

UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA



Casa abierta al tiempo

*“Caracterización de Romo1 y su relación con la ruta HGF/c-Met en el hígado de ratón
(cepa CD1) y la línea celular RIN-m5F”*

TESIS

Que para obtener el grado de Maestra en Biología Experimental

PRESENTA

Biól. Exp. Atzin Balderas Morales

Comité Tutorial:

Directora:

Dra. Roxana Uri Miranda Labra. Departamento de Ciencias de la Salud. Laboratorio
de Fisiología Celular. UAM-I.

Asesores:

Dr. Luis Enrique Gómez Quiróz. Departamento de Ciencias de la Salud. Laboratorio
de Fisiología Celular. UAM-I.

Dr. Francisco José Fernández Perrino. Departamento de Biotecnología. Laboratorio
de Ingeniería Genética y Metabolismo Secundario. UAM-I.

22 de febrero de 2016.

El jurado designado por la Comisión Académica del Posgrado en Biología Experimental de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana aprobó la Tesis titulada:

"Caracterización de Romo1 y su relación con la ruta HGF/c-Met en el hígado de ratón (cepa CD1) y la línea celular Rinm5f"

Que presentó

Biól. Exp. Atzin Balderas Morales.

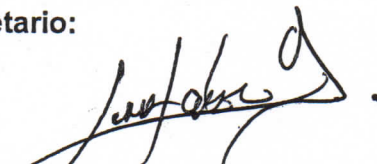
El día 22 de febrero del año 2016.

Sinodales:

Presidenta:


Dra. María Concepción Gutiérrez Ruiz.

Secretario:


Dr. Armando Luna López.
Instituto Nacional de Geriatria.

Vocal 1


Dr. Luis Enrique Gómez Quiroz.*

Vocal 2:


Dra. Leticia Bucio Ortiz.*

*Departamento de Ciencias de la Salud. Laboratorio de Fisiología Celular. UAM-I.

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Fisiología Celular, en el Departamento de Biológicas y de la Salud, de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, bajo la dirección de la Dra. Roxana U Miranda Labra. Contó con el apoyo de CONACYT del proyecto “Caracterización de Romo1 y su relación con la ruta HGF/c-Met en el hígado de ratón (cepa CD1) y la línea celular RIN-m5F”, con número **222578** bajo la responsabilidad técnica de la Dra. Roxana Uri Miranda Labra.

“El Programa de Maestría en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, registro 001481, en el Nivel Consolidado, y cuenta con apoyo del mismo Consejo, clave DAFCYT-2003IMPTNNN0020”.

Número de registro de la beca otorgada por CONACYT: con número 566097/302001 (CVU/Becario).

El jurado designado por la Comisión Académica del Posgrado en Biología Experimental de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana aprobó la Tesis titulada:

“Caracterización de Romo1 y su relación con la ruta HGF/c-Met en el hígado de ratón (cepa CD1) y la línea celular Rinm5f”

Que presentó

Biól. Exp. Atzin Balderas Morales.

El día 22 de febrero del año 2016.

Sinodales:

Presidenta:

Dra. María Concepción Gutiérrez Ruiz.

Secretario:

Dr. Armando Luna López.
Instituto Nacional de Geriátría.

Vocal 1

Dr. Luis Enrique Gómez Quiroz.*

Vocal 2:

Dra. Leticia Bucio Ortiz.*

*Departamento de Ciencias de la Salud. Laboratorio de Fisiología Celular. UAM-I.

Directora de tesis:

Dra. Roxana Uri Miranda Labra. Departamento de Ciencias de la Salud. Laboratorio de Fisiología Celular. UAM-I.

Asesores:

Dr. Luis Enrique Gómez Quiróz. Departamento de Ciencias de la Salud. Laboratorio de Fisiología Celular. UAM-I.

Dr. Francisco José Fernández Perrino. Departamento de Biotecnología. Laboratorio de Ingeniería Genética y Metabolismo Secundario. UAM-I.

A la Dra. María Concepción Gutiérrez Ruiz y a mi comité tutorial, Dra. Roxana Uri Miranda Labra, Dr. Luis Enrique Gómez Quiroz y Dr. Francisco José Fernández Perrino, por hacer posible este proyecto y permitirme aprender.

A Mayrel Palestino Domínguez, por su invaluable ayuda y paciencia.

A Pavel Camacho Moreno, por su gran apoyo y comprensión.

Resumen.

La señalización por el estado redox ha emergido como un mecanismo esencial en la regulación de las actividades biológicas de la célula, dado que las especies reactivas de oxígeno (ROS) tienen un papel importante en numerosos procesos tanto fisiológicos como patológicos. En 2006 se describió la proteína Romo1 (Ros modulador 1), la cual modula los niveles de ROS, participando de manera importante en el mantenimiento de la homeostasis redox para la sobrevivencia celular, apoptosis, proliferación celular, carcinogénesis y activación de vías de señalización. El estrés oxidante (EOX) crónico derivado de las ROS producidas por Romo1 promueve la aparición de hepatocarcinogénesis (HCC). Se considera importante el estudio de esta proteína debido a antecedentes de nuestro laboratorio donde se evaluó el efecto de una dieta aterogénica en ratones Δc -met, se encontró una sobreproducción de ROS, EOX y un incremento en la proteína Romo1, lo que sugiere un control regulatorio de HGF/c-Met sobre la proteína Romo1, y de lo cual hasta el momento no existen reportes. Además, se ha relacionado a esta proteína con patologías en diversos órganos del ser humano.

Métodos. Se realizó la caracterización de diversos órganos de ratón cepa CD1, con respecto a los niveles de RNAm y proteína Romo1. Se determinó que el hígado tiene los niveles más altos en ambos y por tanto se realizó la caracterización de líneas celulares hepáticas. Se realizaron tratamientos con HGF a ratones (20ug/Kg), y en células RIN-m5F y se determinaron los niveles de RNAm y proteína Romo1. Se realizó y comprobó la eficiencia de una construcción genética transiente e inducible para silenciar al gen que codifica a la proteína Romo1, esto para lograr un estudio controlado de esta proteína.

Discusión y conclusiones. En el hígado se encontraron los niveles más altos de RNAm y proteína Romo1, lo cual, junto con el estudio de esta proteína en líneas las líneas celulares estudiadas indican que Romo1 podría tener una mayor relevancia en células del parénquima hepático de origen epitelial más que en células mesenquimales, y que podría estar involucrada en procesos fisiológicos importantes en el hígado. El análisis de los tratamientos con HGF en hígado de ratón CD1 y en la línea celular RIN-m5F sugiere que Romo1 sufre una regulación post-transcripcional en respuesta a este factor, por lo que se sugiere el estudio de las proteínas antioxidantes en estos tratamientos. Se logró obtener la construcción para silenciar el gen *romo1*, y se comprobó su eficiencia; Esta construcción servirá en estudios posteriores para evaluar el efecto del silenciamiento del gen *Romo1* en diversos sistemas estudiados relacionados con hepatopatías.

Abstract.

Redox-mediated signaling has emerged as a key mechanism in regulating biological activities of the cell, since reactive oxygen species (ROS) play an important role in numerous physiological and pathological processes. In 2006 it was described Romo1 (modulator Ros 1) protein, which modulates the levels of ROS, participating significantly in the maintenance of redox homeostasis for cell survival, apoptosis, cell proliferation, carcinogenesis and activation of signaling pathways. Chronic oxidative stress (EOX)-derived ROS produced by Romo1 promotes hepatocarcinogenesis (HCC). We decided to study this protein because our previous findings reveal an overproduction of ROS, EOX and an increase in Romo1 protein content in Δc -met mice with an atherogenic diet, suggesting a HGF/c-Met-mediated Romo1 regulation, issue that is poorly addressed. Also this protein has been linked in various diseases that could impact life quality in patients. **Methods:** It was performed the characterization of Romo1 expression in various CD1 mouse organs. We found that liver has the highest levels in both, mRNA and protein and thus the characterization of hepatic cell lines was performed to confirm this. It was determined the expression of Romo1 in both, mice treated with HGF (20ug / kg) and the pancreatic cell line RIN-M5F. It was performed and confirmed the efficiency of a transient and inducible genetic construct for silencing the gene encoding the protein Romo1, this in order to achieve a controlled study of expression of this protein. **Discussion and conclusions:** We found the highest levels of mRNA and Romo1 protein in the liver, as well as in the HepG2 cell line, both findings indicate that Romo1 could have a larger role in liver parenchymal cells of epithelial origin rather than mesenchymal cells, and that may be involved in important physiological processes in the liver. Analysis of HGF treatments in CD1 mouse liver and RIN-M5F cell line suggests that Romo1 undergoes post-transcriptional regulation in response to this factor, so the study of antioxidant proteins suggested in these treatments. It was possible to obtain the construct to silence the *romo1* gene and its efficiency was found; This construction will help in future studies to assess the effect of gene silencing Romo1 in various systems related to liver disease.

Tabla de contenido

1.0. Introducción	1
1.1. Generación de las ROS en mitocondria.....	2
1.2. Regulación de la liberación de ROS mitocondriales al citosol.....	4
1.3. La ruta de señalización HGF/c-Met y la respuesta antioxidante.	4
2.0. Antecedentes	7
2.1. Romo1.....	8
2.2. Estudios sobre Romo1 en pulmón.	16
2.3. Estudios sobre Romo 1 relacionados con el hígado.	18
3.0. Justificación.....	20
4.0. Hipótesis.	21
5.0. Objetivos.	21
5.1. Objetivo General	21
5.2. Objetivos particulares.....	21
6.0. Material y métodos.	22
6.1. Aparatos y equipos utilizados en la realización de este proyecto:	22
6.2. Organismos utilizados	24
6.3. Preparación de células <i>E.coli</i> competentes.....	25
6.4. Transformación bacteriana.....	26
6.5. Extracción de DNA plasmídico.....	27

6.6.	Medios de cultivo.....	28
6.7.	Suplementos a medios de cultivo.....	29
6.8.	Condiciones de cultivo	30
6.9.	Software utilizado.....	31
6.10.	Vectores plasmídicos:.....	31
6.11.	Diseño de primers.....	32
6.14.	Secuenciación.....	35
6.15.	Transfección e inducción del silenciamiento.....	35
6.17.	Western blot de Romo1.....	36
6.18.	Extracción de RNA.....	37
6.19.	Electroforesis en geles con formaldehído para determinar la integridad de RNA37	
6.20.	Electroforesis en geles de agarosa.....	37
6.21.	Purificación de vectores, cds's y genes directo de gel de agarosa ...	38
6.22.	RT-PCR.	39
6.23.	Tratamientos con HGF	39
7.0.	Resultados.....	40
7.1.0.	Estudio de la expresión de Romo1 en el ratón.	40
7.1.1.	RT-PCR para la obtención de <i>romo1</i>	41

7.1.2. Caracterización de tejidos de ratón CD1 con respecto a la expresión de <i>romo1</i> .	42
7.1.3. Caracterización de tejidos de ratón CD1 con respecto a la expresión de la proteína Romo1.	43
7.2.0. Estudio del efecto del HGF en el hígado.	44
7.2.1. Determinación de los niveles de mensajero <i>romo1</i> en hígado de ratones tratados con HGF.	44
7.2.2. Determinación de los niveles de la proteína Romo1 en hígado de ratones tratados con HGF.	45
7.3.0. Estudio de la expresión de <i>romo1</i> en líneas celulares hepáticas.	46
7.3.1. Determinación de los niveles de mensajero <i>romo1</i> líneas celulares hepáticas.	46
7.3.2. Determinación de los niveles de proteína Romo1 en líneas celulares hepáticas.	48
7.4.0. Efecto del HGF en células RIN-m5F.	49
7.4.1. Determinación de los niveles del mensajero de <i>romo1</i> .	49
7.4.2. Determinación del contenido de proteína de Romo1.	50
7.5.0. Diseño e implementación de un vector de silenciamiento de <i>romo1</i> .	51
7.5.1. Hibridación de primers.	52
7.5.2. Clonación de los primers alineados dentro de pSingle.	54
7.5.3. Secuenciación.	54

7.5.4. Comprobación de la eficiencia de la construcción <i>SilRomo1</i>	55
8. Discusión.....	57
9. Conclusiones.....	62
10. Perspectivas.....	62
11. Bibliografía.....	63

1.0. Introducción

La señalización por el estado redox ha emergido como un mecanismo esencial en la regulación de las actividades biológicas de la célula (Clavijo-Cornejo *et al.*, 2013). La generación de especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) es inducida tanto por estímulos endógenos como exógenos. La evidencia muestra que estas ROS juegan un rol importante en numerosos procesos fisiológicos y patológicos (Droge, 2002, Martindale *et al.*, 2002). Aunque altos niveles de ROS contribuyen a la carcinogénesis y otras enfermedades relacionadas con el daño oxidante, se ha demostrado que niveles apropiados de ROS son indispensables para la sobrevivencia de la célula, la apoptosis y la diferenciación (Bae *et al.*, 2011).

Consistentemente, varias proteínas de señalización, incluyendo NF- κ B, PI3-K, MAPK y p53, desarrollan sus roles celulares respectivos en respuesta a la generación de ROS (Martindale *et al.*, 2002). Además, la relación entre el peróxido de hidrógeno y la proliferación de células de mamíferos se ha estudiado en diferentes tipos celulares (Liu *et al.*, 2002, Caporossi *et al.*, 2003, Na *et al.*, 2008, Chung *et al.*, 2009). Por ejemplo, la reducción de ROS endógenas por adición o sobreexpresión de proteínas antioxidantes inhiben la proliferación de tanto células de músculo liso como de células tumorales (Liu *et al.*, 2002, Caporossi *et al.*, 2003, Sigaud *et al.*, 2005). Adicionalmente, la inhibición de la generación endógena de ROS causa la detención del ciclo celular en la fase G1, demostrando que niveles estables de ROS son requeridos para entrar a la fase S (Bae *et al.*, 2011).

La producción de ROS necesarias para la señalización redox es llevada a cabo, principalmente, por la NADPH oxidasa, y por varios factores de crecimiento y citocinas que estimulan la generación de ROS a través de la activación de esta enzima (Droge, 2002). Aunque las ROS originadas en la mitocondria contribuyen a la señalización redox por un mecanismo no muy conocido, existe evidencia que muestra que el H₂O₂ liberado al citosol participa en varias redes de señalización, tales como la transición del ciclo celular y el balance redox (Kowaltowski *et al.*, 2009).

1.1. Generación de las ROS en mitocondria.

Muchas de las ROS producidas intracelularmente se originan en la cadena mitocondrial respiratoria y, subsecuentemente, producen subproductos metabólicamente tóxicos. Sin embargo, las ROS producidas por la mitocondria han sido implicadas en gran manera en las rutas de señalización, incluyendo aquellas para la sobrevivencia y la muerte celular. En estos procesos, muchas proteínas modulan la liberación de ROS de la mitocondria al citosol y esto es finamente controlado. Las ROS liberadas están implicadas en el mantenimiento de la homeostasis redox y en varias rutas de señalización (Fainstein, 2008).

La mitocondria es uno de los sitios propuestos como principales generadores de ROS, esto gracias a que el oxígeno que se respira gracias al intercambio de gases en los pulmones, y que es transportado por la hemoglobina de la sangre hasta llegar a las células, se utiliza como aceptor final en la respiración mitocondrial. La mitocondria genera la mayor parte de la energía de las células animales durante la fosforilación oxidativa, durante la cual electrones provenientes del NADH

(nicotinamida adenín dinucleótido reducido), que es producido por el ciclo de Krebs durante la oxidación de nutrientes como la glucosa, y su aceptor final es el oxígeno.

La cadena respiratoria mitocondrial consiste de cinco complejos de proteínas localizadas en la membrana interna de la mitocondria complejos respiratorios I-IV y el F1F0-ATP sintasa) y dos factores (citocromo c, Cyt c; coenzima Q10). Durante la respiración, los electrones liberados de la cadena transportadora de electrones, reducen incompletamente el O₂ a la forma de superóxido. El superóxido es convertido a H₂O₂ por la manganeso superóxido dismutasa (MnSod) en la matriz mitocondrial o por la Cu, Zn-Sod en la membrana interna mitocondrial (Fainstein, 2008).

Cuando se emplean inhibidores de la cadena respiratoria, se estima que el 1-2% del O₂ consumido durante la respiración es reducido de forma incompleta para producir superóxido. Sin embargo, del 0.12-0.15% del O₂ produce H₂O₂ cuando se emplean palmitoil-CoA o glutamato/malato como sustratos (Kudin *et al.*, 2004).

Una de las principales funciones de la mitocondria es la producción oxidativa de ATP, en el cual el oxígeno (O₂) es reducido a agua. Consecuentemente, la mayor fuente intracelular de generación de ROS es la cadena respiratoria mitocondrial (Brand, 2010), la producción de ROS es una propiedad inherente de la cadena respiratoria mitocondrial de las células eucariotas (Fainstein, 2008).

1.2. Regulación de la liberación de ROS mitocondriales al citosol.

Las ROS liberadas al citosol participan en una variedad de funciones intracelulares incluyendo proliferación, muerte, ciclo y homeostasis celular (Droge, 2002).

En los últimos años se han realizado aproximaciones para explicar el papel de las ROS en la activación de diferentes rutas de señalización; particularmente, se ha descrito que poseen un papel importante en la activación de la ruta de señalización HGF/c-Met, la cual ha demostrado ser clave para la reparación del hígado, la sobrevivencia y el control redox celular.

1.3. La ruta de señalización HGF/c-Met y la respuesta antioxidante.

El factor de crecimiento de hepatocitos (HGF por sus siglas en inglés Hepatocyte

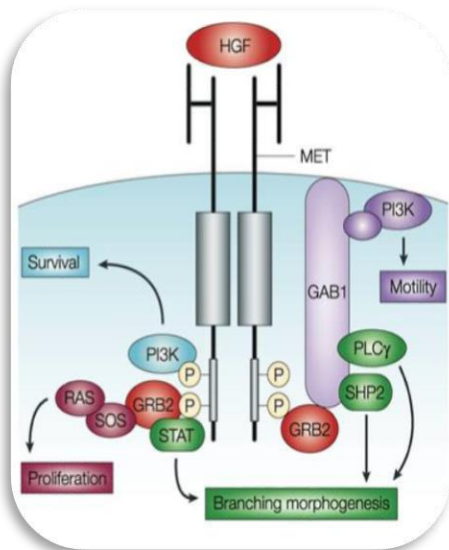


Figura 1. Rutas de señalización mediadas por HGF/c-Met, Regulación del estado redox celular y control del estrés oxidante (Trusolino *et al.*, 2002).

