

INSTITUTO NACIONAL DE SALUD PÚBLICA

ESCUELA DE SALUD PÚBLICA DE MÉXICO

PARTICIPACIÓN DE IRS-1 E IRS-2 EN LA PROLIFERACIÓN E INVASIÓN DE CÉLULAS DE CÉRVIX VPH POSITIVAS

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS EN **ENFERMEDADES INFECCIOSAS**

PRESENTA

Biol. ANABEL MARTÍNEZ BAEZ

COMITÉ DE TESIS:

DIRECTORA DE TESIS: DRA. JULIETA IVONE CASTRO ROMERO

ASESORES: DRA. MARÍA LOURDES GUTIÉRREZ XICOTENCATL DRA. CINTHYA E. DÍAZ BENITEZ DR. JORGE REYES ESPARZA

CUERNAVACA, MORELOS FEBRERO, 2014

DATOS DE SINODALES

PRESIDENTE

Dra. Julieta Ivone Castro Romero

SECRETARIA

Dra. María Lourdes Gutiérrez Xicotencatl

LECTORA

Dra. Elizabeth Langley McCarron

El presente trabajo fue realizado en el departamento de infecciones crónicas y cáncer del Centro de Investigación Sobre Enfermedades Infecciosas del Instituto Nacional de Salud Pública bajo la dirección de la Dra. Julieta Ivone Castro Romero.



Este trabajo es parte del proyecto "Análisis molecular de participación del adaptador de señalización de proteínas IRS-1 e IRS-2 en la progresión del cáncer cervicouterino" el cual se encuentra registrado ante el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT).



Agradezco el apoyo económico otorgado por CONACYT durante la realización de esta tesis.

RESUMEN

En los últimos años se ha demostrado que existe una relación entre las IRS-1 y 2 y diversos tipos de cáncer, tales como mama, pulmón, próstata, liposarcomas, miosarcomas y neuroblastoma. Se ha observado que tanto la expresión como la función de las IRS pueden variar en los diversos tipos de cáncer. Así mismo, IRS-1 se ha relacionado con proliferación, crecimiento y anti apoptosis; mientras que IRS-2 se ha vinculado con metástasis, motilidad e invasión. Sin embargo, este tipo de estudios no se han hecho para cáncer cervicouterino (CaCu), el cual presenta una alta incidencia y mortalidad tanto a nivel mundial como en México. Se ha demostrado que la insulina en células SiHa (VPH16+) puede activar a Akt y ERK1/2, moléculas que participan en las vías PI3K y MAPK, asociadas con proliferación y apoptosis. Pero no se conoce si este efecto se lleva a cabo a través de la activación de las IRS's. Objetivo: Investigar la participación de IRS-1 e IRS-2 en la vía de señalización del receptor de insulina y su participación en proliferación en células HeLa. Metodología: Se trata de un estudio in vitro en la línea celular HeLa (VPH18+), y como controles, las líneas celulares C33a (VPH-) y MCF7 (cáncer de mama). La expresión basal de los genes IR, IRS-1 e IRS-2 se observó con la técnica de RT-PCR. Los cambios en la proliferación en las diferentes líneas celulares tratadas con insulina se llevó a cabo mediante ensayos con MTT y conteo en cámaras de Neubauer. Los cambios en la a expresión y fosforilación de las proteínas IR, IRS-1, IRS-2, PI3K, Akt, ERK1/2 en respuesta a insulina se hizo mediante Western Blot, usando anticuerpos específicos para cada proteína. Resultados: las dos isoformas del IR se expresan en HeLa, mientras que en C33a solo se expresa la isoforma A. El gene IRS-1 se expresa en las líneas celulares HeLa y C33a en condiciones basales. En el caso del gene IRS-2, se obtuvo un producto de PCR más pequeño que el esperado en ambas líneas celulares, por lo cual se sintetizarán nuevos oligos. La curva de crecimiento demostró que tanto HeLa y C33a proliferan en condiciones mínimas de SFB (0.2%) o sin suero, hasta las 72 horas, lo cual se observó con MTT y con azul de tripano. La respuesta en proliferación medida con MTT en ambas líneas después del estímulo con insulina muestra que no hay ninguna diferencia estadísticamente significativa con ninguna de las dosis utilizadas. Mediante conteo con azul de tripano se observó que en células C33a no hay ninguna diferencia significativa, sin embargo, en HeLa hay un incremento significativo con respecto al control con la dosis de 100 nM de insulina. Las proteínas IR, IRS1, p-IRS1, IRS2, ERK1/2, p-ERK1/2, Akt1 y p-Akt1 se están expresando a los 15 y 30 minutos después del estimulo con insulina 50nM. **Análisis estadístico:** Promedio ± DS. ANOVA y para hacer una comparación entre grupos, se utilizó la prueba post-hoc Tukey HSD.

INDICE DE CONTENIDO

ABF	EVIATURAS1
1.	INTRODUCCIÓN
1.1.	Epidemiología de cáncer cervicouterino3
1.2.	Factores de riesgo para cáncer cervicouterino3
1.3.	Biología Molecular del VPH4
1.4.	Genotipos del VPH5
1.5.	Clasificación de las lesiones5
1.6.	Historia natural del VPH6
2.	ANTECEDENTES7
2.1.	IRS-1 e IRS-28
2.2.	IRS y cáncer10
2.3.	Insulina y cáncer13
3.	JUSTIFICACIÓN16
4.	HIPÓTESIS16
5.	OBJETIVO GENERAL
5.1.	Objetivos específicos16
6.	MAPA CONCEPTUAL
7.	MATERIALES Y MÉTODOS18
7.1.	Cultivo celular
7.2	Medición de la proliferación celular
7.	2.1 Técnica de MTT
7.	2.2 Conteo en cámaras de Neubauer 19
7.3 N	/ledición de la expresión de RNAm de IR, IRS-1 e IRS-220

7.3.1 Extracción de RNA total	20
7.3.2 Transcripción reversa (RT)	20
7.3.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	21
7.3.4 Separación de los fragmentos por electroforesis en gel de agarosa	22
7.4 Evaluación de las modificaciones en la expresión y fosforilación de IR, IRS-1, IRS-2, PI3K, Akt y	y
ERK1/2 por Western Blot	23
7.4.1 Estimulación de los cultivos celulares con Insulina2	23
7.4.2 Extracción de proteínas totales	23
7.4.3 Cuantificación de proteínas	23
7.4.4 Separación de proteínas en SDS-PAGE	25
7.4.5 Western Blot	25
7.5 Análisis estadístico	26
7.6 Estrategia experimental	27
8 ASPECTOS ÉTICOS 2	28
9 MEDIDAS DE BIOSEGURIDAD 2	28
10 RESULTADOS	0
10.1 Expresión del RNAm del receptor de insulina (IR) en las líneas celulares HeLa y C33-A en condiciones de crecimiento basal	30
10.2 Expresión del RNAm de IRS-1 y de la proteína IRS-2 en condiciones basales de crecimiento	31
10.3 Crecimiento celular en diferentes condiciones de cultivo en presencia y ausencia de 0.2% y 10 % SBF	32
10.4 Crecimiento celular en presencia y ausencia de Insulina recombinante humana 10.4.1 Curva dosis-respuesta 3	34 34
10.5 Análisis de la vía de señalización de IRS en resnuesta al estímulo con insulina	26
10.5 Analisis de la via de serialización de la subunidad R del recentor de insulina (IDR)	27
10.5.1 Modificaciones en la expresión de IRS-1 y nIRS-1	37 27
10.5.2 Modificaciones en la expresión de IRS-2	20
10.5.5 Modificaciones en la expresión de ERK1/2 $\mu_{\rm E}$ ERK1/2	20
10.5.5 Modificaciones en la expresión de Akt1 y p-Akt1	41
11. DISCUSIÓN 4	12
12 CONCLUSIÓN	18
13. PERSPECTIVAS	19

13	REFERENCIAS	
		53
PKEP	ARACION DE SOLUCIONES	

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
Akt	Protein kinase B
ANOVA	Análisis de varianza
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
BSA	Albúmina sérica bovina
CaCu	Cáncer Cervicouterino
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementario
DEPC	Dietil pirocarbonato
EMEM	Eagle's Mínimum Essential Medium
ERK	Extracellular signal-regulated kinase
HCI	Ácido clorhídrico
HSIL	High grade Squamous Intraepithelial Lesión (Lesiones intraepiteliales
	escamosas de alto grado)
IGF	Insulin-like Growth Factor (Factor de crecimiento similar a la insulina)
IGFR	Insulin-like Growth Factor Receptor (Receptor del factor de crecimiento
	similar a la insulina)
IR	Insulin Receptor (Receptor de insulina)
IRS	Insulin receptor substrate (Sustrato del receptor de insulina)
IRS-1	Insulin receptor substrate 1
IRS-2	Insulin receptor substrate 2
LSIL	Low grade Squamous Intraepithelial Lesión (Lesiones intraepiteliales
	escamosas de bajo grado)
МАРК	Mitogen-Activated Protein Kinases (Cinasa activada por mitogéno)
MTT	[(3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5) difenil tetrazolio]
NIC1	Neoplasia Intraepitelial Celular grado 1
NIC2	Neoplasia Intraepitelial Celular grado 2
NIC3	Neoplasia Intraepitelial Celular grado 3
nm	Nanometros
p-Akt	Protein kinase B Phosphorylated

PBS	Phosphate Buffered Saline (Solución Salina de Fosfatos)
PCR	Polymerase Chain Reaction (Reacción en Cadena de la Polimerasa)
p-ERK	Extracellular Signal-regulated Kinase Phosphorylated
РН	Dominio de homología a pleckstrina
p-IRS1	Sustrato del receptor de insulina 1 fosforilado
p-IRS2	Sustrato del receptor de insulina 2 fosforilado
РІЗК	Cinasa fosfatidilinositol-3-OH
RPBI	Residuos Peligrosos Biológico-Infecciosos
rpm	Revoluciones por minuto
RT	Transcripción reversa
SFB	Suero Fetal Bovino
ТА	Temperatura ambiente
VPH	Virus del Papiloma Humano

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Epidemiología de cáncer cervicouterino

El cáncer cervicouterino (CaCu) es el tercer tipo de cáncer más común y la cuarta causa de muerte por neoplasias en las mujeres a nivel mundial, lo que representa el 9% (529 800) del total de nuevos casos de cáncer y el 8% (275 100) de las muertes totales por esta enfermedad ¹. En América Latina y el Caribe, la incidencia y la mortalidad causadas por el CaCu son muy altas, y ocupan el segundo lugar dentro de los tipos de cánceres más comunes ².

En México, en el año 2008, se reportaron 10,186 (15.5%) casos con diagnóstico reciente de CaCu, colocando a este padecimiento en el segundo lugar de los cánceres más frecuentes. De estos casos, 5,061 (12.8%) fueron decesos, posicionando al CaCu como la segunda causa de muerte por neoplasia en la población femenina mexicana². El CaCu es una enfermedad caracterizada por el crecimiento anormal y diseminado de células del cuello uterino, que al desarrollarse de forma incontrolada, avanzan entre el tejido normal y lo destruye, alterándose así el funcionamiento del organismo ³. Histológicamente, el tipo más frecuente es el carcinoma de células escamosas, seguido por el adenocarcinoma ⁴.

1.2. Factores de riesgo para cáncer cervicouterino

El CaCu es de origen multifactorial y la infección por el virus del papiloma humano (VPH) es un factor necesario, pero no suficiente para el desarrollo de esta patología. Diversos estudios reportan otros factores de riesgo que junto con el VPH, modulan la transición entre la infección y el desarrollo de cáncer⁴. Entre ellos, se encuentran el consumo de anticonceptivos orales durante un período de tiempo prolongado⁵, la paridad, el efecto mutagénico de las sustancias carcinogénicas del tabaco⁶, la conducta sexual del individuo (incluyendo la edad de la primera relación sexual, el número de parejas y la mala higiene), el estado inmunológico, el cual se puede ver afectado por la edad, infección con VIH (Virus de Inmunodeficiencia Humana) o por trasplante de órganos, la susceptibilidad genética y la co-infección con otros

patógenos, entre ellos, *Chlamydia trachomatis*, que ocasiona inflamación crónica y mutaciones ⁷.

