G1 e inclusive estimulando la proliferación de éstas; incluso en la circulación sanguínea donde sus péptidos opioides presentan una función regulatoria, así como también en células embrionarias en desarrollo en las cuales se la relaciona con la diferenciación y la maduración celular. (Denning et al 2008). Por otra parte, células polimorfonucleares del sistema hemático, neutrófilos de origen humano, de bovino y de rata son capaces de producir y liberar péptidos derivados de PENK con procesamiento diferencial en cada uno de ellos de la porción no opioide (sinencefalina) (Vindrola et al, 1990).

Cabe mencionar que no solamente se ha encontrado el mRNA de la PENK y péptidos derivados de su procesamiento, sino que existen evidencias de la presencia de esta proteína en su forma completa. Se ha encontrado, por radioinmunoensayo y estudios cromatográficos, que la liberación de la forma completa de PENK *in vitro* en astrocitos de

rata neonatal con un peso molecular de 30 kDa, con escasa presencia de Met-enkefalina, además de un péptido de 1,5 kDa extracelularmente (Batter et al, 1991). En una línea celular de neuroblastoma Lindberg y Shaw demuestran la liberación de la PENK completa fosforilada de 32 kDa y un péptido de 3.6 kDa. (Lindberg y Shaw, 1992) y en adenomas productores de ACTH, en donde se observó la presencia de PENK completa en el citoplasma y en el núcleo (Vindrola et al, 1998).

A mediados de los ochentas, se comienza a relacionar la actividad de los péptidos derivados del procesamiento de PENK con la diferenciación celular. Estudios realizados en ratón y rata, por técnicas de hibridación *in situ* de ARNm, demuestran la presencia de ARNm de PENK en tejidos mesodérmicos no diferenciados, a diferencia de las células maduras, en cartílago, hueso, dermis, túbulos renales, coroides y retina, piel y músculo (Keshet et al, 1989; Isayama et al, 1991; Polakiewicz y Rosen, 1990).

Por otra parte, los cambios en la velocidad de la proliferación y diferenciación de células mesenquimáticas a fibroblastos están en relación con la disminución de la expresión del gen de PENK, esto durante el arresto del ciclo celular, a diferencia de los máximos niveles de expresión de PENK antes de la transición a las fases G1/S (Polakiewicz et al, 1992).

Además, existe evidencia de la participación de PENK y sus péptidos derivados de alto peso molecular en la proliferación y/o diferenciación celular. A partir de 1993, Saravia y colaboradores, encuentran que en tejido indiferenciado del sistema hematopoyético de ratón la PENK es procesada a péptidos de alto y mediano peso molecular mientras que en tejido maduro se realiza un procesamiento completo hacia péptidos de bajo peso molecular (Saravia et al, 1993).

El uso de anticuerpos monoclonales y policlonales contra la porción amino terminal (sinencefalina) de la PENK inhiben la respuesta proliferativa de células mononucleares humanas al ser activadas con fitohemaglutinina, sugiriendo que los productos derivados de PENK que son liberados al espacio extracelular participan en la proliferación en estas células maduras (Padrós et al, 1995). De igual manera, los ratones deficientes del gen de PENK (*knockout*) presentan una reducción sustancial en la proliferación de los linfocitos T CD4+ y CD8+ inducida por estímulos mitogénicos y antigénicos; y una disminución importante de los niveles de citocinas Th 2: IL-4 e IL-5 (Hook et al, 2003). Aunado a esto, Kamphuis et al, en 1998, reportan que, si se inhibe el procesamiento de PENK en linfocitos T de origen

humano, hay un aumento en la proliferación de dichas células, lo cual no es reversible al uso de met-enkefalina exógena (Kamphuis et al, 1998).

En base a las investigaciones mencionadas previamente, se ha concluido que el procesamiento de PENK es específico y depende del tipo celular en el que se lleve a cabo. En el sistema nervioso y neuroendócrino, la PENK se procesa hacia péptidos de bajo peso molecular, mientras que en tejidos y células no nerviosas el procesamiento es incompleto. Los productos de alto peso molecular pueden tener acciones no mediadas por los receptores opioides, ya que se ha encontrado a PENK completa carente de actividad opioide (Padrós et al, 1989; Vindrola et al, 1990).

3.1.4. Proencefalina nuclear

En base a los reportes mencionados anteriormente, se sabe que PENK y sus péptidos derivados participan en los procesos de control del crecimiento y la diferenciación celular. En estos trabajos se consideró que PENK entraba a la vía secretoria de las células, produciendo y liberando productos proteicos derivados de su procesamiento que al ser secretados pueden actuar como agentes activadores o inhibidores de la proliferación celular. Aunque se ha encontrado que los cultivos celulares de astrocitos de cerebro de rata neonatal liberan PENK sin procesar (PENK intacta) al medio extracelular y también secretan las enzimas que la procesan, lo cual sugiere que la ruptura proteolítica de PENK se realiza en el medio extracelular originando productos peptídicos de bajo peso molecular (Vilijn et al, 1989).

En un trabajo teórico donde se analiza la estructura de preprodinorfina y prePENK se indica la posibilidad de que estos precursores sean proteínas que se pueden unir al ADN como probables factores de transcripción; sobre la base de que poseen regiones ricas en cisteína las cuales son características de los dominios dedos de zinc, además de presentar dominios de hélice-alfa-hélice similares a las que tienen ciertos factores proteicos relacionados con la transcripción de genes (Bakalkin et al, 1991). Sin embargo, en esta década tras varios análisis informáticos de la secuencia de PENK completa se ha demostrado que esta carece de una señal de importación nuclear clásica.

A pesar de esto, las evidencias experimentales de que PENK intacta puede seguir una vía nuclear, además de la secretoria, en diversos tipos celulares comienza a partir de 1995, cuando Böttger y Spruce demuestran su localización en núcleo de líneas embrionarias de origen de humano (MRC-5) y ratón (Swiss 3T3), así como en mioblastos murinos (C2C12), utilizando 15 anticuerpos monoclonales dirigidos contra diferentes epitopes de la molécula. Ellos observan que esta PENK intacta se localiza en diferentes compartimientos sub-nucleares dependiendo de las señales extracelulares que controlan el crecimiento o la diferenciación. Por inmunofluorescencia y microscopía confocal, la inmunoreactividad se presentó en forma de máculas y de punteado grueso en los cultivos en crecimiento exponencial. Por el contrario, bajo condiciones de arresto del crecimiento o de inducción de la diferenciación, el patrón de inmunofluorescencia se observó en forma de punteado fino en el 100% de las células. En base a estos resultados los autores proponen que PENK existe como una proteína nuclear involucrada en el arresto del crecimiento y/o la diferenciación celular (Böttger y Spruce, 1995).

Como ya se mencionó antes, se ha descrito que las diferencias en la traducción de los productos de PENK resultan a partir de distintos sitios de inicio transcripcional o por splicing alternativo del RNA de la prePENK. (Weisinger 1995). En el trabajo mencionado de Spruce, cuando el cDNA que codifica para PENK está truncado, carente de la secuencia del péptido señal, y fue transfectado a células COS demuestran que la eliminación del péptido señal es suficiente para que PENK se transporte al núcleo y que su producto transcripcional es la proteína completa con un peso molecular de 30 a 32 kDa. Se conoce que una población de células de cerebro de rata contiene un transcrito primario de PENK que le falta el exon II que codifica para el péptido señal y parte de la molécula de synencefalina (Brooks et al, 1993).

En otro estudio también se observó la presencia de PENK en el citoplasma y en el núcleo de adenomas productores de ACTH. En estos tumores la molécula precursora encontrada en citoplasma se procesa a productos de alto, mediano y bajo peso molecular. Pero en la fracción nuclear se encuentra la molécula completa con pesos moleculares de 32-30 y 17 kDa. Dichas moléculas pudieron extraerse luego de digestión enzimática con DNAsa I, evidencia que demuestra que ambas estaban unidas a cromatina (Vindrola et al, 1998).

Más adelante se encontró que la depleción de PENK por medio de la transfección de RNA de interferencia conduce a una mayor viabilidad celular con aumento en los niveles de transcripción de genes antiapoptóticos, regulados por NF- κ B, en respuesta a factores inductores de apoptosis, como la irradiación UV y la exposición a peróxido de hidrógeno y etopóxido, en células embrionarias de origen murino (Swiss 3T3) y humano (HEK293). Se observó que la PENK nuclear se asocia físicamente a p53 y ReIA en respuesta a estos inductores de apoptosis. Además, los autores reportan que la PENK nuclear se asocia en forma constitutiva y mediante uniones de alta afinidad al complejo co-represor de histona deacetilasa HDAC1. En base a lo cual los investigadores proponen que la PENK nuclear forma parte del complejo proteico co-represor conformado de HDAC1, y que en respuesta a un estímulo apoptótico se asocia en forma transitoria con p53 y ReIa(p65) promoviendo la apoptosis al reprimir la transcripción de genes antiapoptóticos (McTavish et al, 2007).

Además de esto, proteínas relacionadas con la PENK han sido descritas dentro del núcleo, en el año 2001, Seung Hyun Yoo y colaboradores demostraron la localización de Cromogranina B en el núcleo, y su rol como un regulador de la expresión de algunas otras proteínas. Por otra parte, a finales del año 2016, Kononenko y colaboradores localizaron dos transcritos alternativos del mRNA de Prodinorfina (PDYN), otra proteína precursora de péptidos opioides, uno de los cuales es traducido a una variante de la PDYN carente de 13 aa perteneciente al péptido señal, además de una secuencia de localización nuclear la cual dirige a la proteína al núcleo de neuronas del cuerpo estriado humano. Sin embargo, a diferencia de la PENK completa, las proteínas mencionadas anteriormente contienen dentro de su estructura motivos NLS para su importe al núcleo, por lo cual el mecanismo de entrada al núcleo por parte de PENK sigue siendo una incógnita por resolver.

En base a todas estas evidencias experimentales presentadas, se puede concluir que la presencia de PENK intacta en el núcleo participa en otros procesos celulares, como el arresto del crecimiento, respuesta a señales de diferenciación y en la regulación de la apoptosis, además de ser una molécula precursora de péptidos opioides.

3.2. Antecedentes en el Laboratorio

Se ha demostrado que en las líneas de fibroblastos embrionarios de ratón NIH 3T3 y de neuroblastoma humano SK-N-MC, la PENK sintetizada *de novo* se libera intacta como un doblete de 46-44 kDa, luego es internalizada y cortada para producir fragmentos de 46-44, 34 y 32 kDa en el citoplasma y en el núcleo (Vindrola O et al, 2005). Las moléculas de 46-44 kDa aparecen principalmente en el citoplasma de estas células y se solubilizan con detergentes, mientras que las moléculas de 34 y 32 kDa son insolubles a los detergentes y sólo son extraíbles luego del tratamiento con DNasa seguida de RNasa. El fraccionamiento subcelular mostró claramente que las moléculas de 34 y 32 kDa se localizan en el núcleo unidas a la cromatina y a la matriz nuclear dependiendo de las condiciones de activación celular; mientras que el doblete de 46-44 kDa permaneció en la fracción citoplasmática (Rosete et al 2004; Vindrola et al, 2005).

Además, en cultivos sincronizados por privación de suero en las células NIH 3T3, el ARNm de PENK no se expresa constitutivamente a lo largo del ciclo celular, sino que presenta un incremento entre los primeros treinta minutos, llegando a un máximo a las 2 horas de reentrada al ciclo. También se ha observado una relocalización intranuclear que puede contribuir a su unión a diferentes moléculas y a un nuevo papel fisiológico.

Por estudios de inmunocitoquímica, se demostró que PENK intacta es una proteína nucleolar que co-localiza con nucleolina, donde la inmunoreactividad decreció después de 2 horas de la inhibición de la RNA polimerasa I con bajas dosis de actinomicina D. Después del reinicio del ciclo celular de las células NIH 3T3, se encontró que la PENK completa migra desde el nucléolo hacia el nucleoplasma al inicio de la fase G1, y retorna al nucléolo en la interfase de G1/S (Rosete et al 2004; Vindrola O et al, 2005).

Además, en las clonas transfectadas de manera estable con el cDNA del exón III de PENK (sin la secuencia del péptido señal) se incrementaron los niveles de PENK nuclear, con un aumento en los niveles del ARNm y de la proteína ciclina D1, potenciándose la proliferación celular. Este efecto fue observado fundamentalmente en cultivos sincronizados de fibroblastos embrionarios, donde el ciclo celular se disparó en presencia de altas concentraciones de suero. Simultáneamente, estas clonas presentaron un aumento en el tiempo necesario para alcanzar la sincronización de los cultivos por privación de SBF. Las clonas transfectadas con el cDNA antisentido de PENK mostraron una marcada inhibición

de la proliferación celular y de la expresión de ciclina D1 (Rosete et al 2004; Vindrola O et al, 2005; Rodríguez Linares, 2006).

Asimismo, en células de neuroblastoma humano SK-N-MC se encontró la PENK nuclear asociada específicamente en el nucléolo (Padrós MR et al, 2003; Terán L. 2003). La inmunoelectrotransferencia empleando distintos anticuerpos que reconocen diferentes epitopes de PENK permitió la detección de moléculas que se encuentran en el núcleo (32-34 kDa) y otras cuya localización es citoplasmática (44-46 kDa). Estos resultados son similares a los encontrados en fibroblastos de ratón (Terán L, 2003). Por otra parte, en esta misma línea celular, la transfección transitoria de diferentes ARN de interferencia dirigidos contra el mRNA de PENK disminuyeron la proliferación celular, así como la expresión de PENK (Flores A. 2011).

De estos estudios se concluye que la PENK sin procesar es una proteína nuclear biológicamente activa que puede actuar en diferentes compartimientos subnucleares y que participa, directa o indirectamente por unión a otras proteínas, aumentando la proliferación celular.

3.3. RNAs de interferencia

Los RNAs de interferencia (RNAi) son RNAs cortos (20-30 nucleótidos) de una sola cadena, encontrados fuera de la región codificante de los cuales reconocen selectivamente y se unen a RNAm específicos a través del apareamiento de bases, y una vez unidos pueden inhibir el proceso de traducción del RNAm e inclusive catalizar su destrucción. Además, si el RNAm está en proceso de transcripción puede unirse y dirigir la formación de cromatinas represivas ancladas a la cadena de DNA molde. Existen tres tipos de RNAi, microRNAs (RNAmi), RNAs pequeños de interferencia (RNAsi) y RNAs de interacción con piwi (RNApi).

Más de mil diferentes RNAmi son producidas por el genoma humano y parecen regular al menos un tercio de todos los genes codificantes de proteínas, los RNAmi son sintetizados por la RNA polimerasa II, capuchados, poli-adenilados, reciben después un procesamiento especial por la enzima *Dicer* para formar con un conjunto de proteínas un complejo de silenciamiento inducido por RNA (RISC), el cual busca secuencias complementarias al RNAmi presente en el complejo, esto facilitado por una proteína argonauta presente dentro del mismo, la cual mantiene el RNAmi en una posición óptima para el apareamiento de bases.

Una vez ocurrido el apareamiento de bases con un RNAm que presente la secuencia complementaria, si este es extensivo el RNAm será cortado por la proteína argonata, removiendo la cola de poli-A y exponiéndolo a las exonucleasas. Luego del corte el complejo RISC libera el RNAm y va en busca de secuencias complementarias adicionales. Por otra parte, si el apareamiento de bases no es extensivo la proteína argonata no realiza el corte, sin embargo, se queda asociado al RNAm reprimiendo su traducción, enviándolo a los cuerpos-P donde lejos de los ribosomas será degradado. (Alberts et al 2015, Morris 2005)

Por otra parte, la presencia de RNA bicatenario desencadena iRNAs esto atrayendo a un complejo proteico el cual contiene a *Dicer*, la misma nucleasa encargada de procesar a los RNAmi, generando pequeños fragmentos de una sola cadena, conocidos como RNAsi, los cuales se asocian con la proteína argonata y otras más del complejo RISC, inhibiendo así los RNAm con secuencias complementarias por los mecanismos anteriormente descritos.