Growth Factor), se describió originalmente como un mitógeno potente de hepatocitos (principal inductor de la proliferación celular), pero también se ha relacionado con otros procesos fisiológicos como la migración y la sobrevivencia, tal como se muestra en la Figura 1 (Stuart *et al.*, 2000, Gentile *et al.*, 2004). Todos estos efectos biológicos que dependen del contexto celular, son el resultado de la activación de varias rutas de señalización, las cuales son activadas a

partir de la unión de HGF a su receptor c-Met (Gao *et al.*, 2005). La señalización dependiente de HGF/c-Met es esencial para la sobrevivencia del hepatocito, ya

que la supresión de los genes que los codifican, tiene efectos letales a nivel embrionario, debido al desarrollo de múltiples defectos, incluyendo una apoptosis masiva de los hepatocitos fetales (Schmidt *et al.*, 1995).

El mecanismo de protección y reparación mediado por el HGF ha sido ampliamente estudiado, básicamente, en modelos de hepatectomía parcial (Nakamura *et al.*, 2010) y por agentes químicos tóxicos, y datos recientes sugieren tiene un efecto protector como respuesta ante una sobrecarga de colesterol (Gutierrez Ruiz *et al.*, 2012).

Es evidente que una respuesta común ante el daño hepático, es la generación de estrés oxidante (EOX) inducido por un incremento en el nivel de ROS, que a su vez induce la activación de rutas de transducción de señales a partir de la activación de proteínas específicas como ERK1/2, JNK y NF- κ B (Czaja, 2007). En el hígado, HGF y c-Met son los principales responsables de iniciar una respuesta reparadora tras un daño, y dicha respuesta se centra en la regulación de los procesos mitogénicos, motogénicos, morfogénicos y de sobrevivencia (Gutierrez Ruiz *et al.*, 2012), pero se ha mostrado que además modula la respuesta antioxidante como un mecanismo hepatoprotector (Gomez-Quiroz *et al.*, 2008).

La evidencia muestra que esta ruta puede ser activada por las ROS, donde una proporción de estas son generadas por la enzima NADPH oxidasa por un mecanismo dual mediado por el factor transcripcional Nrf2; sin embargo, se ha descrito la existencia de una nueva proteína moduladora de ROS llamada Romo1, cuyo gen codificante se encontró sobreexpresado en ratones con delección en c-MET y sometidos a una dieta alta en colesterol. Lo anterior sugiere un control

regulatorio de HGF/c-Met sobre Romo1, debido a que la pérdida de c-Met conduce a una sobreproducción de ROS, EOX y sensibilización a la apoptosis.

En este sentido, el grupo de investigación de Fisiología Celular de la UAMI, se ha centrado en la caracterización de dicha respuesta antioxidante mediada por HGF, y ha comprobado que este factor en particular induce la expresión de proteínas antioxidantes y de supervivencia por mecanismos que involucran rutas de señalización canónicas de la reparación, como son las mediadas por las proteínas Stat3, Erk, Akt, y por factores de transcripción como el factor nuclear NF- κ B, entre otros. Es así como HGF puede funcionar como un factor antioxidante capaz de proteger a la célula del daño por estrés oxidante, a través de la modulación de los niveles intracelulares de GSH (el mayor determinante del potencial celular redox) y enzimas citoprotectoras como catalasa y superóxido dismutasa. Además, c-Met inicia la activación de la ruta de la fosfatidil-inositol 3 cinasa (PI3K)/Akt, la cual es clave para la supervivencia celular en el hígado, pero también dicha ruta ha mostrado estar involucrada en la respuesta al EOX, al inducir la activación del factor nuclear κ B (NF- κ B), que a su vez regula la expresión tanto de genes antioxidantes como antiapoptóticos (Gomez-Quiroz *et al.*, 2008).

Datos reportados por (Gutierrez Ruiz *et al.*, 2012) mostraron que HGF protege contra el daño oxidante generado por una dieta alta en colesterol (HC), incrementando la expresión de proteínas antioxidantes como un mecanismo central de hepatoprotección, lo cual se ve reflejado en la disminución notable en el contenido de proteínas oxidadas en las células provenientes de ratones alimentados con la dieta HC. Esta misma respuesta de protección también se

encontró contra el daño oxidante generado por el metabolismo de etanol (Valdes-Arzate *et al.*, 2009). Además, esta dieta logró activar la ruta de supervivencia mediada por RAS/Erk (Gutierrez Ruiz *et al.*, 2012).

2.0. Antecedentes

Recientemente en el grupo de investigación de Fisiología Celular, se realizó una serie de experimentos preliminares para evaluar el efecto de la dieta aterogénica durante 30 días en la expresión de múltiples genes en ratones con supresión en el receptor c-Met. Se analizaron muestras de hígado completo por microarreglos utilizando el sistema Illumina Bead Chip Mouse Ref8-v2 para 25,600 genes. Los resultados mostraron que existen varias rutas alteradas relacionadas con el metabolismo de lípidos, aminoácidos y ácidos biliares, así como con la función mitocondrial (principalmente genes relacionados con la producción de ATP y de estrés oxidante). Lo anterior sugiere un alto compromiso mitocondrial que puede redundar en déficit energético y compromiso celular (apoptosis). El análisis fisiológico reveló que hay daño hepático, colestasis e inflamación, todos ellos relacionados con el estrés oxidante. Respecto a esto último, se encontró particularmente que el gen de la proteína Romo1, está sobre-regulado mientras que la expresión del gen de la proteína chaperona para cobre de la SOD está disminuida, lo que reforzaría la hipótesis de que el estrés oxidante juegue un papel importante en el daño hepático debido a la dieta aterogénica.

2.1. Romo1

“ROS modulador 1” o simplemente Romo1 es un péptido de aproximadamente 79 aminoácidos y tiene un peso aproximado de 8.9 kDa, es una proteína mitocondrial y se ha encontrado expresada en tejido de cerebro, hígado y riñón de ratón. El grupo de investigación formado por

(Chung *et al.*, 2006) hizo un análisis de traducción hipotética usando el programa “Translate” en el sitio Web de EXPASY, que **sugiere** que Romo1 es una proteína

transmembranal (Chung *et al.*, 2006). Bajo este supuesto, su dominio transmembrana fue predicho usando los servidores de predicción SMART y CBS, tal como se muestra en la figura 2 (Kim *et al.*, 2010).

Podemos tener una mejor imagen de esta proteína, gracias al modelo de sus estructura proteica computacional proporcionado por MODBASE

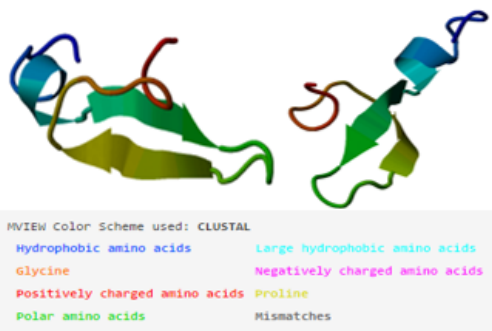


Figura 3. Diagrama esquemático del modelo computacional de la proteína Romo1, (MODBASE, 2013).

cancerosas (Chung *et al.*, 2006).

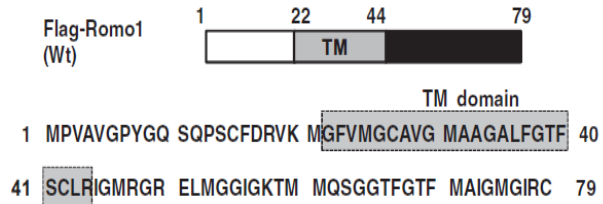


Figura 2. Diagrama esquemático de la estructura de Romo1, destacando su dominio transmembranal (Chung *et al.*, 2006).

(<http://modbase.compbio.ucsf.edu/>), tal como se muestra en la Figura 3.

Aunque hay indicios de que modula la producción de ROS, su rol y su mecanismo de acción no están definidos.

Esta proteína incrementa los niveles de ROS en varias líneas celulares

El gen *romo1* cuenta con tres variantes (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/140823#reference-sequences>), hasta ahora se ha analizado en detalle sólo la variante 1, la primera en ser descubierta, y al hablar de *romo1*, se hará referencia únicamente a esta primera variante. Los cambios de las dos últimas variantes se dan sólo en algunos pares de bases y hasta ahora no se ha reportado que estos cambios modifiquen ni la función ni la estructura de Romo1.

Las ROS endógenas derivadas de Romo1 también regulan la proliferación celular a través de la activación de ERK en varias líneas normales y celulares (Na *et al.*, 2008). Romo1 también se incrementa en células senescentes, y la delección de su gen codificante ha mostrado inhibir el proceso de envejecimiento (Chung *et al.*, 2008). Romo1 juega un rol importante en la producción mitocondrial de ROS, las cuales en su momento pueden inducir la muerte apoptótica (Lee *et al.*, 2010).

Los niveles de ROS en un estado estable son requeridos para entrar a la fase S del ciclo celular en células normales, así como células tumorales. Sin embargo, la contribución de ROS de las mitocondrias para la proliferación no se ha investigado hasta la fecha. Se ha demostrado que las ROS endógenas generadas por Romo1 son indispensables para la transición de la fase G1 a la fase S (en fibroblastos de riñón humano), ya que al eliminar a *romo1*, el nivel de ROS se reguló a la baja, resultando en la detención del ciclo celular en la fase G1. Esta parada se asoció con el nivel de p27Kip1, demostrando que las ROS generadas por Romo1 son requeridas para la proliferación normal de célula (Chung *et al.*, 2009). Lo anterior sugiere que Romo1 actúa como modulador, al suplir las ROS del complejo III de la

cadena respiratoria mitocondrial hacia el citosol (Chung *et al.*, 2006), pero ¿cómo modula Romo1 la liberación de ROS al citosol? Un reporte reciente mostró que las ROS, inducidas por TNF- α , están asociadas con Romo1 localizada en la membrana mitocondrial externa, demostrando el mecanismo posible para liberar ROS al citosol por Romo1 (Kim *et al.*, 2010).

Aunque el rol fisiológico de Romo1 no ha sido identificado, varios reportes demuestran los posibles roles celulares de Romo1. Uno de ellos indica que Romo1 mantiene la homeostasis redox para la sobrevivencia celular, demostrando que su delección decreta los niveles basales de ROS y detiene el ciclo celular de varias células normales y tumorales en la fase G1, lo que sugiere que los niveles basales de ROS en estado estable generados por Romo1 son indispensables para la proliferación celular (Na *et al.*, 2008). El arresto producido por el silenciamiento de Romo1 en líneas celulares tumorales se asocia con el incremento de los niveles de p27^{Kip1} a través de la inhibición de la activación de Erk (Na *et al.*, 2008, Chung *et al.*, 2009). De este modo, Romo1 puede jugar un rol importante en la señalización redox durante la proliferación celular normal.

Investigaciones recientes, (Norton *et al.*, 2014) identificaron a Romo1 como una proteína reguladora del estado REDOX requerida para conservar la morfología normal de las crestas mitocondriales y es esencial para la oligomerización correcta de OPA1. Observaron que tanto el silenciamiento de esta proteína como su sobreexpresión promueven fisión mitocondrial. Su silenciamiento produjo mitocondrias fragmentadas y pérdida morfológica de las crestas mitocondriales, causando daño a la respiración mitocondrial y sensibilidad a estímulos de muerte

celular, lo que coloca a Romo1 como un interruptor molecular que acopla el estrés metabólico y la morfología mitocondrial, ligado a la fusión mitocondrial a la supervivencia celular.

En el 2007, (Hwang *et al.*, 2007) se analizó la resistencia celular al tratamiento con el fármaco anticancerígeno 5 fluorouracilo (5-FU), que causa muerte celular por estrés oxidante, en pacientes con cáncer de cabeza y cuello, encontrando sobreexpresada a la proteína Romo1. Los resultados de esa investigación indican que las ROS inducidas por el tratamiento con 5-FU son a través de la inducción de Romo1, lo que provoca la compensación por el aumento de enzimas antioxidantes, de lo cual deriva la resistencia al fármaco. Esto sugiere que la expresión de Romo1 tiene una implicación clínica en la resistencia a la terapia contra el cáncer.

Otro estudio realizado con células IMR-90, sugiere que la expresión de esta proteína se incrementa durante el envejecimiento y que los niveles de ROS derivados de ella causan disfunción mitocondrial y daño nuclear al DNA, observando el posible papel clave de Romo1 en la senescencia replicativa (Chung *et al.*, 2008).

Romo1 ha sido implicada con el mecanismo de muerte celular por apoptosis mediante privación sérica, del cual no se sabe el mecanismo exacto, mas es bien sabido que se debe al incremento de ROS. Para comprobarlo, se realizaron una serie de experimentos en los que se silenció la expresión del gen para esta proteína y se eliminó parcial y completamente el suero del medio de cultivo celular. El análisis demostró que el silenciamiento de Romo1 suprimió completamente la

inducción de ROS, demostrándose que Romo 1 juega un papel fundamental en la producción de ROS generada por la deprivación sérica (Lee *et al.*, 2010). De manera más detallada, el seguimiento de esta investigación indica que Bcl-X_L regula la generación de ROS debida a la deprivación del suero y la apoptosis inducida por Romo1, puesto que la sobreexpresión de Bcl-X_L bloquea significativamente el estrés oxidativo e inhibe la apoptosis inducida por tratamientos con especies reactivas de oxígeno mediado por Romo1 (Lee *et al.*, 2011).

Otro estudio propone a Romo1 como un puente molecular entre la señal de TNF- α y la producción mitocondrial de ROS que dispara a TNF- α mediando apoptosis, ya que en esta serie de experimentos diseñados para investigar la posible relación de Romo1 con las ROS inducidas por TNF- α en células HEK y HeLa y se encontró que Romo 1 es un mediador corriente arriba de caspasa 8 y Bid en la vía apoptótica desencadenada por TNF- α . Al silenciar a Romo1 se inhibió parcialmente la apoptosis, demostrando que Romo1 es un mediador importante de la muerte celular mediada por TNF- α . Asimismo, encontró que Romo1 endógeno interactúa con RIP1 (cinasa involucrada en decisión vida/muerte celular), TRADD, TRAF-2, FADD y caspasa 8 durante la estimulación con TNF- α . Además de todo lo mencionado, también examinó la localización de otras proteínas de señalización del complejo II de TNF- α , observando que estas se translocan a la mitocondria para interactuar con la región carboxilo terminal de Romo1, orientado hacia el citosol y que TNF- α induce el decremento inicial en el potencial de membrana mitocondrial inducido a través de Romo1 y este decremento es seguido de la

producción de ROS y la subsecuente inducción de la apoptosis, lo que coloca a Romo1 como un importante mediador de la apoptosis inducida por TNF- α . Romo 1 también regula el decremento temprano del potencial de membrana mitocondrial inducido por TNF- α a través de la interacción con Bcl-X_L en su región carboxilo terminal, lo que previene la apoptosis, modelo que se muestra en la Figura 4 (Kim *et al.*, 2010). Sin embargo, son necesarios estudios para elucidar el rol preciso de Romo1 en la ruta de señalización de TNF- α .

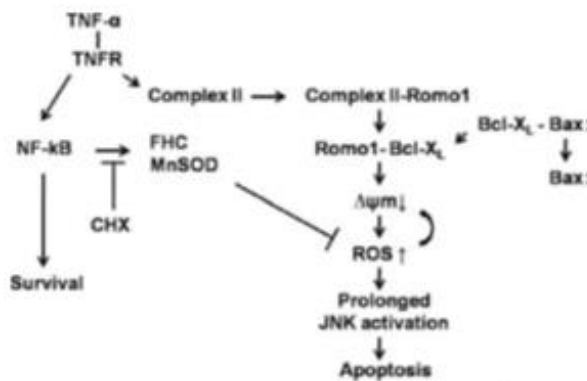


Figura 4. Modelo propuesto para la producción de ROS inducida por TNF- α a través de Romo1 y Bcl-X_L, (Kim *et al.*, 2010).

Otro papel atribuido a esta proteína es que juega un rol importante en el cambio de c-Myc. La proteína c-Myc es sobrerregulada en respuesta a las señales de crecimiento estimuladoras para disparar o iniciar la progresión del ciclo

celular. Subsecuentemente, c-Myc estimula la expresión de Romo1. Las ROS derivadas de la expresión de Romo1, entonces disparan Skp2 mediando la degradación de c-Myc en un mecanismo negativo (Lee *et al.*, 2011). Se ha observado que las ROS generadas por Romo1 están relacionadas con la progresión de tumores hacia formas más agresivas que eventualmente presentan un mal pronóstico para el paciente (Chung *et al.*, 2006).

También se ha descubierto un homólogo de Romo1: Lj-Romo1 en la lamprea japonesa (*Lampetra japonica*). La lamprea japonesa, uno de los vertebrados más

antiguos, es importante como modelo de estudios evolutivos de caracteres morfológicos sobre el origen de los craneados ya que además es el modelo científico más accesible. Este organismo se caracteriza por parasitar a los peces, adhiriéndose a ellos con su boca y extrayéndoles su sangre y fluidos corporales. Algunos compuestos en la secreción de la glándula bucal lamprea, tales como anestésicos, anticoagulantes y vasodilatadores, facilitar la alimentación de lampreas parasitarias sobre sus anfitriones. Los estudios de (Zhao *et al.*, 2013), sugieren que Lj-Romo1 se expresa ampliamente en diferentes tejidos en lampreas adultas (hígado, branquias, riñones, intestinos, corazón, músculos, glándula bucal y células sanguíneas, aunque en diferentes niveles) y que los genes que codifica a la proteína Romo1 y a Lj-Romo1 comparten más de 85% de similitud, conteniendo ambas la misma región transmembrana (22e44 aa).