1.3. Biología Molecular del VPH

El VPH pertenece a la familia *Papillomaviridae*, son partículas pequeñas que miden de 45-55 nm de diámetro aproximadamente. Su genoma es ácido desoxirribonucleico (ADN) de doble cadena circular de aproximadamente 8,000 pares de bases (pb), compactado y encapsulado en viriones icosaédricos de 72 capsómeros ⁸. Este genoma se divide en tres regiones: 1) región larga de control (del inglés LCR), 2) región de expresión temprana (E, Early) y 3) región tardía (L, Late). La LCR regula la replicación y la transcripción viral. La región E codifica proteínas de expresión temprana involucradas en replicación (E1), transcripción (E2) y transformación celular (E5, E6 y E7). La región tardía codifica proteínas estructurales del virus (L1 y L2) que forman la cápside viral (Fig. 1) ^{9,10}.



Figura 1. Genoma del Virus del Papiloma Humano genotipo 16. Se representan las diferentes regiones que regulan la replicación del virus. La región larga de control (LCR), la región de expresión temprana (E, Early) y la región tardía (L, Late)¹⁰.

1.4. Genotipos del VPH

Los virus del papiloma humano causan una gran variedad de lesiones proliferativas en piel, mucosa cervical, oral, laringe y región ano genital, con un rango de severidad desde verrugas benignas hasta cáncer invasivo. Según su tropismo en el epitelio, estos virus se pueden clasificar en mucosos y cutáneos. Los VPH's que tienen tropismo por las mucosas se clasifican como de alto riesgo (oncogénicos) y de bajo riesgo (no oncogénicos) dependiendo de sus características de transformación celular. Los genotipos más frecuentes de VPH son 16, 18, 31, 33, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 67 y 68 considerados de alto riesgo y se encuentran en lesiones intraepiteliales de alto grado e invasoras, tanto en el epitelio escamoso como en el glandular. A su vez, los virus de bajo riesgo más comunes son los genotipos 6, 11, 13, 42, 43 y 44, los cuales se asocian con condilomas y lesiones intraepiteliales escamosas de alto grado (HSIL) y cáncer ¹¹.

1.5. Clasificación de las lesiones

Existen tres sistemas o clasificaciones para evaluar las anormalidades del epitelio cervical: la elaborada por la Organización Mundial de la Salud (OMS), la clasificación de Richard (1973) y el Sistema Bethesda. Así, tenemos que las lesiones precursoras se pueden clasificar de la siguiente manera:

- a) Neoplasia Intracelular grado 1 (NICI) o displasia leve (LSIL, por sus siglas en ingles). En esta etapa los cambios estructurales de las células se encuentran confinados a un tercio bajo del epitelio.
- b) Neoplasia Intracelular grado 2 (NICII) o displasia moderada en la cual, los cambios estructurales de las células sobrepasan la mitad del epitelio.
- c) Neoplasia intracelular grado 3 (NICIII) o displasia severa y carcinoma *in situ*, cuyos cambios estructurales de las células se extiende hasta la superficie epitelial.

 d) ASCUS (Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance) hace referencia a los cambios atípicos que se presentan en las células escamosas del cuello uterino que no pueden ser específicamente clasificados.

De acuerdo a la clasificación de Bethesda, las lesiones se clasifican como de bajo (LSIL) ó alto grado (HSIL) y ASCUS. Los estadios NICII y NICIII se integran dentro del grupo de lesiones de alto grado ó HSIL¹².

1.6. Historia natural del VPH

El VPH infecta las capas basales del epitelio cervical, por lo tanto, se requiere de micro lesiones que le permitan al virus llegar al fondo del epitelio donde se encuentran estas células e infectarlas ^{13, 14}. La infección transitoria con el VPH no genera anormalidades microscópicas en el epitelio y el 80% de las mujeres eliminan la infección en un periodo de 8 a 12 meses ¹¹. El 20% de mujeres restantes infectadas con VPH de alto riesgo establecen una infección persistente, que puede llevar a la formación de lesiones NIC1, NIC2 y NIC3 hasta CaCu ¹⁵.

La infección persistente puede ser: latente o productiva. En la infección latente el DNA viral permanece en el núcleo de la célula de forma episomal y no hay replicación viral ni cambios observables, sin embargo, la presencia de otros factores de riesgo, permiten que el virus puede replicarse. En la infección productiva algunas células son capaces de replicar el genoma viral en forma episomal, sintetizar proteínas virales y formar viriones. En la infección productiva del VPH las proteínas E6 y E7 se expresan en las capas basales del epitelio cervical, no está bien determinado si estas proteínas también se expresan en las capas para-basales e intermedias. Las proteínas E1, E2 y E4 se expresan en las células de la capa intermedia y superficial del epitelio, y la expresión de la proteína mayor de la cápside L1 se lleva a cabo en la capa superficial del epitelio sin importar el genotipo de VPH (Figura 2)^{13, 14}.



Figura 2. Infección productiva del VPH. Las proteínas E6 y E7 se expresan en las capas basales del epitelio; las proteínas E1, E2, E4 y E5 se expresan en las capas intermedia y superior del epitelio, mientras que las proteínas estructurales L1 y L2 se expresan en la superficie.

En estadios de NIC1 y NIC2, el genoma de los VPH 16 y 18 se encuentra en forma episomal; sin embargo, en lesiones NIC3 y CaCu se encuentra integrado en el genoma del hospedero ¹⁶. Por lo tanto, la transformación celular deriva de una infección viral productiva, seguida de la integración del DNA viral en el genoma celular del hospedero ¹⁷. La integración del genoma viral a la célula hospedera da como resultado la ruptura del marco abierto de lectura de los genes E1 y E2, cabe mencionar que E2 actúa como un regulador de la transcripción viral de los genes E6 y E7. De esta manera, la proteína E2 deja de expresarse favoreciendo el incremento de expresión de E6 y E7 de los genotipos oncogénicos, las cuales descontrolan el ciclo celular interactuando con varias proteínas; por ejemplo p53 y pRb induciendo el crecimiento, la transformación e inmortalización de las células infectadas con VPH ^{18, 19}.

2. ANTECEDENTES

Como se mencionó anteriormente, las oncoproteínas E6 y E7 del virus ayudan a la transformación oncogénica de la célula hospedera mediante la alteración del ciclo celular. Sin embargo, existen muchos otros procesos celulares que están siendo desregulados para que se lleve a cabo la progresión a cáncer. Estos mecanismos complejos incluyen señalización proliferativa sustancial, evasión de señales anticrecimiento, resistencia a muerte celular, inmortalidad replicativa, inducción de angiogénesis, invasión activa y metástasis, reprogramación del metabolismo energético y evasión de la destrucción por parte del sistema inmune ²⁰.

Todos estos procesos, se encuentran regulados por la activación o inhibición de diversas vías de señalización, las cuales convergen en cambios en la expresión génica y se ven reflejados en la proliferación o muerte celular.

La activación de las cáscadas de señalización de la cinasa activada por mitogéno (MAPK) y la cinasa fosfatidilinositol-3-OH (PI3K), son eventos cruciales durante la activación celular y proliferación. Se conoce que genes que participan en estas vías sufren alteraciones y se vuelven oncogénicos²¹.

En diferentes tipos de cáncer se ha demostrado que la activación del receptor del factor de crecimiento similar a la insulina (IGFR) o del receptor de insulina (IR)²², activa las vías de señalización MAPK y PI3K, en ambos casos es necesaria la activación de una familia de proteínas citoplasmáticas conocidos como sustrato del receptor de insulina (IRS)²².

2.1. IRS-1 e IRS-2

Los sustratos IRS son proteínas adaptadoras entre receptores de superficie celular y distintas moléculas que participan en varios procesos celulares, tales como, metabolismo, motilidad, sobrevivencia, proliferación y metástasis. La familia de IRS está conformada por 5 proteínas, dos que se expresan en humanos y por ende las más estudiadas conocidas como IRS-1 e IRS-2. El resto han sido menos estudiadas ya que se encuentran en roedores o son muy diferentes al resto de la familia ²³. Las IRS fueron inicialmente identificadas como proteínas fosforiladas en residuos de tirosina en células tratadas con insulina. La fosforilación de los residuos de tirosina ocurre en motivos Y-X-X-M (donde X es cualquier aminoácido y M es metionina). Las tirosinas fosforiladas se convierten en sitios de unión para SH2 (motivos con homología a src 2). De esta manera, las IRS funcionan como moléculas de acoplamiento para mediar la interacción indirecta entre el receptor de insulina y su señalización hacia el núcleo ²³.

Las IRS's están involucradas en diversas cascadas de señalización intracelular, principalmente en la vía de la insulina y el IGF (factor de crecimiento similar a la insulina), a la cual se le denomina vía canónica (Fig. 3)²². Además de participar en esta vía, también pueden participar en la vía no canónica (Fig. 3), en donde la fosforilación de las IRS puede ser estimulada por algunas interleucinas y también por receptores de hormonas esteroides, como el receptor de estrógenos.



Figura 3. Vía canónica y no canónica de señalización de las IRS. Los sustratos del receptor de insulina pueden ser activados por los receptores fosforilados de IGF o insulina, al activarse las IRS se pueden desencadenar las cascadas de señalización Grb2/ERK1/2 o PI3K/Akt (Vía canónica). O bien, las IRS pueden unirse a receptores de interleucinas u hormonas esteroides ²².

Un complejo de señalización clave en la acción de la insulina se forma entre IR, las IRS y la subunidad regulatoria (p85) de la enzima PI3-K. La asociación entre IR y las IRS ocurre principalmente en el dominio de unión a fosfotirosina de IRS y la región yuxtamembranal de IR. Para ello, se requiere la fosforilación de la tirosina 972 en el dominio yuxtamembranal del receptor. El dominio de homología a pleckstrina (PH) estabiliza esta conformación, además de la unión de la membrana celular.

Subsecuentemente, las IRS pueden activar la cascada de señalización PI3K, a través de los dominios SH2 en la estructura de p85 de la enzima. La unión de las IRS a los dos dominios SH2 conlleva a la activación de la subunidad catalítica p110 de PI3-K. La actividad catalítica de p110 estimula la fosforilación del fosfatidilinositol en la posición D3 del anillo de inositol, generando PI3- fosfato. Hay evidencia de que esta vía de señalización impacta en procesos tales como metabolismo, motilidad, crecimiento y proliferación celular ²³. Otra de las vías de señalización regulada por las IRS, es la vía MAPK, la cual está asociada a procesos de crecimiento celular y diferenciación. Mutaciones de moléculas relacionadas con esta última vía se han visto estrechamente asociadas a cáncer ²².

Actualmente se sabe que IRS-1 y 2 se expresan en diferentes tejidos tales como cerebro, musculo, corazón, tejido adiposo, células renales, ovario, glándula mamaria ²⁴, así como en células HeLa y HeLa 3b2. En células HeLa se ha demostrado que la expresión de los IRS's es regulada de manera diferencial por hormonas esteroides. Tal es el caso de la progesterona, la cual incrementa la expresión de IRS-2, tanto a nivel de mensajero como de proteína sin que se modifique los niveles de IRS-1, sugiriendo que la relación de la expresión IRS-1/IRS-2 en este tipo célular puede constituir un mecanismo de modulación de los efectos de insulina, IGF y citocinas sobre la proliferación y diferenciación celular ²⁵. Estudios realizados en la glándula mamaria del ratón y en células de cáncer de mama MCF-7, han demostrado que la transcripción del gen de IRS-1 se incrementa tanto por estrógenos, como por progesterona, encontrando que la expresión dependiente de estrógenos esta en relación directa al incremento en la proliferación celular. ²⁶.

