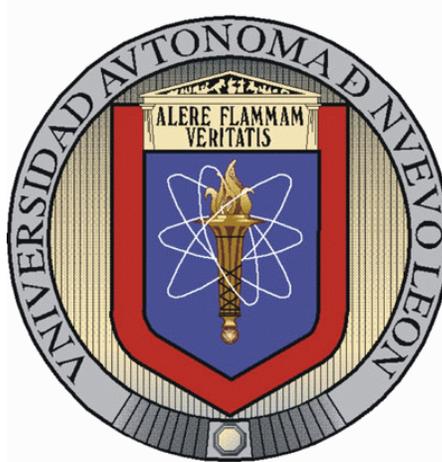


UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA E INMUNOLOGÍA



EFFECTO DE LA SOBRE EXPRESIÓN DE WT1 EN LA EXPRESIÓN DE
GENES ANGIOGÉNICOS EN MELANOMA MURINO BAJO CONDICIONES
NORMALES Y DE HIPOXIA *IN VITRO*

Tesis presentada por

LBG ANA KARINA CHÁVEZ ESCAMILLA

Como requisito para obtener el título de
MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN INMUNOBIOLOGÍA

SAN NICOLÁS DE LOS GARZA, N.L. ENERO 2013

DEDICATORIA

A mi hija Sara, que con su espíritu de guerrera y sus inmensas ganas de vivir y salir adelante, fue siempre la luz que me alumbraba en momentos de oscuridad, gracias por ser mi fuerza...

A Santiago mi compañero de vida y de aventuras, sin tu apoyo y sin tu cariño no lograría lo que hasta hoy, este logro más es de los dos, gracias por confiar en mí...

A Dios...

“Nunca sabes que tan fuerte eres, hasta que serlo es tu única opción”

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por permitirme tener los medios para llevar a cabo este trabajo de Maestría.

A la Dra. Cristina Rodríguez Padilla, Jefa del Laboratorio de Inmunología y Virología, por aceptarme a realizar esta tesis de Maestría.

Al Dr. Pablo Zapata, por su apostar su confianza en mí, y porque a pesar de que aun me falta muuuuucho por aprender no perdió la paciencia, bueno eso creo jajajaj.

A la Dra. Diana Zamora, Dra. Laura Trejo, Dr. Edgar Mendoza Gamboa y al Dr. Moisés Franco, por brindarme su amistad, asesoría, su apoyo y por recibirme en sus laboratorios cuando necesitaba de su ayuda.

A mis amigos y compañeros del LIV, absolutamente a TODOS!!!, a Dany, a Liz y a Debi que me apoyaron incondicionalmente en el infinito numero de geles de agarosa y los miles de Western Blot, las quiero muchísimo chicas!!!; al cadillito de Edgar Manilla, a Karlita obviamente razones sobran, al bandón del L6, L7, L2, L8 por siempre brindarme la compañía, la ayuda y asesoría cuando lo necesitaba, y por compartir valiosos momentos de relax.

A mi familia mami, papi y Pau, que siempre estuvieron al pendiente y apoyándome estos 2 años de formación, infinitas gracias!!

Gracias Totales!!

ÁREA DE TRABAJO

El presente trabajo se llevó a cabo en la Unidad de Biología Molecular del Cáncer del Laboratorio de Inmunología y Virología del Departamento de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la dirección del Dr. Pablo Zapata Benavides.

INDICE DE CONTENIDO

Sección	Página
ÍNDICE DE TABLAS.....	X
ÍNDICE DE FIGURAS.....	XI
LISTA DE ABREVIATURAS Y SIMBOLOGÍA.....	XII
RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	3
ANTECEDENTES.....	5
Cáncer.....	5
Etiología del cáncer.....	5
Etapas del cáncer.....	5
Angiogénesis.....	7
Angiogénesis tumoral.....	10
Genes angiogénicos de importancia.....	11
Gen VEGF.....	11
Gen EGR-1.....	14
Gen TSP-1.....	15
Gen ETS-1.....	16
Gen bFGF.....	17
Gen wt1.....	17
Gen wt1 en cáncer.....	21
Gen wt1 y la angiogénesis.....	22
Hipoxia.....	25
Factor Inducible por Hipoxia (HIF).....	26
HIF en cáncer.....	28
Relación HIF-WT1.....	28