La expresión de Romo1 se ha asociado con la producción de ROS en glioblastomas humanos (GBM) y tanto los niveles de RNA y proteína están frecuentemente sobre regulados en tejidos tumorales y líneas celulares derivadas de tumores comparados con tejido normal de cerebro. Con respecto a los niveles de RNAm, las células de GBM tienen niveles altos, pero contienen niveles normales del gen *romo1*, lo que sugiere que la sobreexpresión de *romo1* en GBM humano se debe a regulación transcripcional del gen. Sorprendentemente, a diferencia de otros estudios, los mayores niveles de Romo1 se localizaron en el citoplasma y estos niveles de expresión correlacionan con el grado de tumor gliál, lo que coloca a Romo1 como un blanco común de sobreexpresión durante la tumorigénesis en GBM humano, y su activación puede contribuir al progreso de

malignidad de este tipo tumoral. En esta misma serie de experimentos, se confirmó que el silenciamiento de *romo1* induce el arresto del ciclo celular a través de la activación de ERK y p27^{Kip1}, sin embargo, ellos encontraron el arresto del ciclo celular en la fase G2/ M del ciclo celular, soportado por una acumulación dramática de fosfo-cdc2 (Yu *et al.*, 2015).

Con la finalidad de investigar la relación entre los polimorfismos del gen *romo1* y el riesgo de cáncer gástrico (GC) se condujeron estudios caso-control en población china (358 pacientes con GC y 412 controles sanos), encontrando que la distribución del genotipo y del alelo de los dos polimorfismos fue significativamente diferente en pacientes con GC comparado con los controles, lo que sugiere que los polimorfismos genéticos del gen *romo1* se asocian con un riesgo significativo de GC en la población china, lo cual es incrementado si el paciente abusa del consumo de alcohol y/o cigarro y –en caso de pacientes masculinos- si se encuentra infectado por *Helicobacter pylori* (Wu *et al.*, 2015).

La anemia Fanconi (FA) es un desorden genético raro asociado con fallas en la medula espinal, inestabilidad genómica, hipersensibilidad a agentes intercalantes del DNA y acumulación de daño oxidativo a DNA, proteínas oxidadas y otras anomalías en los puntos de regulación REDOX, lo que se relaciona con disfunción mitocondrial y lo que hace que la mayoría de los pacientes de la padecen desarrollen cáncer, siendo leucemia el más recurrente. En la FA se encuentran comprometidos tanto la estructura mitocondrial como la producción de ATP, consumo de oxígeno y el potencial de membrana mitocondrial, así como altos niveles de factores promotores de Met, vía NF-κB, los cuales, se producen en

células tumorales y sirven como impulsores de la iniciación y progresión de la FA. Dadas las condiciones anteriores, (Shyamsunder *et al.*, 2015) estudiaron a Romo1, con el objetivo de comprender las bases moleculares que lo correlacionan con el control redox de Met, el contenido de ROS y la disfunción mitocondrial FA. El resultado de sus estudios indica que Romo1 podría ser un objetivo prometedor para la terapia contra el cáncer en la FA y lo sugieren como un biomarcador de la FA.

A Romo1 también se le ha asociado actividad antibacteriana. En el 2009, el grupo de investigadores dirigidos por Sha (Sha *et al.*, 2012) identificaron a una proteína homóloga a Romo1, proteína por ellos denominada hGlyrichin. Durante su investigación ellos sugieren que Romo1 tiene la capacidad de matar eficientemente a bacterias multidrogorresistentes sin efectos secundarios, tales como hemólisis, *in vitro* o *in vivo*. Por lo tanto, la proponen como sustituto prometedor para antibióticos en la lucha contra la multidrogorresistencia (MDR).

2.2. Estudios sobre Romo1 en pulmón.

La sobreexpresión de Romo1 se ha encontrado en pacientes con fibrosis pulmonar idiopática (IPF), de los cuales, el resultado de una serie de experimentos sugiere que Romo1 media la producción de ROS y apoptosis por estrés oxidante en células epiteliales pulmonares y que la expresión de esta proteína esta correlacionada con el mecanismo de apoptosis de tejidos humanos con IPF (Shin *et al.*, 2013).

En el 2014 (Kim *et al.*, 2014) estudiando si los niveles de expresión de DKK1 están relacionados en la vía de señalización para crecimiento y muerte celular, además

de resistencia a la radiación en células cancerosas de pulmón no pequeñas (“Non-Small Cell Lung Cancer” NSCLC), suprimieron DKK1 en la líneas celular A549 y la sobreexpresaron en H460, encontrando expresada a la proteína Romo1 en ambos tratamientos y que DKK1 regula negativamente su expresión. Los niveles de DKK requeridos para modular la producción de ROS vía Romo1 son diferentes en estas líneas celulares.

Se ha encontrado que la expresión de Romo1 se encuentra incrementada significativamente en tejidos tumorales de pacientes con NSCLS en comparación con tejidos no tumorales. La expresión tumoral de Romo1 se correlaciona positivamente con el suero de estos pacientes, por lo que un análisis de Romo1 en suero podría discriminar a pacientes con NSCLS de otras poblaciones, con sensibilidad y especificidad significantes, sin embargo, se desconoce el mecanismos por el cual Romo1 intracelular es detectable en el suero, la posible explicación dada por los autores, es que de alguna manera Romo1 se libere después de la muerte celular y migre hacia la circulación. El aumento en los niveles de esta proteína en pacientes con NSCLS se atribuiría –bajo la explicación anterior- al incremento de la expresión de Romo1 en el tejido pulmonar o a la alta tasa de recambio de las células cancerosas tumorales y la alta liberación resultante a la circulación. Los autores sustentan esta explicación temporal debido a que no hay cambios en los niveles de expresión de Romo1 séricas e histológicas (Lee *et al.*, 2014).

La sobreexpresión de esta proteína ha sido tomada como un predictor independiente de baja supervivencia en pacientes con NSCLC después de someterse a una resección quirúrgica (Lee *et al.*, 2015).

2.3. Estudios sobre Romo 1 relacionados con el hígado.

Investigado el papel de Romo1 en el desarrollo de invasividad tumoral en HCC, (Chung *et al.*, 2012) encontraron que la expresión de Romo1 se encuentra incrementada en células de HCC, en comparación con células fibroblásticas de pulmón humano. La expresión exógena de Romo1 en células de HCC aumentó su actividad invasiva, en comparación con las células control. El silenciamiento de Romo1 en Hep3B y Huh7 redujo su actividad invasiva en respuesta a la estimulación con 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetato. Los niveles de Romo1 se incrementaron en 63 de 95 muestras de pacientes con HCC, en los que se encontró correlación inversa entre la sobreexpresión de Romo1 y los tiempos de supervivencia de los pacientes, por lo que se propone a Romo1 como biomarcador de la progresión de HCC, que podría ser utilizado en el diagnóstico. Y se propone que los reactivos que inhiban la actividad de Romo1 y por tanto la supresión de la producción de ROS mitocondrial, podrían ser utilizados como terapias contra el cáncer.

En tejidos con HCC, Romo 1 se encuentra incrementado, lo que correlaciona positivamente con el tamaño del tumor, (Chung *et al.*, 2014, Lee *et al.*, 2015) demostraron que su expresión es requerida para mantener la actividad constitutiva nuclear de unión al DNA de NF- κ B y su actividad transcripcional a través de la fosforilación constitutiva de I κ B α . La sobreexpresión de Romo1 promueve la

translocación nuclear de p65 y su actividad de unión al DNA, en cambio el silenciamiento del gen *romo1* la formación de colonias en células HCC y la consecuente formación de tumores *in vivo*. Por lo tanto, se propone a Romo1 como uno de los principales factores reguladores en el mantenimiento de la activación constitutiva de NF- κ B en células tumorales y por tanto, al igual que en estudios anteriores, indican que podría ser utilizada como blanco en terapias contra el cáncer.

Los factores de crecimiento y citocinas incrementan los niveles celulares de las ROS mediante la activación de enzimas como NADPH oxidasa y otros factores, por lo cual en el 2012 (Chung *et al.*, 2012) se investigó la relación entre Romo1 y la invasividad celular en HCC, silenciando a *romo1* tratando a las células con TGF- β , TGF- α y HGF respectivamente, encontrando que TGF- β incrementa la actividad invasiva celular vía Romo1 y que TGF- α , EGF y HGF requieren de Romo1 para incrementar la invasividad celular en HCC.

Debido a que HCC puede ser consecuencia de un estado previo de daño en el hígado, como en el caso de NAFLD o NASH, Romo1 puede estar involucrada en la generación de HCC desde estadios previos, tal como sugiere un estudio realizado por nuestro grupo de investigación, donde se encontró que en la NAFLD generada por una dieta alta en colesterol, el gen *romo1* se encontró sobreexpresado (Gutierrez Ruiz *et al.*, 2012).

3.0. Justificación.

En los últimos años se han dado diferentes funciones a la proteína Romo1, sin darle una específica, sin embargo, la evidencia indica que esta proteína toma las ROS del complejo III de la cadena respiratoria mitocondrial y las lleva al citosol, por un mecanismo incierto. Las funciones en las que se ha identificado a esta proteína van desde su participación en el ciclo celular para permitir el paso de G1-S tanto en condiciones celulares normales y durante procesos carcinogénicos.

La evidencia indica que esta proteína debe ser estudiada ya que aunque no se le asigna un rol específico, ésta ha sido implicada en diversas patologías humanas, como en glioblastomas (cerebro) (Yu *et al.*, 2015), en cáncer gástrico (estómago) (Wu *et al.*, 2015), en anemia Fanconi (sangre) (Shyamsunder *et al.*, 2015), fibrosis pulmonar idiopática (Shin *et al.*, 2013), tumores pulmonares (pulmón) (Lee *et al.*, 2014), y en cáncer hepatocelular (HCC) (Chung *et al.*, 2012, Chung *et al.*, 2014, Lee *et al.*, 2015).

Laboratorio de Fisiología Celular de la UAM-I, se tienen antecedentes del aumento de esta proteína en ratones tratados con dieta aterogénica y con supresión génica en el receptor c-Met, del cual HGF es su ligando, por lo cual es importante determinar el efecto del HGF sobre Romo1 en ratones normales y en otro sistema (línea celular).

4.0. Hipótesis.

La proteína Romo1 se expresará mayoritariamente en órganos con mayor tasa proliferativa, en el ratón, y líneas celulares transformadas tendrán niveles más altos. La proteína HGF incrementará los niveles de esta proteína ya que induce invasión celular en etapas no embrionarias ni regenerativas.

5.0. Objetivos.

5.1. Objetivo General

- Caracterizar la expresión y contenido de la proteína Romo1 en diversos órganos del ratón CD1 y diferentes líneas celulares, así como analizar su expresión después de un tratamiento con HGF.

5.2. Objetivos particulares

- Caracterizar a Romo1 a nivel de RNAm y proteína en diferentes órganos del ratón cepa CD1 y en diferentes líneas celulares hepáticas.
- Determinar los niveles de expresión de RNAm y proteína de Romo1 después de un tratamiento con HGF en ratón.
- Diseñar, construir y evaluar el efecto de un vector para silenciar el gen *romo1*.

6.0. Material y métodos.

6.1. Aparatos y equipos utilizados en la realización de este proyecto:

Cámaras de electroforesis.

- Sub-cell GT mini (BIO-RAD).
- Wide mini-Sub cell GT (BIO-RAD).

Refrigeradores y congeladores.

- Ultracongelador REVCO Scientific Inc. -80°C.
- Ultracongelador -20°C Revco.
- Refrigerador 4°C FORMA (Thermo Scientific)

Horno de microondas.

- Horno de microondas SANYO.

Termociclador.

- Termociclador R. Corbett. (AccesoLab).

Centrífugas.

- Centrifuga GS-15R (Beckman).
- Coulter Allegra™ X-22R (Beckman).
- Centrifuga eppendorf 5415 C.

Balanzas.

- Adventurer™ (OHAUS).

- AE 200s (METTLER).

Electroporador.

- Gene Pulser Xcell™ electroporation System 165-2660 (BIO-RAD).

Espectrofotómetro.

- Nanodrop 2000c (Thermo Scientific).

Incubadora.

- Incubadora modelo 3110 (Forma Scientific Inc.).

Campana para cultivo celular.

- Steril GARD (The Baker Company).

Microscopio.

- Campo claro, Axiovert 25 zeiss.

Potenciómetro.

- Potenciometro PWR RS 232 (Beckman).

Concentrador de muestras.

- Speed Vac® plus SC210A
(Savant).

6.2. Organismos utilizados

6.2.1. Ratón de la cepa CD1.

Es un una cepa de fácil manejo, albino, ideal como modelo de estudios multipropósito generales que puede ser usado en toxicología (evaluando seguridad y eficacia), envejecimiento, oncología y como modelo quirúrgico (<http://www.criver.com/>).

6.2.2. Cepa bacteriana: *Escherichia coli* DH5a.

La cepa es utilizada normalmente en experimentos de transformación pues contiene un genotipo *recA* (evita la recombinación del plásmido con el DNA bacteriano), el DNA introducido a esta cepa no se metila, y aunque su eficiencia de transformación no es muy alta: 1×10^6 , provee de buena calidad al plásmido extraído. Entre sus características más útiles está la de poseer una deleción en el gen Z del operón lac, que hace que se puedan seleccionar fácilmente con ella aquellos transformantes que posean un plásmido capaz de originar la α -complementación de dicha mutación.

6.2.3. Líneas celulares

Durante el desarrollo del proyecto se realizó la caracterización de diferentes líneas celulares epiteliales en función de la proteína Romo1.

- AML12 (ATCC® CRL-2254™): células epiteliales adherentes, derivadas de tejido hepático sano de *Mus musculus* (ratón macho, de tres meses) de la cepa CD-1, transgénica para TGF α humana, por lo que expresa altos niveles de TGF α humana y pocos de la de ratón. Esta línea no es tumorigénica.
- CFSC-2G: Esta línea fue donada por el Dr. Marcos Rojkind, no es una línea celular comercial. Estas células son epiteliales adherentes derivadas de células estelares hepáticas de rata, cuyo fenotipo es similar a las células estelares hepáticas recién aisladas. No metabolizan en etanol.
- RIN-m5F (ATCC® CRL-11605™): células epiteliales adherentes, derivadas de células beta pancreáticas, de islotes de Langerhans con insulinoma de

Rattus norvegicus (rata macho), producen y secretan insulina, y producen L-dopa-descarboxilasa.

- HepG2 (ATCC® HB-8065™): Células adherentes, derivadas de tejido epitelial de hígado humano: Hepatocarcinoma, de varón de 15 años, caucásico. Estas células son ideales para realizar transfecciones, y es una línea considerada no tumorigénica (<http://www.atcc.org/>).

6.3. Preparación de células *E.coli* competentes.

6.3.1. Preparación de *E.coli* electrocompetentes.

Se sembró células *E.coli* en una caja con medio LB-agar, se incubó a 37°C por 16 h y de las colonias resultantes se eligió una, la cual se inoculó en 50 ml de medio LB líquido y se incubó a 400 rpm de 16-20 h. Del cultivo resultante se tomaron 2.5 ml y se inocularon en 250 ml de medio LB líquido y se incubaron de 2-4 h a 150 rpm a 37°C hasta obtener una densidad de 0.5-0.6 a 600 nm, posterior a las 2 horas se midió cada 20 min. Una vez alcanzada la densidad, se pasó el cultivo a hielo, a partir de este punto se trabajó en hielo y las centrifugaciones se realizaron a 4°C. El cultivo se agitó lentamente durante 10 minutos y se centrifugó a 4500 rpm durante 10 minutos, el sobrenadante se decantó y la pastilla celular se resuspendió en 5 ml de H₂O helada y estéril, se aforó a 50 ml. Se centrifugó a 4500 rpm durante 10 minutos y una vez decantado el sobrenadante, el botón celular se resuspendió en 20 ml de glicerol al 10% (v/v) helado. Se realizó una última centrifugación a 4500 rpm durante 10 minutos, después de la cual se resuspendió en 2 ml de glicerol al 10% (v/v). Por otro lado, se enfriaron tubos eppendorf en N₂ líquido y en estos se repartieron 100 µl de cultivo. Las alícuotas con las *E.coli* electrocompetentes se conservaron en ultracongelador, a -70°C hasta su uso.

6.3.2. Preparación de *E.coli* ultracompetentes.

Se sembró células *E.coli* en una caja con medio LB-agar, se incubó a 37°C por 16 h y de las colonias resultantes se eligieron entre 10-12 grandes, las cuales se inocularon a 18°C en 100 ml de medio LB líquido en un matraz de 2 L con agitación vigorosa hasta obtener una densidad de 0.6-0.9 a 600 nm. Una vez

alcanzada la densidad, el matraz se pasó al hielo. El cultivo se centrifugó a 7500 rpm durante 10 min, se decantó el sobrenadante y la pastilla celular se resuspendió en 80 ml de solución TB (10mM PIPES, 15 mM CaCl₂, 250 mM KCl, pH 6.7, filtrada en poro 0.45 µm) helada y estéril, y se dejó en hielo durante 10 min. Después se centrifugó a 3000xg durante 10 min, el sobrenadante se decantó y la pastilla celular se resuspendió en 20 ml de solución TB, se le agregaron 1.4 ml de DMSO y se homogenizó la mezcla suavemente. Se enfriaron tubos eppendorf en N₂ líquido y en estos se repartieron 100 ul de cultivo. Las alícuotas se conservaron en ultracongelador, a -70°C hasta su uso

6.4. Transformación bacteriana

6.4.1. Transformación por Electroporación.

Se descongelaron las células competentes en hielo, así como el tubo conteniendo el ADN a electroporar. Una vez descongeladas las células, se mezclaron con 10 pg – 25 ng del ADN a transformar (contenido en un volumen de 1 a 2 µl) y se incubaron en hielo durante 60 seg. Se pipeteó la mezcla de células/ADN en una cubeta de electroporación fría, asegurándose de que esta suspensión quedara en el fondo de la cubeta. Se secó la condensación y la humedad del exterior de la cubeta, para colocarla en el electroporador. Se aplicó un pulso de electricidad de 20 µF de capacitancia, 2.5 kV y 200 ohm de resistencia. El aparato debe registrar un tiempo de 1-4 msec con una fuerza de campo mínima de 8.5 kV/cm para asegurarnos que la transformación hubiera ocurrido. Inmediatamente después del pulso, se retiró la cubeta de electroporación y se agregó 1 mL de medio LB a temperatura ambiente, las células electroporadas se incubaron a 150 rpm durante 1.5 h a 37 °C y después se plaquearon en cajas con medio LB-agar con el antibiótico apropiado para la selección manteniendo las cajas a temperatura ambiente hasta que el líquido fue absorbido. Las cajas fueron incubadas en posición invertida a 37 °C. Las transformantes aparecieron en 12-16 horas.