Además, algunos de estos RNAsi tienen la capacidad de apagar específicamente la síntesis de sus RNAm blanco, donde los RNAsi junto con la proteína argonata y algunas otras se unen para formar el complejo de silenciamiento transcripcional inducido por RNA (RITS). Este complejo se une por apareamientos de bases a los transcritos de RNA emergentes de la RNA Pol II y recluta a otras proteínas cercanas para que modifique covalentemente las histonas para formar la heterocromatina y prevenir futuros trascritos. (Alberts et al 2015, Morris 2005)

Finalmente, los RNApi, realizan funciones similares a los anteriormente descritos, sin embargo, difieren en tamaño, ya que son ligeramente más largos, además de que la enzima *Dicer* no está presente en su síntesis y se asocian con otra clase de proteína relacionada con las proteínas argonautas, conocida como Piwi. (Alberts et al 2015)

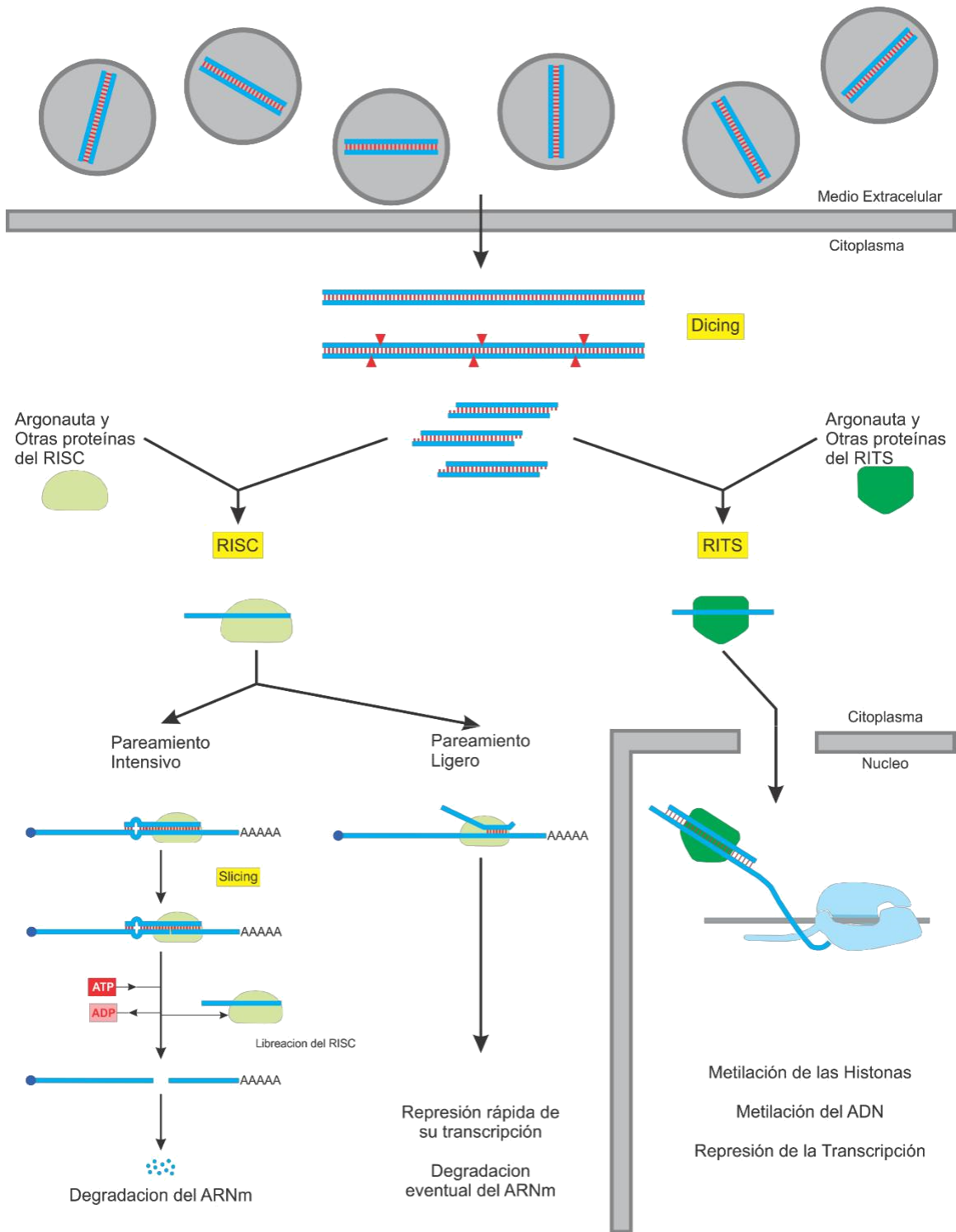


Figura 4 Mecanismo de acción de los siRNA. (Modificado de Alberts et al 2015)

3.4. Características de las líneas celulares

3.4.1. MDA-MB-231

La línea celular fue obtenida de una sola muestra de una efusión pleural el 17 de octubre de 1973 de una mujer blanca de 51 años. Fue establecida como una línea celular pura endotelial, con un rápido crecimiento gracias a su regulación autócrina con factores de crecimiento, además de su respuesta a hormonas. Las células mantienen una forma granular y de igual manera constituyen una red flexible de células cortas, con forma de huso o redondas, e inclusive se apilan para formar cúmulos de células redondas en condiciones de confluencia. Esta línea celular está cerca de tener un número de cromosomas triploides, oscilando en una presencia de entre 55 y 60 cromosomas. (Cailleau et al 1974; Martínez et al, 1999)

3.4.2. MCF-7

La línea celular fue obtenida de una sola muestra de una efusión pleural en agosto de 1970 de una mujer Caucásica de 69 años, Con sangre tipo 0 y RH positivo. Fue establecida como la primera línea celular de mama capaz de vivir más allá de unos cuantos meses. Es una línea endotelial, con un rápido crecimiento, las células mantienen morfología poligonal e inclusive pueden formar domos ante el estímulo hormonal. Su cariotipo contiene entre 88 y 85 cromosomas y corresponde al patrón típico para los cultivos humanos. (Soule et al 1973; Levenson y Craig, 1997).

4. Planteamiento del Problema

La PENK es reconocida principalmente por ser una prohormona, de manera que se ha estudiado ampliamente su procesamiento proteolítico, así como las funciones de sus productos peptídicos. Sin embargo, han sido pocas las implicaciones con las que se ha encontrado relacionada la molécula de PENK completa sin un procesamiento proteolítico.

Investigaciones realizadas por Böttger y Spruce (1995) y Vindrola y colaboradores (1998) han demostrado que PENK está presente dentro del espacio nuclear con una demostración clara de que estaba relacionada con el ciclo celular. Esta molécula es capaz de unirse a la cromatina y a la matriz nuclear, además de co-localizar con nucleolina. Es una proteína biológicamente activa que puede actuar en diferentes compartimentos subnucleares ante señales mitogénicas, de arresto del crecimiento y de diferenciación (Böttger y Spruce, 1995; Vindrola et al, 1998; Rosete et al 2004; Terán L. 2003; Vindrola O et al, 2005; Rodríguez-Linares, 2006; McTavish et al, 2007).

Sin embargo, este mecanismo solo ha podido constatararse en ciertas líneas celulares, por lo cual se requiere de un estudio más amplio para determinar si la presencia de PENK nuclear y su efecto en la proliferación celular ocurre de igual manera en todos los tipos celulares o si existen cambios significativos de una línea celular a otra.

Hasta el presente desconocemos si PENK está presente dentro de los núcleos de las células MDA-MB-231 y MCF-7, las cuales presentan diferente potencial invasivo. Y por otra parte no sabemos si existe una alteración en el perfil de proliferación de las líneas celulares MDA-MB-231 y MCF-7 al transfectarlas con un RNA de interferencia dirigido contra la PENK.

5. Hipótesis

La presencia de PENK nuclear influye en los perfiles de proliferación celular en las líneas celulares MCF-7 y MDA-MB-231.

6. Objetivos

6.1. Objetivo General

- Determinar la presencia de PENK nuclear en líneas celulares cancerígenas MCF-7 y MDA-MB-231, para establecer si existe una relación entre la disminución en los niveles de expresión de PENK y su perfil de proliferación. Además, analizar la estructura de PENK para comprobar si existen elementos que la guíen hacia el núcleo.

6.2. Objetivos Específicos

- Analizar la expresión de PENK en las células de las líneas celulares MCF-7 y MDA-MB-231.
- Analizar la expresión de PENK en núcleos aislados de las líneas celulares MCF-7 y MDA-MB-231.
- Realizar transfecciones transitorias con un ARN de interferencia en las células MCF-7 y MDA-MB-231 así como verificar los patrones de expresión de PENK en los núcleos aislados provenientes de las células transfectadas.
- Determinar la proliferación celular de las líneas MCF-7 y MDA-MB-231 luego de la transfección transitoria con el ARN de interferencia para PENK.
- Analizar la estructura de PENK mediante herramientas informáticas para comprobar si existen elementos que la guíen hacia el núcleo.

7. Material y Métodos

7.1. Técnicas y procedimientos

7.1.1. Cultivo de las líneas celulares

Las células utilizadas MCF-7 y MDA-MB-231 se tomaron de un vial mantenido en criopreservación, sometidas a una descongelación rápida a 37°C y resuspendidas en su medio de propagación correspondiente. Luego de lo cual fueron centrifugadas durante 10 minutos para remover los restos del criopreservador así como de posibles células muertas.

El pellet obtenido fue resuspendido en el medio de cultivo y las células se cultivaron en un frasco T25 en incubador húmedo con 5% de CO₂ y a 37°C. Una vez que éstas alcanzaron una confluencia del 90 %. Se realizó el subcultivo por tripsinización. Y las células fueron resembradas en frascos T75 o placas de 96 pozos, según el experimento a realizar posteriormente.

7.1.1.1. Medios de cultivo

Para las células MCF-7 se utilizó el medio MEM suplementado con 10% de SBF, 2 mM de glutamina, 10 mg/ml de insulina sérica bovina y antibióticos 1X (InVitrogen).

Para las células MDA-MB-231 se usó el medio Advanced DMEM suplementado con 3% de SBF, 2 mM de glutamina y antibióticos 1X (InVitrogen).

7.1.2. Obtención de extractos celulares

Las células se cultivaron en frascos T75 hasta alcanzar una confluencia del 80%, luego se retiró el medio sobrenadante y se lavaron tres veces con buffer de fosfatos salinos PBS 1X (pH 7.4, NaCl 171 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 1.83mM, KCl 3.35 mM) con CaCl₂ a una concentración de 2mM. Posteriormente se agregó buffer Laemmli 2x sin azul de bromofenol a las células adheridas y se lisaron con ayuda de un levantador de células, incubando durante cinco minutos dentro de un contenedor con hielo. Se colectó las células lisadas en tubos eppendorf de 1.5ml y se procedió a homogenizar las preparaciones en forma mecánica con la ayuda de agujas de diferente calibre. Posteriormente, los homogenatos al igual que los extractos de núcleos aislados fueron sometidos a la extracción de proteínas (como se indica en el apartado 7.1.4).

7.1.3. Aislamiento de núcleos

El fraccionamiento celular para obtener los componentes subcelulares ha sido un gran avance en la biología celular, permitiendo estudiar las estructuras y la función de los organelos y compartimentos subcelulares, así como el procesamiento y tráfico de componentes moleculares, etc. El objeto principal del fraccionamiento subcelular es obtener organelos y macromoléculas en un estado funcional en el que se retenga la mayoría de sus propiedades bioquímicas. La obtención del núcleo se realiza aplicando fuerza mecánica.

Para la separación de núcleos se crecieron las células en frascos T75 hasta 80% de confluencia y una vez en este punto se retiró el sobrenadante, se despegaron las células con solución PBS 1x EDTA 2mM o Tripsina-EDTA, incubando entre 5 a 10 minutos a temperatura ambiente apoyándose del uso de un levantador de células. Posteriormente las células se centrifugaron por 10 minutos a 1,200 rpm. Se desechó el sobrenadante, y el pellet se resuspendió en PBS 1X, lavando dos veces con esta solución, centrifugando nuevamente por 10 min a 1,200 rpm. La pastilla se resuspendió en buffer de núcleos con inhibidores.

Se utilizó un homogenizador Dounce para homogeneizar bien la suspensión celular hasta obtener núcleos perfectamente definidos, y se centrifugaron a 1,500 rpm a 4°C. El pellet se resuspendió en buffer de lisis con inhibidores, dejando incubar por 30 min a temperatura ambiente, y una vez finalizada la incubación se aplicó la suspensión sobre un gradiente de sucrosa y se centrifugó durante 10 min a 1,600 rpm a 4°C. Se recolectó todo el colchón de sucrosa y el sobrenadante, en caso de ser necesario, para un posterior análisis de la fracción postnuclear. La pastilla se lavó dos veces con PBS 1x centrifugando a 1,200 rpm durante 10 min a 4°C y luego con buffer de núcleos con inhibidores centrifugando 10 min a 1,200 rpm a 4°C. Se secó y almacenó la pastilla a -20°C para su posterior preparación para Western Blot.

7.1.4. Extracción de Proteínas celulares con Buffer Laemmli 2x

La extracción de proteínas tiene como objetivo liberar el máximo número de proteínas de interés evitando la degradación de estas o alteraciones secundarias para poder estudiarlas a mayor detalle, en este caso combinado junto con el fraccionamiento celular para obtener solo las proteínas nucleares para su estudio por medio de Western Blot.

Las pastillas de núcleos obtenidas por fraccionamiento nuclear son resuspendidas en buffer Laemmli 2x sin azul de bromofenol y homogeneizadas, luego fueron transvasadas a un tubo eppendorf y hervidas a baño maría por 5 min, para después homogenizar la muestra con ayuda de una aguja 20G de manera mecánica. Finalmente, los homogenatos fueron centrifugados a 14,000 rpm por 10 minutos a 4°C, se separa el sobrenadante del pellet y ambos se almacenan a -20°C.

7.1.5. Western Blot

El western blot es la metodología utilizada en este trabajo de Tesis para el análisis de las proteínas de los extractos nucleares provenientes de las células MCF-7 y MDA-MB-231. Se siguieron los pasos utilizados anteriormente por Vindrola y colaboradores en 1998. El Western blot es una técnica analítica usada para identificar proteínas específicas en una mezcla compleja de proteínas, por medio de tres etapas: separación por tamaño y aplicación de campo eléctrico, transferencia a un soporte sólido y, visualización.

Para la separación se utilizaron geles de poliacrilamida, los cuales fueron polimerizados en dos partes, primero un gel de corrida con concentraciones determinadas por el peso de la proteína de interés para la parte del gel de corrida, poliacrilamida al 12% para proteínas de 20 a 60 KDa de peso molecular y poliacrilamida al 8.8% para proteínas de 30 a 100 KDa de peso molecular, y posteriormente sobre éste un gel de apilamiento de poliacrilamida al 4%, dentro de soportes especializados.

Las muestras se prepararon para su inclusión dentro de los geles en buffer Laemmli y azul de bromofenol, además de la preparación aparte del estándar de peso molecular. Las muestras y el marcador de peso molecular son sembradas dentro de los pozos del gel de empaquetamiento. La electroforesis se corre a un voltaje constante de 100 voltios (V) durante el tiempo necesario, aproximadamente dos horas.