2.2. IRS y cáncer

La mayoría de los estudios relacionados con IRS se han centrado en su efecto sobre el metabolismo; sin embargo en los últimos años empezaron a aparecer reportes relacionados con su probable participación en diversos tipos de cáncer.

Se ha demostrado que la sobreexpresión de las proteínas IRS en fibroblastos de embriones de ratón, así como en los fibroblastos NIH3T3 induce transformación de las

10

células normales a malignas capaces de formar tumores en ratones desnudos, por hiperactivación de la vía MAPK y la activación del IGFR, en tanto que los fibroblastos IGFR^{-/-} son resistentes a dicha transformación, sugiriendo que los IRS pueden funcionar como moléculas oncogénicas transformantes. Esta actividad ha sido poco estudiada en diferentes tejidos, excepto mama y pulmón en donde se ha avanzado más en el conocimiento. El mecanismo a través del cual las IRS ejercen su acción transformante ha sido poco estudiado y no es claro a la fecha cuales son las señales que activan las IRS o cuales son los factores involucrados en la señalización hacia la transformación celular. Si bien las IRS pueden funcionar como oncogenes, éstas también requieren de otras proteínas oncogénicas para ejercer su acción. Se ha visto que las IRS pueden unirse a otras proteínas (antígeno JCV T, antígeno SV40T, oncoproteína RET, ETV6-NTRK3), las cuales no solo se unen sino también dependen de la fosforilación en tirosina de las IRS para ejercer su acción mitogénica y transformante²². Además, en el caso del cáncer de mama, se ha demostrado que las IRS pueden unirse a otras proteínas tales como el receptor de estrógenos (ER α), β -catenina, FAK y Bcl2, las cuales son proteínas que se han asociado en forma importante con este tipo de cáncer²⁷.

Los estudios relacionados con la participación de las IRS en el cáncer se han ido extendiendo en los últimos años hacia el cáncer de hígado, páncreas, y pulmón encontrándose que en los dos primeros casos hay una sobreexpresión de estas proteínas oncogénicas y una hiperactivación de las vías de señalización de IGF e insulina, observándose además que la sobreexpresión de IRS-1 previene la apoptosis ²⁸. En el caso del cáncer de células escamosas en pulmón la expresión de este sustrato se encuentra disminuida, sugiriendo que la capacidad transformante de las IRS depende del tejido ²⁹.

Por otro lado, algunos grupos enfocados en el estudio de la actividad de las IRS han encontrado que éstas se encuentran constitutivamente fosforiladas (activas) en una amplia variedad de tumores, pero con un efecto diferente dependiendo el tipo de tumor.

Por ejemplo; se ha demostrado que en tumores como liposarcomas, miosarcomas y leiomiosarcomas IRS-1 promueve la proliferación y transformación celular ³⁰; en tanto

11

que en otros como el neuroblastoma y el cáncer de mama la sobre expresión de IRS-2 promueve la motilidad celular, la invasión y metástasis.³¹. Por otro lado, en cáncer de próstata, IRS-1 disminuye la motilidad de las células ²⁷, en tanto que en mama está altamente relacionado con la progresión del cáncer. A la fecha hay poca información asociada al cáncer cervicouterino; sin embargo en un estudio realizado por Xuan Luo *et al.*, en 2012 ³², en el que utilizaron células derivadas de un tumor primario de lengua y garganta cuyas características eran con poca capacidad metastasica o altamente metastasica, así como muestras de tejido de cáncer de cuello y cabeza (asociado a la infección con el VPH) se demostró mediante PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) en tiempo real, que la disminución en la expresión de IRS-1 promueve metástasis, lo cual sugiere que esta proteína podría estar funcionando como un factor protector de la expansión de este tipo de cáncer a otros tejidos.

Todos estos resultados, que se resumen en la tabla 1, nos muestran que la expresión de IRS-1 e IRS-2 depende del tipo celular presente en los tumores y que su efecto sobre las diferentes funciones celulares difiere. Mientras que IRS-1 se asocia principalmente con proliferación, crecimiento y anti-apoptosis, IRS-2 se relaciona generalmente con procesos como metástasis, motilidad e invasión celular.

Tipo de cáncer	Expresión	Referencia
Liposarcomas, miosarcomas, leiomiosarcomas	Se encuentran constitutivamente fosforiladas (activas), y posiblemente, IRS-1 participe en la proliferación celular del tumor y la transformación	Qing Chang et al., 2002
Cáncer de células escamosas de pulmón	La expresión se encuentra disminuida	Han CH, et al., 2006
Neuroblastoma	IRS-2 se encuentra sobreexpresada y promueve la motilidad celular y la invasión	Shannon et al., 2007
Células de cáncer de próstata	Expresión de IRS-1 disminuye la motil'dad celular	Shannon et al., 2007
Cáncer de mama	La sobreexpresión de IRS-1 promueve la proliferación y el crecimiento celular. La sobreexpresión de IRS-2 promueve la metastasis	Bonita et al, 2008
Células de hepatocarcinoma	Sopreexpresión y una hiperactivación de las vías de señalización de IGF e insulina. La sobreexpresión de IRS-1 previene la apoptosis	Heather E. Metz y A. McGarry Houghton, 2011
Cáncer de cuello y cabeza	La disminución en la expresión de IRS-1 promueve metástasis	Xuan Luo et al., 2012

Tabla 1. Resumen de la expresión de IRS-1 e IRS-2 en diferentes tejidos.

2.3. Insulina y cáncer

La insulina es una hormona compuesta de dos cadenas de polipéptidos unidos por dos puentes disulfuro. En el humano, la cadena A consta de 21 aminoácidos y la cadena B de 30 aminoácidos. Su mecanismo de acción inicia cuando esta hormona se une a su receptor (IR) localizado en la membrana celular, a partir del cual puede activar una de dos cascadas de señalización, ya sea la vía PI3K que activa a su vez la proteina cinasa B (Akt), o bien, la vía de las MAPK (mitogen-activate protein cinase). Esta última se activa a través de la formación de complejos entre el factor intercambiador SOS y la proteína 2 unida al receptor del factor de crecimiento (GRB-2), a su vez, GRB-2 puede ser activada por IRS-1/2 o por la proteína adaptadora *shc* (SHC). En algunos tejidos, estas dos cascadas de señalización presentan como intermediario a las IRS's y están involucradas en procesos cancerosos²³.

Algunos de los estudios iniciales sobre el papel de la insulina como factor de crecimiento celular, se realizaron en cultivos de la línea celular de mama MCF-7. En

dichos estudios se demostró claramente que la insulina incrementa la síntesis de DNA y el crecimiento celular ³³; en tanto que Frasca y colaboradores, 2008 ³⁴, usando un modelo animal, han sugerido que la insulina puede tener un papel directo en la progresión a cáncer. Este grupo observó que las células MCF-7 no tenían la capacidad de formar tumores en ratones diabéticos sin ningún tratamiento, mientras que en los ratones diabéticos tratados con insulina éstas mismas células formaban tumores en un 100%, sugiriendo que la insulina es un factor importante para el desarrollo de tumores. Este tipo de resultados han sido reportados por otros investigadores que han demostrado que la administración de insulina a ratas con carcinoma mamario incrementa de forma significativa el tamaño de los tumores y que la deficiencia de esta hormona ejerce efectos opuestos ³⁵.

Por otro lado, en varios estudios se han reportado niveles del receptor de insulina significativamente altos en biopsias de tejido de mujeres con cáncer de mama, comparados con los niveles encontrados en otros tejidos normales, incluidos el hígado y mama, los cuales mantuvieron su capacidad de unión a su ligando ³⁶. Esta sobreexpresión del receptor se ha asociado con la transformación de una célula normal hacia un fenotipo maligno en células NIH3T3 y en células normales ³⁷, sugiriendo que la sobreexpresión del receptor de insulina está asociada con la transformación celular del epitelio de mama.

La sobreexpresión del receptor de insulina parece ser un fenómeno común en varios tipos de cáncer ya que la concentración alta de dicho receptor se ha encontrado en diferentes carcinomas, tales como carcinomas de colon, estómago, ovario, tiroides y linfomas de células T³⁴. En este último se encontró que también el IGF-1R se encuentra incrementado ³⁸.

Debido a las implicaciones que tiene la insulina, el IR y las IRS sobre la proliferación celular y progresión a cáncer, la vía de señalización de la insulina se ha vuelto blanco de muchas investigaciones a nivel molecular para poder establecer claramente la cascada intracelular que se activa en esta patología. A pesar de que esta vía ha sido muy estudiada en cáncer de mama y en otros tipos de cáncer, hay muy escasa información documentada del posible papel de IRS-1 y 2 en la génesis y desarrollo de

14

CaCu. Uno de los estudios realizado por Serrano y colaboradores en el año 2008³⁹, demostró que las células SiHa (línea celular inmortalizada de un cáncer cervicouterino y positivo para VPH) expresan un nivel más alto de los receptores de IGF e insulina, comparado con la expresión de ambos receptores en células C33a (VPH-); además de una sobreexpresión de Akt y ERK (cinasa regulada por señales extracelulares), moléculas clave en las vías de señalización PI3K y MAPK, respectivamente. Sin embrago, la participación de IRS-1 e IRS-2 dentro de esta vía de señalización no fue estudiada, ni tampoco se describe si la expresión de ambas formas (IRS1-, IRS-2) se expresan de la misma manera en ambas líneas celulares.

3. JUSTIFICACIÓN

Los IRS son sustratos que tienen un papel importante en algunas vías de señalización de diversos tipos de cáncer y que están relacionadas con procesos de muerte celular, proliferación, invasión y metástasis ayudando a la progresión de la enfermedad. En cáncer cervicouterino no existen estudios relacionados con la participación de estas moléculas y sus posibles vías de señalización. Dada la alta prevalencia de cáncer cervicouterino en México como a nivel mundial, resulta importante identificar el papel de estas moléculas adaptadoras en este tipo de padecimiento, lo cual nos permitirá conocer nuevos blancos moleculares que puedan ser utilizados en un futuro como terapia biológica.

4. <u>HIPÓTESIS</u>

Los sustratos IRS-1 y 2 participan en la regulación de la proliferación celular a través de la vía canónica de señalización del receptor de insulina en células HeLa.

5. OBJETIVO GENERAL

Investigar la participación de IRS-1 e IRS-2 en la vía de señalización del receptor de insulina y su participación en la proliferación en células HeLa.

5.1. Objetivos específicos

1. Observar la expresión basal del RNAm de IRS-1 e IRS-2 y del receptor de insulina (IR) en las líneas celulares HeLa y controles.

- Investigar la fosforilación de las proteínas IR, IRS1/2, PI3K, Akt y ERK1/2 en HeLa y controles, en presencia de insulina.
- Investigar los cambios en la proliferación en ambas líneas celulares en respuesta a insulina.

6. MAPA CONCEPTUAL



7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1. Cultivo celular

Para este proyecto se utilizaron tres líneas celulares derivadas de carcinomas de cérvix, HeLa (VPH18+) y como control negativo C33a (VPH-); además, como control positivo para IRS-1 e IRS-2 se utilizaron dos líneas celulares de cáncer de mama MCF7 y MDA-MB-231. Estas líneas celulares fueron compradas a la compañía ATCC (American Type Culture Collection) para asegurar la calidad de las mismas. Las células fueron mantenidas para su crecimiento en medio de cultivo EMEM (Eagle's Mínimum Essential Medium), suplementado con 10% de suero fetal bovino (SBF), 500 µg/ml ampicilina-estreptomicina y 250 µg/ml de fungizona en una incubadora a 37 °C, con 95% de humedad y 5% de CO₂.