6.4.2. Transformación por choque térmico.

A un tubo de células competentes, se adicionó no más de 50 ng de DNA a transformar, contenido en un volumen no mayor de 10 ul. Se mezcló el contenido

gentilmente y se colocaron los tubos en hielo durante 30 min. Se dio un choque térmico a 42°C, durante 2 minutos y al terminar, inmediatamente se transfirió a un baño de hielo durante 2 minutos. Inmediatamente después se adicionó 1 mL de medio LB a cada tubo y se incubó durante 1 hora a 37 °C con agitación gentil (50 ciclos/min o menos) para permitir que la bacteria recupere y exprese el marcador de resistencia al antibiótico codificado por el plásmido. Se transfirieron 200 ul por placa de 90 mm en medio LB-agar con el antibiótico apropiado a temperatura ambiente hasta que el líquido fue absorbido. Las placas se incubaron a 37°C.

6.5. Extracción de DNA plasmídico.

6.5.1. Lisis alcalina.

Las células transformantes se sembraron en 10 mL de medio LB líquido con 10 uL de ampicilina y se incubaron a 37° C toda una noche en agitación vigorosa. Se centrifugaron 1.5 ml de cultivo durante 2 minutos a 14.000 rpm (cantidad para 1 reacción). El sobrenadante se desechó y el pellet se resuspendió con ayuda del vortex en 200 ul de solución 1 (10 mM EDTA pH 8.0, 50 mM glucosa, 25 mM Tris-HCl pH 8.0), hasta la homogeneidad. A esta mezcla se le adicionó 200 ul de solución 2 (preparada al momento: Para 500 ul: 400 de H₂O, 50 ul de SDS 10%, 50 ul de NaOH 2N (2M)) mezclando por inversión hasta que el lisado quedó claro. Se agregaron 200 ul de solución 3 (acetato de potasio 5M, ácido acético glacial y H₂O destilada), se mezcló por inversión y se dejó en hielo durante 5 minutos. Se centrifugó durante 10 minutos a 14.000 rpm para bajar los restos celulares y cromosomas. El sobrenadante se transfirió a un tubo limpio adicionándole 300 ul de cloroformo (para precipitar proteínas), se mezcló bien por inversión y se centrifugó durante 2 minutos a 14,000 rpm. El sobrenadante se transfirió a otro tubo, adicionándole 2 volúmenes de etanol absoluto, mezclando por inversión y dejando a temperatura ambiente durante 5 minutos, enseguida se centrifugó durante 10 minutos para bajar el DNA. El sobrenadante se decantó, secando el tubo lo mejor posible y se agregó 1 volumen de etanol al 70%, esta mezcla se centrifugó durante 3 minutos a 14.000 rpm y se desechó el sobrenadante. La

pastilla de DNA se secó a temperatura ambiente y se resuspendió en 20-30 ul de agua estéril.

6.5.2. Extracción por kit PURE YIELD™ PLASMID MINIPREP SYSTEM.

Las células transformantes se sembraron en 10 mL de medio LB líquido con 10 uL de ampicilina y se incubaron a 37° C toda una noche en agitación vigorosa. A 1.5ml de este cultivo se agregó 100µl de buffer de lisis celular y se mezcló por inversión 6 veces. Después se le agregó 350µl of Solución de Neutralización fría (4–8°C) y se mezcló por inversión del tubo hasta que la mezcla quedó homogénea. La mezcla se centrifugó a 14 mil rpm por 3 minutos y su sobrenadante (~900µl) se transfirió a una mini columna (PureYield™ Minicolumn) sin remover el botón celular, este se centrifugó a 14 mil rpm por 15 segundos. Después de lo cual se descartó el sobrenadante y se colocó la minicolumna dentro del mismo tubo colector. Se agregaron 200µl de la solución de eliminación de endotoxinas o ERB (Endotoxin Removal Wash) a la mini columna. Esta mezcla se centrifugó a 14 mil rpm por 15 segundos y se le agregaron 400µl de solución de lavado de columna o CWC (Column Wash Solution) a la mini columna, centrifugando de nuevo por 30 segundos. La mini columna se transfirió a un tubo de micro centrifuga estéril de 1.5 mL y se le agregaron 30µl de Buffer de elución (Elution Buffer) o agua libre de nucleasas directamente a la matriz de la mini columna, incubando a temperatura ambiente por 1 minuto, después de lo cual se centrifugó por 15 segundos para obtener el DNA plasmídico, que se almacenó a -20°C.

6.6. Medios de cultivo.

6.6.1. Medio de cultivo para *Escherichia coli*: Medio Luriabertani (LB) líquido.

Se utilizó el medio Luria Bertani (LB broth L 3022, Sigma) de crecimiento bacteriano, ideal para cultivar y crecer rápidamente a *E.coli* pues contiene péptidos, aminoácidos, vitaminas solubles en agua y carbohidratos en una formulación baja en sales. Está compuesto por triptona 10g/L, extracto de bacteria

5 g/L y NaCl 5 g/L. La triptona y el extracto bacteriano proporcionan factores de crecimiento esenciales que de otra forma tendría que sintetizar *E.coli*, el medio también contiene electrolitos esenciales para el transporte y balance osmótico debido al NaCl.

Para su preparación, se disolvieron 20 g de medio en polvo por litro de agua, se esterilizó en autoclave durante 15 min a 120°C.

6.6.2. Medio de cultivo para *Escherichia coli*: Medio Luria Bertani (LB) con agar.

Se utilizó el medio Luria Bertani con agar (LB broth L 2897, Sigma), el cual contiene los mismos componentes nutritivos que el medio sin agar. La adición de agar provee de un medio sólido para el crecimiento bacteriano y la elección de clonas, el medio contiene 15g/L de agar.

Para su preparación, se disolvieron 35 g de medio en polvo por litro de agua, se esterilizo en autoclave durante 15 min a 120°C. Se distribuyó en placas Petri y se dejó solidificar. Las cajas se almacenaron a 4°C y se atemperaron antes de su utilización.

6.6.3. Medio de cultivo para líneas celulares.

Se utilizó el medio E de Williams (Sigma, catalogo # W4125), el cual contiene sales inorgánicas, aminoácidos, vitaminas, D-glucosa, glutatión reducido, metillinoleato, rojo fenol, acido pirúvico, L-glutamina y NaHCO₃. Este medio es ideal para cultivas líneas celulares derivadas células epiteliales de hígado. El medio se suplementó con antibióticos y suero fetal bovino como se menciona más adelante.

6.7. Suplementos a medios de cultivo.

6.7.1. Antibióticos suplementados para la selección de transformantes.

Se empleó Ampicilina (SIGMA) para la selección de transformantes y el mantenimiento del plásmido con resistencia a éste. El stock se preparó en una

concentración de 100 mg/mL. Se esterilizó por filtración, al emplear membranas de 0.20 mm de poro marca Millipore. Se guardó en alícuotas de 500 mL a -20°C. Cuando se requirió, el medio LB fue suplementado con Ampicilina en una concentración de 100 mg/mL en medio a temperatura ambiente, ya fuera LB-agar o líquido.

6.7.2. Suplementos a medios de cultivo para líneas celulares.

Al medio de cultivo celular se adicionó al 1% con la solución Antibiotic-Antimycotic (Gibco®), para prevenir la contaminación fúngica y por bacterias. La solución contiene 10,000 unidades/mL de penicilina, 10,000 µg/mL de estreptomina, y 25 µg/mL del antimicótico Fungizone®. La penicilina y estreptomina previenen la contaminación bacteriana contra Gram positivas y negativas al cultivo celular. El antimicótico previene de la contaminación por hongos ya que inhibe el crecimiento de hongos multicelulares y bacterias. También se adicionó suero fetal bovino al 10% (GE Healthcare Life Sciences, Catalogo # SH30071.03). Al medio Williams con estos suplementos se le llamará medio completo.

6.8. Condiciones de cultivo

6.8.1. Condiciones de cultivo celular bacteriano.

Las bacterias se incubaron a 37°C y agitación a 240 rpm para su crecimiento en medio líquido hasta alcanzar la fase exponencial (amplificación para extracción del DNA plasmídico) a las 16 h y a 37°C sin agitación toda la noche (16 h) cuando el crecimiento fue sobre placas de LB-agar.

6.8.2. Condiciones de cultivo de líneas celulares.

Se utilizó medio de cultivo Williams completo a temperatura ambiente. Las células se sembraron en botellas de cultivo de plástico estériles (Corning, Acton, MA, EUA). El medio de cultivo se cambió cada tercer día. Las células se resembraron a una dilución 1:3 una vez por semana, levantándose con tripsina-EDTA al 0.25%. El cultivo se mantuvo con una atmósfera de 5% de CO₂ y 90% de humedad, a una temperatura de 37°C.

6.9. Software utilizado.

- Para el diseño de primers para determinar expresión se requiere del programa ApE (disponible de forma gratuita en el sitio <http://biologylabs.utah.edu/jorgensen/wayned/ape/>) y la Herramienta OligoEvaluator de Sigma Aldrich (<http://www.oligoevaluator.com>).
- Para el diseño de primers de silenciamiento se requirió de la herramienta online shRNA Sequence Designer de Clontech ubicado en: <http://bioinfo.clontech.com/rnaidesigner/oligoDesigner.do?overhangs=on&restrictionSite=on>
- La secuencia del gen *romo1* se obtuvo del acceso al GenBank: NM_001164216.1, ubicado en la página de NCBI (National Center for Biotechnology Information; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).
- Para el análisis densitométrico de las imágenes resultantes de inmunoblots y RT-PCRs realizados se utilizó el programa ImageJ y Excel.
- Para realizar estadística se ocupó el programa GraphPad prism6 versión 6.01.

6.10. Vectores plasmídicos:

6.10.1. Vector de silenciamiento pSingle-tTs-shRNA (pSingle).

Este vector comercial de Clontech (mostrado en la figura 5), tiene las siguientes características: este plásmido es de alto número de copias y confiere resistencia a ampicilina, característica usada como marcador selectivo de crecimiento bacteriano. El plásmido pSingle, tiene un peso de 6990 pb, con un sitio de clonación flanqueado por los sitios de corte para las enzimas *HindIII* y *XhoI*. Su expresión transcripcional está controlada por un supresor transcripcional (tTs) potente e inducible por tetraciclina y sus derivados. En ausencia de esta última, el tTs se une a las secuencias tetO y bloquea la expresión del shRNA. El sistema de silenciamiento de pSingle se compone de dos partes importantes 1) un promotor/enhancer que controla la expresión de proteínas reguladas por tetraciclina y 2) un cassette de expresión de shRNA inducible por tetraciclina, el cual es un supresor transcripcional fuerte, creado por la fusión de la proteína

supresora (TetR) con un dominio transcripcional de silenciamiento KRAB. La RNA polimerasa III (Pol III), inducida por tetraciclina, fue creada por la unión de un elemento de respuesta Tet que consiste en 7 repeticiones directas del *tetO* 19-mer del operón tet, a un promotor pequeño promotor del snRNA U6. La figura 5 muestra la estructura del vector pSingle y sus características más importantes en cuestión de funcionalidad.

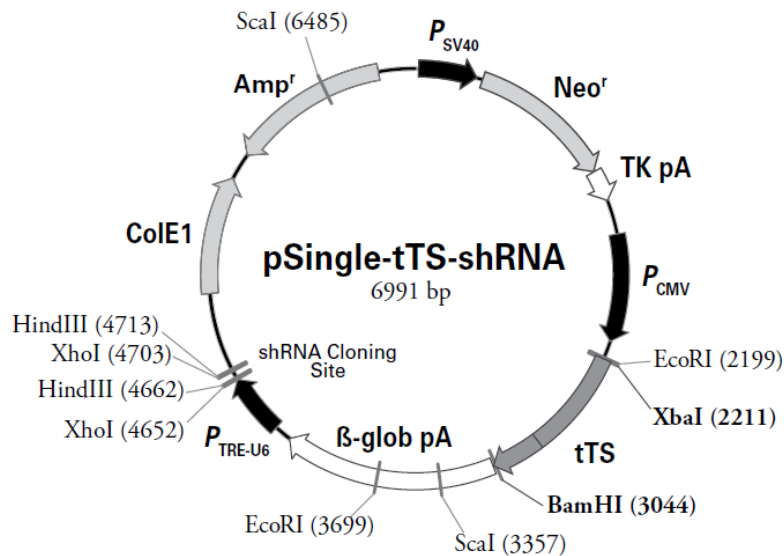


Figura 5. Imagen representativa del vector pSingle. En el esquema se pueden observar el promotor P-TRE-U6, seguido del sitio de corte para insertar al DNAd que formará al shRNA. También se puede observar el sistema de silenciamiento controlado por tetraciclina tTS, (Clontech).

6.11. Diseño de primers

6.11.1. Diseño de primers de silenciamiento del gen *romo1*.

El diseño de primers se realizó tomando un fragmento de la región codificante de 240 pb del gen *romo1* (GenBank: NM_001164216.1, NCBI). A partir de estas pb seleccionadas (blanco o target (en inglés)), se tomó en cuenta el software shRNA Sequence Designer de Clontech (disponible en la web) para poder diseñarlos.

Es necesario sintetizar dos primers complementarios (cadenas sentido y antisentido) por cada sitio blanco (target). La figura 6 ilustra la estructura de los primers una vez hibridados:

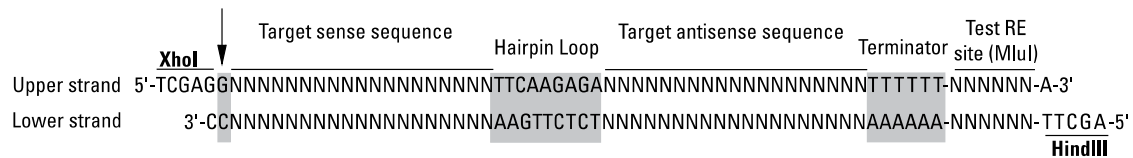


Figura 6: Estructura general de los primers de silenciamiento hibridados. En cada extremo 5' contiene los sitios de restricción *XhoI* y *HindIII* respectivamente. Un sitio de G al extremo 5' de la secuencia blanco. Una secuencia corta del gen a silenciar y una secuencia de poliA.

Estos primers son diseñados de manera diferente a los convencionales y se tomaron en cuenta los siguientes puntos:

1. Un sitio de restricción sobresaliente en el extremo 5' en la cadena sentido (se muestra como upper strand en la figura 6), y un sitio de restricción sobresaliente en el extremo 5' de la cadena antisentido (lower strand) para la enzima *HindIII*.
2. Un residuo de guanina agregado corriente arriba del extremo 5' del "target" en la cadena sentido, si el blanco no inicia con una purina (es el sitio de inicio de la transcripción preferida por la Pol III).
3. De 19 a 21 pb de secuencia blanco (del gen a silenciar).
4. De 7 a 9 nucleótidos de secuencia para formar el bucle en horquilla; el software tiene predefinidas varias).
5. La secuencia antisentido de la secuencia blanco.
6. Un terminador de secuencia para la RNA Pol III, que consiste entre 5 a 6 nucleótidos de timina (poli-T).
7. Se recomienda (no esencial) un sitio de corte para la enzima *MluI*.
8. Finalmente, un residuo de adenina para completar el sitio de corte de la enzima *HindIII*.

Una vez que los primers se hibridan y clonan dentro del vector pSingle, la maquinaria transcripcional generará un transcrito que se plegará y formará en shRNA, quien será el responsable de iniciar el proceso de silenciamiento.

Para este trabajo se diseñó el siguiente juego de primers de silenciamiento:

Romo1-sil-fwd: 5'-TCG AGG GCC ATT GGA ATG GGC ATA TTC AAG AGA TAT
GCC CAT TCC AAT GGC CTT TTT A-3'.

Romo1-sil-Rvs: 5'- AGC TTA AGG CCA TTG GAA TGG GCA TAT CTC TTG AAT ATG CCC ATT CCA ATG GCC C-3'.

6.11.2. Diseño de primers de expresión de la cds de romo1.

Se diseñaron dos juegos de primers de expresión de *romo1* para determinar la expresión de *romo1* mediante RT-PCR.

Tabla1: Primers diseñados para el silenciamiento y determinación de la expresión del gen *romo1*.

Nombre del primer	Secuencia de 5' -3' .	Amplicón
Romo1-1-fwd	AAGGATCCGGGCCGGTGGCCG	240 pb (todo la cds del gen)
Romo1-1-rvs	TTGAATTCTTAGCATCGTATGCCCATTC CAATGGCC	
Romo1-2-fwd	TGTCTCAGGATCGGAATGCG	91 pb
Romo1-2-rvs	GCCATGAAAGTGCCAAACGTG	

6.12. Alineamiento de primers de silenciamiento.

Los primers se diluyeron a 100 µM en agua destilada estéril (grado biología molecular) y se realizó una mezcla de alineamiento (9 µl de Romo1-s, 9 µl Romo1-as, 2 µl de Buffer de alineamiento 10X). El ciclo de temperaturas para el alineamiento se realizó por medio de una sucesión de decrementos de temperatura de dos partes, de la manera siguiente:

Primera parte: 95°C, 78°C, 74°C, 70°C, 67°C, 63°C, 60°C, 56°C, 53°C, 50°C, 48°C, 46°C, 44°C, 42°C, 40°C, 39°C, 37°C, 36°C, 35°C, 34°C, 33°C, 32°C, 31°C-----
---5 minutos en cada paso.