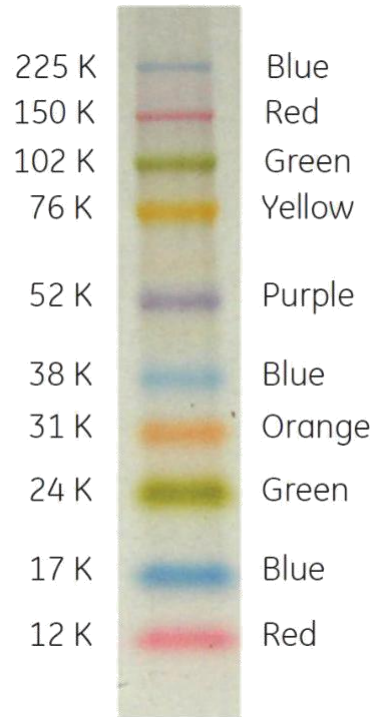


Figura 5 Representación del Marcador de peso molecular Full Range en condiciones estándar

Posterior a esto comienza la etapa de transferencia a un soporte sólido, donde los geles son retirados de los soportes de la electroforesis y llevados a los soportes para la transferencia mediante un arreglo realizado junto con papel filtro y esponjas además de membranas de nitrocelulosa con un poro de $0.45\mu\text{m}$ de diámetro, en el que quedaron ancladas las proteínas. Una vez armados y colocados los soportes en un cámara de transferencia se aplica una corriente constante de 190 amperios (A) y un voltaje de 140 V durante 90 minutos dentro de una solución de Tris-HCL 25mM, glicina 102 mM y metanol al 20%.

Finalmente, las membranas son retiradas de los soportes de transferencia y bloqueadas durante 1 hora con buffer TBS, Tween al 0.1%, en agitación constante y a temperatura ambiente. Luego, se incubaron con los primeros anticuerpos diluidos en la misma solución de bloqueo durante toda la noche por al menos 16 horas, con agitación constante y a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Terminada la incubación del anticuerpo primario, se realizaron cuatro lavados de 10 minutos cada uno, con buffer TBS y Tween al 0.1%. Luego de esto, se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente con el segundo anticuerpo diluido en la solución de bloqueo, para que, seguido de este paso, se lleven a cabo otros cuatro lavados. Finalmente, las membranas de nitrocelulosa

se expusieron al reactivo de color para fosfatasa alcalina. Los lavados, la incubación con el segundo anticuerpo y el revelado se efectuaron con agitación constante y a temperatura ambiente. Para determinar el peso molecular de las proteínas se usaron marcadores de peso molecular de rango completo (Amersham, USA).

Primer Anticuerpo	
Nombre	Dilución
Anti Actina (Santa Cruz Biotechnology)	1:200
Hepta Swartz (Donado por Dr Swartz)	1:500
DAM5 B7 (Producido por el Dr Vindrola)	1:1,000
Segundo anticuerpo	
Fab'2 de chivo contra las cadenas pesadas y livianas de IgG de conejo (Jackson Research Laboratories)	1:10,000

Tabla 1 Anticuerpos Utilizados para Western Blot

7.1.6. Transfecciones transitorias con ARN de interferencia

Se empleó el vector plasmídico pGFP-V-RS de OriGene que contiene las repeticiones terminales largas (LTRs) 5' y 3' del virus de leucemia moloney murina flanqueando al promotor humano U6 (promotor de genes de ARN nucleares pequeños) y al promotor temprano SV40 que comanda el gen de puomicin-N-acetil transferasa, mismo que provee resistencia al antibiótico puomicina; después del LTR 3' se encuentra el promotor del citomegalovirus (CMV) junto con el gen tGFP que expresa la proteína tGFP constitutivamente en células de mamífero, y por último el casete de resistencia a kanamicina como marcador de selección bacteriano (Figura 3).

Se empleó un inserto de ADNc que codifica para un ARNi específico contra PENK (ARNi 2), el cuales ya se conoce en el Laboratorio por ser el más eficiente para inhibir la expresión de PENK. La secuencia de este casete de expresión shRNA (short hairpin RNA) fue construida empleando oligonucleótidos sintéticos, clonados en los sitios de restricción BamHI/Hind III del vector pGFP-V-RS. El inserto contiene una secuencia específica de 29nt situada inmediatamente corriente abajo del promotor U6 en orientación positiva, un asa de 7nt y la secuencia complementaria de 29nt seguida de una secuencia de terminación TTTTTT; a fin de que al ser transcrito adopte una forma de tallo y asa para ser reconocido y

procesado por la maquinaria celular que origina los ARN de interferencia maduros endógenos.

Promotor U6 – GATCG – 29nt sentido – TCAAGAG – 29nt antisentido –
 TTTTTT – GAAGCT; Secuencias del ARNi 2:
 CACCAGGATGGCAGTGATAATGAGGAAGA

Figura 6 Estructura del inserto utilizado para las transfecciones

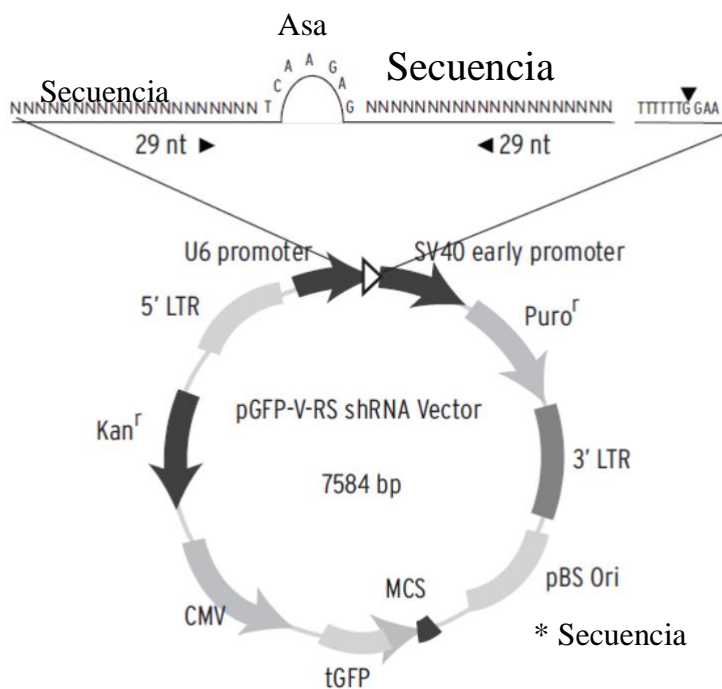


Figura 7 Mapa del vector pGFP-V-RS. (Modificado de OriGene).

Se transfectó dicho plásmido más el control por duplicado a las células. El control es simplemente el vector plasmídico original (C1) sin inserto; se trabajó con una concentración de los plásmidos correspondiente al volumen de células a transfectar.

En placas de 6 pozos de 35 mm se sembraron 6×10^5 células/pozo, se agregaron 1.5 ml de Optimem (GIBCO) + 50 μ l del lipoplex (mezcla del plásmido ya sea 4 μ g y 10 μ g de lipofectamina (InVitrogen)). Se incubaron las placas durante 5 horas, posteriormente se agregaron 1.5 ml de medio con 20% de suero a cada pozo; al día siguiente se le cambió el medio sobrenadante por 3 ml de medio de cultivo fresco (con 10% de SBF) y se incubaron a

37°C en incubador húmedo gaseado con 5% de CO₂ por 48 horas más, es decir, por un tiempo total de 72 horas post-transfección. Mismo procedimiento fue realizado para los frascos T75, simplemente cambiando las concentraciones de plásmido y lipofectamina dependiendo del volumen celular en el cual se encontraban al momento de la transfección.

7.1.7. Ensayo de proliferación celular de MTT

El ensayo MTT es un ensayo colorimétrico para evaluar la actividad celular metabólica por medio de enzimas oxidoreductoras celulares dependientes de NAD(P)H presentes en las mitocondrias celulares, que en ciertas condiciones pueden reflejar el número de células viables presentes. El colorante 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)2,5 bromuro de difeniltetrazolio (MTT) es reducido por las deshidrogenasas mitocondriales de células viables a formazan. La tinción de tetrazolio puede ser usada para medir la citotoxicidad, proliferación y actividad celular de diferentes moléculas. El ensayo MTT generalmente debe ser realizado en la oscuridad pues el reactivo es fotosensible.

Para este estudio se utilizaron células MCF-7 y MDA-MB-231 transfectadas con el ARN de interferencia o sin transfectar. A cada pozo de una placa de 96 pocillos se agregaron 5×10^4 células/pocillo y se dejaron 24 hrs en el incubador húmedo a 37°C y 5% de CO₂. Al día siguiente, se agregaron 10 µl de una solución de 2 mg/ml de MTT en medio HEPES. A continuación, las placas se incubaron durante 4 horas con 5% CO₂ y a 37 °C, para después centrifugar a 1,200 rpm durante 5 minutos y a 20 °C.

Una vez que se ha cumplido este proceso se retiró el medio e inmediatamente se añadieron 200 µl de DMSO, a cada pozo, se resuspendió hasta notar que los sedimentos se disgregaran, y en este paso los pozos cambian a color morado. Finalmente, se agregaron 25 µl del buffer glicina Sorensen (0.1 M glycine, 0.1 M NaCl, pH 10.5) por pozo antes de realizar la lectura espectrofotométrica. La lectura de cada placa se realizó en el lector de microplaca BIO-RAD modelo 550 a $\lambda=570$ nm.

7.2. Análisis Informático

La secuencia de PENK fue obtenida de UniProt en formato Fasta y comparada con la reportada por Noda y colaboradores en 1982. Posterior a esto las secuencias fueron analizadas con cinco herramientas informáticas. SignalP 4.1 evalúa la secuencia de aminoácidos en busca de Péptidos señales que dirijan el destino de la proteína (Petersen et al 2011). TargetP 1.1 se asocia con SignalP, y busca determinar por medio de una evaluación de la secuencia de aminoácidos el destino final de la proteína (Emanuelsson et al 2000). PSORT II es una herramienta conformada por diversos subprogramas, entre ellos varios clasificadores de motivos que dirijan el destino de la proteína, como NLSs o péptido señal, tanto mitocondriales como de la vía secretoria. Además, se utilizaron herramientas que evalúan la presencia de la proteína en los diversos compartimentos celulares o en el núcleo específicamente por los métodos de κ -Nears y el método de Reinhardt's para la discriminación Citoplasmática/Nuclear. cNLS Mapper evalúa específicamente las secuencias de aminoácidos buscando NLS con la posibilidad de calibrar la herramienta en una escala de 10 etapas, siendo 10 para proteínas exclusivas del núcleo y 1 proteínas exclusivas del citoplasma (también secretadas) (Kosugi et al 2009a, Kosugi et al 2009b, Kosugi et al 2008). PredictProtein es una herramienta también conformada por diversos subprogramas, los cuales son capaces de determinar la conformación secundaria de la secuencia de una proteína introducida además de otros motivos que puedan alterar ésta (Rost y Liu 2003). Estas herramientas fueron utilizadas para el análisis exhaustivo de PENK para intentar explicar su localización esperada por los motivos presentes en su estructura.

7.3. Análisis de Datos

Se realizó un análisis de la distribución subcelular de la proteína de interés y se comparó la densidad de las bandas en la membrana del Western blot en las dos líneas celulares con la correspondiente presencia de beta-actina (para los extractos celulares) o entre los extractos de núcleos aislados con o sin la presencia del RNAi2 (para los núcleos), mediante el programa Image J obteniendo los resultados en unidades de densidad óptica. Para medir la proliferación celular posterior a la transfección de los RNA de interferencia se obtuvieron las unidades de densidad óptica (DO) y se compararon los resultados obtenidos vs los controles sin transfectar. Las pruebas estadísticas aplicadas fueron *t* de Student y ANOVA para muestras independientes.

8. Resultados

8.1. Cultivos celulares

Se realizó el cultivo de dos líneas celulares de cáncer de mama, una de alta y otra de baja invasividad, las cuales fueron: MDA-MB-231 y MCF-7, respectivamente. Los cuidados y la morfología del cultivo dependen del procedimiento a realizarse. Para extractos celulares, MTT y aislamiento de núcleos sin transfectar los cultivos fueron verificados cada 24 horas, revisando el color del medio, el número de células adheridas y su morfología.

Las células de la línea celular MDA-MB-231 se cultivaron hasta una confluencia del 90%, las células formaban clusters o colonias de células de tipo epitelial granuladas con forma de huso en una monocapa. (Figura 8) La línea celular MCF-7 de la misma manera se cultivó hasta una confluencia del 90%, las células igualmente formaban rosetas de células de tipo epitelial con morfología poligonal en una monocapa. (Figura 9)

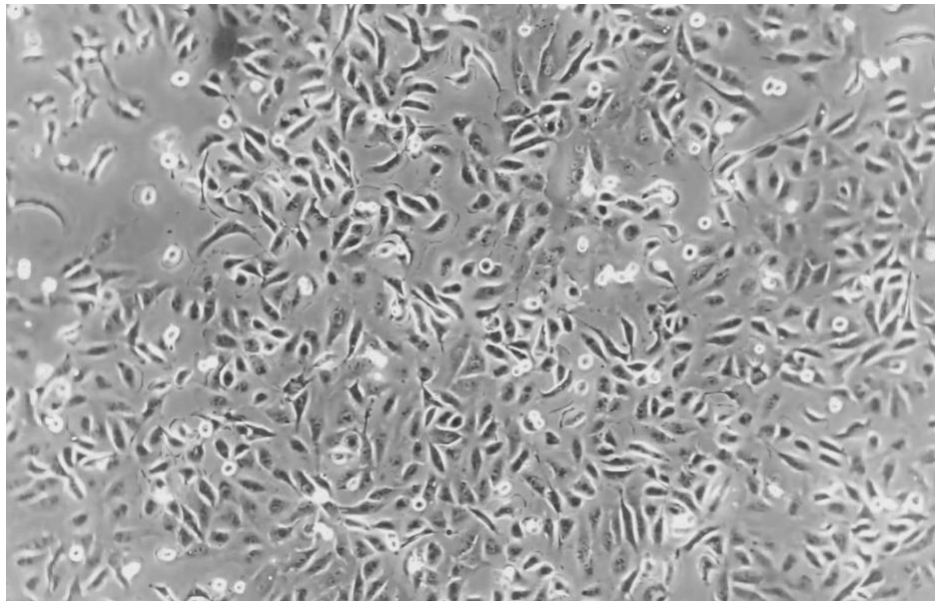


Figura 8. Morfología de un cultivo de células MDA-MB-231 a una confluencia del 50%

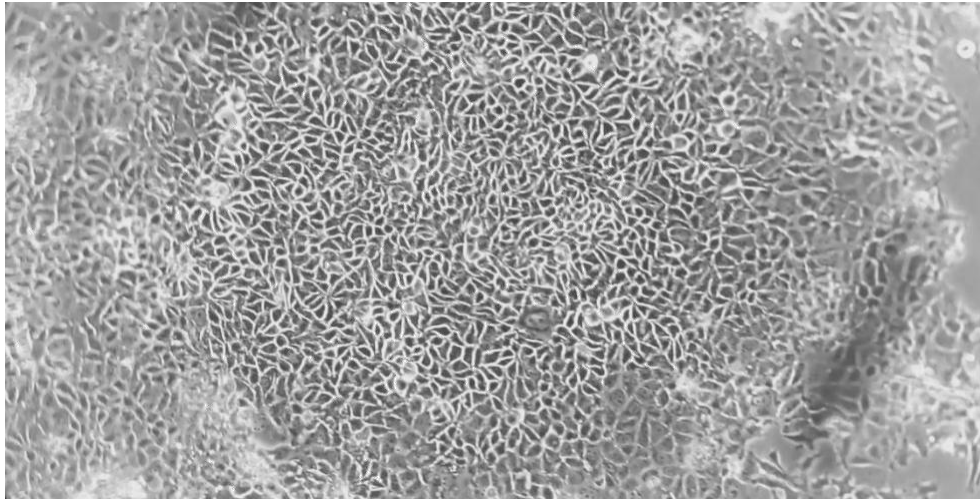


Figura 9. Morfología de un cultivo de células MCF-7 a una confluencia del 90%

8.2. Expresión de PENK en células Cancerígenas

El Western blot es una importante técnica usada en la biología celular y molecular para identificar proteínas específicas en una mezcla compleja de proteínas extraídas de las células. La técnica comprende tres etapas para su realización: la separación, la transferencia a un soporte sólido y el marcaje de la proteína a través del uso de anticuerpos para poder visualizarla

Las muestras fueron obtenidas de los cultivos celulares realizados previamente de las líneas MCF-7 y MDA-MB-231, estas fueron cosechadas y sus proteínas totales fueron obtenidas a través del método de Laemmli, posteriormente se llevó a cabo una cuantificación de proteínas de los extractos para su utilización. Para ambas líneas celulares se llevaron a cabo experimentos de western blot por duplicado; y la detección de actina para su uso como control de la expresión de proteínas por su característica de gen constitutivo, y para la proteína PENK en los extractos celulares.