La dosis y el tiempo óptimo de incubación con el estímulo de insulina (Insulina recombinante humana, de SIGMA) se obtuvo mediante curvas dosis-respuesta y temporales de crecimiento de las células, tanto en presencia, como en ausencia de la hormona.

7.2 Medición de la proliferación celular

Los cambios en la proliferación celular se evaluaron mediante la técnica de MTT y conteo del número de células en cámaras de Neubauer como se describe a continuación:

7.2.1 Técnica de MTT

Esta técnica nos permitió medir la actividad de la enzima succinato deshidrogenasa mitocondrial para reducir el MTT [(3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5) difenil tetrazolio] a formazán insoluble, dando una coloración púrpura, que fué medida en forma cuantitativa en un espectrofotómetro. Se sembraron 5,000 células HeLa y 10,000 células C33a en placas de 96 pozos, se dejaron incubar durante 24 h a 37°C y 5% de

CO₂ en presencia de medio de cultivo EMEM suplementado con 10% de Suero Fetal Bovino (SFB). Transcurrido este tiempo, se lavó una vez con Solución Salina de Fosfatos (por sus siglas en inglés, PBS [137 mM de NaCl, 2.7 mM de KCl, 10 mM de NaHPO, 2 mM de KHHPO), se adicionó medio EMEM fresco sin SFB y se incubaron por 2 horas. Posteriormente se eliminó este medio y se adicionó medio fresco (EMEM sin SFB + diferentes concentraciones de Insulina) y se incubó a diferentes tiempos. Cuatro horas antes de que se cumpliera cada uno de los diferentes tiempos de estímulo con insulina, se agregaron 10 μ l de MTT a cada uno de los pozos de las placas de cultivo y se continuó con la incubación a 37° C. Transcurridas las 4 horas, se agregaron 100 μ l de una solución 0.04 M de ácido clorhídrico (HCl) en isopropanol, para detener la reacción con el MTT. El cambio en la absorbancia en cada uno de los pozos fué medido en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 595 nm.

7.2.2 Conteo en cámaras de Neubauer

Esta es una forma visual para el conteo celular. Se sembraron 5,000 células HeLa y 10,000 células C33a en placas de 96 pozos, se dejaron incubar durante 24 h a 37°C y 5% de CO₂ en presencia de medio de cultivo EMEM suplementado con 10% de SFB. Transcurrido este tiempo, se lavó una vez con PBS, se adicionó medio EMEM fresco sin SFB y se incubaron por 2 horas. Posteriormente se eliminó este medio y se adicionó medio fresco (EMEM sin SFB + diferentes concentraciones de Insulina) y se incubó a diferentes tiempos. Posteriormente las células de cada pozo se pasaron a un tubo Eppendorf de 0.5 ml. Se tomaron 50 μ l de la suspensión celular y se agregó 50 μ l de azul de tripano dejando reposar 1 minuto. Por último, 10 μ l de la suspensión celular se colocaron en la cámara de Neubauer. Las células vivas (sin teñir) y las muertas (teñidas de azul) se contaron en el microscopio de luz (objetivo 10X). El número de células vivas por mililitro se determinó con la siguiente fórmula:

Células/ml= sumatoria de células ÷ 4 cuadrantes x factor de dilución x factor de corrección de la cámara (10⁴)

7.3 Medición de la expresión de RNAm de IR, IRS-1 e IRS-2

La expresión de los genes del receptor de insulina y de las IRS's se hizo mediante la técnica de RT-PCR.

7.3.1 Extracción de RNA total

Se sembraron 1,000,000 de células en frascos de cultivo de 25 cm². La monocapa de células se lavó dos veces con PBS, posteriormente se adicionaron 5 ml de PBS y las células se desprendieron de la superficie utilizando un gendarme. Posteriormente se pasó la suspensión celular a tubos Falcon y se centrifugó a 1000 rpm durante 10 min. La pastilla celular se re suspendió en 1 ml de Trizol y se pasaron a tubos Eppendorf y se colocaron en hielo por cinco minutos. La extracción de RNA total se hizo de acuerdo al método de Chomczynski y Sacci⁴⁰. Brevemente, se agregó a cada tubo 200 µl de cloroformo/ml de Trizol, se homogenizó 20 s en vórtex y se colocaron 3 min en hielo y se centrifugaron a 12,000 rpm por 15 min a 4°C. La fase acuosa incolora (RNA) se transfirió a otro tubo Eppendorf y se agregaron 500 µl de isopropanol, se homogenizó en vórtex 15 s y se mantuvieron a -20°C por 10 min. Posteriormente se centrifugó y la pastilla se resuspendió con 75% etanol/H₂O-DEPC (Dietil Pirocarbonato) para inhibir las RNasas. Se centrifugó nuevamente a 10,000 rpm por 5 min, se dejó secar la pastilla se resuspendió en 15 μ l de H₂O-DEPC y los tubos se colocaron en baño maría a 56°C/10 min. La cantidad de RNA total se cuantificó en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 260 nm.

7.3.2 Transcripción reversa (RT)

Antes de la RT, se hizo un tratamiento previo con DNAsa. 1.5 μ g de RNA total se mezclaron con 1 μ l de buffer DNAsa 10X; mas 1 μ l de DNAsa, llevando a un volumen de 10 μ l con H₂O con DEPC. Esta mezcla se incubó por 15 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, la reacción se paró agregando 1 μ l de EDTA (25 mM) y los tubos se colocaron en baño maría a 65°C durante 10 min.

Después de este tiempo, para llevar a cabo la RT, a cada muestra se le adicionó 1 μ l de oligo DT (0.5 μ g/ μ l), se incubaron a 70°C/10 min y se colocaron en hielo. Para la reacción de transcripción reversa se usó una mezcla constituida por: 0.5 μ l de RNAsin (40 U/ μ l), 4.0 μ l de amortiguador de reacción RT (5X), 2.0 μ l de DTT (0.1 M), 1.0 μ l de dNTP's (10 mM), y 0.5 μ l de transcriptasa reversa (200 U/ μ l); todo en un volumen final de 20 μ l. La reacción se llevó a cabo a 37°C durante 1 hora y a 70°C por 15 min. Finalmente se colocaron en hielo o se almacenaron a -20°C hasta su uso.

7.3.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Para llevar a cabo la amplificación de las cadenas de cDNA para los genes del receptor de insulina, IRS-1 e IRS-2, se utilizaron los oligonucleótidos específicos para cada uno de ellos y se muestran en la Tabla 2.

Gen	Oligonucleótido
IR	Sentido: 5'- AAC CAG AGT GAG TAT GAG GAT-3'
	Anti-sentido: 5'-CCG TTC CAG AGC GAA GTG CTT-3'
IRS-1	Sentido: 5'-TCCACTGTGACACCAGAATAAT-3'
	Anti sentido: 5'-CGCCAACATTGTTCATTCCAA-3'
IRS-2	Sentido: 5'- GCTGCTGCTACAGCTCCT-3'
	Anti-sentido: 5'-GGCTCGCCAAAGTCGATGT-3'
β-actina	Sentido: 5'-GACAGGATGCAGAAGGAGATCACT-3'
	Anti-sentido: 5'-TGATCCACATCTGCTGGAACCT-3'

Tabla 2. Oligonucleótidos que fueron utilizados para la amplificación de los fragmentos de los genes IR ⁴¹, IRS-1 ⁴², IRS-2 ⁴² y β-actina ⁴³como control interno.

Dos microlitros de cDNA de cada muestra obtenido mediante RT, fueron adicionados a la mezcla de reacción de PCR, la cual contenía: 2.5 µl de amortiguadorTaq DNA polimerasa 10X, 0.5 µl de dNTPs 10 mM, 1.0 µl de cloruro de magnesio 50 mM, 30 pmol de cada uno de los oligonucleótidos sentido y anti sentido especifico para cada gen y agua bidestilada estéril, para ajustar a un volumen final de 25 µl. Las muestras se agitaron suavemente en vórtex y se agregó 0.1 μ l de la enzima Taq DNA polimerasa (5U/ μ l). La amplificación se realizó en un termociclador (Bio-Rad), utilizando diferentes condiciones para cada uno de los genes de interés (Tabla 3). Todas las reacciones tuvieron un ciclo inicial de desnaturalización a 95°C por 5 min.

Gen	Condiciones de amplificación	Ciclos	Producto esperado
IR	95°C por 1 min (desnaturalización)	30	Isoforma A: 600 pb
	58°C por 1 min (alineamiento)		Isoforma B: 636 pb
	72°C por 1.5 min (síntesis)		
IRS-1	95°C por 1 min (desnaturalización)	30	763 pb
	55°C por 1 min (alineamiento)		
	72°C por 2 min (síntesis)		
IRS-2	95°C por 1 min (desnaturalización)	30	384 pb
	54°C por 1 min (alineamiento)		
	72°C por 1 min (síntesis)		
β-actina	94°C por 1 min (desnaturalización)	25	540 pb
	58°C por 1 min (alineamiento)		
	72°C por 1 min (síntesis)		

Tabla 3. Condiciones de amplificación para cada uno de los genes de interés.

7.3.4 Separación de los fragmentos por electroforesis en gel de agarosa

Los productos de PCR de cada uno de los genes fueron separados en geles de agarosa al 1.2%. Para cada uno de los genes se tomaron 10 μ l de cada reacción de PCR. A cada uno de los tubos se les agregó 2 μ l de buffer de carga [0.25% de Azul de Bromofenol, 0.25% de Xyleno Cyanol, 30% de glicerol en agua]. La electroforesis se llevó a cabo a 100 V durante 1 h, 25 minutos aproximadamente y los geles se tiñeron con bromuro de etidio. Para determinar el tamaño de los fragmentos amplificados se usaron dos marcadores; 1 kb plus DNA ladder (Invitrogen) y 50 pb DNA ladder (Invitrogen).

7.4 Evaluación de las modificaciones en la expresión y fosforilación de IR, IRS-1, IRS-2, PI3K, Akt y ERK1/2 por Western Blot.

7.4.1 Estimulación de los cultivos celulares con Insulina.

Se sembraron células HeLa en placas de 6 pozos con medio EMEM suplementado con 10% de SFB. La densidad celular utilizada fue de 400,000 células por pozo. Las células se dejaron incubar durante 48 horas para la formación de la monocapa, transcurrido este tiempo, se cambió el medio suplementado por medio sin SFB y se dejaron incubar 24 horas más. Posteriormente, se estimuló con insulina 50 nM durante 5, 15, 30, y 60 minutos; y durante 6 horas. Se tomaron como control, células del mismo experimento sin la estimulación con la insulina.

7.4.2 Extracción de proteínas totales

Terminado el tiempo de estimulación con la insulina, la monocapa de células se lavó con PBS frío y se agregó buffer de lisis (RIPA, ver anexo 1), 100 μl por pozo. Posteriormente, las células se colectaron con un scraper y se transfirieron a un tubo de centrifuga Eppendorf de 1.5 ml. Los tubos se mantuvieron en agitación constante 30 min a 4°C, se centrifugaron a 12, 000 rpm durante 20 minutos a 4°C y el sobrenadante se transfirió a otro tubo limpio para la cuantificación de las proteínas.

7.4.3 Cuantificación de proteínas

La cuantificación se llevó a cabo utilizando el kit comercial 2D Quant (Amersham Biosciences). Antes de realizar el ensayo, se preparó un volumen apropiado del reactivo de trabajo de color ("working color") mediante la mezcla de 100 partes de reactivo de color A con 1 parte de reactivo B. Cada ensayo individual requirió de la preparación de 500 µl. Posteriormente, se preparó la curva estándar de acuerdo a la Tabla 4, utilizando la solución de albúmina sérica bovina (BSA) estándar proporcionada

en el kit (2 mg/ml). El tubo 1 se consideró el blanco del ensayo, que no contenía proteína. La curva estándar se hizo por duplicado.