Segunda parte: 30°C, 28°C, 24°C, 22°C, 20°C-----10 minutos en cada paso.
Para esta etapa, se obtuvieron los primers alineados y el vector linearizado, listos para su ligación,

6.13. Clonación de los primers alineados dentro de pSingle.

Después del alineamiento de los primers, la mezcla de reacción de diluyó 50x para clonarse dentro del vector pSingle linearizado y con los sitios de corte específicos

complementarios a los de los primers alineados. La ligación del vector con el inserto se realizó utilizando T4 DNA ligase (Promega) en la reacción de ligación (2 µl pSingle lineal, 2 µl Primers alineados, 1 ul de buffer de ligación 10X, 1 ul Ligasa (1 unidades/ul) y H₂O a un volumen final de 10 ul). La mezcla se dejó a 4°C toda la noche.

6.14. Secuenciación.

La construcción de silenciamiento se secuenció por PCR en tiempo real mediante un secuenciador automático de DNA, ABI PRISM 3100 Avant (Applied Biosystems) en el Laboratorio Divisional de Biología Molecular de la UAM-I. El inicio la de secuenciación se marcó por la secuencia Sing-Tet-U6-R, que va de 4999–4967 pb (5'-GAAGC GGAAG AGCGC CCAAT ACGCA AACCG CCT-3'). El análisis de los resultados de la secuenciación se realizó en el programa ApE.

6.15. Transfección e inducción del silenciamiento.

- La transfección de la construcción de silenciamiento, así como de los vectores vacíos se realizó en células Rinm5f en fase de crecimiento exponencial en platos de 6mm. Se cambió a medio sin suero al menos 5 horas antes de realizar la transfección. Antes de la transfección se esterilizó la construcción y el vector vacío (control) para eliminar los riesgos de contaminación por nucleasas, proteínas o bacterias, calentando a 80°C durante 20 minutos en el termociclador. Para la transfección se agregaron 2ml de medio Opti-MEM® en 4 tubos falcon de 15 ml y en dos de ellos se agregó cada muestra de DNA de 0.8-1 ug. A los dos restantes se les agregó 40 ul de Lipofectamine® 2000 (Thermo Fisher Scientific) y estas mezclas se dejaron incubar por 5 minutos. Después se juntó el medio medio Opti-MEM® con lipofectamina y el medio Opti-MEM® -DNA para formar el complejo DNA-lipofectamina, se incubó por 20 minutos. Por último se sustituyó el medio sin suero de las células por el medio Opti-MEM® con el complejo DNA-lipofectamina, se homogenizó por movimiento e incubó por 24 horas, después de las cuales se indujo el silenciamiento agregando doxiciclina 1 µg/ml.

6.16. Extracción de proteína para Western blot.

Posterior al tiempo del tratamiento, las células se lavaron dos veces con PBS frío y después se agregaron 200 μ l de PBS frío y las células fueron despegadas usando un gendarme estéril, la suspensión celular se centrifugó a 2000 rpm durante 15 minutos a 4°C, se recuperó el sobrenadante y se le agregó de 30-60 μ l de buffer de lisis celular Rippa adicionado con 0.01% de ácido desoxicólico dependiendo del tamaño del botón celular. Para completar la lisis, la suspensión celular fue agitada 15 segundos cada 5 minutos durante media hora, manteniendo en hielo. Para obtener la proteína, la suspensión se centrifugó a 3000 rpm durante 10 minutos, se recuperó el sobrenadante y la proteína se alicuoteó y cuantificó mediante Nanodrop 2000c (Thermo Scientific).

6.17. Western blot de Romo1.

Para determinar la expresión de Romo1, se utilizaron 100 μ g de proteína, la cual se separó por electroforesis en geles de poliacrilamida al 15% en presencia de SDS al 0.1%, usando un voltaje de 120 V durante 1.5 horas. Posteriormente la proteína se transfirió a una membrana PVDF durante 1 hora en transferencia húmeda a 120 V. La membrana fue bloqueada con leche descremada al 5% en TBS-Tween durante 1 hora en agitación suave y constante. Para la detección de la proteína, la membrana se incubó con el anticuerpo primario Anti-ROMO1 TA505611, Clon OTI5G8 (Origene) 1:2,000 diluido en TBS-Tween, durante toda la noche en agitación suave y constante a 4 °C, tiempo después del cual se lavó 2 veces con TBS-Tween por 15 minutos y se incubó con el anticuerpo secundario antimouse acoplado a peroxidasa (Amersham™ ECL™ Anti-Mouse IgG, Horseradish PeroxidaseLinked Species-Specific Whole Antibody (from sheep) 1:8000, diluido en TBS-Tween. Después se lavó 2 veces más en TBS-Tween por 15 minutos. La membrana se reveló con 2 ml de sustrato luminiscente (SuperSignal® West Pico Substrate, Pierce). Como control de carga se marcó actina (santa cruz sc-13065 42 kDa). Las bandas se cuantificaron por densitometría usando el programa ImageJ (NIH).

6.18. Extracción de RNA.

La extracción de RNA total se obtuvo mediante TRIzol® reagent (Thermo Fisher Scientific), siguiendo el protocolo del reactivo sin modificaciones. En el caso de tejidos para realizar la extracción se homogenizaron de 50-100 mg de tejido, al cual se le agregó 1 ml de Trizol. Para el caso de cultivo celular, se agregó 1 ml de Trizol por cada 10cm² directo a las células (previamente lavadas con PBS), las células se pipetearon por pipeteo continuo. La mezcla se incubó 5 minutos a temperatura ambiente, tiempo después del cual se agregaron 0.2 ml de cloroformo y se homogenizó vigorosamente por 15 segundos. Se incubó la mezcla 2 minutos a temperatura ambiente y después se centrifugó a 12000xg por 15 minutos a 4°C. Se recuperó la fase acuosa en otro tubo y se agregó 0.5 ml de isopropanol, se incubó por 10 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó a 12000xg por 10 minutos a 4°C. Se eliminó el sobrenadante y se lavó el pellet con 1 ml de etanol al 75%. La mezcla se agitó brevemente y se centrifugó a 7500xg por 5 minutos a 4°C. Se eliminó el sobrenadante y el pellet de RNA se secó parcialmente y se solubilizó con agua DEPC. Las muestras se mantuvieron a -70°C hasta su uso.

6.19. Electroforesis en geles con formaldehído para determinar la integridad de RNA

Por cada 100 mL de solución de agarosa se necesitaron de 1.2 g de agarosa + 87 mL de agua (destilada estéril), la mezcla se fundió al microondas. Entre 50-55°C, se le agregaron 10 mL de MAE 10X. En la campana de extracción, se le agregaron 3 mL de formaldehído al frasco. Tras gelificación, se colocó dentro del tanque de electroforesis buffer MAE 1X. Se colocaron 1:1 las muestras de RNA/Buffer de carga para RNA (formamida, formaldehído, MAE10X, glicerol 80%, azul de bromofenol y Gelred), se colocaron dentro de cada pocillo y se corrió el gel 1 hora a 100 V. Las bandas se visualizaron con la luz ultravioleta, en el fotodocumentador, donde también se tomó la foto correspondiente a cada gel.

6.20. Electroforesis en geles de agarosa.

Para separar fragmentos de ADN, para su análisis o posterior extracción, se ocuparon corrieron las muestras en geles de agarosa 1%, para un gel de 40 mL.

Se pesaron 0.40 gr. de Agarosa y se diluyeron con 40 ml de TBE 0.5X, la mezcla se calentó en microondas hasta que se diluyó completamente, se dejó enfriar un poco y se agregó al molde de electroforesis alineado e inmediatamente se agregó el peine adecuado. Una vez gelificada la agarosa, se agregó el molde a la cubeta de electroforesis y se rellenó con buffer de corrida TBE 0.5X. Para cargar las muestras, se ponen 2 μ L de LB 6X con 5 μ L de muestra de DNA y se utilizó el marcador de peso molecular GeneRuler™ 1kb DNA ladder (Thermo Scientific). Se corrió el gel 1-1.5 horas a 80 V. Para observar las bandas correspondientes al DNA, después de la electroforesis, se puso el gel en un recipiente de plástico y se cubrió completamente con el reactivo Diamond™ Nucleic Acid Dye (Promega) 1:10,000 en TBE 1X, protegiendo de la luz, en agitación suave y constante por 30 minutos. Las bandas se visualizaron con la luz ultravioleta, en el fotodocumentador, donde también se tomó la foto correspondiente a cada gel.

6.21. Purificación de vectores, cds's y genes directo de gel de agarosa

Después de la electroforesis, se visualizaron las bandas con luz ultravioleta y se cortaron las bandas de interés, se pusieron en un tubo eppendorf de 1.5 ml, a los cuales se agregaron 10 μ l de solución de unión a membrana por cada 10mg de gel, esta mezcla se agitó por vortex y se incubó a 50–65°C hasta que el gel se disolvió completamente. Por otro lado, se insertó una Minicolumna SV dentro de un tubo colector. Se transfirió el gel disuelto a la Minicolumna y se incubó a temperatura ambiente por 1 minuto, después del cual se centrifugó a 16,000 \times g por 1 minute. Se desechó el sobrenadante y se agregaron 700 μ l de solución de lavado de membrana (adicionada con etanol), la mezcla se centrifugó a 16,000 \times g por 1 minuto. Se repitió el lavado con 500 μ l de solución de lavado de membrana y centrifugando 5 minutos. Se vació el tubo colector y se centrifugó la columna por un minuto con la tapa de la centrifuga abierta para eliminar rastros de etanol. La columna se transfirió a un tubo de centrifuga estéril y se le agregaron 50 μ l de H2O libre de nucleasas, incubando durante 1 minuto y centrifugando a 16,000 \times g por 1 minuto. El DNA recuperado se guardó a -20°C hasta su uso.

6.22. RT-PCR.

Para determinar cambios en la expresión génica de *Romo1* y de la *GADPH* se realizó RT-PCR con el kit SuperScript® III One-Step RT-PCR System with Platinum® Taq DNA Polymerase. Los ciclos fueron los siguientes:

1 ciclo - 55°C por 30 minutos

1 ciclo - 94°C por 2 minutos

45 ciclos - 94°C por 15 segundos.

58.1 °C por 30 segundos

68.1 °C por 1 minuto

1 ciclo - 68°C por 5 minutos.

Para amplificar a EGFP s se realizó PCR con el kit SuperScript® III First-Strand System for RT-PCR con Taq DNA Polimerasa. Los ciclos fueron los siguientes:

PCR: 1 ciclo - 95°C por 3 minutos

35 ciclos - 94°C por 30 segundos.

60°C por 50 segundos

72 °C por 1 minuto

1 ciclo - 72°C por 5 minutos

6.23. Tratamientos con HGF

Para tratar a línea celular, se tomaron células en fase de crecimiento exponencial en cajas de 6mm en medio sin suero, al cual se le agregó HGF (Peprotech) a 50 ng/ml.

En el caso de los ratones, se trató a ratones CD1 con HGF 20 ug/kg, diluido en PBS tibio y estéril.

7.0. Resultados

7.1.0. Estudio de la expresión de Romo1 en el ratón.

La proteína Romo1, como reguladora de ROS celular, tiene un papel importante en diversos órganos humanos, tal como se ha mencionado en la bibliografía. Para determinar los niveles basales de ROMO1 en diversos órganos del ratón CD1, se extrajo RNA total y proteína de varios órganos, tal como lo muestra la figura 7.

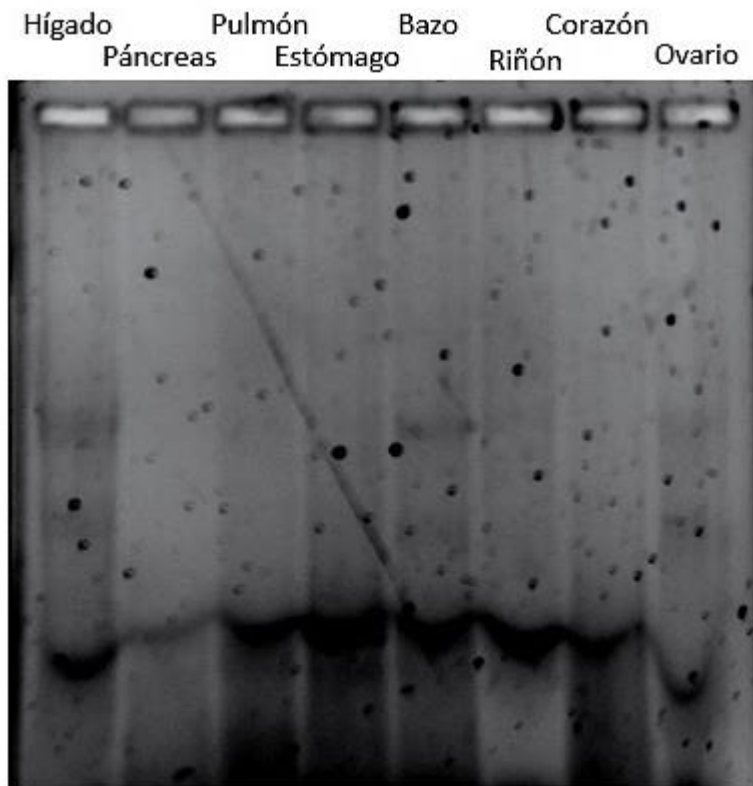


Figura 7: Integridad del RNA usado en el análisis por RT-PCR. Gel de agarosa al 1% con formaldehído que muestra el resultado de la integridad de diversas muestras de RNA extraídas de ratón de la cepa CD1.

7.1.1. RT-PCR para la obtención de *romo1*.

Para determinar la expresión génica de *romo1*, se realizaron ensayos de RT-PCR mediante un gradiente de temperaturas para obtener la óptima de alineamiento. Los ensayos se realizaron con los dos juegos de primers disponibles para *romo1*. En el caso del primer juego de primers, que flanquean 240 pb, se encontró que la temperatura óptima de alineamiento fue de 57.7°C, tal como se muestra en los recuadros rojos de la figura 8, donde se observan bandas fuertes y bien definidas, lo que implica una buena amplificación a la temperatura anterior, por lo cual se ocupó en los experimentos posteriores. En el caso de la amplificación de 91 pb de este gen, ocupando el segundo juego de primers, resultó que las temperaturas óptimas fueron de 55.3 y 57.7, por lo que se eligió usar 55.7 en adelante, tal como se muestra en la figura 9.

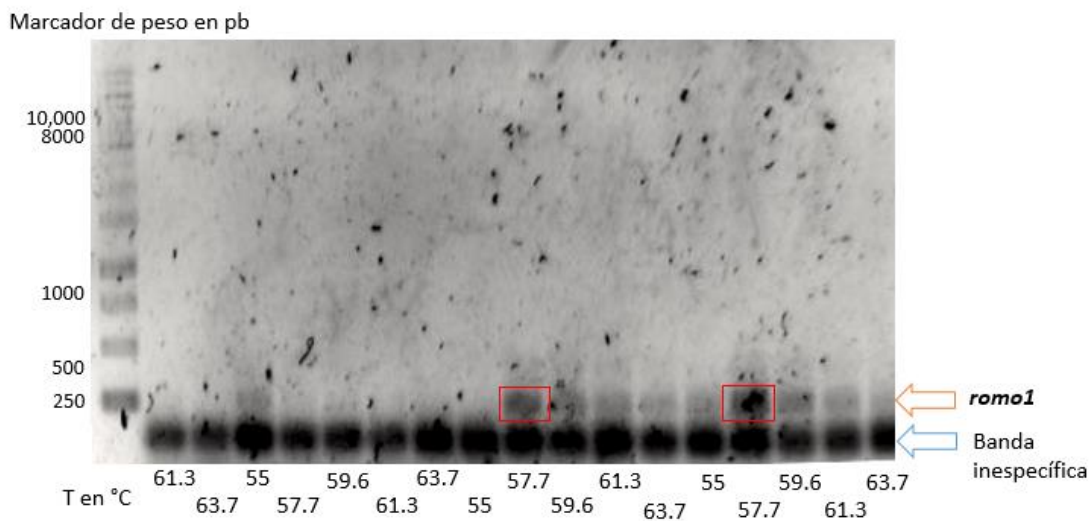


Figura 8: Gel de agarosa al 1% que muestra el resultado del gradiente de temperaturas de alineamiento en PCR para determinar la temperatura óptima de obtención de *romo1* utilizando el primer juego de primers, que amplifica para 240 pb. En el recuadro rojo se muestran las bandas correspondientes a *romo1* que amplificaron mejor, ambas en una temperatura de 57.7 °C, la cual se utilizó para amplificar a *romo1* en adelante.

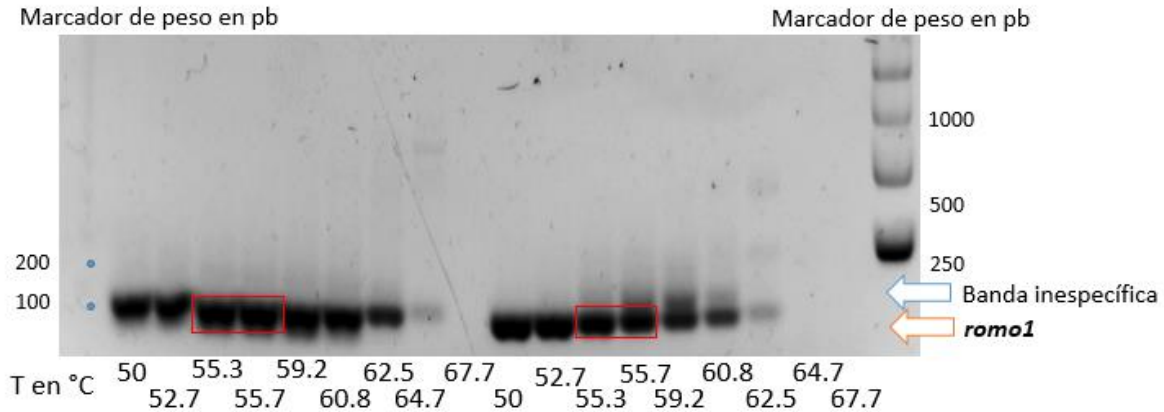


Figura 9: Gel de agarosa al 1% que muestra el resultado del gradiente de temperaturas de alineamiento en PCR para determinar la temperatura óptima de obtención de *romo1* utilizando el segundo juego de primers, que amplifica para 91 pb. En el recuadro rojo se muestran las bandas correspondientes a *romo1* que amplificaron mejor, ambas en temperaturas entre 55.3 y 57.7°C, por lo que, al igual que en el caso anterior, se utilizó 55.7 °C para amplificar a *romo1*.