8.2.1. PENK en células MCF-7

En las células pertenecientes a la línea celular MCF-7 se detectó la presencia de PENK en dobletes de bandas con pesos moleculares de 32-34 y 44-46 kDa como se muestra en la Figura 10A mediante el uso del anticuerpo DAM5, el cual reconoce la porción amino-terminal de la molécula completa. El análisis densitométrico demuestra que no hay diferencias significativas en la cantidad de PENK entre las concentraciones sembradas y normalizadas frente a actina.

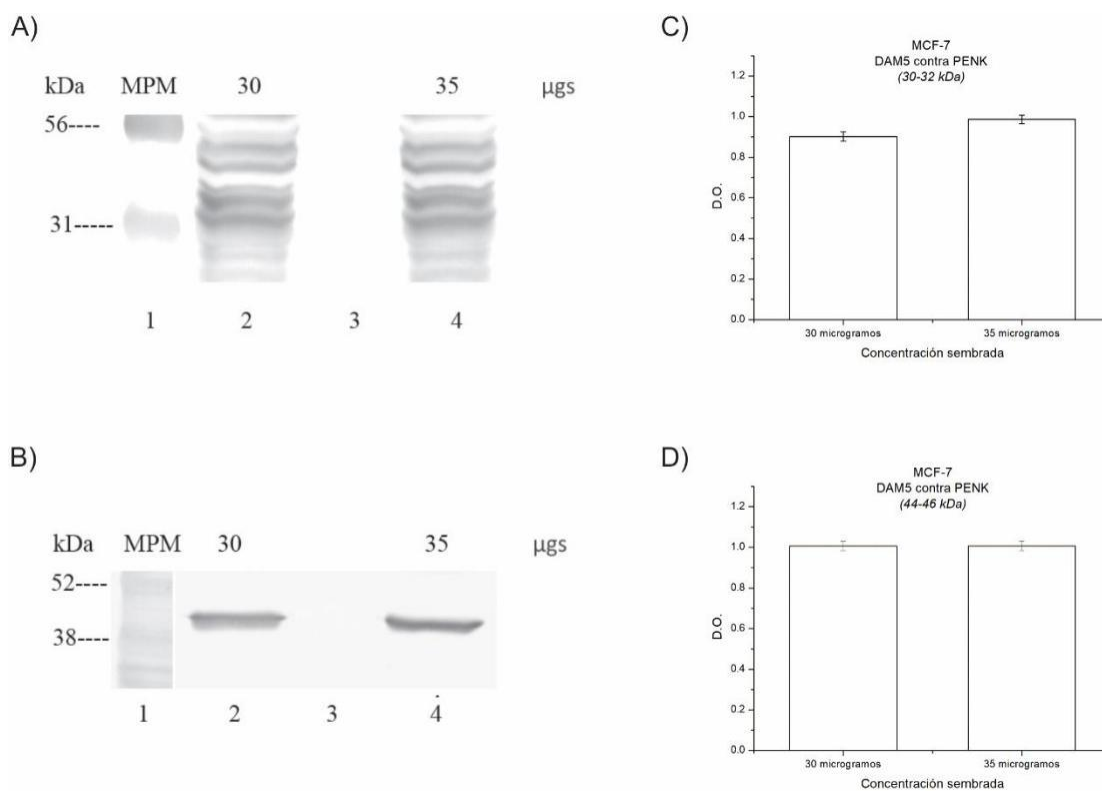


Figura 10 *Expresión de PENK en células de la línea MCF-7. Detección de la proteína PENK mediante Western Blot, inmunomarcado con el anticuerpo DAM5 y posteriormente revelado (A). Detección de Actina como control mediante Western Blot Inmunomarcado con el anticuerpo Anti-Actina y posteriormente revelado (B). Comparación de la cantidad de PENK de peso molecular de 32-34 kDa en las condiciones sembradas tras el análisis densitométrico normalizadas contra actina (C). Comparación de la cantidad de PENK de peso molecular de 44-46 kDa en las condiciones sembradas tras el análisis densitométrico normalizadas contra actina (D).*

Posteriormente se realizó un western blot de los mismos extractos celulares, pero inmurevelando con el anticuerpo Hepta-Swartz, el cual está dirigido contra la porción carboxilo-terminal de la molécula completa de PENK. Como se observa en la Figura 11A, aparecen dos dobletes de bandas: uno de 44-46 kDa y otro de 32-34 kDa pertenecientes a PENK. El análisis densitométrico demuestra que no hay diferencias significativas en la cantidad de PENK entre las concentraciones sembradas y normalizadas frente a actina.

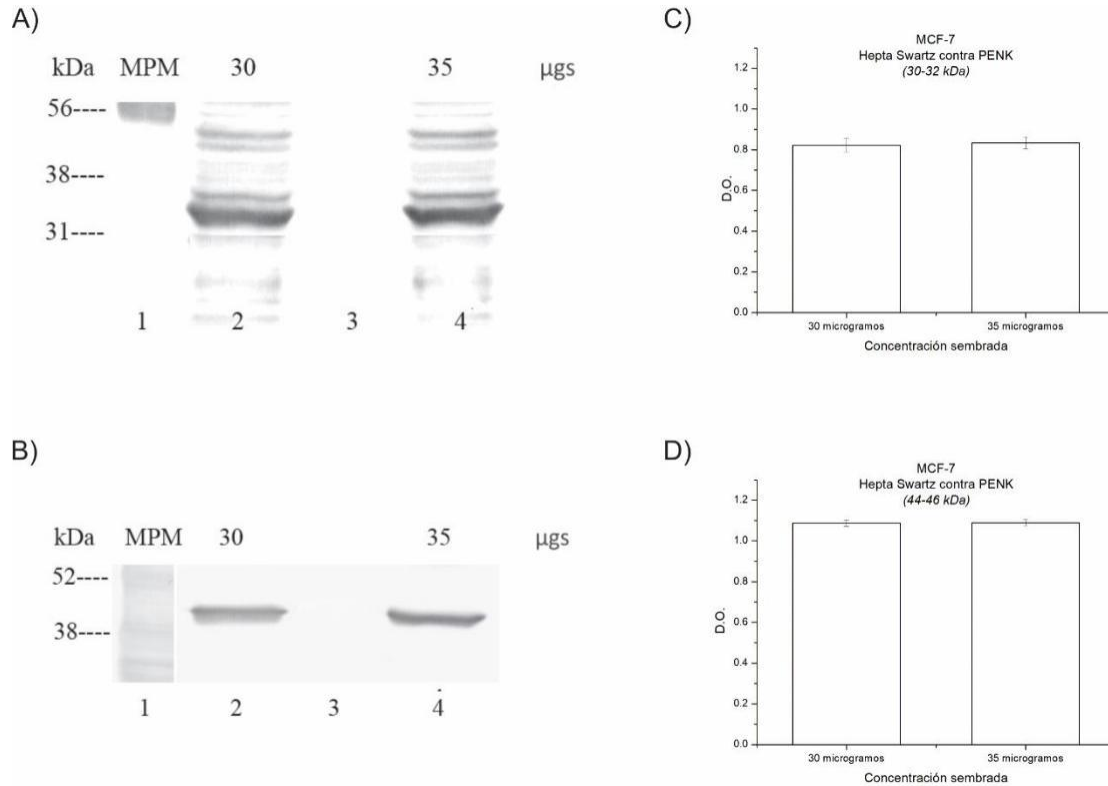


Figura 11 Expresión de PENK en células de la línea MCF-7. Detección de la proteína PENK mediante Western Blot, inmunomarcado con el anticuerpo Hepta Swartz y posteriormente revelado **(A)**. Detección de Actina como control mediante Western Blot Inmunomarcado con el anticuerpo Anti-Actina y posteriormente revelado **(B)**. Comparación de la cantidad de PENK de peso molecular 32-34 kDa en las condiciones sembradas tras el análisis densitométrico normalizadas contra actina **(C)**. Comparación de la cantidad de PENK de peso molecular de 44-46 kDa en las condiciones sembradas tras el análisis densitométrico normalizadas contra actina **(D)**.

8.2.2. PENK en células MDA-MB-231

En las células pertenecientes a la línea MDA-MB-231 de la misma manera se detectó la presencia de PENK en dobletes de bandas con pesos moleculares de 32-34 y 44-46 kDa mediante el uso de los Anticuerpos DAM5 y Hepta (Figuras 12A y Figura 13A, respectivamente). Tras un análisis densitométrico no se detectaron diferencias significativas en la cantidad de PENK entre las concentraciones sembradas (Figuras 12C y D y Figura 13C y D, respectivamente).

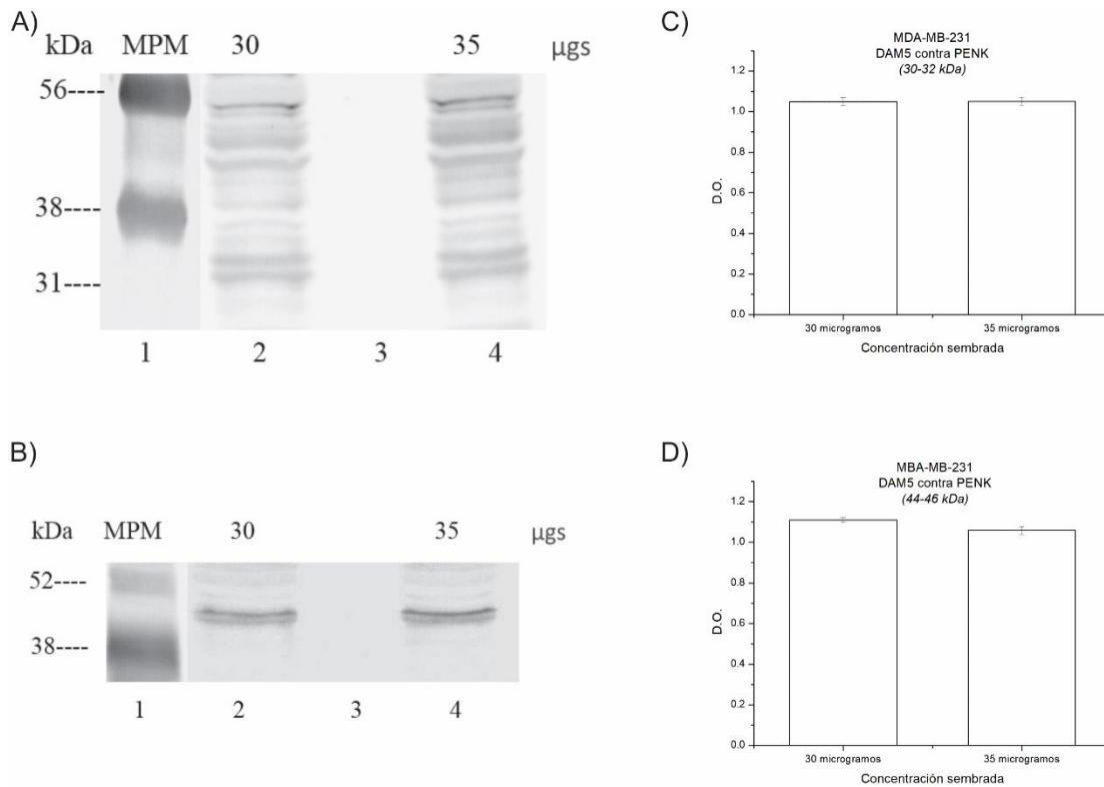


Figura 12 **Expresión de PENK en células de la línea MDA-MB-231.** Detección de la proteína PENK mediante Western Blot, inmunomarcado con el anticuerpo DAM5 y posteriormente revelado **(A)**. Detección de Actina como control mediante Western Blot Inmuno marcado con el anticuerpo Anti-Actina y posteriormente revelado **(B)**. Comparación de la cantidad de PENK de peso molecular de 32-34 kDa en las condiciones sembradas tras el análisis densitométrico normalizadas contra actina **(C)**. Comparación de la cantidad de PENK de peso molecular de 44-46 kDa en las condiciones sembradas tras el análisis densitométrico normalizadas contra actina **(D)**.

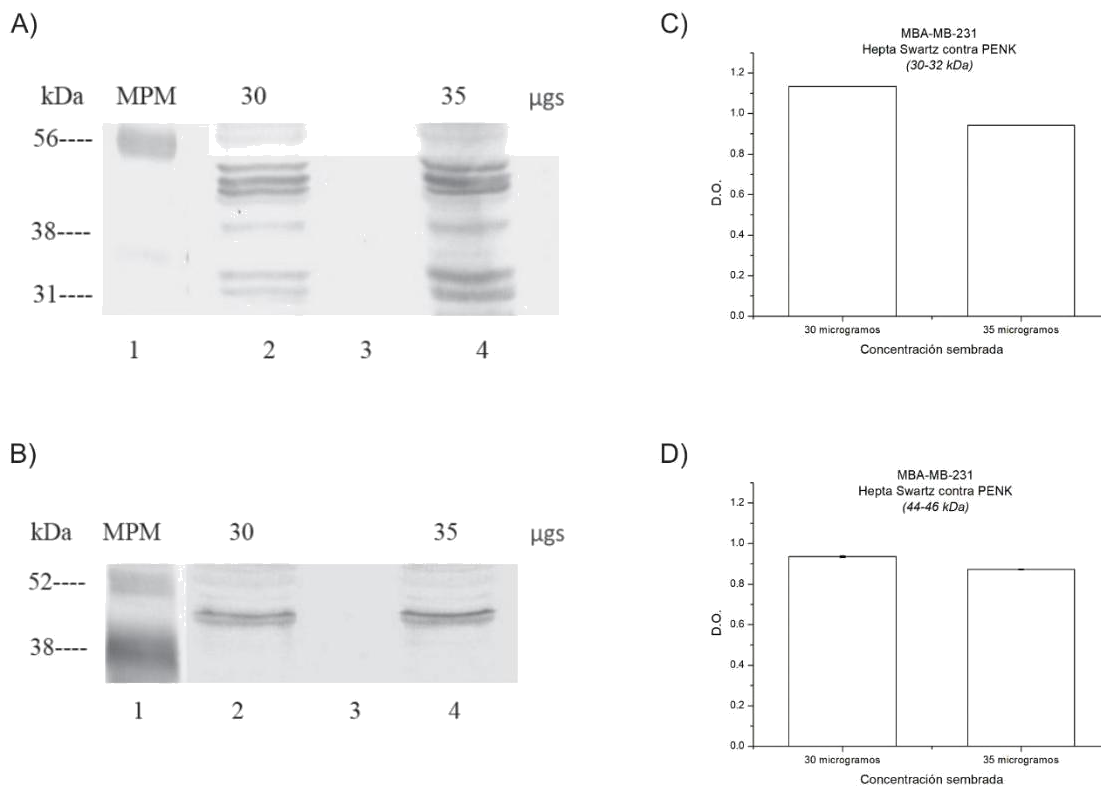


Figura 13 *Expresión de PENK en células de la línea MDA-MB-231. Detección de la proteína PENK mediante Western Blot, inmunomarcado con el anticuerpo Hepta Swartz y posteriormente revelado (A). Detección de Actina como control mediante Western Blot Inmuno marcado con el anticuerpo Anti-Actina y posteriormente revelado (B). Comparación de la cantidad de PENK de peso molecular de 32-34 kDa en las condiciones sembradas tras el análisis densitométrico normalizadas contra actina (C). Comparación de la cantidad de PENK de peso molecular de 44-46 kDa en las condiciones sembradas tras el análisis densitométrico normalizadas contra actina (D).*

8.3. Aislamientos de núcleos

El fraccionamiento celular como ya ha sido mencionado antes en el apartado de metodología resulta de gran apoyo para el estudio de moléculas en un compartimiento específico, en este caso el núcleo. Para poder obtener resultados de manera fidedigna primero se realizó el aprendizaje de la técnica, hasta obtener núcleos viables para los protocolos experimentales siguientes.