Número de tubo	1	2	3	4	5	6
Volumen BSA (2mg/ml)	0 µl	2.5 μl	5 μl	7.5 μl	10 µl	12.5 μl
Concentración de proteína (BSA)	0 µg	5 µg	10 µg	15 µg	20 µg	25 µg

Tabla 4. Preparación de la curva estándar.

Posteriormente se prepararon los tubos que contenían 5 µl de cada muestra problema por duplicado. Se adicionaron 250 µl del precipitante a cada tubo (incluyendo los tubos de la curva estándar). Se agitó brevemente y se incubó 2-3 min a temperatura ambiente. Se agregaron 250 μl del co-precipitante a cada tubo y se mezcló brevemente por agitación con vórtex o inversión. Los tubos se centrifugaron a 10 000 × g durante 5 min. Se decantaron los sobrenadantes, sin tocar la pastilla y se continuó rápidamente al siguiente paso para evitar la re suspensión o dispersión de la pastilla. Los tubos se centrifugaron nuevamente para llevar todo el líquido restante a la parte inferior del tubo. Un breve pulso fue suficiente. Se utilizó una micro pipeta para eliminar el sobrenadante restante hasta que no quedara líquido visible en los tubos. Se adicionaron 50 µl de solución de cobre y 200 µl de agua destilada o desionizada a cada tubo. Se agitó en vórtex brevemente para disolver la proteína precipitada. Se agregaron 500 µl de reactivo "working color" a cada tubo, asegurándose de mezclar por inversión lo más rápidamente posible. Se dejó incubar a temperatura ambiente durante 15-20 min. La absorbancia de cada una de las muestras se hizo en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 480 nm. La concentración final de proteína en cada muestra se obtuvo extrapolando los valores de absorbancia de las muestras problema en la curva estándar (Figura 4).



Figura 4. Ejemplo de una curva estándar.

7.4.4 Separación de proteínas en SDS-PAGE

La separación de proteínas se hizo en geles acrilamida-bisacrilamida-SDS al 7.5%. Se preparó la mezcla del gel de separación al 7.5% para dos mini geles (6.6 ml de Acrilamida/Bis-acrilamida 30%:0.8%; 5 ml de Tris 1.5 M pH 8,8; 200 µl de SDS 10%; 8 ml de agua destilada; 140 µl de persulfato de amonio 100 mg/ 1 ml; y 14 µl de TEMED). Se preparó la mezcla del gel concentrador al 4% para 2 mini geles [1.3 ml de acrilamida/bis-acrilamida 30%:0.8%; 2.5 ml de tris 0,5 M pH 6,8; 100 µl de SDS 10%; 120 µl de per sulfato de amonio 100 mg/ 1 ml; y 14 µl de SDS 10%; 120 µl de per sulfato de amonio 100 mg/ 1 ml; y 14 µl de TEMED)]. Un total de 40 µg de proteína se mezcló en una dilución 1:1 con el Buffer de carga 2X (ver anexo 2 y la mezcla se hirvió 5 minutos a 95-100°C e inmediatamente se colocó en hielo. La corrida se realizó a 80 Volts durante 2 h, usando un buffer de corrida (ver anexo 3).

7.4.5 Western Blot

Las proteínas separadas previamente en el gel SDS-PAGE se transfirieron a membranas de PVDF (Thermo Scientific), previamente sumergidas en metanol por 30 segundos. Se

uso una cámara de transferencia para minigeles (Bio Rad) llena del buffer de transferencia (ver anexo 4). La transferencia se hizo a 40 V por 90 min.

Terminado el tiempo de la transferencia, la membrana se lavó durante 10 min en un recipiente pequeño con TBS (ver anexo 5) se colocó la membrana en una solución de bloqueo (BLOTTO, ver anexo 6) y en agitación suave por una hora a temperatura ambiente (TA). Transcurrido este tiempo se realizaron 3 lavados de 5 minutos c/u con TBS-T (ver anexo 7) durante 5 min y con agitación suave a TA. Posteriormente, se agregó el anticuerpo primario (Se utilizó una dilución 1:500 para todos los anticuerpos primarios utilizados. Esta dilución se realizó en solución 2.5% BSA/TBS-T y se incubó toda la noche con agitación suave a 4°C. Al día siguiente, se lavó 3 veces con TBS-T por 5 min en agitación suave a TA. Después de los lavados se adicionó el anticuerpo secundario (utilizando una dilución 1:2500 para todos los anticuerpos secundarios ocupados en este trabajo), el cual se diluyó en solución BLOTTO (la cual se preparó justo antes de utilizarla). Se incubó durante 2 horas en agitación suave a TA. Posteriormente, la membrana se lavó 3 veces por 5 min con TBS-T en agitación suave y a TA. Por último, las membranas se revelaron mediante quimioluminiscencia utilizando un kit comercial (Super Signal West Femto Maximum Sensitivity Substrate, de Thermo Scientific). Se utilizó un equipo para detectar quimioluminiscencia (Chemi DocX RS, de Bio-Rad). Brevemente, a las membranas se les añadieron 200 µl del sustrato (dilución 1:1) e inmediatamente se colocaron en una plancha dentro del equipo para posteriormente tomar varias fotografías cada 2 segundos.

La α-actina fue utilizada como control para normalizar los valores de las proteínas de interés obtenidos mediante densitometría.

7.5 Análisis estadístico

Se realizó análisis de varianza (ANOVA). Cuando dicho análisis presento una p<0.05, las diferencias entre los grupos, se calculó utilizando la prueba de comparación múltiple Tukey HSD. Para este análisis estadístico, se utilizó un software específico (SPSS).

26

7.6 Estrategia experimental



8 ASPECTOS ÉTICOS

Este trabajo se trata de un estudio sin riesgo, ya que se utilizaron líneas celulares humanas derivadas de CaCu (HeLa, y C33A) y de cáncer de mama (MCF7), las cuales fueron adquiridas de la empresa American Type Culture Collection (ATCC), compañía que cuenta con normas éticas para la obtención de materiales humanos así como las autorizaciones correspondientes para la venta de estas líneas celulares.

9 MEDIDAS DE BIOSEGURIDAD

Para el desecho de residuos peligrosos generados en el laboratorio durante el desarrollo de este trabajo que presenten algunas de las características: corrosivo, reactivo, explosivo, tóxico, inflamable y biológico infeccioso (CRETIB), se envasaron en recipientes especiales de acuerdo a su contenido, fueron debidamente clasificados e identificados por medio de un sello adhesivo o etiqueta de identificación. Estos recipientes se llenaron hasta el 80% de su capacidad aproximadamente, además las sustancias que se colocaron dentro de ellos fueron compatibles entre sí, por ejemplo, no se mezclaron ácidos y bases, ya que puede provocar reacciones violentas o generar gases tóxicos que causan serios problemas. Posteriormente, los recipientes asegurados fueron transportados al sitio de almacenamiento temporal ubicado en un área específica dentro del edificio del CISEI hasta que se entregaron a una empresa especializada en el manejo y tratamiento de residuos. Todos los CRETIB fueron manipulados dentro de campanas de extracción y/o flujo laminar.

Todo el material biológico utilizado para el desarrollo de este proyecto, por ejemplo células o material que haya estado en contacto con éstas se consideró como Residuos Peligrosos Biológico-Infecciosos (RPBI), los cuales se eliminaron en bolsas de polietileno de color rojo traslúcido y marcadas con la leyenda Residuos Peligrosos Biológico-Infecciosos y debidamente etiquetados. Y fueron transportados al sitio de almacenamiento temporal.

Para el desecho de los residuos peligrosos punzocortantes, estos se colocaron en recipientes rígidos, de polipropileno color rojo, resistentes a fracturas y pérdidas de contenido al caerse, destructibles por métodos físicos, y debidamente etiquetados con la leyenda: "RESIDUOS PELIGROSOS PUNZOCORTANTES BIOLOGICO-INFECCIOSOS".

10 <u>RESULTADOS</u>

10.1 Expresión del RNAm del receptor de insulina (IR) en las líneas celulares HeLa y C33-A en condiciones de crecimiento basal.

Las células Hela (7x10⁵) y C33-A (1x10⁶) se sembraron en medio EMEM suplementado con 10% de SFB se dejaron incubar durante 48 horas. Transcurrido este tiempo, las células se cosecharon y se hizo extracción de RNA y el RT-PCR. En la figura 5A se puede observar la amplificación de los fragmentos correspondientes a las isoformas A (600bp) y B (636 bp) del receptor de insulina en las células Hela y MCF-7; en tanto que en las células C33-A solo se amplificó una banda correspondiente a la isoforma A. Así mismo se puede observar que en el caso de las células HeLa, la banda predominante es la correspondiente a la isoforma A.



Figura 5. Expresión de IR en las líneas celulares HeLa, C33a y MCF7.En (A) se muestran los fragmentos de 600 y 636 pb correspondientes a las isoformas A y B del receptor de insulina en las diferentes líneas celulares. En (B) se muestra el fragmento de 540 pares de bases del control de β -actina. MCF7 se usó como control positivo.

10.2 Expresión del RNAm de IRS-1 y de la proteína IRS-2 en condiciones basales de crecimiento.

Las células Hela (7 x 10⁵) y C33-A (1 x 10⁶) se sembraron en medio EMEM suplementado con 0.2 % ó 10% de SFB, y se dejaron incubar durante 24 y 48 horas. Transcurridos estos tiempos, las células se cosecharon y se hizo extracción de RNA y RT-PCR. Como se puede observar el la figura 6, la expresión del mensajero para este gen se incrementa ligeramente por las diferentes concentraciones de suero bovino fetal adicionado al medio de cultivo; siendo mayor a una concentración de suero del 10%; sin embargo no depende del tiempo de cultivo. Así mismo se observó que la expresión del mensajero fue menor en la línea celular C33-A, comparado con las células HeLa, aunque esto debe de tomarse con precaución, ya que no tenemos el control del gene constitutivo.



Figura 6. Expresión de IRS-1 en las líneas celulares C33a y HeLa. Las bandas corresponden al fragmento amplificado de 763 pb correspondiente a IRS-1. A) C33 y B) HeLa.

En el caso del RNAm de IRS-2 solo obtuvimos un fragmento de 342 pb tanto en C33a, como en HeLa, el cual no corresponde al producto esperado para IRS-2 de 729 bp, publicado por Boissan M., *et al.* en líneas celulares humanas de hepatocarcinoma por lo que se están diseñando nuevos oligonucleótidos. Sin embargo, en los ensayos de Western Blot, la proteína de IRS-2 si se expresa en células HeLa, aún en ausencia de suero bovino fetal (Figura 13).

10.3 Crecimiento celular en diferentes condiciones de cultivo en presencia y ausencia de 0.2% y 10 % SBF.

Se sembraron 10,000 (C33-A) y 5,000 (HeLa) células por pozo en placas de 96. Se sembraron con medio EMEM suplementado con 10% SFB y se dejaron incubar 24 horas para la formación de la monocapa. Transcurridas las 24 horas, se retiró el medio, se hizo un lavado con PBS y se les adicionó medio nuevo suplementado con diferentes concentraciones de SFB (0, 0.2%, 10%) y se incubaron 24, 48 y 72 horas. En la figura 7 se muestran los resultados de la evaluación indirecta de la proliferación celular por el método de MTT. En la figura 7A se muestra la cinética de proliferación de C33a, en donde se puede observar que las células incubadas con las tres concentraciones de SBF mantienen un crecimiento similar hasta las 48 hrs, sin embargo, a las 72 hrs de incubación, hay una diferencia significativa entre las células crecidas en EMEM con 0.2% de SFB y EMEM sin suero con respecto a las células incubadas con 10% de SFB, estas últimas presentan una proliferación mayor. En la figura 7B se muestran los resultados de células HeLa, en la cual se observa un patrón de proliferación celular similar con las diferentes concentraciones de SFB hasta las 24 hrs. A las 48 y 72 hrs, no se observan diferencias entre el grupo sin suero y el grupo al 0.2% de SFB. Cuando estos dos grupos son comparados contra el grupo al 10% de SFB, hay una disminución estadísticamente significativa tanto a las 48 como a las 72 hrs.