HIPÓTESIS.....	30
JUSTIFICACIÓN.....	31
OBJETIVOS.....	32
DISEÑO EXPERIMENTAL.....	34
MATERIALES Y MÉTODOS.....	35
Producción a gran escala de plásmidos recombinantes wt1 S+/-, H+/- y RNAi-wt1.....	35
Preparación de cloruro de cobalto (CoCl ₂) para los ensayos de hipoxia.....	36
Cultivo celular.....	36
Transfección de la línea B16F10 para evaluar efecto en la viabilidad en placa 96.....	36
Ensayo de viabilidad celular por MTT.....	37
Transfección de la línea B16F10 en placa de 6 pozos para extracción de RNA total y proteínas.....	38
Extracción del RNA total.....	39
Reacción de transcriptasa reversa.....	39
PCR de wt1 y genes angiogénicos.....	40
Electroforesis en gel de agarosa.....	41
Extracción de proteínas y Western Blot.....	41
RESULTADOS.....	43
Expresión basal de wt1 y genes angiogénicos VEGF, EGR1, ETS1, bFGF y TSP1 en la línea celular B16F10 cultivada bajo condiciones normales.....	43
Efecto de la transfección de las isoformas de WT1 en la proliferación de la línea celular B16F10 cultivada bajo condiciones normales.....	44
Análisis de la expresión proteica de WT1 en la línea B16F10 transfectada con las isoformas de WT1.....	45
Análisis de la expresión de WT1 y genes angiogénicos en la línea B16F10 transfectada con las isoformas de wt1.....	47
Efecto de la transfección de las isoformas de WT1 en la proliferación de la línea celular B16F10 cultivada bajo condiciones de hipoxia.....	49

DISCUSIÓN.....	58
CONCLUSIONES.....	65
PERSPECTIVAS.....	66
BIBLIOGRAFÍA.....	67

INDICE DE TABLAS

Tabla		Pág.
I	Activadores e inhibidores de la angiogénesis	8
II	Genes blanco de regulación por wt1	20
III	Oligonucleótidos y condiciones usados para la PCR de wt1 y genes angiogénicos	40

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Título	Pág.
1	Esquema de la angiogénesis tumoral	9
2	Funciones atribuidas a la familia VEGF	12
3	Isoformas de VEGF	12
4	Estructura EGR1	15
5	Estructura molecular de la Trombospondina 1	15
6	Estructura molecular de ETS1	16
7	Estructura molecular de bFGF	17
8	El gen wt1 y sus isoformas	19
9	Funciones atribuidas al gen wt1	22
10	Representación esquemática de HIF1-alfa y su regulación	27
11	Patrón de expresión del gen wt1 y genes angiogénicos en la línea celular B16F10	43

Figura	Título	Pág.
12	Efecto de la sobre expresión de las isoformas de wt1 sobre la proliferación celular de la línea B16F10	45
13	Efecto de la sobre expresión de las isoformas de wt1 36-38 kDa (17aa+/KTS-) y 52-54 (17aa+/KTS-) y con el RNAi wt1-1 sobre la expresión proteica de wt1 en la línea B16F10	46
14	Efecto de la sobre expresión de las isoformas de wt1 sobre la expresión de genes angiogénicos en la línea B16F10	49
15	Ensayo de MTT para evaluar proliferación de la línea B16F10 cultivada bajo condiciones hipóxicas con CoCl ₂	51
16	Efecto de la sobre expresión de las isoformas de wt1 sobre la proliferación celular de la línea B16F10 bajo condiciones de hipoxia	52
17	Membrana de nitrocelulosa teñida con Rojo Ponceu	53
18	Efecto de la sobre expresión de las isoformas de wt1 36-38 kDa (17aa+/KTS-) y 52-54 (17aa+/KTS-) y con el RNAi wt1-1 en la expresión de genes angiogénicos de la línea B16F10 cultivada bajo condiciones de hipoxia	54
19	Efecto de la sobre expresión de las isoformas S+/- y H+/- en la expresión de HIF1-alfa en la línea celular B16 F10 cultivada bajo condiciones normales y de hipoxia	57

LISTA DE ABREVIATURAS Y SIMBOLOGÍA

<u>Símbolo</u>	<u>Significado</u>
°C	Grados Celsius
µg	Microgramo
µL	Microlitro
B16F10	Línea celular de melanoma murino
bFGF	Factor básico de crecimiento de fibroblastos
Buffer SB	Buffer de borato de sodio
Buffer TE	Buffer Tris-EDTA
cDNA	DNA complementario
CoCl ₂	Cloruro de Cobalto
DMEM/F12	Medio Duplecco Modificado Eagle
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP's	Desoxinucleótidos trifosfatos
EGR1	Factor de crecimiento de respuesta temprana
ETS1	Homólogo del oncogén del virus de la eritroblastosis E26
MgCl ₂	Cloruro de Magnesio
Min	Minuto
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
nm	Nanómetros
pb	Pares de base
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PEI	Polietilenimina
RNA	Ácido ribonucleico
RNAi	RNA de interferencia
RNAm	RNA mensajero
RT	Transcriptasa reversa
Taq	Polimerasa de <i>Termophilus acuaticus</i>
TSP1	Trombospondina 1
UV	Ultravioleta
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular
wt1	Gen del tumor de wilm's