7.1.2. Caracterización de tejidos de ratón CD1 con respecto a la expresión de *romo1*.

Se realizó la RT-PCR para determinar los niveles de *romo1* con los dos juegos de primers ocupados anteriormente. Cabe mencionar que el juego de primers 1, que flanquea 240pb funcionó mejor, con lo que, analizando los resultados con este par de primers se observa que la expresión de *romo1* es mayor en el corazón, ovario, estómago e hígado, en comparación con el páncreas, pulmón, riñón y bazo, lo cual puede sugerir una relevancia mayor de la proteína en estos órganos. En la figura 10 se muestran encerrados en recuadros rojos las bandas correspondientes a *romo1*, con mayor expresión, de las muestras anteriormente mencionadas.

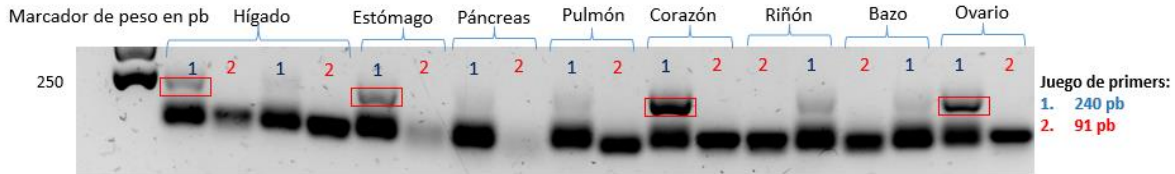


Figura 10: Gel de agarosa al 1% que muestra el resultado PCR para determinar la expresión de *romo1* en diversos órganos de ratón CD1. En azul se marcan los fragmentos amplificados con el juego de primers que flaquean 240 pb de *romo1* y en rojo los que solo flaquean 91 pb. En recuadros se observan los fragmentos correspondientes a *romo1* con la mayor expresión. Gel representativo de al menos tres repeticiones

7.1.3. Caracterización de tejidos de ratón CD1 con respecto a la expresión de la proteína Romo1.

Debido a que las proteínas pueden sufrir modificaciones traduccionales y post-traduccionales, se realizó el análisis de la proteína Romo1 en los mismos tejidos en los que se determinó la expresión de *romo1* mediante RT-PCR. Interesantemente, tal como lo muestra la figura 11, el contenido de proteína de Romo1 comparada con su expresión génica, que fue alta, se mantuvo sin cambio, a diferencia del estómago, corazón y el ovario, en donde disminuyó el contenido de la proteína en comparación con su expresión génica.

De igual forma, el páncreas y el pulmón, presentaron tanto niveles de expresión como de proteína baja.

En este análisis de proteína se usó la tinción del gel con azul de Coomassie como control de carga debido a que los diversos tejidos tienen niveles diferentes de actina, por lo cual no se puede ocupar como control de carga.

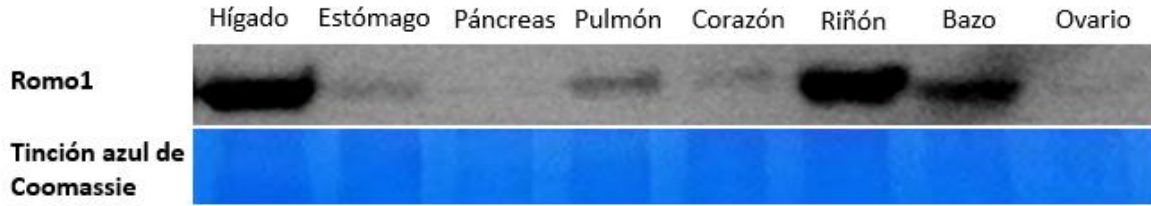


Figura 11: Western blot de proteína extraída de diversos órganos de ratón CD1, mostrando que el hígado, el riñón y el bazo tienen expresión alta en comparación con los demás órganos. Como control de carga se utilizó tinción de azul de Coomassie.

7.2.0. Estudio del efecto del HGF en el hígado.

Dado que nos interesa saber la regulación de HGF sobre Romo1 en el hígado, se realizaron tratamientos con HGF (20 ug/kg) en ratones CD1, posteriormente se analizaron los niveles de expresión de *romo1* y del contenido de la proteína.

7.2.1. Determinación de los niveles de mensajero *romo1* en hígado de ratones tratados con HGF.

Se inyectaron a los ratones con 20 µg/kg de HGF por vía intravenosa en la vena de la cola, y posteriormente se sacrificaron a 15, 30, 60 y 180 min. Al finalizar estos tiempos los animales se sacrificaron y se extrajo el hígado, del cual se aisló RNA y se realizó un RT-PCR en las condiciones mencionadas en material y métodos. Se encontró que la expresión de *romo1* incrementa a la hora de tratamiento, lo cual se confirmó repitiendo una vez más el tratamiento a una hora. En la figura 12 podemos observar la imagen representativa de los niveles de expresión de *romo1*, así como la gráfica de la densitometría a los niveles basales y a los 60 minutos de tratamiento.

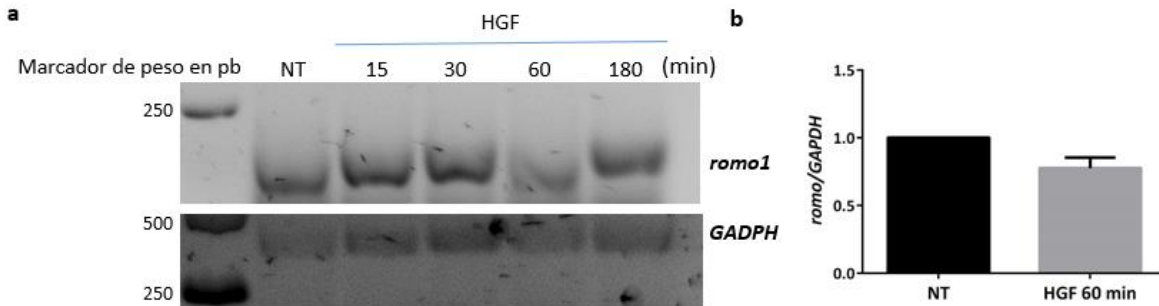


Figura 12: PCR para determinar la expresión de *romo1* en ratones CD1 tratados con HGF. a) Gel de agarosa al 1% que muestra la imagen representativa de dos experimentos independientes para determinar la expresión de *romo1* a diferentes tiempos de tratamiento con HGF. b) Densitometría de dos experimentos independientes, mostrando el comportamiento de los niveles de *romo1* a niveles basales y a los 60 minutos de tratamiento con HGF.

7.2.2. Determinación de los niveles de la proteína Romo1 en hígado de ratones tratados con HGF.

Se aisló proteína total de los hígados de los ratones tratados con HGF y se realizó un Western blot para conocer el contenido de proteína de Romo1. El resultado, mostrado en la figura 13, indica que Romo1 incrementa a la hora de tratamiento, efecto contrario en el observado con su mensajero, lo cual sugiere una regulación post-transcripcional.

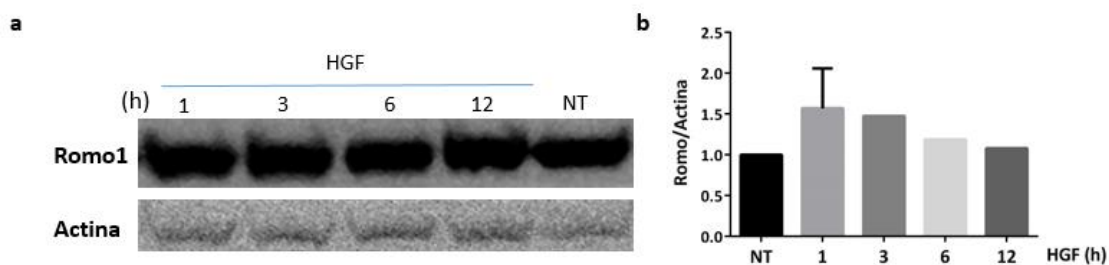


Figura 13: Contenido de Romo1 en diferentes tiempos de tratamiento con HGF en ratones CD1. a) Imagen representativa de dos Western blot de proteína extraída de hígado de ratón CD1 a diferentes tiempos de tratamiento con HGF, se realizaron dos experimentos independientes. b) Densitometría del comportamiento de los niveles de *romo1* mostrando que la expresión de Romo1 incrementa una hora de tratamiento con HGF

7.3.0. Estudio de la expresión de *romo1* en líneas celulares hepáticas

Para validar la relevancia de Romo1 en tejido hepático, se decidió evaluar la expresión en las líneas celulares hepáticas: AML12 (derivadas de tejido hepático sano de *Mus musculus*, no tumorigénica), CFSC-2G (derivadas de células estelares hepáticas de rata), y HepG2 (derivadas de un hepatoblastoma humano).

7.3.1. Determinación de los niveles de mensajero *romo1* líneas celulares hepáticas.

Utilizando los dos juegos de primers para el análisis de la expresión de *romo1*, se aisló RNA total de las líneas celulares HepG2, AML-12 y CFS-2G, encontrando que, en el caso del primer juego de primers, solo hay diferencias en los niveles de *romo1* en la línea celular AML-12, mas este incremento no es muy grande y que no se encuentran diferencias en su expresión cuando se utilizan los juegos de primers que flanquean 91 pb de *romo1* (figuras 14 y 15).

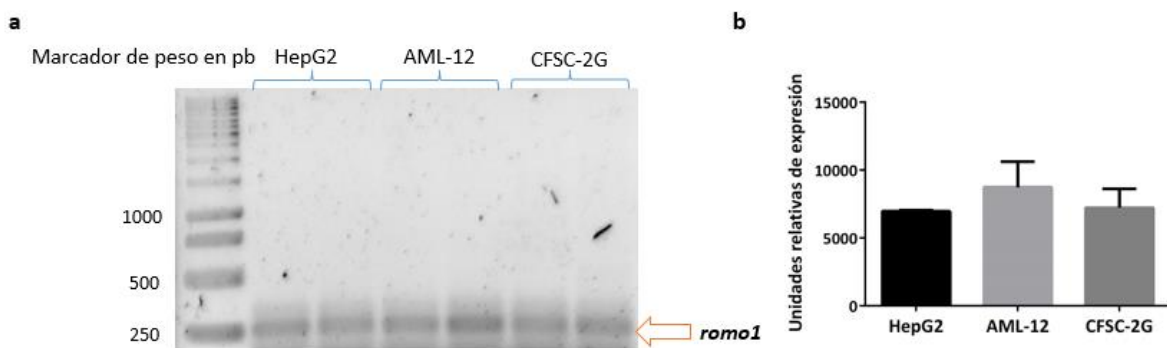


Figura 14: Expresión de *romo1* en diversas líneas celulares hepáticas. a) Gel de agarosa al 1% mostrando los niveles de *romo1* con el par de primers que flanquean 240 pb. b) Densitometría de los niveles de *romo1* indicando un ligero aumento en los niveles de la línea celular AML-12.

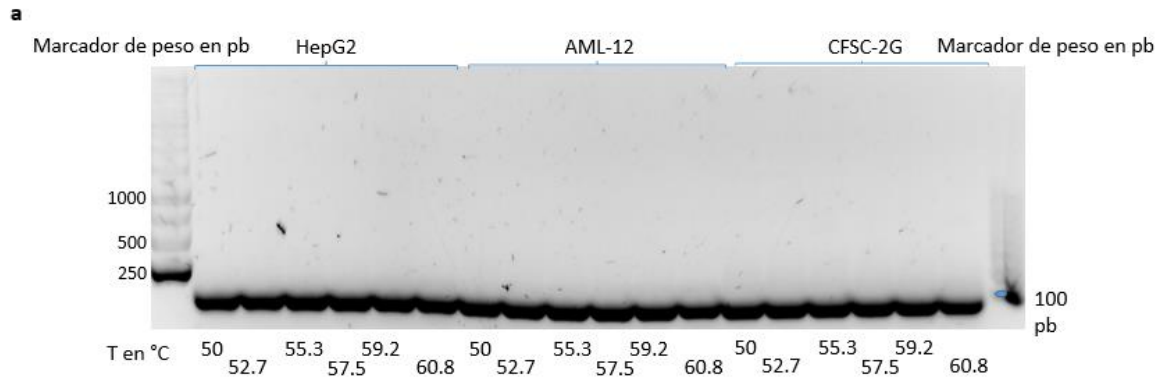


Figura 15: Gel de agarosa al 1% mostrando los niveles expresión de *romo1* en diversas líneas celulares hepáticas con el par de primers que flanquean 91 pb. No se muestran cambios en la expresión de *romo1*.

7.3.2. Determinación de los niveles de proteína Romo1 en líneas celulares hepáticas.

Como se mencionó anteriormente, debido a las modificaciones post-transcripcionales y post-traduccionales, se determinaron los niveles de la proteína en las líneas celulares anteriores, encontrando que la línea celular que contiene los niveles más altos es la HepG2, seguida de la AML-12 y por último, con niveles muy bajos, la línea celular CFSC-2G. El resultado sugiere una relevancia mayor en células del parénquima hepático, de origen epitelial más que mesenquimales como puede ser la célula estelar, tal como muestra la gráfica de la figura 16.

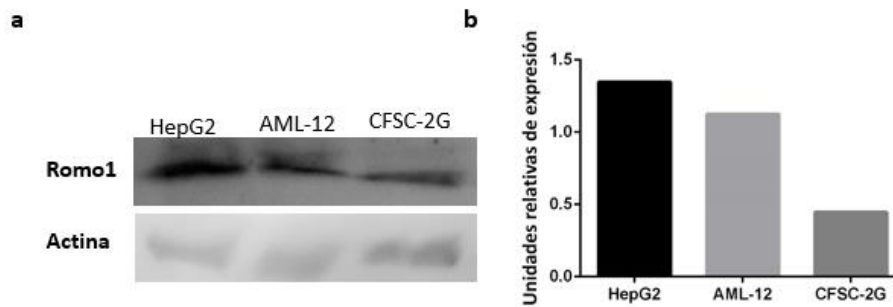


Figura 16: Contenido proteico de Romo1 en líneas celulares hepáticas. a) Western blot representativo. b) Densitometría del Western blot. La gráfica muestra el promedio de dos experimentos independientes.

7.4.0. Efecto del HGF en células RIN-m5F.

Para ganar más evidencia y conocer preliminarmente que tanto se conserva en otra línea celular diferente a las hepáticas, decidimos estudiar la expresión de *romo1* en la línea celular RIN-m5F, derivadas de un insulinoma de *Rattus norvegicus*, con linaje de células beta pancreáticas.

7.4.1. Determinación de los niveles del mensajero de *romo1*.

Se realizó la RT-PCR con RNA total aislado de las células tratadas con HGF por diferentes tiempos. Se realizaron dos experimentos independientes y se comprobó un aumento en la expresión de *romo1*, con su punto máximo a los 60 minutos de tratamiento y con una disminución por debajo de los niveles basales a los 180, tal como se muestra en la figura 17.

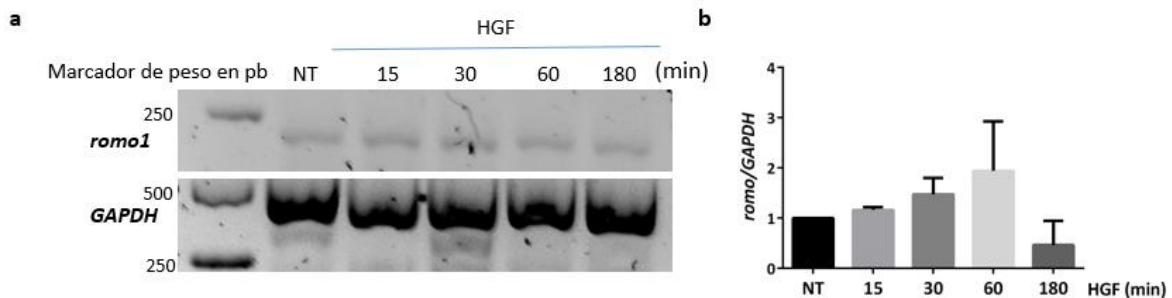


Figura 17: Expresión de *romo1* de la línea celular RIN-m5F tratada con HGF. a) Gel de agarosa al 1%, mostrando la imagen es representativa de dos experimentos independientes en los que se determinó los niveles de expresión de *romo1*. b) Densitometría. La gráfica muestra el promedio de dos experimentos independientes.

7.4.2. Determinación del contenido de proteína de Romo1.

Para determinar la expresión de la proteína Romo1, se trató a células RIN-m5F con HGF a diferentes tiempos y se realizó un Western blot, encontrando que la expresión de Romo1 incrementa significativamente a las 24 h de tratamiento con HGF (figura 18).