Para validar el uso de la fracción nuclear primero se verificaba su morfología mediante visualización en un microscopio de contraste de fases. En dicha preparación los núcleos obtenidos debían ser completamente redondos, con el centro opaco y los bordes refractantes sin protuberancias en la membrana nuclear. Además, tras el último proceso de separación a través del gradiente de sucrosa, el medio en el cual se encontraban contenidos no debía

presentar restos celulares. La fracción de núcleos que no cumpliera con estas características o que presentara roturas de la envoltura nuclear fue descartada. En la Figura 14 se muestra una representación de los núcleos viables luego del fraccionamiento subcelular.

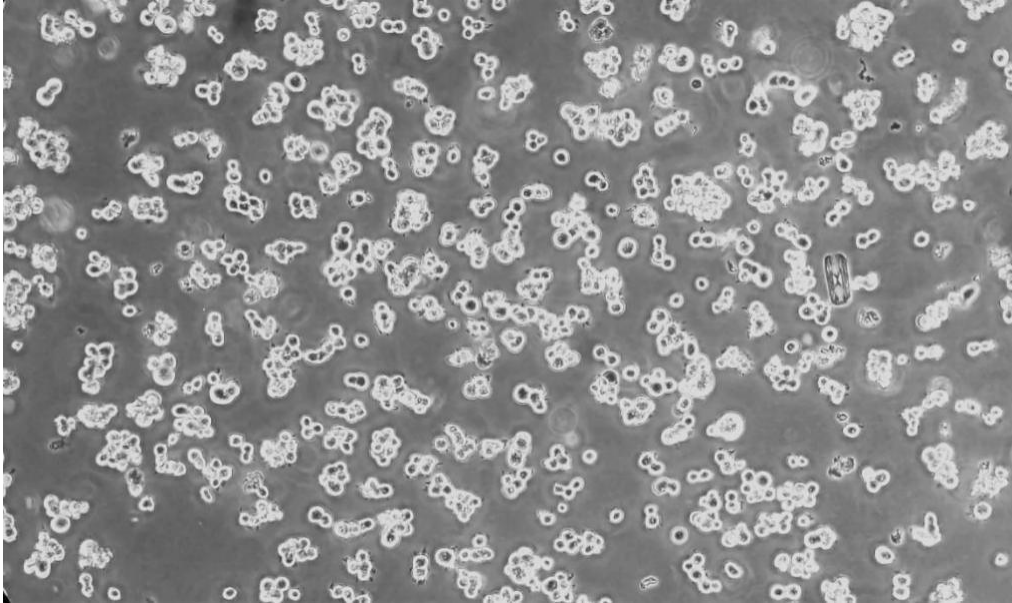


Figura 14. Morfología de núcleos viables post-fraccionamiento subcelular

8.4. Expresión de PENK en núcleos aislados de células cancerígenas

Tras la comprobación de la presencia de PENK en los lisados celulares, los cuales contenían las proteínas presentes en la célula como organismo, decidimos aislar los núcleos celulares y extraer las proteínas totales presentes en este mismo para comprobar la presencia de PENK dentro del núcleo específicamente. Además, se utilizó solo del anticuerpo Hepta Schwartz por su detección eficiente y revelado más limpio. No se utilizaron como control de estas muestras las correspondientes expresiones de la actina, ya que, si bien se ha demostrado la presencia de actina en el núcleo, ésta presenta diferentes conformaciones que no son reconocidas por nuestro anticuerpo, el cual no nos permitió detectar esta proteína dentro del núcleo (Pederson y Aebi, 2003, Bettinger et al, 2004).

8.4.1. PENK en núcleos MCF-7

En los núcleos sin transfectar pertenecientes a la línea MCF-7 se detectó la presencia de PENK en el doblete de bandas con peso molecular de 32-34 kDa mediante el uso del Anticuerpo Hepta Swartz. Sin embargo, para los núcleos transfectados con el siRNA2 no se detecta la presencia de PENK (Figura 15A, comparando carril 2 vs 3), lo cual es atribuible a la alta eficiencia del siRNA2 para silenciar la expresión de PENK a diferentes niveles por lo cual PENK sale del rango de detección de la técnica de Western Blot.

Posteriormente se realizó un análisis densitométrico de las bandas y esto fue luego sometido a un examen estadístico para validar los resultados mediante de pruebas de t de Student a los valores obtenidos por el análisis densitométrico entre los núcleos sin transfectar y los transfectados con el siRNA2. La comparativa entre los núcleos sin transfectar y transfectados muestra una diferencia significativa ($p \leq 0.001$), lo cual valida la eficiencia del siRNA2 utilizado. (Figura 15B).

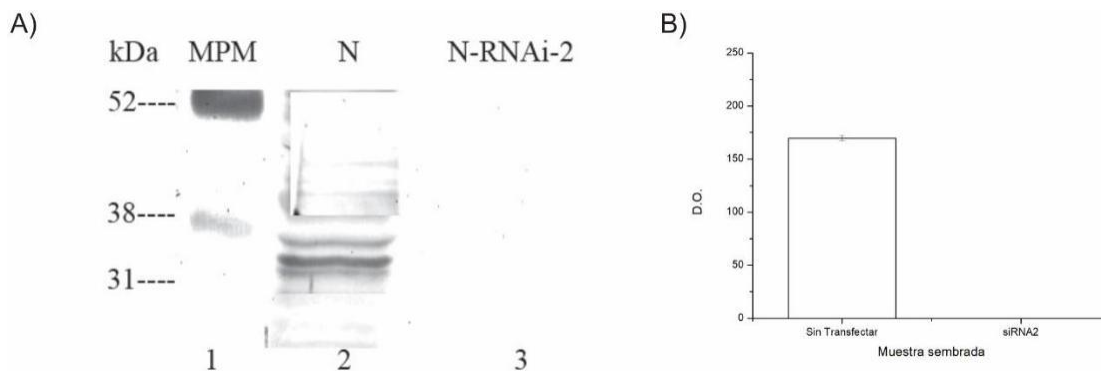


Figura 15 **Expresión de PENK en núcleos de la línea MCF-7.** Detección de la proteína PENK mediante Western Blot, inmunomarcado con el anticuerpo Hepta Swartz y posteriormente revelado (A). Comparación entre la cantidad relativa de PENK de peso molecular de 32-34 kDa en las condiciones sembradas tras el análisis densitométrico (B).

8.4.2. PENK en núcleos MDA-MB-231

En los núcleos sin transfectar pertenecientes a la línea núcleos MDA-MB-231, al igual que con MCF-7, se detectó la presencia de PENK como el doblete de bandas con peso molecular de 32-34 kDa mediante el uso del Anticuerpo Hepta Swartz. (Figura 16A; comparando carriles 2 vs 3).

Posteriormente se realizó un análisis densitométrico de las bandas y esto fue luego sometido a un examen estadístico para validar los resultados mediante la prueba de t de Student a los valores obtenidos por el análisis densitométrico entre los núcleos sin transfectar y los transfectados con el siRNA2. A pesar de la detección de PENK en los núcleos transfectados de las células, la reducción de la expresión de nuestra proteína de interés es muy significativa, alcanzando una disminución del 99%. Esto nuevamente comprueba la eficiencia del siRNA2 utilizado. La comparativa entre los núcleos sin transfectar y transfectados muestra una diferencia significativa ($p \leq 0.001$ validando estadísticamente los resultados. (Figura 16B).

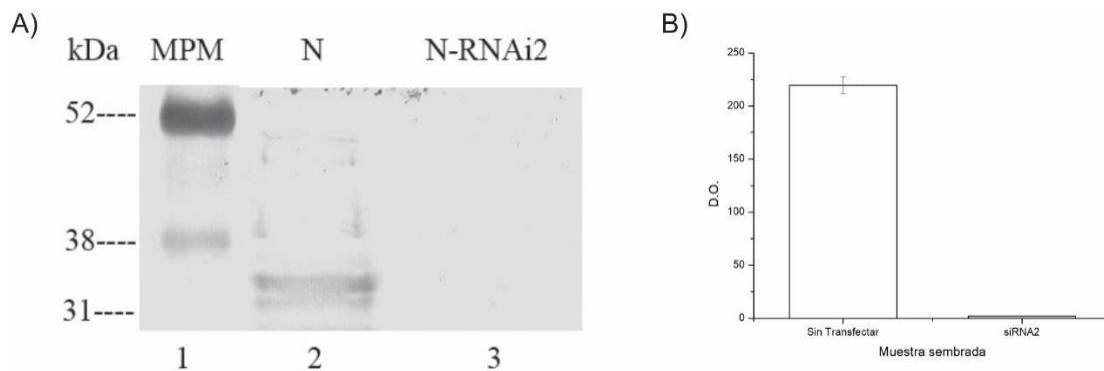


Figura 16 *Expresión de PENK en los núcleos aislados de la línea MDA-MB-231. Detección de la proteína PENK mediante Western Blot, inmunomarcado con el anticuerpo Hepta Swartz y posteriormente revelado (A). Comparación entre la cantidad relativa de PENK con peso molecular de 32-34 kDa en las condiciones sembradas tras el análisis densitométrico (B).*

8.5. Ensayo de la proliferación celular por MTT

El propósito de la realización del ensayo de MTT es determinar si existe una relación entre PENK nuclear y la proliferación celular, esto por medio del siRNA2 para silenciar la expresión de PENK específicamente. Tras la realización de las pruebas de Western Blot se determinó la alta eficiencia del siRNA 2 para el silenciamiento de PENK, por lo cual fue utilizado para la transfección de las líneas celulares cancerígenas trabajadas en este proyecto. Se realizaron dos experimentos, el primero para MCF-7 y posteriormente para MDA-MB-231, ambos elaborados por sextuplicado en experimentos independientes y representativos, los datos obtenidos fueron procesados y analizados.

Para la línea celular MCF-7 se puede observar una disminución en la proliferación tras la transfección con el plásmido que codifica para el RNAi 2, el cual es específico para proencefalina, donde se demuestra una disminución de la capacidad proliferativa de un 45% comparado con las condiciones nativa (sin transfectar) y transfectadas con el plásmido vacío (Figura 17).

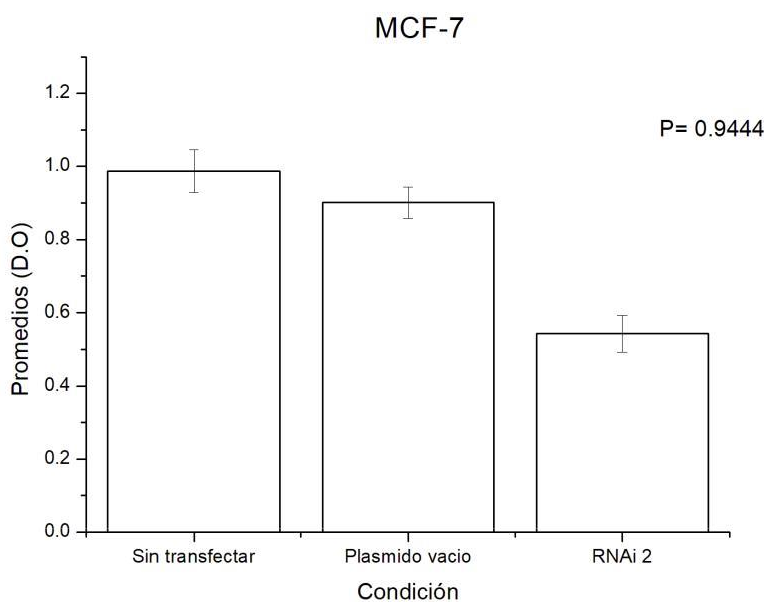


Figura 17 Resultados de la medición de la proliferación celular. Las barras representan el promedio \pm la desviación estándar de cultivos realizados por sextuplicado. Para obtener las densidades ópticas se leyeron las placas por espectrofotometría a $\lambda=570$ nm para las células MCF-7 en las 3 condiciones experimentales

Mientras que para las células MDA-MB-231, la presencia del RNAi2 indujo una disminución en la proliferación del 59%, con respecto a las condiciones controles: condición nativa y con el plásmido vacío (Figura 18).

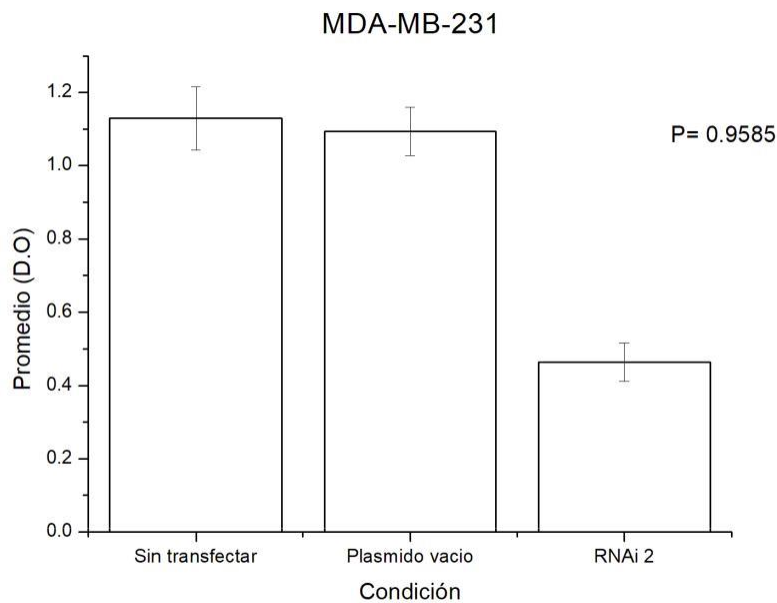


Figura 18 Resultados de la medición de la proliferación celular. Las barras representan el promedio \pm la desviación estándar de cultivos realizados por sextuplicado. Para obtener las densidades ópticas se leyeron las placas por espectrofotometría a $\lambda=570$ nm para las células MDA-MB-231 en las 3 condiciones experimentales.

En ambos casos (Figura 17 y 18) y para las condiciones mencionadas anteriormente, los cambios observados demuestran tras un análisis de Varianza (ANOVA) que son altamente significativos en ambos experimentos, tanto para MCF-7 con una $p < 0.0001$, así como para MDA-MB-231 con una $p < 0.0001$.

De forma interesante, a pesar de que la proteína PENK no se encuentra presente en las células cancerígenas tras la transfección con el siRNA 2, el cual demostró ser altamente eficiente al inhibir la expresión de la proteína en los experimentos de western blot, las células no pierden completamente su capacidad proliferativa, lo cual nos habla de mecanismos subyacentes o compensatorios que controlan de igual forma este proceso.