Figura 7. Cinética de proliferación de C33a y HeLa en respuesta a diferentes concentraciones de SFB utilizando MTT. A) C33a y B) HeLa. Los datos son el resultado de dos experimentos (n=12) y están expresados como el promedio ± DE. Significancia estadística: * p<0.05 con respecto al grupo de 10% SFB.

La figura 8 muestra los resultados obtenidos por conteo celular en cámara de Neubauer de ambas líneas celulares correspondientes al mismo experimento descrito antes. En C33a se puede ver claramente una disminución estadísticamente significativa en el grupo de células cultivadas sin suero y con 0.2% de SFB con respecto a las células con 10% de SFB a las 48 y 72 hrs (Fig. 8A). En HeLa, se observa que el número de células aumenta conforme al tiempo en los tres grupos, sin embargo, solo el grupo que se mantuvo en ausencia de suero presentan una disminución estadísticamente significativa con respecto al grupo cultivado en condiciones normales (suero al 10%) (Fig. 8B).



Figura 8. Cinética de proliferación de C33a y HeLa en respuesta a diferentes concentraciones de SFB mediante conteo en cámara de Neubauer. A) C33a y B) HeLa. Los datos son el resultado de dos experimento con una n=6 y están expresados como el promedio ± DE. Significancia estadística: * p<0.05 con respecto al grupo de 10% SFB.

10.4 Crecimiento celular en presencia y ausencia de Insulina recombinante humana.

10.4.1 Curva dosis-respuesta

Para estos experimentos se usó un tiempo de incubación de 48 hrs definido a partir de los datos de la curva temporal previamente descritos. La estimulación con las diferentes dosis de insulina (10, 50 y 100 nM) se hizo en medio EMEM sin SFB. La proliferación fue medida con el método de MTT y por conteo celular en cámaras de Neubauer. Los resultados se muestran en las figuras 9 y 10, respectivamente. El histograma muestra que la proliferación celular tanto de C33a como de HeLa presenta una tendencia a disminuir con respecto al control, siendo más evidente a la dosis de 50 y 100 nM, sin embargo, estos resultados en ambas líneas celulares no son estadísticamente significativos, no obstante, cuando se hace una comparación entre grupos, se obtiene que las dosis de 50 y 100 nM son significativamente más bajas con respecto a la dosis de 10 nM. Este patrón no se ve reflejado en los resultados obtenidos con el conteo de las células con azul de tripano, sin embargo, en las células HeLa, se observa un incremento estadísticamente significativo entre los valores encontrados con la dosis de 100nM comparado contra el grupo control no estimulado (p<=0.05) (Fig. 10B).



Figura 9. Efecto dosis-respuesta de insulina sobre la proliferación de C33a y HeLa medida con la técnica de MTT. A) C33a y B) HeLa. El histograma representa el resultado de tres experimentos (n=6). Los datos están expresados como el promedio ± DS.





10.5 Análisis de la vía de señalización de IRS en respuesta al estímulo con insulina.

Las diferencias en la expresión de las proteínas IR, IRS-1, pIRS-1, IRS-2, ERK1/2, pERK1/2, Akt1 y pAkt1 se midieron mediante la técnica de Western Blot, usando anticuerpos específicos para cada uno de ellos. Para ello, se sembraron 600,000 células HeLa por pozo en placas de 6 pozos. Se dejaron 48 horas en medio EMEM suplementado con SFB 10% para la formación de la monocapa. Transcurrido este tiempo, el medio se reemplazó por medio nuevo sin SFB y las células se incubaron por 24 horas más. Posteriormente, las células se estimularon durante 5, 15, 30, 60 minutos y 6 horas con insulina 50 nM, ya que se necesitan tiempos cortos para observar la fosforilación de proteínas.

10.5.1 Modificaciones en la expresión de la subunidad 6 del receptor de insulina (IR6)

En la figura 11 se observa que la expresión de la subunidad β del receptor de insulina se incrementa en presencia de 50 nM de insulina y que este incremento depende además del tiempo de permanencia de la hormona en el medio de cultivo. Como se puede ver en la gráfica que contiene los datos normalizados contra la proteína constitutiva (α -actina), la mayor expresión se alcanza a los 30 minutos y decae hasta las 6 hrs. El anticuerpo utilizado en este experimento no discrimina entre las dos isoformas del receptor.



Figura 11. Expresión del receptor β de Insulina medido por Western Blot. Las células fueron estimuladas con insulina (50nM) e incubadas a diferentes tiempos. Los datos fueron normalizados con los valores de α -actina. Resultado de un experimento.

10.5.2 Modificaciones en la expresión de IRS-1 y pIRS-1.

La siguiente proteína a analizar después del receptor de insulina fue la IRS-1. Células HeLa se estimularon con insulina 50 nM a diferentes tiempos, para posteriormente medir la expresión de IRS-1 tanto en su forma no fosforilada, como en su forma fosforilada. Se utilizaron como controles positivos las líneas celulares derivadas de cáncer de mama MCF7 y MDA-MB-321. Se observó que la expresión de IRS-1 en su forma no fosforilada incrementa a lo largo del tiempo, alcanzando su expresión mayor a los 30 minutos después del estimulo con insulina comparado con el control. En el caso de la forma fosforilada se observa que un incremento a partir de los 15 minutos y

alcanza un pico a los 30 minutos, para posteriormente reducirse a niveles basales. También se hizo la normalización de los valores de p-IRS-1 contra los valores correspondientes de IRS-1 total y se observó que se mantiene la misma tendencia con respecto a la normalización con actina (figura12).



Figura 12. Expresión de IRS-1 y p-IRS-1 por Western Blot. Las células fueron estimuladas con insulina (50nM) e incubadas a diferentes tiempos. Los datos fueron normalizados con los valores de α -actina y con los valores de IRS-1 total correspondiente a cada experimento.

10.5.3 Modificaciones en la expresión de IRS-2

Otra proteína a analizar en la cascada de señalización de interés es IRS-2. Para ello, se estimularon células HeLa con insulina 50 nM a distintos tiempos, para posteriormente observar los cambios en la expresión de IRS-2 mediante Western Blot. El control positivo utilizado para esta proteína fue la línea celular de cáncer de mama MDA-MB-321. En la figura 13 se observa un incremento en la expresión de IRS-2 a partir de los 5 min con respecto al control, alcanzando un pico los 30 min, para posteriormente disminuir sin alcanzar los niveles basales.



Figura 13. Expresión de IRS-2 por Western Blot. Las células fueron estimuladas con insulina (50nM) e incubadas a diferentes tiempos. Los datos fueron normalizados con los valores de α -actina. Resultado de un experimento.

10.5.4 Modificaciones en la expresión de ERK1/2 y p-ERK1/2

Las IRS pueden activar dos vías de señalización; una de estas vías es la de las MAPK, donde las ultimas proteínas en activarse en esta cascada son ERK1/2, por ello, se analizó la expresión de estas proteínas en su formas no fosforilada y fosforilada en células HeLa estimuladas con insulina 50 nM a diferentes tiempos. ERK1/2 total incrementa su expresión a los 15 min, manteniendo este aumento hasta los 30 min comparado con el control. Una hora después del estimulo, la expresión de ERK1/2 regresa a los niveles basales, mientas que 6 horas después de haber estimulado a las células se observa que los niveles de ERK1/2 disminuyen cuando se compara con el control. Cuando la proteína fosforilada es normalizada contra la proteína total, hay una disminución en la expresión de p-ERK1/2 en todos los tiempos de estímulo comparado con el control (Fig. 14).



Figura 14. Expresión de ERK1/2 y p-ERK1/2 por Western Blot. Las células fueron estimuladas con insulina (50nM) e incubadas a diferentes tiempos. Los datos fueron normalizados con los valores de α -actina, y con los valores de ERK ½ total. Resultado de un experimento.

10.5.5 Modificaciones en la expresión de Akt1 y p-Akt1

Otra de las vías de señalización de las IRS es la cascada PI3K, esta cascada tiene como producto final en su activación a la proteína Akt. Se analizó la expresión de dicha proteína, en sus formas fosforilada y no fosforilada utilizando células HeLa estimuladas con insulina 50 nM. La figura 15 muestra las bandas correspondientes a los pesos moleculares tanto de Akt1 como de p-Akt1. La forma no fosforilada de la proteína incrementa con el tiempo, viéndose una mayor activación a los 30 min con respecto al control. Sin embargo, p-Akt1 presenta una mayor expresión a los 15 min, para posteriormente disminuir hasta llegar a las 6 horas después de la estimulación con insulina. Cuando Akt1 en su forma fosforilada, se normalizó contra los valores de Akt1 total, se observa el mismo efecto que se obtuvo normalizando contra la actina.



Figura 15. Expresión deAkt1 y p-Akt1 por Western Blot. Las células fueron estimuladas con insulina (50nM) e incubadas a diferentes tiempos. Los datos fueron normalizados con los valores de α -actina y con los valores de Akt1 total. Resultado de un experimento.

11. DISCUSIÓN

Recientemente se ha sugerido que la insulina juega un papel importante en el desarrollo de cáncer y su progresión, ya que se le ha involucrado en procesos de crecimiento y proliferación celular debido a que estimula la síntesis de DNA en diversos tejidos. La unión de la insulina a su receptor activa la actividad cinasa del IR para su autofosforilación y para la fosforilación de otros sustratos endógenos. Las cascadas de fosforilación constituyen el mecanismo básico de la acción de la insulina en las células. La señalización de la insulina está determinada por varios mecanismos que incluyen endocitosis de la insulina mediada por receptor seguido de degradación; activación de fosfatasas de tirosina o cinasas de serina/ treonina; internalización del receptor de la membrana plasmática y reducción del número de receptores en respuesta a altas concentraciones de insulina. Alguna falla en uno de estos mecanismos, lleva a un estado metabólico degenerado conocido como diabetes mellitus²³.

Recientemente ha habido un considerable incremento a nivel mundial en la incidencia de diabetes mellitus, así como en el uso generalizado de análogos de insulina, metformina y otros agentes antidiabéticos. Esto ha venido generando información que ha permitido el surgimiento de nuevas hipótesis sobre el riesgo de cáncer en la población diabética. De esta manera se sabe ahora que la Diabetes tipo 2 se asocia con un mayor riesgo de cáncer de mama, de colon, de páncreas y de otros tipos de cáncer, mientras que la Diabetes tipo 1 se asocia con el riesgo de desarrollar cáncer de estómago, páncreas, endometrio y cuello uterino.

A este respecto, diversos estudios epidemiológicos y algunos modelos experimentales para el estudio de la resistencia a la insulina e hiperinsulinemia han demostrado que existe una correlación entre los niveles de insulina y el desarrollo de cáncer. En pacientes con cáncer afectados por resistencia a la insulina, el aumento de los niveles circulantes de la insulina se combina con la frecuente sobreexpresión del receptor de insulina en células cancerosas, lo que resulta en la estimulación anormal de efectos no metabólicos de IR, tales como la supervivencia celular, la proliferación y la migración.

42

Desde un punto de vista molecular se sabe que una vez que la insulina interacciona con su receptor y éste se activa, se inicia el encendido de cascadas de señalización que dependen de un orquestado número de interacciones de diferentes proteínas. Existen dos vías principales de transducción de señales activadas por la insulina: la vía de la fosfatidilinositol 3-cinasa (PI3K) y la vía de las cinasas activadas por mitógenos (MAP cinasas). Ambas vías regulan la mayoría de las acciones de la insulina asociadas a la regulación del metabolismo energético, de la expresión genética y de efectos mitogénicos²³.