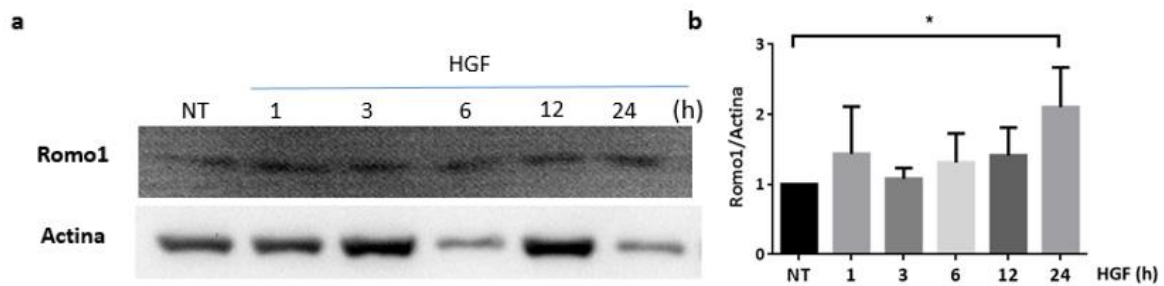


Figura 18: Expresión de Romo1 en la línea celular RIN-m5F tratada con HGF a diferentes tiempos. a) Western blot mostrando tres tratamientos de células RIN-m5F a diferentes tiempos. b) Densitometría del Western blot. La gráfica muestra el promedio de al menos tres experimentos independientes.

7.5.0. Diseño e implementación de un vector de silenciamiento de *romo1*.

Aunque hay indicios de que la proteína Romo1 modula la producción de ROS, su rol y su mecanismo de acción no están definidos. Sin embargo, estudios del grupo de investigación indican que esta proteína está involucrada en diversos procesos fisiológicos (Chung *et al.*, 2006), principalmente patológicos, pues se encuentra incrementada en diversas líneas celulares cancerosas, entre ellas las derivadas de HCC, donde tiene una participación importante en el desarrollo de invasividad tumoral (Chung *et al.*, 2012), lo que aumenta su actividad invasiva, en comparación con las células control. De igual forma, en pacientes con HCC los niveles de Romo1 se incrementaron en 63 de 95 muestras, sugiriendo una correlación inversa entre la sobreexpresión de Romo1 y los tiempos de supervivencia de los pacientes. También se correlaciona su expresión con el tamaño del tumor, (Chung *et al.*, 2014, Lee *et al.*, 2015) por lo que se propone como blanco en terapias contra el cáncer. Por todo esto, se consideró importante el uso de herramientas genéticas moleculares para el estudio controlado de la regulación de esta proteína en hepatopatías.

Para el estudio regulado de Romo1, se decidió silenciar al gen que codifica a esta proteína, mediante la transfección celular de un vector plasmídico que produjera un shRNA para silenciar *romo1* de manera inducible, por lo que se eligió al vector pSingleTS-shRNA (Clontech) y se diseñaron primers con una secuencia homologa a gen *romo1*, tal como se indica en material y métodos. La elección del vector pSingle nos confiere muchas ventajas pues en *E.coli* es de alto numero de copias y confiere resistencia a ampicilina, además tiene la característica de que su

expresión transcripcional esta controlada un supresor transcripcional (tTs) potente inducible por tetraciclina y sus derivados, por lo que únicamente se silenciará a *romo1* cuando se agregue doxiciclina al medio de cultivo con las células transfectadas con la construcción de silenciamiento.

Caracterización del vector pSingle-tTs-shRNA (pSingle).

El primer paso para realizar esta construcción fue la caracterización del vector por medio de su linealización por digestión enzimática doble con las enzimas *HindIII* y *XhoI*, de su sitio de clonación, con la finalidad de tenerlo listo para su ligación con el inserto, lo que se realizó de manera eficiente, tal como se muestra en la figura 19.

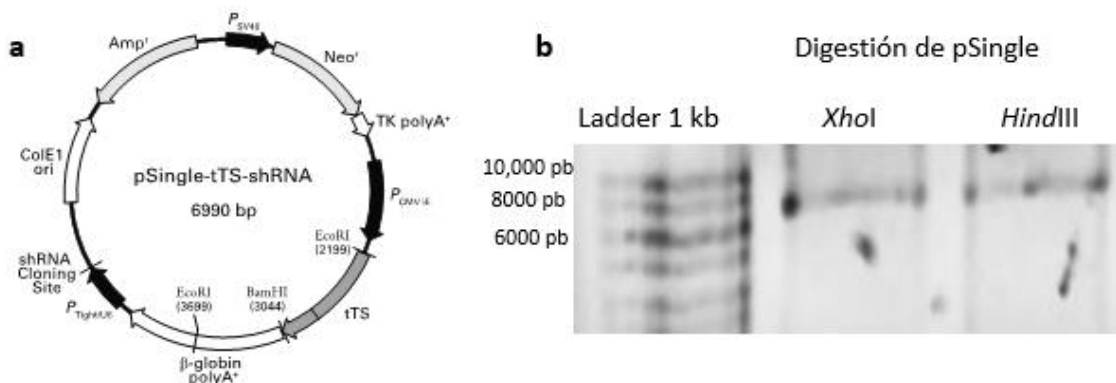


Figura 19: Caracterización del vector pSingle-tTs-shRNA. a) Imagen representativa del vector pSingle de 6990 pb. b) Gel de agarosa al 1% mostrando el vector linealizado, listo para clonar el inserto que generará el shRNA que silenciará a *romo1*.

7.5.1. Hibridación de primers.

El inserto para generar el shRNA y silenciar a *romo1* es en realidad un par de primers alineados, formando una molécula de DNA de doble cadena que a su vez formaron extremos protuberantes, de manera tal que el extremo 5' se

complementa con un sitio de corte generado por la enzima *XhoI* y el extremo 3' con el sitio generado por la enzima *HindIII* (Figura 20 a).

Una hibridación positiva se pudo obtener al transformar el producto de su ligación con el vector pSingle. Esto se logró cuando se utilizó el “buffer de alineamiento” y bajo las condiciones especificadas en “materiales y métodos”.

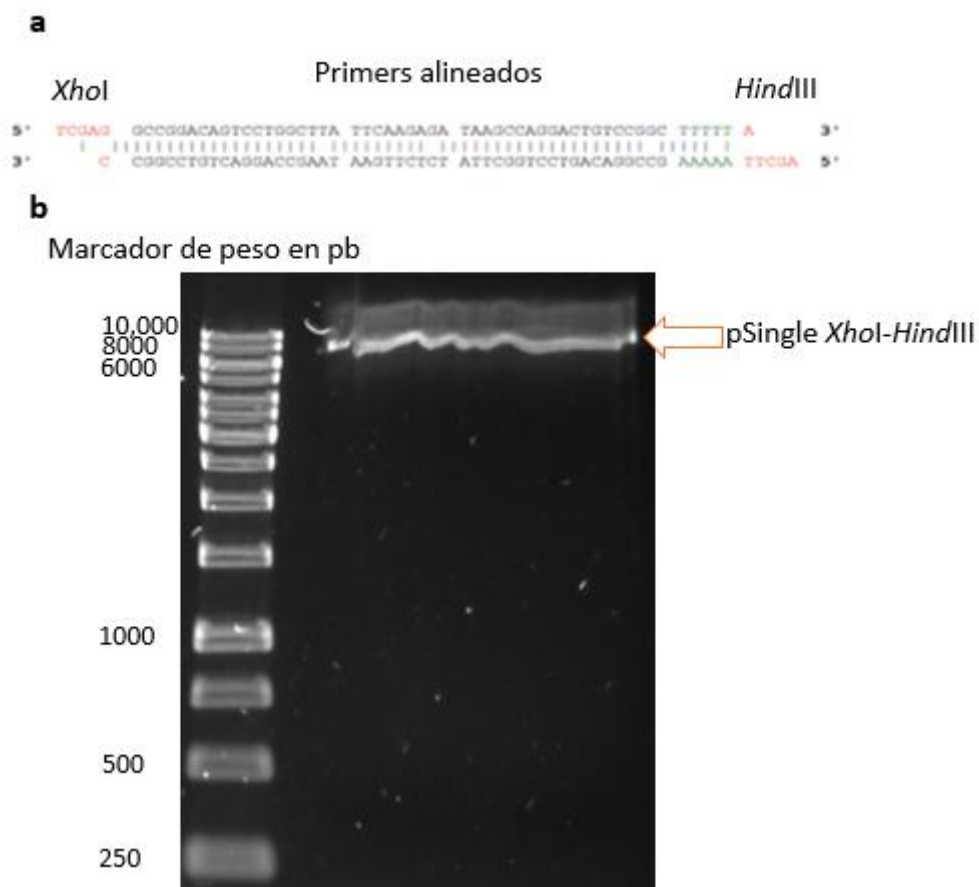


Figura 20: Alineamiento de primers. a) Representación esquemática de los primers alineados con las secuencias de corte para las enzimas de restricción *XhoI* y *HindIII*. b) Gel de agarosa al 1% mostrando el vector linearizado con los mismos sitios de corte.

7.5.2. Clonación de los primers alineados dentro de pSingle.

La ligación de los primers alineados con el vector pSingle lineal se realizó conforme al protocolo de la ligasa, tal como se indica en material y métodos. De las transformantes positivas se seleccionaron 2, denominadas Sil1N y Sil5F de las cuales se extrajo el DNA y se linearizó mediante digestión enzimática simple y luego doble usando las enzimas de restricción *XhoI* y *HindIII* para comprobar la presencia del inserto, tal como se muestra en la figura 21. Como control se corrió el vector vacío linearizado de la misma forma.

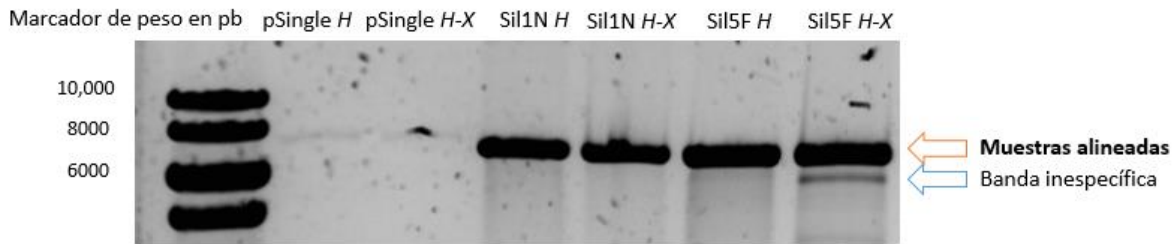


Figura 21: Gel de agarosa al 1% mostrando la clonación de los primers alineados dentro del vector pSingle en dos transformantes: Sil1N y Sil5F, linearizadas mediante digestión enzimática con *XhoI* y *Hind III* para comprobar la presencia del inserto.

7.5.3. Secuenciación.

Para comprobar la clonación correcta del inserto en el vector pSingle, de las construcciones resultantes de las dos clonas anteriormente mencionadas se extrajo el DNA plasmídico y se secuenció. La secuenciación se llevó a cabo a partir de la secuencia Sing-Tet-U6-R. El análisis de la secuenciación mostró que dentro del producto de la secuenciación se encuentra una parte de la secuencia del primer s-Romo1 (que genera el shRNA) seguida de la secuencia del sitio de corte para la enzima *XhoI*, lo que demuestra la presencia del inserto en pSingle,

comprobándose así la presencia del inserto en el vector: construcción de silenciamiento *SilRomo1* (figura 22).

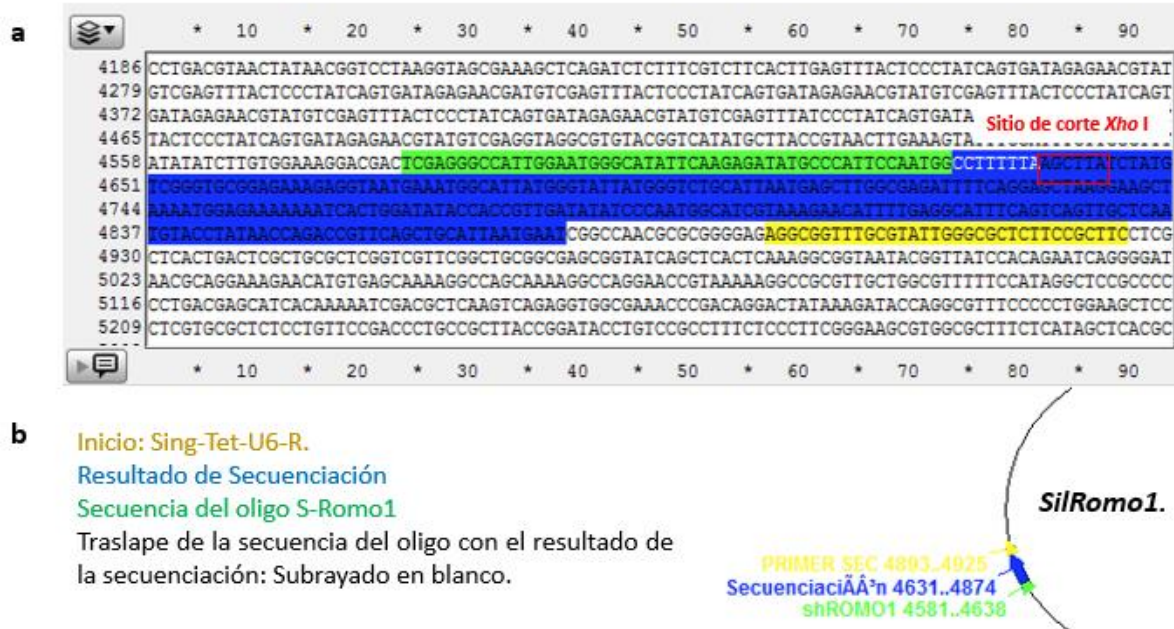


Figura 22: Análisis de la secuenciación de la construcción de silenciamiento *SilRomo1*. a) Resultado de la secuenciación dentro demostrando la clonación de los primers alineados dentro del vector como la secuencia que translapa a los primers para generar el shRNA de *romo1* dentro del producto de la secuenciación, a su lado se observa encerrado en el recuadro rojo la secuencia del sitio de corte para la enzima *Xho I*.

7.5.4. Comprobación de la eficiencia de la construcción *SilRomo1*.

Para comprobar el nivel de silenciamiento transiente de *romo1*, se analizaron los niveles de Romo1, en células RIN-m5F transfectadas, como control del experimento se utilizó células sin transfectar, como control de la transfección se transfectó a células con el vector pSingle vacío (Mock) y por último se transfectó la construcción *SilRomo1*, y se indujo el silenciamiento. El análisis de los niveles de Romo1 mediante Western blot indica que el silenciamiento es de al menos el 48% según densitometría mostrada en la figura 23.

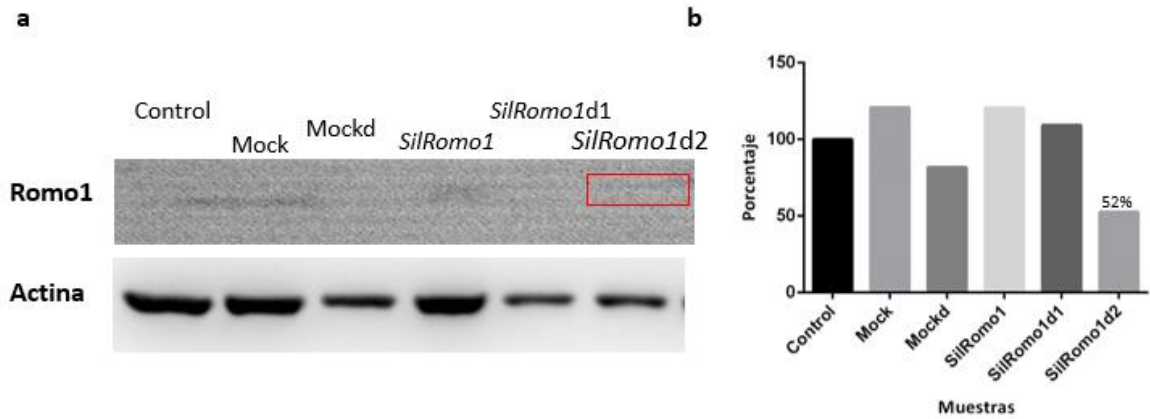


Figura 23: Análisis de la expresión de Romo1 en la construcción de silenciamiento *SilRomo1* inducida en célulasRIN-m5F. a) Western blot mostrando los niveles de expresión de Romo1 en la construcción, como control del experimento se utilizó células sin transfectar, como control de la transfección se transfectó a células con el vector pSingle vacío (Mock) y por último se transfectó la construcción *SilRomo1*. La letra “d” indica que fue inducido el silenciamiento. b) Densitometría mostrando los niveles de expresión de Romo1, la cual indica que el silenciamiento es de al menos el 48%.

8. Discusión.

La mayoría de las especies reactivas de oxígeno (ROS) son producidas por la cadena respiratoria. Un desbalance en la producción de ROS altera la homeostasis celular redox que puede causar daño al DNA, conduciendo a una inestabilidad genómica, la cual contribuye a la generación de diferentes patologías como cáncer. Debido a que Romo1 ha sido involucrada en procesos carcinogénicos (Chung *et al.*, 2006, Hwang *et al.*, 2007, Chung *et al.*, 2012, Kim *et al.*, 2014, Lee *et al.*, 2014, Lee *et al.*, 2015, Shyamsunder *et al.*, 2015, Wu *et al.*, 2015), en esta tesis nos enfocamos a caracterizar los niveles basales de Romo1 en diferentes órganos del ratón de la cepa CD1 y a determinar los niveles de ésta proteína después de un tratamiento con HGF, ya que esta molécula está implicada en procesos carcinogénicos y en el Laboratorio de Fisiología Celular de la UAM-I, se tienen antecedentes del aumento de esta proteína en ratones tratados con dieta aterogénica y con supresión génica en el receptor c-Met, del cual HGF es su ligando.

Se decidió estudiar a Romo1 en función de los órganos debido a que Romo1 ha sido implicada en diversas patologías humanas, como en glioblastomas (cerebro) (Yu *et al.*, 2015), en cáncer gástrico (estómago) (Wu *et al.*, 2015), en anemia Fanconi (sangre) (Shyamsunder *et al.*, 2015), fibrosis pulmonar idiopática (Shin *et al.*, 2013), tumores pulmonares (pulmón) (Lee *et al.*, 2014), y en cáncer hepatocelular (HCC) (Chung *et al.*, 2012, Chung *et al.*, 2014, Lee *et al.*, 2015).

Los resultados de este proyecto indicaron que a nivel de RNAm, *romo1* se expresó a niveles altos en órganos como corazón, ovario, estómago e hígado,

resultado similar al encontrado por (Chung *et al.*, 2006), donde evaluó la expresión de RNAm de ratón y encontró a esta proteína expresada en riñón, cerebro e hígado. Cabe destacar que (Chung *et al.*, 2006) no especifica la cepa de ratón utilizada.