8.6. Análisis informático

El análisis informático se realizó en dos etapas, la primera etapa fue realizada con la secuencia completa de 267 aminoácidos pertenecientes a PENK Humana y posteriormente se efectuó un análisis omitiendo los 24 aminoácidos iniciales del extremo N-terminal pertenecientes al péptido señal.

```
MARFLTLCTWLLLLGPGLLATVRAECSQDCATCSYRLVRPADINFLACVMECEGKLP  
SLKIWETCKELLQLSKPELPQDGTSTLRENSKPEESHLLAKRYGGFMKRYGGFMKKMDELYPMEPEEEANGSEILAKRYGGFMKK  
DAEEDDSLANSDDLKELLETDGDNRERSHHQDGSNDEEVSKRYGGFMRGLKRSPQLEDEAKELQKRYGGF  
MRRVGRPEWMDYQKRYGGFLKRFAEALPSDEEGESYSKEVPEMEKRYGGFMRF
```

Figura 19 *Secuencia de aminoácidos completa de PENK en formato FASTA, se denota en cajas el péptido señal.*

Se realizó primero un análisis de la secuencia completa de PENK en busca de la Secuencia-Señal para entrada a la vía secretoria y de la Señal de localización al núcleo (NLS), iniciando con el servidor Signal P 4.1. Los resultados arrojaron la presencia de una secuencia señal con un sitio de corte entre los aminoácidos 20 y 21 de la secuencia primaria de aminoácidos de PENK. Sin embargo, los aminoácidos en las posiciones 20 a 25 muestran una gran puntuación para ser el sitio de corte de una secuencia señal, siendo los residuos 21 y 25 aquellos con una puntuación más alta. De la misma forma el servidor PSORT II encuentra un posible sitio de corte entre el aminoácido número 24 y 25 de PENK, proponiendo un péptido señal presente en la región perteneciente a los aminoácidos del 1 al 24. Sin embargo, ninguno de los dos servidores fue capaz de encontrar la NLSs en la cadena de PENK. (Figura 19)

Posteriormente esta misma secuencia de la Figura 1 fue analizada por TargetP 1.1, el cual determinó un sitio de corte para un péptido señal en el aminoácido 24, además de una localización correspondiente a la vía secretoria. Así mismo Predict Protein Open predijo para PENK humana su localización principalmente secretada. Y de la misma manera PSORT II por medio de su subprograma *k-Nearest Neighbors Classifier* predijo una mayor posibilidad de encontrar a PENK en el medio extracelular (66.7%). Sin embargo, también predijo la posibilidad de encontrar PENK en la mitocondria (22.2%) y **el núcleo (11.1%)**. Aunado a esto, otro de los subprogramas denominado *NCCN* (Reinhardt's method for

Cytoplasmic/Nuclear discrimination), determinó la presencia de **PENK en el núcleo con un índice de confiabilidad de 55.5.**

El péptido señal es conocido por ser una secuencia de aminoácidos que dirige las proteínas a través de la vía secretoria, es por eso luego se llevó a cabo una omisión de los primeros 24 aminoácidos pertenecientes al péptido señal de PENK, (determinados anteriormente con las herramientas informáticas), para representar a la proteína en su estado maduro (Figura 20) y poder determinar su destino.

```
ECSQDCATCSYRLVRPADINFLACVMECEGKLP SLKIWETCKELLQLSKPELPQDGTSTLRE
NSKPEESH L
LAKRYGGFMKRYGGFMKKMDELYPMEPEEEANGSEILAKRYGGFMKKDAEEDDSLANSDDL
KELLE TGDN
RERSHHQDGS DNEEEVSKRYGGFMRGLKRSPQLEDEAKELQKRYGGFMRRVGRPEWWM DYQK
RYGGFLKRF AEALPSDEEGESYSKEVPEMEKRYGGFMRF
```

Figura 20 Secuencia de aminoácidos de PENK sin el péptido señal (Proteína madura) en formato FASTA

SignalP 4.1 no fue capaz de determinar un péptido señal o una NLS dentro de la secuencia de PENK madura (Figura 20). Por otra parte, el servidor TargetP 1.1 no fue capaz de determinar ningún sitio de corte para el péptido señal o la localización de subcelular de PENK en su forma madura. Predict Protein Open por su parte determinó, igual que en el caso anterior, que el destino de PENK en su forma madura es el de ser secretada. (Figura 20)

PSORT II, mediante un subprograma *k-Nearest Neighbors Classifier* predijo una mayor posibilidad de encontrar a **PENK madura en el núcleo (56.5%)**, además del citoplasma (17.4%), mitocondria (17.4%) y peroxisomas (8.7%). Además, el subprograma, *NNCN* (Reinhardt's method for Cytoplasmic/Nuclear discrimination), determinó la presencia de **PENK madura en el núcleo con un índice de confiabilidad de 76.7.**

ECSQDCATCSYRLVRPADINFLACVMECEGKLP SLKIWETCKELLQLSKPELPQDGTSTLRENSKPEESHLLAKRYGGFMKRYGGFMKKMDELYPMEPEEEANGSEILAKRYGGFMKKDAEEDDSLANSDDLKELLETTGDNRRERSHHQDGS DN EEEVSKRYGGFM RGLKRSPQLEDEAKELQKRYGGFMRRVGRPEWWM DYQKRYGGFLKRFAEALPSDEEGESYSKEVPEMEKRYGGFMRF

Figura 21 *Secuencia de aminoácidos de PENK completa señalando los residuos pertenecientes a los NLS predichos por cNLS Mapper (En rojo), se denotan en cajas los sitios Dibasicos donde se lleva a cabo el procesamiento catalítico.*

Posterior a las pruebas realizadas por PSORT II, que demostraban una mayor probabilidad de encontrar PENK dentro del núcleo celular, e llevó a cabo un análisis por medio de cNLS Mapper, software con la función de evaluar más precisamente la presencia de NLS en las estructuras proteicas, calibrando la detección para proteína tanto en el citoplasma como en el núcleo. cNLS Mapper determinó la presencia de dos NLSs, el primero con una secuencia ⁸²RYGGFMKKMDELYPMEPEEEANGSEILAKRYGG con una puntuación de 5.4, y el segundo con la secuencia ¹⁶⁷RGLKRSPQLEDEAKELQKRYGGFMRRVGRPE con una puntuación de 5 (Figura 21). Los resultados al llevar a cabo el análisis dentro de ProPENK fueron los mismos. (Figura 22)

MARFLTLC TWLLLL GPGLLATVRAECSQDCATCSYRLVRPADINFLACVMECEGKLP SLKIWETCKELLQLSKPELPQDGTSTLRENSKPEESHLLAKRYGGFMKRYGGFMKKMDELYPMEPEEEANGSEILAKRYGGFMKDAEEDDSLANSDDLKELLETTGDNRRERSHHQDGS DN EEEVSKRYGGFM RGLKRSPQLEDEAKELQKRYGGFMRRVGRPEWWM DYQKRYGGFLKRFAEALPSDEEGESYSKEVPEMEKRYGGFMRF

Figura 22 *Secuencia de aminoácidos de PENK completa señalando los residuos pertenecientes a los NLS predichos por cNLS Mapper (En rojo), se denotan en cajas el péptido señal y los sitios Dibasicos donde se lleva a cabo el procesamiento catalítico.*

Determinada la presencia de las secuencias NLSs dentro de la secuencia primaria procedimos a analizar las estructuras secundarias de PrePENK y PENK madura en busca de características que las diferenciaron y que pudieran influir en el reconocimiento de las NLSs.

Por lo tanto, utilizando la herramienta DISULFIND, perteneciente a Predict Protein se evaluó la presencia de puentes disulfuro en las secuencias antes mencionadas. Para pre-PENK y a pesar de contener varios residuos de cisteínas en su estructura, los algoritmos de la herramienta DISULFIND no fueron capaces de identificar algún enlace de este tipo. Mientras que para PENK madura se determinaron dos puentes disulfuro, el primero entre los residuos en posiciones 2 y 24 y un segundo enlace entre los residuos 28 y 41 (Figura 25).

ECSQDCATCSYRLVVPADINFLA**C**VMCEGKLP**SLKI**WETC**K**ELLQLSKPELPQDGTSTLRENSKPEESH
LAKRYGGFMK**RYGGFMKKMDELYPMEPEEEANGSEILAKRYGGFMKKDAEEDDSLANSDDLKELLE**TGDN
RERSHHQDGS**DNEEEVSKRYGGFMRGLKRSPQLEDEAKELQKRYGGFMRRVGRPE**WMDYQKRYGGFLKRF
AEALPSDEEGESYSKEVPEMEKRYGGFMR**F**

Figura 25 **Secuencia de aminoácidos de PENK Madura mostrando las puentes disulfuro**, en azul se muestran los residuos de cisteínas participantes y subrayado se muestra la distancia entre las mismas, en rojo se denotan las NLS.

9. Discusión

La Proencefalina es un precursor de péptidos opioides cuya función principal es almacenar encefalinas las cuales sirven como moléculas de señalización celular principalmente en el sistema nervioso central (Blackader 1993). Sin embargo, la expresión de PENK se ha descrito en otros tejidos, tales como: cardiaco, muscular, glandulares, renal, intestinal, entre otros, principalmente durante el desarrollo embrionario lo cual sirve como indicador de que la función de PENK es mucho más compleja que la de solo una molécula precursora de neurotransmisor o neuro modulator. (Keshet et al 1989, Denning et al 2008).

Para diversas moléculas, al igual que PENK, se ha determinado una distinta función de la cual fue descrita en un inicio, casos como la actina o la cromogranina B son ejemplo de ello, efecto que parece estar ligado a cambios en la estructura de la molécula, así como de su localización subcelular (Bettinger et al 2004, Pederson y Aebi 2003, Yoo et al 2002). De la misma manera, PENK madura al hallarse en tejidos embrionarios los cuales se encuentran en un estado de gran proliferación y requieren señales para su diferenciación, puede tener otra función diferente a la de ser solamente una molécula precursora de péptidos opioides. Es por ello que hemos decidido estudiar a PENK dentro de líneas celulares de cáncer de mama, MCF-7 y MDA-MB-231, las cuales se encuentran desdiferenciadas, son cancerosas y tienen una alta tasa de proliferación (Soule et al 1973, Cailleau et al 1974). De la misma manera decidimos enfocar nuestra investigación a la presencia de PENK en el núcleo, el cual contiene el nucléolo, subcompartimento que se ha demostrado el mediador de la proliferación celular (Tsai y McKay 2002). Finalmente, decidimos analizar la estructura de PENK en busca de elementos que puedan conducir la molécula hacia el núcleo, como los que ya han sido demostrados en otros precursores opioides. (Kononenko et al 2017)

La presencia de PENK en células cancerígenas ha sido anteriormente descrita. Con un peso molecular de 46 kDa fue encontrada en las líneas celulares de cáncer de mama MCF-7, ZR-75-1 y SC115 a través de Western Blot (Brar y Lowry 1999). En células de tumores pituitarios, se detectó PENK correspondiente a los pesos moleculares de 44, 32-30, 27 y 17 kDa por medio de radioinmunoensayo y western blot (Vindrola et al 1998).

Por otra parte, se demostró mediante Western blot la presencia de PENK con un peso molecular aproximado de 30 kDa en células de diversas líneas, incluyendo biopsias de piel,

fibroblastos y células epidermales normales humanas, y del mismo modo, la presencia de esta proteína también fue evidenciada en queratinocitos, melanocitos y células de melanoma (Slominski et al 2011). En este trabajo se reporta otra forma de PENK con un peso molecular de 40 kDa, el cual da indicio de los diversos procesamientos post-transcripcionales que puede sufrir PENK dependiendo del tejido donde se exprese (Slominski et al 2011).

En correlación con estos datos reportados en la literatura, y en el presente trabajo de Tesis encontramos la presencia de PENK en la línea celular MCF-7, corroborando la publicación de Brar y Lowry de 1999. Además, se detectó su presencia en la línea celular MDA-MB-231, con dobletes de bandas pertenecientes a los pesos moleculares de 32-34 y 44-46 kDa en ambos casos, y mediante los experimentos del Western blot (Figuras 10A, 11A, 12A y 13A).

Asimismo, las bandas de mayor peso molecular en los dobletes, correspondientes a los pesos de 34 y 46 kDa representan las formas glicosiladas de las formas de 32 y 44 kDa como ya ha sido previamente demostrado en la literatura por Lindberg y Shaw en 1992, Vindrola et al 1998, Brar y Lowry ,1999).

Determinada la presencia de PENK en las líneas celulares estudiadas, procedimos a preparar a comprobar la presencia de esta molécula dentro del núcleo. Tras el aislamiento de los núcleos provenientes de las líneas celulares MCF-7 y MDA-MB-231 y la realización del Western blot con posterior análisis de datos, pudimos detectar sólo la presencia de PENK con un peso molecular de 32-34 kDa dentro del núcleo en ambas líneas celulares (Fig 15A y 16A, respectivamente). Esto en concordancia con los reportes de la presencia de PENK en núcleos celulares de fibroblastos de las líneas Swiss 3T3, MRC-5, C12C12 y COS, detectada a través de inmunocitoquímica, utilizando 15 anticuerpos dirigidos contra varias de las regiones de PENK, con pesos moleculares correspondientes a 34.5, 33 y 31.5 KDa las cuales corresponderían a las formas que nosotros hemos detectado (Böttger y Spruce 1995). Asimismo, en las líneas celulares de fibroblastos Swiss 3T3, MRC-5, C12C12 y COS, mencionadas ya anteriormente, se observó mediante inmunofluorescencia no solo la presencia de PENK en el núcleo, sino también diversos patrones de fluorescencia dentro de éste, los cuales mantenían relación con el estado de proliferación y diferenciación celular. Tras distintas pruebas con diversos agentes los investigadores lograban desvanecer los patrones de fluorescencia, lo cual indicaba que la proteína se encuentra relacionada a diversas

moléculas dentro de la sub-arquitectura del núcleo, mayoritariamente a un compartimiento extraíble mediante sales (Böttger y Spruce 1995).

Además de ello, también se ha descrito la presencia de PENK en el núcleo de células de tumores pituitarios, detectando por medio de radio inmunoensayo y wester blot las formas con pesos moleculares de 30-32 y 17 kDa dentro del núcleo celular reforzando nuestras observaciones (Vindrola et al 1998).

Además, en este trabajo de Tesis el doblete de PENK de 44-46 kDa no está presente en los núcleos aislados de las células de cáncer de mama: MCF-7 y MDA-MB-231. Similares resultados fueron encontrados por Vindrola et al en 1998, donde ellos demuestran que el doblete de 44-46 kDa tiene una localización citoplasmática y no nuclear.

Una vez determinada la presencia de PENK dentro del núcleo celular de ambas líneas celulares, el siguiente paso era determinar su funcionalidad, es por ello que se procedieron a realizar pruebas de proliferación mediante MTT, no sin antes obtener células de las líneas celulares MCF-7 y MDA-MB-231 transfectadas de manera transitoria con el siRNA 2 para de esta manera reducir la expresión de PENK de manera específica. Además, se utilizó el plásmido vacío como control, y con ello poder establecer una relación entre la presencia de PENK en el núcleo y el perfil de proliferación celular. La eficiencia del siRNA 2 fue tan alta que la cantidad de PENK detectada mediante Western blot fue mínima o inferior al límite de detección que se alcanza con esta técnica (Figuras 15A y 16A), validando las pruebas de proliferación mediante MTT.

Para la línea celular MCF-7 observamos una disminución en la capacidad proliferativa de un 45% comparado con las condiciones nativas y con el plásmido vacío (Figura 15B), mientras que para las células MDA-MB-231, la presencia del RNAi2 indujo una disminución en la proliferación del 59%, con respecto a las condiciones nativa y plásmido vacío (Figura 16B). A pesar de que la expresión de PENK en los núcleos aislados de las células transfectadas con RNAi2 fue no detectable, tanto las células MCF-7 como MDA-MB-231 continuaban proliferando significativamente a una menor capacidad que las células controles sin el RNAi2, lo cual manifiesta la presencia de otros mecanismos que compensan la pérdida de PENK o que regulan la supervivencia y proliferación por otras vías.

Resultados similares a los que nosotros reportamos se obtuvieron tras la transfección estable y transitoria con plásmidos antisentido para inhibir la expresión de PENK en cultivos de fibroblastos, los cuales disminuían su tasa de proliferación y, tras un análisis más a fondo se dieron cuenta que tras sincronizar los cultivos, las células transfectadas con los plásmidos antisentido tenían más posibilidades de encontrarse en la Fase G1 del ciclo celular, mientras las células nativas o control ya habían superado dicho punto (Weisinger et al 1995). Un efecto similar fue descrito en células T humanas (Kamphuis et al 1998).

Dicho efecto se puede explicar por medio del efecto regulatorio que PENK ejerce sobre la expresión de ciclina D1, cuando se sobreexpresa la proteína PENK nuclear, se presenta de igual manera una sobreexpresión de la ciclina D1, tanto de su mRNA como del producto proteico. Esto conduce a un aumento en los niveles de ciclina D1 nuclear o a un incremento en su tiempo de vida media, dando como resultado el acortamiento o aceleración de la fase G1 del ciclo celular; generando así un ciclo celular más corto que promueve una mayor proliferación debido a un menor tiempo de duplicación (Rodríguez Linares, 2006).