En células tumorales, la resistencia a la insulina y la hiperinsulinemia compensatoria están asociados con un desajuste de la red de señalización de la insulina. En estudios realizados en ratas obesas Zucker (fa/fa), así como en pacientes que presentan resistencia a la insulina se ha puesto de manifiesto que la vía PI3K se entorpece ó atenúa selectivamente en comparación con la vía MAPK cuya actividad se ve aumentada.

En diversos tipos de cáncer se ha demostrado que la acción de la insulina en las células del tumor esta mediado por dos proteínas adaptadoras conocidas como sustratos del receptor de insulina (IRS-1 e IRS-2), las cuales se expresan de manera diferente en los diferentes tipos de cáncer. En la mayoría de los canceres estas proteínas se encuentran sobre-expresadas y están asociadas con diferentes procesos celulares. Mientras que IRS-1 se asocia principalmente con proliferación, crecimiento y anti apoptosis, IRS-2 se relaciona generalmente con procesos como metástasis, motilidad e invasión celular.

A la fecha existe muy escasa información en la literatura relacionada con el papel que tienen estos substratos en la carcinogénesis de cáncer cervicouterino. Se sabe que las células HeLa expresan IRS-1 e IRS-2 y que éstas pueden ser reguladas por el estradiol y la progesterona en forma diferencial ²⁵; pero no se sabe cuál es el papel de estas sobre proliferación celular y la vía de señalización asociada a la activación por insulina.

Por ello, inicialmente hicimos una caracterización de la línea celular HeLa en función de la expresión del receptor de insulina y los dos sustratos, IRS-I e IRS-2. Esto debido a que para este proyecto usamos una línea nueva que se compró directamente a la compañía ATTC. Como se muestra en las figuras 1 y 8, las células HeLa expresan tanto

la isoforma A (600 pb) como la isoforma B (630 pb) del receptor de insulina en condiciones basales de cultivo, en tanto que las C33-A no expresa la isoforma B. Estos resultados concuerdan con los reportados por Serrano, (2008) quien demuestra que las células C33-A solo expresan la forma A del IR, en tanto que SiHa expresa ambas isoformas. En esta parte, es importante mencionar que el IR es un tetrámero que presenta dos isoformas generadas por splicing alternativo, la isoforma A (IR-A) y la isoforma B (IR-B). La IR-A no presenta el exón 11, el cual codifica un péptido de 12 aminoácidos, mientras que la IR-B si presenta este exón. La isoforma que carece del exón 11 está regulada durante el desarrollo, y se expresa predominantemente en tejidos fetales; esta isoforma se expresa menos en tejidos diferenciados de adultos, como son el hígado, musculo y tejido adiposo, blancos clásicos de los efectos metabólicos de la insulina donde predomina la IR-B. Sin embargo, la IR-A se sigue expresando en tejidos adultos, que no son los blancos típicos de la insulina. Así mismo, la IR-A ha sido estrechamente relacionada con el desarrollo de cáncer de mama, cáncer de tiroides y leimiosarcoma ⁴³.

Además de observar el IR a nivel de mensajero, en este estudio también se evaluó la expresión de dicho receptor en su forma no fosforilada, observándose que hay un ligero incremento desde los 15 min hasta una hora después del estímulo con insulina 50nM; sin embargo, no se pudo observar la expresión del IR fosforilado, pero ya se ha reportado previamente que la estimulación con 50 nM de insulina induce la autofosforilación del receptor, tanto en células SiHa como en C33³⁹.

Las siguientes moléculas en fosforilarse en la cascada de señalización del receptor de insulina son IRS-1 e IRS-2. Las IRS no poseen actividad cinasa, sin embargo, cuando estas moléculas se unen a receptores activados, se fosforilan mediante sus dominios PTB. IRS-1 e IRS-2 son forforilados en múltiples residuos de tirosina, los cuales sirven de sitios de unión para varias moléculas de señalización, incluidas la subunidad catalítica de PI3K, p85; Grb2; y SH-PTP2, para así, iniciar las distintas vías de señalización que contribuyen a los efectos biológicos de las IRS .

En este contexto, en el presente trabajo demostramos que las células HeLa expresan tanto la proteína IRS-1, como IRS-2. IRS-1 se pudo identificar tanto por su RNAm (Fig

6), como por Western Blot (fig 12); sin embargo, IRS-2 solo se detectó su expresión por Western Blot (fig 13), ya que los oligonucleótidos reportados por Boissan *et al.*, 2005⁴² no amplificaron la banda correspondiente y se procedió a diseñar otros oligonucleótidos.

Por otro lado y dado que se ha demostrado que la expresión tanto de IRS-1 como de IRS-2 puede ser regulada por algunas hormonas esteroides, como el estradiol y la progesterona ²⁴, por lo que fue necesario conocer si una baja concentración de SFB podría estar alterando la expresión de estos substratos. Esto se investigó solo para IRS-1, ya que no contamos con los oligos adecuados para amplificar IRS-2. Nuestros resultados demuestran que la expresión del mensajero para IRS-1 se modifica ligeramente por la presencia de diferentes concentraciones de SFB (0.2% y 10%), pero no hay cambios respecto al tiempo.

Debido a que observamos que la expresión de IRS-1 es modificada por la concentración de SFB en el medio de cultivo, procedimos a investigar si era posible eliminar el suero sin que se alterara su crecimiento. En la figura 7 y 8 podemos observar que las células HeLa cultivadas en ausencia de suero incrementan su crecimiento de una manera lineal hasta las 72 hrs de cultivo cuando se compara con el tiempo cero. Este mismo patrón se observó tanto en el ensayo de proliferación con el método de MTT, como con el conteo del número de células con la tinción con azul de tripano. Este mismo patrón fue observado para las células C33a.

Una vez caracterizada la línea, procedimos a investigar el efecto de la adición de diferentes concentraciones de insulina recombinante humana (10, 50 y 100nM) sobre la proliferación celular en un tiempo fijo de 48 hrs de cultivo. Los resultados obtenidos por la técnica de MTT nos indican que la insulina ejerce un efecto deletéreo sobre la viabilidad de las células HeLa y C33a cuando se utilizan las dosis de 50 y 100nM, sin embargo, el análisis estadístico de los datos mostró que no existe una diferencia significativa con respecto al control, pero si hay una diferencia significativa entre la dosis mayor (100 nM) y la dosis menor (10 nM); además, no se observó un efecto importante sobre la proliferación celular evaluado por el conteo del número de células vivas por tinción con azul de tripano, en donde a pesar de que se observa un

ligero incremento en el número de células a las mismas dosis; no se observó una diferencia significativa. Se sabe que las sales de tetrazolio (MTT) son especialmente útiles para ensayos de cuantificación de células viables porque la conversión de las sales de tetrazolio (amarillo y soluble) a cristales de formazán (púrpura e insoluble) sólo se puede producir por la actuación de las deshidrogenasas mitocondriales de las células vivas; las mitocondrias de las células muertas no respiran.

Por último y con el fin de identificar las vías de señalización activadas por la adición de insulina al medio de cultivo, se analizaron los efectos sobre la expresión de IRS-1 e IRS-2 total y la cascada de señalización de PI3K [IR/IRS-1/ Akt1] y la vía de las MAP cinasas [IR/IRS-1/Erk ½]. Los resultados muestran que la insulina incrementa mayormente la expresión de IRS-2 (≈400% sobre el control sin estímulo) (Figura 13), en tanto que IRS-1 se incrementa en un ≈100%. En ambos casos el incremento se observó desde los 5 minutos, alcanzando un pico máximo a los 30 minutos de incubación con la hormona (Figura 12). Estos hallazgos sugieren que es posible que en esta línea celular la actividad predominante sea la de IRS2, la cual esta relaciona generalmente con procesos como metástasis, motilidad e invasión celular en diferentes tipos de cáncer; sin embargo esto debe de ser demostrado analizando la fosforilación de la proteína.

Ya que el sustrato IRS-1 se ha asociado en diferentes tipos de cáncer con los procesos de proliferación, crecimiento y anti apoptosis; se analizó la vía de PI3K [IR/IRS1/ Akt ½] y MAP cinasas [IR/IRS1/Erk ½]. Como se puede observar en la figura 12, 14 y 15, la insulina a una dosis de 50mM incrementa la concentración de las proteínas fosforiladas p-IRS1, p-Akt1 y p-Erk 1 y 2 a partir de los 15 minutos post tratamiento sugiriendo con esto que esta hormona es capaz de activar uno de los sustratos del receptor de insulina, a partir del cual se activan las vías PI3K y MAP cinasas. Estos resultados correlacionan con los obtenidos en células SiHa por Serrano y colaboradores en 2008³⁹, donde observa que se activan ambas vías de señalización cuando las células se tratan con insulina. Sin embargo, será necesario analizar a futuro cual de de los dos sustratos tiene mayor peso para esta activación.

La carcinogénesis es un proceso complejo. Las células normales tienen que someterse a múltiples "golpes" genéticos antes de que el fenotipo neoplásico completo de

46

crecimiento, invasión y metástasis ocurra. Este proceso de transformación maligna puede ser dividida en múltiples etapas: iniciación (irreversible primer paso hacia el cáncer), de promoción (estimulación del crecimiento de las células iniciadas), y de progresión (desarrollo de un fenotipo más agresivo de las células promovidas). La diabetes puede influir en el proceso neoplásico por varios mecanismos, incluyendo la hiperinsulinemia (ya sea endógena debido a la resistencia a la insulina o exógena debido a la insulina administrada o secretagogos de insulina), la hiperglucemia, o la inflamación crónica.

En México y en diferentes partes del mundo la obesidad y la diabetes se han venido incrementando de manera importante. Las mujeres con cáncer cervicouterino no están exentas de presentar al mismo tiempo estas dos patologías, por lo que consideramos que en este grupo de mujeres la hiperinsulinemia podría ser un factor de riesgo para la promoción y progresión de éste tipo de cáncer; sin embargo esto no se ha estudiado. Por lo anterior pensamos que es necesario profundizar en este campo y que los resultados obtenidos en este trabajo de tesis servirán de base para futuros estudios.

12 CONCLUSIÓN

Todos los resultados en conjunto sugieren que las células Hela presentan la maquinaria necesaria para la activación de las dos vías principales de señalización por la insulina. Si bien no estudiamos la activación de la cascada completa, los resultados muestran que al menos uno de los sustratos del receptor de insulina esta activa (IRS1) y que dos de las proteínas finales de la cascada de señalización de las vía PI3K y de las MAPK (p-Akt1 y - Erk ½, respectivamente) se activan en un tiempo corto a la dosis de insulina utilizada. Consideramos que esta es una aproximación para continuar con el estudio del papel de estos sustratos en la progresión del cáncer cervicouterino, ya que es necesario conocer cuál de los dos sustratos es predominante sobre la activación de las dos diferentes vías de señalización asociadas con proliferación celular ó metástasis e invasión.

13. PERSPECTIVAS

- Queda por definir la presencia del mensajero de IRS-2 en células HeLa y C33a, para ello es necesario sintetizar nuevos oligonucleótidos ya que los que se utilizaron en este trabajo no amplificaron el fragmento del tamaño esperado.
- También resulta importante observar las diferencias en la fosforilación de IRS-2 por el estimulo con insulina, ya que en este trabajo se obtuvo que la proteína total incrementa con el estímulo de insulina 50nM en tiempos cortos.
- Otro punto a revisar es la activación de PI3K tanto en sus formas no fosforilada como fosforilada, utilizando nuevos anticuerpos debido a que los anticuerpos con los que se contaba para estas proteínas no funcionaron.
- Por otro lado, dado que el efecto estimulatorio de la insulina sobre la activación de las proteínas podría estar dado tanto por IRS1 y/o IRS2, se deben realizar otros experimentos en los cuales se haga el bloqueo de estos sustratos con el fin de analizar su efecto sobre las cascadas de señalización en forma independiente.
- Finalmente, en cuanto a los procesos celulares que están activando las IRS, se encuentra la invasión y motilidad celular, procesos relacionados principalmente con IRS-2, por ello encontramos importante investigar los cambios en la invasión y motilidad en células HeLa y C33a en respuesta al estímulo de insulina, esto se hará utilizando cámaras de Boyden.