A diferencia de (Chung *et al.*, 2006) nosotros también estudiamos los niveles proteicos de Romo1 y encontramos que los niveles de hígado, riñón y bazo son altos, mientras que en el estómago, páncreas, pulmón, corazón y ovario se mantienen bajos.

Comparando los niveles de RNAm con los proteicos de Romo1, se observa que el hígado mantiene los niveles altos tanto de RNAm como de proteína, a diferencia del estómago, corazón y el ovario, en donde disminuyó el contenido de la proteína en comparación con su expresión génica, lo que sugiere que *romo1* tiene regulación post-transcripcional.

Romo1 induce la producción de ROS, indispensables para la proliferación en células normales y cancerosas, y se ha demostrado que la reducción de su expresión decrementa los niveles normales de ROS, inhibiendo el crecimiento celular canceroso, inmortalizado y de células normales (Na *et al.*, 2008); por lo que no es raro encontrar niveles altos de proteína en el hígado debido a que sus funciones normales (síntesis de proteínas plasmáticas, desintoxicación de fármacos, almacenaje de vitaminas y glucógeno, síntesis y secreción de bilis, síntesis y almacenaje de hierro, entre otras), obligan a este órgano a tener una tasa de proliferación celular alta.

Se ha reportado una expresión alta de Romo1 en la mayoría de las líneas celulares cancerosas, como H146, H211, H1299 (cáncer de pulmón humano), SiHa (carcinoma de cérvix) y RKO (carcinoma de colon), así como una sobreexpresión en las líneas celulares no transformadas Vero (Riñón de mono) y 293T (Riñón humano) (Chung *et al.*, 2006).

En el caso del páncreas y el pulmón en condiciones normales, se presentaron y se mantuvieron tanto niveles de expresión como de proteína a la baja. Como se mencionó antes, estudios en tumores y cáncer de pulmón, encontraron implicada en altos niveles a Romo1, por lo que haber obtenido esta proteína en niveles bajos en un ratón sano, solo confirma que efectivamente, tal como lo propone el análisis de las líneas celulares y los estudios de (Shin *et al.*, 2013) y (Lee *et al.*, 2014), el incremento de Romo1 se encuentra implicado en procesos patológicos del pulmón.

Debido a que se encontró una expresión basal alta en células de hígado, se realizó el estudio de líneas celulares hepáticas, en donde se encontró que los niveles de expresión proteicos de Romo1 fueron más altos en la línea celular cancerosa HepG2, lo que coincide con la literatura (Chung *et al.*, 2012), y comparada con otras las líneas celulares estudiadas, AML-12 y CFS-26, indican que Romo1 podría tener una mayor relevancia en células del parénquima hepático de origen epitelial más que en células mesenquimales, y que podría estar involucrada en procesos fisiológicos importantes en el hígado.

HGF es una proteína producida por células de origen mesenquimal, único ligando del receptor c-Met, HGF/c-Met están involucrados en muchos procesos biológicos

normales (principalmente durante el desarrollo embrionario y procesos regenerativos). Sin embargo, la señalización MET también está involucrada en el crecimiento tumoral, invasión, resistencia a la terapia, angiogénesis y especialmente en la generación y mantenimiento de las células madre cancerosas (Garajova *et al.*, 2015).

(Chung *et al.*, 2012) evaluaron la capacidad invasiva de células HepG2 a las que se silenció Romo1 y se les aplicó HGF (40 ng/mL) encontrando que este silenciamiento suprime parcialmente la invasión celular, por lo que se sugiere que las células HCC requieren a Romo1 para incrementar su actividad invasiva, sin embargo, el mecanismo por el cual lo hacen no se ha descrito.

Para evaluar los efectos del HGF sobre Romo1 en el hígado, se trató a ratones CD1 con HGF 20 ug/kg y se evaluaron los niveles de RNAm y proteína, encontrando que, con respecto al control, a la hora de tratamiento los niveles de RNAm disminuyeron y los de proteína aumentaron de manera discreta.

Hace falta medir los niveles de proteínas antioxidantes y ROS bajo esos tratamientos, ya que podría ser que este incremento en Romo1 se deba a que éstas disminuyan y el estado celular sea de estrés reductor transiente, durante el cual y como efecto compensatorio, Romo1 transfiera ROS al citosol.

Para evaluar los efectos del HGF sobre Romo1 en otro sistema (línea celular), se trató a células RIN-m5F (50 ng/mL) y se encontró un aumento del mensajero a la hora del tratamiento y un pico de expresión proteico máximo a las 24 horas. Lo

que sugiere que Romo1 sufre una regulación post-transcripcional ante el estímulo con el HGF.

Resultados encontrados por nuestro grupo de investigación indican que no hay cambios en las ROS medidas por DCFI y DHE en las células RIN-m5F con estos tratamientos con HGF, por lo que se propone estudiar los posibles efectos compensatorios celulares ante el estímulo con HGF, como los sistemas pro oxidantes (NADPH oxidasa).

Debido a la dificultad de estudiar a Romo1 por métodos como el Western blot y el RT-PCR, se requiere de métodos no convencionales como el silenciamiento del gen *romo1*, por lo que se diseñó, elaboró y comprobó la eficiencia de una construcción de silenciamiento para *romo1*, que facilitará el estudio controlado de esta proteína en diversos sistemas.

Esta construcción servirá en estudios posteriores para evaluar el efecto del silenciamiento del gen Romo1 en diversos sistemas estudiados relacionados con hepatopatías

9. Conclusiones.

Romo1 se expresa diferencialmente en los órganos del ratón CD1.

Se sugiere que Romo1 tiene una mayor participación fisiológica en el hígado, debido a que por sus funciones, tiene una alta tasa proliferativa.

Romo1 podría tener una mayor relevancia en células del parénquima hepático de origen epitelial más que en células mesenquimales.

Se diseñó, elaboró y comprobó la eficiencia de una construcción de silenciamiento para *romo1*, que facilitará el estudio controlado de esta proteína en diversos sistemas relacionados con hepatopatías y otras enfermedades (cáncer).

10. Perspectivas

- Silenciar a *romo1* en línea celular hepática/hepatocitos (cultivo primario) y tratar con HGF a la célula transfectada .
- Silenciar a *romo1* en línea celular RIN-m5F y eventualmente en otros tipos celulares y tratar con HGF a las células transfectadas.
- Hacer estudios de sobre expresión de *romo1* y relacionarlo con la señalización del HGF.
- Analizar el promotor del gen *romo1* para predecir la unión de factores de transcripción relacionados con la ruta HGF/c-Met.

11. Bibliografía

- Bae, Y. S., H. Oh, S. G. Rhee and Y. D. Yoo (2011). "Regulation of reactive oxygen species generation in cell signaling." Mol Cells **32**(6): 491-509.
- Brand, M. D. (2010). "The sites and topology of mitochondrial superoxide production." Exp Gerontol **45**(7-8): 466-472.
- Caporossi, D., S. A. Ciafre, M. Pittaluga, I. Savini and M. G. Farace (2003). "Cellular responses to H₂O₂ and bleomycin-induced oxidative stress in L6C5 rat myoblasts." Free Radic Biol Med **35**(11): 1355-1364.
- Clavijo-Cornejo, D., C. Enriquez-Cortina, A. Lopez-Reyes, M. Dominguez-Perez, N. Nuno, M. Dominguez-Meraz, L. Bucio, V. Souza, V. M. Factor, S. S. Thorgeirsson, M. C. Gutierrez-Ruiz and L. E. Gomez-Quiroz (2013). "Biphasic regulation of the NADPH oxidase by HGF/c-Met signaling pathway in primary mouse hepatocytes." Biochimie **95**(6): 1177-1184.
- Czaja, M. J. (2007). "Cell signaling in oxidative stress-induced liver injury." Semin Liver Dis **27**(4): 378-389.
- Chung, J. S., S. Lee and Y. D. Yoo (2014). "Constitutive NF-kappaB activation and tumor-growth promotion by Romo1-mediated reactive oxygen species production." Biochem Biophys Res Commun **450**(4): 1656-1661.
- Chung, J. S., S. B. Lee, S. H. Park, S. T. Kang, A. R. Na, T. S. Chang, H. J. Kim and Y. D. Yoo (2009). "Mitochondrial reactive oxygen species originating from Romo1 exert an important role in normal cell cycle progression by regulating p27(Kip1) expression." Free Radic Res **43**(8): 729-737.
- Chung, J. S., S. Park, S. H. Park, E. R. Park, P. H. Cha, B. Y. Kim, Y. M. Chung, S. R. Woo, C. J. Han, S. B. Kim, K. S. Suh, J. J. Jang, K. Lee, D. W. Choi, S. Lee, G. Y. Lee, K. B. Hahm, J. A. Shin, B. S. Kim, K. H. Noh, T. W. Kim, K. H. Lee and Y. D. Yoo (2012). "Overexpression of Romo1 promotes production of reactive oxygen species and invasiveness of hepatic tumor cells." Gastroenterology **143**(4): 1084-1094 e1087.
- Chung, Y. M., J. S. Kim and Y. D. Yoo (2006). "A novel protein, Romo1, induces ROS production in the mitochondria." Biochem Biophys Res Commun **347**(3): 649-655.
- Chung, Y. M., S. B. Lee, H. J. Kim, S. H. Park, J. J. Kim, J. S. Chung and Y. D. Yoo (2008). "Replicative senescence induced by Romo1-derived reactive oxygen species." J Biol Chem **283**(48): 33763-33771.
- Droge, W. (2002). "Free radicals in the physiological control of cell function." Physiol Rev **82**(1): 47-95.
- Fainstein, M. K. (2008). RADICALES LIBRES Y ESTRES OXIDATIVO: APLICACIONES MEDICAS.
- Gao, C. F. and G. F. Vande Woude (2005). "HGF/SF-Met signaling in tumor progression." Cell Res **15**(1): 49-51.
- Garajova, I., E. Giovannetti, G. Biasco and G. J. Peters (2015). "c-Met as a Target for Personalized Therapy." Transl Oncogenomics **7**(Suppl 1): 13-31.
- Gentile, A. and P. M. Comoglio (2004). "Invasive growth: a genetic program." Int J Dev Biol **48**(5-6): 451-456.

Gomez-Quiroz, L. E., V. M. Factor, P. Kaposi-Novak, C. Coulouarn, E. A. Conner and S. S. Thorgeirsson (2008). "Hepatocyte-specific c-Met deletion disrupts redox homeostasis and sensitizes to Fas-mediated apoptosis." J Biol Chem **283**(21): 14581-14589.

Gutierrez Ruiz, M. C., M. Dominguez Perez, S. Rodriguez Gonzalez, N. Nuno Lambarri, C. Licona Retama and L. E. Gomez-Quiroz (2012). "[High cholesterol diet modifies the repairing effect of the hepatocyte growth factor]." Gac Med Mex **148**(3): 236-242.

Hwang, I. T., Y. M. Chung, J. J. Kim, J. S. Chung, B. S. Kim, H. J. Kim, J. S. Kim and Y. D. Yoo (2007). "Drug resistance to 5-FU linked to reactive oxygen species modulator 1." Biochem Biophys Res Commun **359**(2): 304-310.

Kim, I. G., S. Y. Kim, H. A. Kim, J. Y. Kim, J. H. Lee, S. I. Choi, J. R. Han, K. C. Kim and E. W. Cho (2014). "Disturbance of DKK1 level is partly involved in survival of lung cancer cells via regulation of ROMO1 and gamma-radiation sensitivity." Biochem Biophys Res Commun **443**(1): 49-55.

Kim, J. J., S. B. Lee, J. K. Park and Y. D. Yoo (2010). "TNF-alpha-induced ROS production triggering apoptosis is directly linked to Romo1 and Bcl-X(L)." Cell Death Differ **17**(9): 1420-1434.

Kowaltowski, A. J., N. C. de Souza-Pinto, R. F. Castilho and A. E. Vercesi (2009). "Mitochondria and reactive oxygen species." Free Radic Biol Med **47**(4): 333-343.

Kudin, A. P., N. Y. Bimpong-Buta, S. Vielhaber, C. E. Elger and W. S. Kunz (2004). "Characterization of superoxide-producing sites in isolated brain mitochondria." J Biol Chem **279**(6): 4127-4135.

Lee, S., Y. H. Park, J. S. Chung and Y. D. Yoo (2015). "Romo1 and the NF-kappaB pathway are involved in oxidative stress-induced tumor cell invasion." Int J Oncol **46**(5): 2021-2028.

Lee, S. B., H. J. Kim, J. Shin, S. T. Kang, S. Kang and Y. D. Yoo (2011). "Bcl-XL prevents serum deprivation-induced oxidative stress mediated by Romo1." Oncol Rep **25**(5): 1337-1342.

Lee, S. B., J. J. Kim, T. W. Kim, B. S. Kim, M. S. Lee and Y. D. Yoo (2010). "Serum deprivation-induced reactive oxygen species production is mediated by Romo1." Apoptosis **15**(2): 204-218.

Lee, S. H., J. S. Lee, E. J. Lee, K. H. Min, G. Y. Hur, S. H. Lee, S. Y. Lee, J. H. Kim, S. Y. Lee, C. Shin, J. J. Shim, K. H. Kang and K. H. In (2014). "Serum reactive oxygen species modulator 1 (Romo1) as a potential diagnostic biomarker for non-small cell lung cancer." Lung Cancer **85**(2): 175-181.

Lee, S. H., J. W. Min, J. S. Lee, C. H. Kim, Y. D. Yoo, E. J. Lee, K. H. Min, G. Y. Hur, S. H. Lee, S. Y. Lee, J. H. Kim, S. Y. Lee, C. Shin, J. J. Shim, K. H. Kang and K. H. In (2015). "Reactive oxygen species modulator 1 (Romo1) overexpression is an independent predictor of poor survival in NSCLC patients who undergo surgical resection." Lung Cancer **87**(1): 45-52.

Liu, S. L., X. Lin, D. Y. Shi, J. Cheng, C. Q. Wu and Y. D. Zhang (2002). "Reactive oxygen species stimulated human hepatoma cell proliferation via cross-talk between PI3-K/PKB and JNK signaling pathways." Arch Biochem Biophys **406**(2): 173-182.

Martindale, J. L. and N. J. Holbrook (2002). "Cellular response to oxidative stress: signaling for suicide and survival." J Cell Physiol **192**(1): 1-15.

Na, A. R., Y. M. Chung, S. B. Lee, S. H. Park, M. S. Lee and Y. D. Yoo (2008). "A critical role for Romo1-derived ROS in cell proliferation." Biochem Biophys Res Commun **369**(2): 672-678.

Nakamura, T. and S. Mizuno (2010). "The discovery of hepatocyte growth factor (HGF) and its significance for cell biology, life sciences and clinical medicine." Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci **86**(6): 588-610.

Norton, M., A. C. Ng, S. Baird, A. Dumoulin, T. Shutt, N. Mah, M. A. Andrade-Navarro, H. M. McBride and R. A. Screaton (2014). "ROMO1 is an essential redox-dependent regulator of mitochondrial dynamics." Sci Signal **7**(310): ra10.

Schmidt, C., F. Bladt, S. Goedecke, V. Brinkmann, W. Zschiesche, M. Sharpe, E. Gherardi and C. Birchmeier (1995). "Scatter factor/hepatocyte growth factor is essential for liver development." Nature **373**(6516): 699-702.

Sha, J., G. Zhao, X. Chen, W. Guan, Y. He and Z. Wang (2012). "Antibacterial potential of hGlyrichin encoded by a human gene." J Pept Sci **18**(2): 97-104.

Shin, J. A., J. S. Chung, S. H. Cho, H. J. Kim and Y. D. Yoo (2013). "Romo1 expression contributes to oxidative stress-induced death of lung epithelial cells." Biochem Biophys Res Commun **439**(2): 315-320.

Shyamsunder, P., R. S. Verma and A. Lyakhovich (2015). "ROMO1 regulates RedOx states and serves as an inducer of NF-kappaB-driven EMT factors in Fanconi anemia." Cancer Lett **361**(1): 33-38.

Sigaud, S., P. Evelson and B. Gonzalez-Flecha (2005). "H₂O₂-induced proliferation of primary alveolar epithelial cells is mediated by MAP kinases." Antioxid Redox Signal **7**(1-2): 6-13.

Stuart, K. A., S. M. Riordan, S. Lidder, L. Crostella, R. Williams and G. G. Skouteris (2000). "Hepatocyte growth factor/scatter factor-induced intracellular signalling." Int J Exp Pathol **81**(1): 17-30.

Trusolino, L. and P. M. Comoglio (2002). "Scatter-factor and semaphorin receptors: cell signalling for invasive growth." Nat Rev Cancer **2**(4): 289-300.

Valdes-Arzate, A., A. Luna, L. Bucio, C. Licona, D. L. Clemens, V. Souza, E. Hernandez, D. Kershenovich, M. C. Gutierrez-Ruiz and L. E. Gomez-Quiroz (2009). "Hepatocyte growth factor protects hepatocytes against oxidative injury induced by ethanol metabolism." Free Radic Biol Med **47**(4): 424-430.

Wu, H., Y. H. Gu, L. Wei, T. K. Guo, Y. Zhao, G. Su, J. Li and X. D. Xie (2015). "Association of Romo1 gene genetic polymorphisms with risk of gastric cancer in northwestern Chinese population." Pathol Oncol Res **21**(3): 581-587.

Yu, M. O., N. H. Song, K. J. Park, D. H. Park, S. H. Kim, Y. S. Chae, Y. G. Chung, S. G. Chi and S. H. Kang (2015). "Romo1 is associated with ROS production and cellular growth in human gliomas." J Neurooncol **121**(1): 73-81.

Zhao, C., B. Feng, Y. Cao, P. Xie, J. Xu, Y. Pang, X. Liu and Q. Li (2013). "Identification and characterisation of ROS modulator 1 in *Lampetra japonica*." Fish Shellfish Immunol **35**(2): 278-283.