A pesar de ello, se debe tener la consideración que la maquinaria enzimática necesaria para el procesamiento catalítico de PENK a sus diversos subproductos ha sido demostrada en células de las líneas MCF-7 y ZR-75-1, ambas de cáncer de mama, lo cual puede conducir a la liberación de metabolitos de PENK activos al medio extracelular (Brar y Lowry, 1999). Estos metabolitos cuentan con la capacidad de estimular a los receptores blancos presentes en la membrana celular, también demostrados en estas líneas celulares (Maneckjee et al 1990). Sin embargo, contrario a los efectos proliferativos que podría tener la estimulación de estos receptores en otros tejidos, el incremento en la proliferación aquí descrito no puede ser atribuible a la unión de PENK o alguno de sus sub-productos con un receptor, puesto que se ha demostrado que el estímulo de las células cancerígenas de las líneas MCF-7, MDA-MB-231 y T47D con agonistas específicos de péptidos opioides sobre sus diversos receptores ha resultado en una inhibición de la proliferación, esto mediante la potenciación de la expresión del eje PTEN/p53, moléculas que generan señales con efecto inhibitorio sobre la vía de supervivencia celular PI3K/AKT lo cual desencadena la iniciación de la apoptosis en células (Kharmate et al 2013). También se ha sugerido una asociación de PENK nuclear con la

proteína p53, lo cual parece mediar el desencadenamiento de la apoptosis (McTavish et al 2007).

No obstante, la asociación de PENK con p53 o la regulación de la expresión de ciclina D1 requiere de la presencia de PENK dentro del núcleo, mecanismo que aún no ha sido dilucidado. Un motivo estructural que dirija el destino de PENK hacia el núcleo (Secuencia de localización nuclear, NLS) como el presente en la Cromogranina B, o una posible asociación con otra proteína que contenga dentro de su estructura una secuencia NLS y actúe como chaperona, como en el caso de la insulina y su receptor son las hipótesis más aceptadas (Yoo et al 2002, Arnoys y Wang 2007). Es por ello por lo que decidimos realizar un análisis informático de la secuencia proteica de PENK, tanto en su forma precursora (prePENK) como en la madura para intentar dilucidar el mecanismo de como PENK encuentra su destino nuclear.

Se realizó primero un análisis de la secuencia de prePENK en busca de la Secuencia-Señal para entrada a la vía secretoria y NLS, corroborando la presencia de la secuencia señal presente en los primeros 24 aminoácidos del extremo N-Terminal por medio de Signal P y PSORT II (Figura 19). No obstante, no se encontró ninguna secuencia NLS. Posteriormente mediante Softwares dedicados a la predicción de la localización subcelular de las proteínas se determinó la probabilidad de encontrar prePENK en el núcleo de 11.1%. No obstante, la probabilidad de encontrar prePENK en el espacio extracelular sigue siendo mayor; resultados similares fueron arrojados por TargetP y Predict Protein Open

Los péptidos señales son motivos de aminoácidos con un orden particular cuya función es determinar el destino de las proteínas. PENK, como quedó demostrado anteriormente presenta el péptido señal que guía a la proteína a través de la vía secretoria para su liberación al espacio extracelular. Sin embargo, anteriormente se ha demostrado que la remoción de la secuencia señal es suficiente para cambiar el patrón de expresión de PENK de citoplasmático a citoplasmático y nuclear; dicho efecto puede ser ocasionado de manera fisiológica por cambios post-transcripcionales como diferentes sitios de inicio de la traducción o la generación de diferentes mRNA de la proteína (Böttger y Spruce 1995, McTavish et al 2007). Es por ello por lo que decidimos repetir el análisis informático, esta vez eliminando los 24 residuos de aminoácidos de la secuencia para simular la proteína PENK en su forma madura.

Resulta interesante que PENK madura mostró un aumento en la probabilidad de encontrarse en el núcleo al determinarse un 56.5% tras su introducción en Psort II; los demás programas no fueron capaces de determinar su localización subcelular o mantuvieron su resultado. Es por esto por lo que decidimos llevar a cabo un análisis más extensivo de la estructura de PENK.

PENK posee gran número de residuos básicos, por lo cual a pesar de tener resultados negativos con los programas previos decidimos seguir la búsqueda de NLS, pues previamente, dentro de la secuencia de Prodinomorfina (PDYN), anteriormente llamada Proencefalina B, se demostró no sólo la existencia de la molécula dentro del núcleo, sino también la presencia de un NLS bipartido en el extremo amino-terminal, el cual se encuentra sobrelapado con la secuencia de alf- Neoendorfina (Kononenko et al 2017). A causa de esto, decidimos realizar un análisis dentro de la secuencia de PENK en ambas secuencias: PrePENK y PENK Madura, con el programa cNLS Mapper. Dicho programa a diferencia de los anteriores utilizados no es un clasificador de NLSs, sino un determinador de NLSs por medio de algoritmos, el cual nos reveló la posible presencia de dos secuencias de localización nucleares del tipo bipartido localizadas tanto en la proteína precursora como en la madura

con las secuencias RYGGFMKKMDELYPMEPEEEANGSEILAKRYGG y RGLKRSPQLEDEAKELQKRYGGFMRRVGRPE (Figuras 21 y22).

Los NLS encontrados vislumbran que PENK es llevada al núcleo por medio de su asociación con las importinas, proteínas cuya función es el transporte de moléculas a través de los complejos de poros nucleares para su destino nuclear (Christophe et al 2000). El NLS interacciona con los sitios de reconocimiento mayor y menor que posee la importina, los cuales poseen residuos ácidos que interactúan con sus opuestos presentes en la proteína cargo. Asimismo, se ha demostrado que existen interacciones entre los aminoácidos dispuestos entre ambos sitios del NLS bipartido y la importina, esencialmente cuando estos residuos se encuentran fosforilados (Marfori et al 2011). Por medio de espectroscopia de masas, se ha descrito un péptido, metabolito de PENK, cuyo residuo tirosina en la posición 94 de la secuencia de PENK madura se encuentra fosforilado (Gupta et al 2010). Al localizar este residuo dentro de la estructura tomando en cuenta la posición del NLS observamos que

se posiciona fuera del sitio de reconocimiento del NLS, lo cual puede ayudar a mediar la interacción con la importina (Figuras 21 y 22).

A pesar de la presencia de los NLS dentro de ambas secuencias, la probabilidad de encontrar a PENK completa en el núcleo como anteriormente se calculó, es menor. El análisis de la estructura secundaria de ambas condiciones por medio de Predict Protein Open demostró que existen cambios mayores en PENK madura tras la remoción del péptido señal, generando la presencia de puentes disulfuro (Figura 25), además de un discreto ocultamiento parcial de aminoácidos pertenecientes al NLS del extremo carboxilo terminal (Figuras 23 y 24). Estos cambios pueden modificar la estructura de la proteína y con ello activar los NLS para su interacción con las importinas. Como sabemos, las interacciones entre proteínas son mediadas por la conformación espacial de las mismas, por ende, los resultados obtenidos a partir de este último análisis proveen una explicación plausible para la interacción que existe entre las importinas y PENK madura, produciendo de esta manera la localización de PENK dentro del núcleo (Nelson y Cox 2013).

10. Conclusiones

- La PENK está presente dentro de las células de las líneas celulares MCF-7 y MDA-MB-231 con pesos moleculares de 32-34 kDa y 44-46 kDa.
- La PENK en los núcleos aislados de las células de las líneas MCF-7 y MDA-MB-231 está presente en la forma correspondiente al doblete de peso molecular 32-34kDa.
- La transfección del siRNA 2 específico para PENK reduce prácticamente en su totalidad la expresión de PENK en los núcleos aislados de ambas líneas celulares.
- La proliferación celular disminuye proporcionalmente con respecto a la inhibición de la expresión de PENK, por efecto del RNAi2 transfectado en ambas líneas celulares.
- Se encontró la presencia de dos secuencias NLS las cuales parecerían ser excelentes candidatas para dirigir el destino de PENK al núcleo, por medio de la predicción de herramientas informáticas.
- El péptido señal que guía a PENK a través de la vía secretoria ejerce una gran influencia sobre la estructura de la proteína y tras su remoción favorece cambios estructurales, como el semi ocultamiento de residuos de aminoácidos o la generación de puentes disulfuro, que activaría las secuencias de localización nuclear (NLS) y permitiría su interacción con las importinas para su importe al núcleo. Esta última conclusión es una predicción generada a través del análisis informático.

11. Bibliografía

- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Morgan, D., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2015). *Molecular biology of the cell* (Sixth Edition). Cambridge: Garland Science.
- Arnoys, E. J., & Wang, J. L. (2007). Dual localization: Proteins in extracellular and intracellular compartments. *Acta Histochemica*, 109(2), 89–110. <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2006.10.002>
- Bakalkin, G. Y., Ponomariev, D., Sarkisyan, R. A., & Terenius, L. (1991). Sequence similarity between opioid peptide precursors and DNA-binding proteins. *FEBS Letters*, 282(1), 175–177. [http://doi.org/10.1016/0014-5793\(91\)80471-E](http://doi.org/10.1016/0014-5793(91)80471-E)
- Batter, D. K., Vilijn, M. H., & Kessler, J. (1991). Cultured astrocytes release proenkephalin. *Brain Research*, 563(1–2), 28–32. [http://doi.org/10.1016/0006-8993\(91\)91510-8](http://doi.org/10.1016/0006-8993(91)91510-8)
- Beaumont, A., Metters, K. M., Rossier, J., & Hughes, J. (1985). Identification of a proenkephalin precursor in striatal tissue. *J Neurochem*, 44(3), 934–940. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3838341> <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1471-4159.1985.tb12907.x/abstract>
- Bettinger, B. T., Gilbert, D. M., & Amberg, D. C. (2004). Actin up in the nucleus. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 5(5), 410–415. <https://doi.org/10.1038/nrm1370>
- Blackader, a. D. (1993). *Opioids*. (A. Herz, H. Akil, & E. J. Simon, Eds.), *Canadian Medical Association journal* (Vol. 104 / 1). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-77460-7>
- Böttger, A., & Spruce, B. A. (1995). Proenkephalin is a nuclear protein responsive to growth arrest and differentiation signals. *Journal of Cell Biology*, 130(6), 1251–1262. <http://doi.org/10.1083/jcb.130.6.1251>
- Brar, B. K., & Lowry, P. J. (1999). The differential processing of proenkephalin A in mouse and human breast tumour cell lines. *The Journal of Endocrinology*, 161(3), 475–484.
- Breslin, M. B., Lindberg, I., Benjannet, S., Mathis, J. P., Lazure, C., & Seidah, N. G. (1993). Differential processing of proenkephalin by prohormone convertases 1(3) and 2 and furin. *Journal of Biological Chemistry*, 268(36), 27084–27093.
- Brooks, P. J., Funabashi, T., Kleopoulos, S. P., Mobbs, C. V., & Pfaff, D. W. (1993). Cell-specific expression of preproenkephalin intronic heteronuclear RNA in the rat forebrain. *Molecular Brain Research*, 19(1–2), 22–30. [http://doi.org/10.1016/0169-328X\(93\)90144-E](http://doi.org/10.1016/0169-328X(93)90144-E)

- Cailleau, R., Young, R., Olive, M., & Reeves Jr., W. J. (1974). Breast tumor cell lines from pleural effusions. *Journal of the National Cancer Institute.*, 53(3), 661–674.
- Christophe, D., Christophe-Hobertus, C., & Pichon, B. (2000). Nuclear targeting of proteins: how many different signals? *Cellular Signalling*, 12(5), 337–341. [https://doi.org/10.1016/S0898-6568\(00\)00077-2](https://doi.org/10.1016/S0898-6568(00)00077-2)
- Comb, M., Mermod, N., Hyman, S. E., Pearlberg, J., Ross, M. E., & Goodman, H. M. (1988). Proteins bound at adjacent DNA elements act synergistically to regulate human proenkephalin cAMP inducible transcription. *Embo J*, 7(12), 3793–3805.
- Denning, G. M., Ackermann, L. W., Barna, T. J., Armstrong, J. G., Stoll, L. L., Weintraub, N. L., & Dickson, E. W. (2008). Proenkephalin expression and enkephalin release are widely observed in non-neuronal tissues. *Peptides*, 29(1), 83–92. <http://doi.org/10.1016/j.peptides.2007.11.004>
- Dillen, L., Miserez, B., Claeys, M., Aunis, D., & De Potter, W. (1993). Posttranslational processing of proenkephalins and chromogranins/secretogranins. *Neurochemistry International*, 22(4), 315–352. [http://doi.org/10.1016/0197-0186\(93\)90016-X](http://doi.org/10.1016/0197-0186(93)90016-X)
- Emanuelsson, O., Nielsen, H., Brunak, S., & Von Heijne, G. (2000). Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence. *Journal of Molecular Biology*, 300(4), 1005–1016. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2000.3903>
- Flores Sánchez Andrea Isabel. Licenciatura en Biomedicina-BUAP. “Efecto de diferentes ARNi específicos sobre la expresión de proencefalina en células de neuroblastoma humano SK-N-MC. Noviembre de 2011.
- Gupta, N., Bark, S. J., Lu, W. D., Taupenot, L., OConnor, D. T., Pevzner, P., & Hook, V. (2010). Mass spectrometry-based neuropeptidomics of secretory vesicles from human adrenal medullary pheochromocytoma reveals novel peptide products of prohormone processing. *Journal of Proteome Research*, 9(10), 5065–5075. <https://doi.org/10.1021/pr100358b>
- Hook, S., Camberis, M., Prout, M., & Le Gros, G. (2003). Absence of preproenkephalin increases the threshold for T cell activation. *Journal of Neuroimmunology*, 140(1–2), 61–68. [http://doi.org/10.1016/S0165-5728\(03\)00168-1](http://doi.org/10.1016/S0165-5728(03)00168-1)
- Hook, V., & Bandeira, N. (2015). Neuropeptidomics Mass Spectrometry Reveals Signaling Networks Generated by Distinct Protease Pathways in Human Systems. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 26(12), 1970–1980. <http://doi.org/10.1007/s13361-015-1251-6>
- Hook, V., Bark, S., Gupta, N., Lortie, M., Lu, W. D., Bandeira, N., ... Pevzner, P. (2010). Neuropeptidomic components generated by proteomic functions in secretory vesicles

for cell-cell communication. *Aaps J*, 12(4), 635–645. <http://doi.org/10.1208/s12248-010-9223-z>

- Hughes, J. (1975). Isolation of an endogenous compound from the brain with pharmacological properties similar to morphine. *Brain Research*, 88(2), 295–308. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(75\)90391-1](https://doi.org/10.1016/0006-8993(75)90391-1)
- Isayama, T., McLaughlin, P. J., & Zagon, I. S. (1991). Endogenous opioids regulate cell proliferation in the retina of developing rat. *Brain Research*, 544(1), 79–85. [http://doi.org/10.1016/0006-8993\(91\)90887-2](http://doi.org/10.1016/0006-8993(91)90887-2)
- Johanning, K., Juliano, M. A., Juliano, L., Lazure, C., Lamango, N. S., Steiner, D. F., & Lindberg, I. (1998). Specificity of Prohormone Convertase 2 on Proenkephalin and Proenkephalin-related Substrates. *Journal of Biological Chemistry*, 273(35), 22672–22680. <http://doi.org/10.1074/jbc.273.35.22672>
- Kamphuis, S., Eriksson, F., Kavelaars, A., Zijlstra, J., van de Pol, M., Kuis, W., & Heijnen, C. J. (1998). Role of endogenous pro-enkephalin A-derived peptides in human T cell proliferation and monocyte IL-6 production. *Journal of Neuroimmunology*, 84(1), 53–60. [http://doi.org/10.1016/S0165-5728\(97\)00240-3](http://doi.org/10.1016/S0165-5728(97)00240-3)
- Keshet, E., Polakiewicz, R. D., Itin, A., Ornoy, A., & Rosen, H. (1989). Proenkephalin A is expressed in mesodermal lineages during organogenesis. *Embo J*, 8(10), 2917–2923. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2583085> <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC401357/pdf/emboj00134-0140.pdf>
- Kharmate, G., Rajput, P. S., Lin, Y.-C., & Kumar, U. (2013). Inhibition of tumor promoting signals by activation of SSTR2 and opioid receptors in human breast cancer cells. *Cancer Cell International*, 13(1), 93. <https://doi.org/10.1186/1475-2867-13-93>
- Kilpatrick, D. L., Jones, B. N., Kojima, K., & Udenfriend, S. (1981). Identification of the octapeptide [Met]enkephalin -Arg6-Gly7-Leu8 in extracts of bovine adrenal medulla. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 103(2), 698–705. [http://doi.org/10.1016/0006-291X\(81\)90506-4](http://doi.org/10.1016/0006-291X(81)90506-4)
- Kley, N. (1988). Multiple regulation of proenkephalin gene expression by protein kinase C. *The Journal of Biological Chemistry*, 263(4), 2003–8.
- Kononenko, O., Bazov, I., Watanabe, H., Gerashchenko, G., Dyachok, O., Verbeek, D. S., ... Bakalkin, G. (2017). Opioid precursor protein isoform is targeted to the cell nuclei in the human brain. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1861(2), 246–255. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2016.11.002>
- Kosugi, S., Hasebe, M., Entani, T., Takayama, S., Tomita, M., & Yanagawa, H. (2008). Design of Peptide Inhibitors for the Importin α/β Nuclear Import Pathway by Activity-