13 <u>REFERENCIAS</u>

1. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. CA: a cancer journal for clinicians. 2011; 61:69-90.

2. GLOBOCAN. Cancer, Mortality and Prevalence Worldwild. 2008; Available from: <u>http://globocan.iarc.fr</u>.

3. Celia Escandón-Romero MGB-M, Joel Navarrete-Espinoza, José Luis Vazquéz-Martínez, Olga Georgina Martínez-Montañez, Jorge Escobedo-De La Peña. . Epidemiología del cáncer cervicouterino en el Instituto Mexicano del Seguro Social. Salud Pública Méx 1992; 34:607-14.

4. Castellsague X, Bosch FX, Munoz N, Meijer CJ, Shah KV, de Sanjose S, et al. Male circumcision, penile human papillomavirus infection, and cervical cancer in female partners. The New England journal of medicine. 2002; 346:1105-12.

5. Castro Romero JI, Hernandez Giron C, Madrid Marina V. [Hormonal contraception as a risk factor for developing cervical cancer: biological, epidemiological and immunological evidence]. Ginecologia y obstetricia de Mexico. 2011; 79:533-9.

6. Fonseca-Moutinho JA. Smoking and cervical cancer. ISRN obstetrics and gynecology. 2011; 2011:847684.

7. De Guglielmo Cróquer Z AR, Maira AH, Dayahindara VM, Andreina FB, María CP. Virus de papiloma humano y factores de riesgo en el desarrollo de cáncer cervicouterino Rev Venez Oncol. 2010; 22:32-8.

8. de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, zur Hausen H. Classification of papillomaviruses. Virology. 2004; 324:17-27.

9. Pfister H, Gissmann L, zur Hausen H. Partial characterization of the proteins of human papilloma viruses (HPV) 1-3. Virology. 1977; 83:131-7.

10. Doorbar J. Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. Clin Sci (Lond). 2006; 110:525-41.

11. Feichter G, Meisels A. Task force consensus report on HPV-related changes of the lower female genital tract. Acta cytologica. 2002; 46:630-2.

12. Lax S. Histopathology of cervical precursor lesions and cancer. Acta dermatovenerologica Alpina, Panonica, et Adriatica. 2011; 20:125-33.

13. zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. Nature reviews Cancer. 2002; 2:342-50.

14. Robboy SJ MG, Prat J, Bentley R, Russell P and Anderson MC. . Cervical precancer (intraepithelial neoplasia). In: Robboy SJ AM, Russell P., editor. Pathology of the female reproductive tract. London: Churchill Livigstone2002. p. 165-93.

15. Hildesheim A, Schiffman MH, Gravitt PE, Glass AG, Greer CE, Zhang T, et al. Persistence of type-specific human papillomavirus infection among cytologically normal women. The Journal of infectious diseases. 1994; 169:235-40.

16. Hudelist G, Manavi M, Pischinger KI, Watkins-Riedel T, Singer CF, Kubista E, et al. Physical state and expression of HPV DNA in benign and dysplastic cervical tissue: different levels of viral integration are correlated with lesion grade. Gynecologic oncology. 2004; 92:873-80.

17. Klaes R, Woerner SM, Ridder R, Wentzensen N, Duerst M, Schneider A, et al. Detection of high-risk cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer by amplification of transcripts derived from integrated papillomavirus oncogenes. Cancer research. 1999; 59:6132-6.

18. Steenbergen RD, de Wilde J, Wilting SM, Brink AA, Snijders PJ, Meijer CJ. HPVmediated transformation of the anogenital tract. Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology. 2005; 32 Suppl 1:S25-33.

19. von Knebel Doeberitz M. New markers for cervical dysplasia to visualise the genomic chaos created by aberrant oncogenic papillomavirus infections. Eur J Cancer. 2002; 38:2229-42.

20. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. Cell. 2011; 144:646-74.

21. Tsatsanis C, Spandidos DA. The role of oncogenic kinases in human cancer (Review). International journal of molecular medicine. 2000; 5:583-90.

22. Dearth RK, Cui X, Kim HJ, Hadsell DL, Lee AV. Oncogenic transformation by the signaling adaptor proteins insulin receptor substrate (IRS)-1 and IRS-2. Cell Cycle. 2007; 6:705-13.

23. Najjar S. Insulin Action: Molecular Basis of Diabetes. . Encyclopedia of life sciences2001.

24. Ibrahim YH, Byron SA, Cui X, Lee AV, Yee D. Progesterone receptor-B regulation of insulin-like growth factor-stimulated cell migration in breast cancer cells via insulin receptor substrate-2. Molecular cancer research : MCR. 2008; 6:1491-8.

25. Vassen L, Wegrzyn W, Klein-Hitpass L. Human insulin receptor substrate-2 (IRS-2) is a primary progesterone response gene. Mol Endocrinol. 1999; 13:485-94.

26. Chan BT, Lee AV. Insulin receptor substrates (IRSs) and breast tumorigenesis. Journal of mammary gland biology and neoplasia. 2008; 13:415-22.

27. Gibson SL, Ma Z, Shaw LM. Divergent roles for IRS-1 and IRS-2 in breast cancer metastasis. Cell Cycle. 2007; 6:631-7.

28. Metz HE, Houghton AM. Insulin receptor substrate regulation of phosphoinositide 3kinase. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research. 2011; 17:206-11.

29. Han CH, Cho JY, Moon JT, Kim HJ, Kim SK, Shin DH, et al. Clinical significance of insulin receptor substrate-I down-regulation in non-small cell lung cancer. Oncology reports. 2006; 16:1205-10.

30. Lee AV, Jackson JG, Gooch JL, Hilsenbeck SG, Coronado-Heinsohn E, Osborne CK, et al. Enhancement of insulin-like growth factor signaling in human breast cancer: estrogen regulation of insulin receptor substrate-1 expression in vitro and in vivo. Mol Endocrinol. 1999; 13:787-96.

31. Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. Nature. 2002; 420:860-7.

32. Luo X, Fan S, Huang W, Zhai S, Ma Z, Li P, et al. Downregulation of IRS-1 promotes metastasis of head and neck squamous cell carcinoma. Oncology reports. 2012; 28:659-67.

33. Osborne CK, Bolan G, Monaco ME, Lippman ME. Hormone responsive human breast cancer in long-term tissue culture: effect of insulin. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1976; 73:4536-40.

34. Frasca F, Pandini G, Sciacca L, Pezzino V, Squatrito S, Belfiore A, et al. The role of insulin receptors and IGF-I receptors in cancer and other diseases. Archives of physiology and biochemistry. 2008; 114:23-37.

35. Heuson JC, Legros N, Heimann R. Influence of insulin administration on growth of the 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-induced mammary carcinoma in intact, oophorectomized, and hypophysectomized rats. Cancer research. 1972; 32:233-8.

36. Papa V, Pezzino V, Costantino A, Belfiore A, Giuffrida D, Frittitta L, et al. Elevated insulin receptor content in human breast cancer. The Journal of clinical investigation. 1990; 86:1503-10.

37. Frittitta L, Vigneri R, Stampfer MR, Goldfine ID. Insulin receptor overexpression in 184B5 human mammary epithelial cells induces a ligand-dependent transformed phenotype. Journal of cellular biochemistry. 1995; 57:666-9.

38. Pillemer G, Lugasi-Evgi H, Scharovsky G, Naor D. Insulin dependence of murine lymphoid T-cell leukemia. International journal of cancer Journal international du cancer. 1992; 50:80-5.

39. Serrano ML, Sanchez-Gomez M, Bravo MM, Yakar S, LeRoith D. Differential expression of IGF-I and insulin receptor isoforms in HPV positive and negative human cervical cancer cell

lines. Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et metabolisme. 2008; 40:661-7.

40. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Analytical biochemistry. 1987; 162:156-9.

41. Sciacca L, Costantino A, Pandini G, Mineo R, Frasca F, Scalia P, et al. Insulin receptor activation by IGF-II in breast cancers: evidence for a new autocrine/paracrine mechanism. Oncogene. 1999; 18:2471-9.

42. Boissan M, Beurel E, Wendum D, Rey C, Lecluse Y, Housset C, et al. Overexpression of insulin receptor substrate-2 in human and murine hepatocellular carcinoma. The American journal of pathology. 2005; 167:869-77.

43. Malaguarnera R, Frasca F, Garozzo A, Giani F, Pandini G, Vella V, et al. Insulin receptor isoforms and insulin-like growth factor receptor in human follicular cell precursors from papillary thyroid cancer and normal thyroid. The Journal of clinical endocrinology and metabolism. 2011; 96:766-74.

PREPARACIÓN DE SOLUCIONES

ANEXO 1

Buffer de Lisis (RIPA) [Radio Immuno Precipatition Assay Buffer].

Stock	Concentración final o de	Para 100 ml
	uso	
500 mM Cloruro de sodio	150 mM Cloruro de Sodio	30.3 ml
(Preparar 100 ml)		
100% NP-40 ó Tritón X-100	1.0% NP-40 ó Tritón X-	1 gramo
	100	
10% Deoxicolato de Sodio (5g	0.5% Deoxicolato de	5 ml
en 50 ml)	Sodio	
Proteger de la luz		
10% SDS (10g en 100ml)	0.1% SDS (sodium dodecyl	1 ml
	sulphate	
H ₂ 0 bidestilada		63.7 ml
	Volumen Final	100 ml

Se hicieron alicuotas en tubos de 15 ml y se almacenaron a - 20°C.

ANEXO 2

Preparación del Buffer de carga (Laemmil 2X buffer).

Stock	Concentración final	Para 10 ml
10% (10g en 100ml)	4% SDS	4 ml
100% liquido	10% 2-mercaptoetanol	1 ml
100% liquido	20% glicerol	2 ml
Polvo	0.004 % azul de	0.4 mg
	bromofenol	
0.5M Tris-HCL, pH 6.8	0.125 M Tris-HCL, pH 6.8	2.5 ml
H ₂ O bidestilada		0.1 ml

ANEXO 3

Buffer de corrida (Tris-Glicina 5X)

Stock (5x)	Para 1 L (5X)	Concentración final (1X). Diluir 5 veces
Tris-base (FW 121.1)	15.4 gramos	25 mM
Glicina (FW 75.07)	71.3 gramos	190mM
SDS	5 gramos	0.1%
Agua bi-destilada	1L	

Ajustar pH a 8.3 con HCl

ANEXO 4

Buffer de transferencia (Tris-Glicina 5X)

Stock (5x)	Para 2 L	Concentración final (1X).
		Diluir 5 veces
Tris-base (FW 121.1)	30 gramos	25 mM
Glicina (FW 75.07)	142 gramos	190mM
Metanol	200 ml	20%
Agua bi-destilada	1L	

Ajustar pH a 8.3 con HCl

ANEXO 5

TBS

Reactivo	10X
Tris-Base (0.5 M)	60 g
NaCl (9%)	90 g
Agua miliQ	1 L

Ajustar pH a 7.4

ANEXO 6

Bloking Buffer (BLOTTO)

Reactivo	5 %
Leche semidescremada	0.5 g
TBS-T	10 ml

ANEXO 7

TBS-Tween

Reactivo	Volumen
TBS 10 X	100ml
Agua Mili Q	900ml
Tween 20	1ml