Based Profiling. *Chemistry and Biology*, 15(9), 940–949.
<https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2008.07.019>

- Kosugi, S., Hasebe, M., Matsumura, N., Takashima, H., Miyamoto-Sato, E., Tomita, M., & Yanagawa, H. (2009a). Six classes of nuclear localization signals specific to different binding grooves of importin α . *Journal of Biological Chemistry*, 284(1), 478–485. <https://doi.org/10.1074/jbc.M807017200>
- Kosugi, S., Hasebe, M., Tomita, M., & Yanagawa, H. (2009b). Systematic identification of cell cycle-dependent yeast nucleocytoplasmic shuttling proteins by prediction of composite motifs. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(25), 10171–10176. <https://doi.org/10.1073/pnas.0900604106>
- Kuis, W., Villiger, P. M., Leser, H. G., & Lotz, M. (1991). Differential processing of proenkephalin-A by human peripheral blood monocytes and T lymphocytes. *Journal of Clinical Investigation*, 88(3), 817–824. <http://doi.org/10.1172/JCI115382>
- Levenson, A. S., & Craig, J. V. (1997). MCF-7: The First Hormone-responsive Breast Cancer Cell Line. *Cancer Research*, 57(20), 3071–3078.
- Lewis, R. V., Stern, A. S., Rossier, J., Stein, S., & Udenfriend, S. (1979). Putative enkephalin precursors in bovine adrenal medulla. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 89(3), 822–829. [http://doi.org/10.1016/0006-291X\(79\)91852-7](http://doi.org/10.1016/0006-291X(79)91852-7)
- Lindberg, I., & Shaw, E. (1992). Posttranslational processing of proenkephalin in SK-N-MC cells: evidence for phosphorylation. *J Neurochem*, 58(2), 448–453. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1729392
- Liston, D., Patey, G., Rossier, J., Verbanck, P., & Vanderhaeghen, J. J. (1984). Processing of proenkephalin is tissue-specific. *Science*, 225(4663), 734–737. <http://doi.org/10.1126/science.6547780>
- Litt, M., Buroker, N. E., Kondoleon, S., Douglass, J., Liston, D., Sheehy, R., & Magenis, R. E. (1988). Chromosomal localization of the human proenkephalin and prodynorphin genes. *Am J Hum Genet*, 42(2), 327–334. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2893547> <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1715254/pdf/ajhg00125-0117.pdf>
- Livett, B. G., Dean, D. M., Whelan, L. G., Udenfriend, S., & Rossier, J. (1981). Co-release of enkephalin and catecholamines from cultured adrenal chromaffin cells. *Nature*, 289(5795), 317–319. <http://doi.org/10.1038/289317a0>
- Mains, R. E., Eipper, B. A., Glembotski, C. C., & Dorris, R. M. (1983). Strategies for the biosynthesis of bioactive peptides. *Trends in Neurosciences*, 6(C), 229–235. [http://doi.org/10.1016/0166-2236\(83\)90100-5](http://doi.org/10.1016/0166-2236(83)90100-5)

- Maneckjee, R., Biswas, R., & Vonderhaar, B. K. (1990). Binding of Opioids to Human MCF-7 Breast Cancer Cells and Their Effects on Growth Binding of Opioids to Human MCF-7 Breast Cancer Cells and Their Effects on Growth, (35 mm), 2234–2238.
- Marfori, M., Mynott, A., Ellis, J. J., Mehdi, A. M., Saunders, N. F. W., Curmi, P. M., ... Kobe, B. (2011). Molecular basis for specificity of nuclear import and prediction of nuclear localization. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1813(9), 1562–1577. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2010.10.013>
- Martínez-Carpio, P. a, Mur, C., Rosel, P., & Navarro, M. a. (1999). Constitutive and regulated secretion of epidermal growth factor and transforming growth factor-beta1 in MDA-MB-231 breast cancer cell line in 11-day cultures. *Cellular Signalling*, 11(10), 753–757. [http://doi.org/10.1016/S0898-6568\(99\)00048-0](http://doi.org/10.1016/S0898-6568(99)00048-0)
- McTavish, N., Copeland, L. A., Saville, M. K., Perkins, N. D., & Spruce, B. A. (2007). Proenkephalin assists stress-activated apoptosis through transcriptional repression of NF-kappaB- and p53-regulated gene targets. *Cell Death Differ*, 14(9), 1700–1710. <http://doi.org/10.1038/sj.cdd.4402172>
- Morris, K. V. (2005). siRNA-mediated transcriptional gene silencing: The potential mechanism and a possible role in the histone code. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 62(24), 3057–3066. <https://doi.org/10.1007/s00018-005-5182-4>
- Nelson, D. L., & Cox, M. M. (2013). *Lehninger's principles of biochemistry*. Cambridge: Macmillan Higher Education.
- Noda, M., Furutani, Y., Takahashi, H., Toyosato, M., Hirose, T., Inayama, S., ... Numa, S. (1982). Cloning and sequence analysis of cDNA for bovine adrenal preproenkephalin. *Nature*, 295(5846), 202–206. <http://doi.org/10.1038/295202a0>
- Padrós MR, L. Terán, M. Rosete, S. Durán, Y. Sánchez, I. Velázquez and O. Vindrola. Three endogenous proenkephalin mRNAs translated the proteins transported to the nuclear and secretory pathways in a human neuroblastoma cell line. 43rd Annual Meeting for the American Society for Cell Biology. San Francisco USA. Diciembre de 2003.
- Padrós, M. R., Vindrola, O., Zunszain, P., Fainboin, L., Finkielman, S., & Nahmod, V. E. (1989). Mitogenic activation of the human lymphocytes induce the release of proenkephalin derived peptides. *Life Sciences*, 45(19), 1805–1811. [http://doi.org/10.1016/0024-3205\(89\)90521-3](http://doi.org/10.1016/0024-3205(89)90521-3)
- Padrós, M., Saravia, F., & Vindrola, O. (1995). Antibodies against the amino-terminal portion of pro-enkephalin inhibit DNA synthesis in human peripheral mononuclear cells. *Journal of Neuroimmunology*, 61(1), 79–83. [http://doi.org/10.1016/0165-5728\(95\)00077-F](http://doi.org/10.1016/0165-5728(95)00077-F)

- Pederson, T., & Aebi, U. (2003). Actin in the nucleus [mdash] what form and what for? *J. Struct. Biol.*, 140, 3–9.
- Petersen, T. N., Brunak, S., Von Heijne, G., & Nielsen, H. (2011). SignalP 4.0: Discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nature Methods*, 8(10), 785–786. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1701>
- Polakiewicz, R. D., & Rosen, H. (1990). Regulated expression of proenkephalin A during ontogenic development of mesenchymal derivative tissues. *Mol Cell Biol*, 10(2), 736–742. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2300059> <http://mcb.asm.org/content/10/2/736.full.pdf>
- Polakiewicz, R. D., Behar, O. Z., Comb, M. J., & Rosen, H. (1992). Regulation of proenkephalin expression in cultured skin mesenchymal cells. *Mol Endocrinol*, 6(3), 399–408. <http://doi.org/10.1210/mend.6.3.1584216>
- Rodríguez Linares, G. A. (2006). “EFECTO DE LA TRANSFECCIÓN ESTABLE DEL cDNA DEL EXÓN III Y ANTISENTIDO DE LA PROENCEFALINA SOBRE LOS NIVELES DE CICLINA D1 EN LA LÍNEA CELULAR DE FIBROBLASTOS EMBRIONARIOS DE RATÓN NIH 3T3.” Benemerita Universidad Autonoma de Puebla.
- Rosen, H., Douglass, J., & Herbert, E. (1984). Isolation and characterization of the rat proenkephalin gene. *Journal of Biological Chemistry*, 259(22), 14309–14313.
- Rosete M., Padrós MR., Bazán ML., Durán S., y Vindrola O. El ARNm de la proencefalina en las células NIH 3T3 carece del exon II, se expresa en la fase G1 del ciclo celular y traduce proteínas nucleares. XXV Congreso Nacional de Bioquímica. Ixtapa, México. Noviembre 2004.
- Rossier, J., Dean, D. M., Livett, B. G., & Udenfriend, S. (1981). Enkephalin congeners and precursors are synthesized and released by primary cultures of adrenal chromaffin cells. *Life Sciences*, 28(7), 781–789. [http://doi.org/10.1016/0024-3205\(81\)90161-2](http://doi.org/10.1016/0024-3205(81)90161-2)
- Rossier, J., Trifaro, J. M., Lewis, R. V., Lee, R. W., Stern, A., Kimura, S., ... Udenfriend, S. (1980). Studies with [35S]methionine indicate that the 22,000-dalton [Met]enkephalin-containing protein in chromaffin cells is a precursor of [Met]enkephalin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 77(11), 6889–6891. <http://doi.org/10.1073/pnas.77.11.6889>
- Rossler, J. (1993). Biosynthesis of Enkephalins and Proenkephalin-Derived Peptides. Blackader, a. D. *Opioids*. (A. Herz, H. Akil, & E. J. Simon, Eds.), *Canadian Medical Association journal* (Vol. 104 / 1). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. <http://doi.org/10.1007/978-3-642-77460-7>

- Rost, B., & Liu, J. (2003). The PredictProtein server. *Nucleic Acids Research*, *31*(13), 3300–3304. <https://doi.org/10.1093/nar/gkg508>
- Roth, K. A., Lorenz, R. G., Unanue, R. A., & Weaver, C. T. (1989). Nonopiate active proenkephalin-derived peptides are secreted by T helper cells. *Faseb J*, *3*(12), 2401–2407. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2529160> <http://www.fasebj.org/content/3/12/2401.full.pdf>
- Saravia, F., Ase, A., Aloyz, R., Kleid, M. C., Ines, M., Vida, R., ... Vindrola, O. (1993). Differential posttranslational processing of proenkephalin in rat bone marrow and spleen mononuclear cells: Evidence for synenkephalin cleavage. *Endocrinology*, *132*(4), 1431–1437. <http://doi.org/10.1210/endo.132.4.8462445>
- Slominski, A. T., Zmijewski, M. a, Zbytek, B., Brozyna, A. a, Granese, J., Pisarchik, A., ... Tobin, D. J. (2011). Regulated proenkephalin expression in human skin and cultured skin cells. *The Journal of Investigative Dermatology*, *131*(3), 613–22. <http://doi.org/10.1038/jid.2010.376>
- Soule, H. D., Vazquez, J., Long, a., Albert, S., & Brennan, M. (1973). A Human Cell Line From a Pleural Effusion Derived From a Breast Carcinoma. *J Natl Cancer Inst*, *51*(5), 1409–1416. <http://doi.org/10.1093/jnci/51.5.1409>
- Stefano, G. B., & Kream, R. (2008). Endogenous opiates, opioids, and immune function: Evolutionary brokerage of defensive behaviors. *Seminars in Cancer Biology*, *18*(3), 190–198. <http://doi.org/10.1016/j.semcancer.2007.12.001>
- Stern, A. S., Lewis, R. V, Kimura, S., Rossier, J., Gerber, L. D., Brink, L., ... Udenfriend, S. (1979). heptapeptide Met-enkephalin[Arg6, Phe7], *76*(12), 6680–6683.
- Terán Vazquez Leticia. Maestría en Ciencias Fisiológicas, Título: “Transcripción traducción, distribución subcelular de la proencefalina y efectos de la sobre-expresión de su DNA en la proliferación celular de la línea SK-N-MC”. Instituto de Fisiología, BUAP. Junio 2003.
- Tsai, R., & McKay, R. (2002). A nucleolar mechanism controlling cell proliferation in stem cells and cancer cells. *Science Signalling*, (301), 2991–3003. <https://doi.org/10.1101/gad.55671.GENES>
- Vilijn, M.-H., Das, B., Kessler, J. A., & Flicker, L. D. (1989). Cultured Astrocytes and Neurons Synthesize and Secrete Carboxypeptidase E, a Neuropeptide-Processing Enzyme. *Journal of Neurochemistry*, *53*(5), 1487–1493. <http://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1989.tb08542.x>
- Vindrola Osvaldo, Maria Rosete, Maria Luisa Bazán, Leticia Terán, Silvia Durán and Maria Rosa Padrós. Failure of a pro-neuropeptide post-translational processing in the secretory

pathway converted it in a nuclear-nucleolar protein that enhanced cell proliferation. Annual Meeting of European Life Science Organisation ELSO, Dresden Alemania, Septiembre 2005

- Vindrola, O., Chervin, a, Vitale, M., Mella, a N., Aloyz, R., & Basso, a. (1998). Elevated proenkephalin-derived peptide levels in ACTH-producing adenomas: nucleus and cytoplasm localization. *Endocrine*, 8(3), 231–240. <http://doi.org/10.1385/ENDO:8:3:231>
- Vindrola, O., Padrós, M. R., Sterin-Prync, A., Ase, A., Finkielman, S., & Nahmod, V. (1990). Proenkephalin system in human polymorphonuclear cells: Production and release of a novel 1.0-kD peptide derived from synenkephalin. *Journal of Clinical Investigation*, 86(2), 531–537. <http://doi.org/10.1172/JCI114740>
- Viveros, O. H., Diliberto, E. J., Hazum, E., & Chang, K. J. (1979). Opiate-like materials in the adrenal medulla: evidence for storage and secretion with catecholamines. *Molecular Pharmacology*, 16(3), 1101–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/530253>
- Weisinger, G. (1995). The transcriptional regulation of the preproenkephalin gene. *The Biochemical Journal*, 307 (Pt 3, 617–29.
- Weisinger, G., Zinder, O., & Simantov, R. (1995). Antisense Knockout of a Neuropeptide Gene Reduces Fibroblast Proliferation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 214(2), 530–537. <http://doi.org/10.1006/bbrc.1995.2319>
- Weisingers, G., Decristofaro, J. D., & Lagamma, E. F. (1990). Multiple Preproenkephalin Induced by Stress and Cholinergic. *Journal of Biological Chemistry*, 265(29), 17389– 17392.
- Wilson, S. P. (1991). Processing of Proenkephalin in Adrenal Chromaffin Cells. *Journal of Neurochemistry*, 57(3), 876–881. <http://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1991.tb08232.x>
- Yoo, S. H., You, S. H., Kang, M. K., Huh, Y. H., Lee, C. S., & Shim, C. S. (2002). Localization of the secretory granule marker protein chromogranin B in the nucleus. Potential role in transcription control. *Journal of Biological Chemistry*, 277(18), 16011–16021. <https://doi.org/10.1074/jbc.M105594200>
- Zurawski, G., Benedik, M., Kamb, B., Abrams, J., Zurawski, S., & Lee, F. (1986). Activation of mouse T-helper cells induces abundant preproenkephalin mRNA synthesis. *Science*, 232(4751), 772–775. <http://doi.org/10.1126/science.2938259>