



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

IMPLICACIÓN DE *ETV5* EN LA REGULACIÓN DE LA
PROLIFERACIÓN CELULAR DE LAS CÉLULAS INS-1
(832/13) Y SUS GENES BLANCO

T E S I S

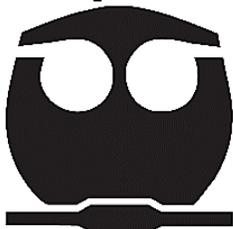
P R E S E N T A :

Y A E L E F R É N D Í A Z L Ó P E Z

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

DIRECTORA DE TESIS

DRA. RUTH GUTIÉRREZ AGUILAR



CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX., 2020



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Jurado Asignado

Profesor: José Pedraza Chaverri

Presidente

Profesora: Martha Patricia Coello Coutiño

Vocal

Profesora: Ruth Gutiérrez Aguilar

Secretaria

Profesora: María del Consuelo Plata Ramos

1era. Suplente

Profesor: Manuel Gutiérrez Aguilar

2do. Suplente

Sitio donde se desarrolló el tema:

División de Investigación, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México

Laboratorio de Enfermedades Metabólicas: Obesidad y Diabetes en el Hospital Infantil de México “Federico Gómez” (HIMFG)

Apoyos recibidos:

- Hospital Infantil de México “Federico Gómez” Protocolo HIM2014/056 SSA 1132
- Universidad Nacional Autónoma de México Protocolo PAPIIT IA200116
- IBM

Dra. Ruth Gutiérrez Aguilar

Asesora del tema

Yael Efrén Díaz López

Sustentante

Índice general

Contenido	Página
1. Resumen	1
2. Introducción	2
2.1. El factor transcripcional ETV5	2
2.2. Función de ETV5 en el metabolismo	2
2.3. Función de ETV5 en la proliferación celular	3
2.3.1. Ciclo celular	4
2.3.1.1. Fase G0	4
2.3.1.2. Fase G1	4
2.3.1.3. Fase S	5
2.3.1.4. Fase G2	6
2.3.1.5. Fase M	6
2.3.2. Proliferación vía mTOR	7
2.4. La línea celular INS-1 (832/13) como modelo de estudio	9
2.5. Intervención de la insulina en la proliferación celular	9
3. Antecedentes	10
4. Hipótesis	10
5. Objetivos	10
5.1. Objetivo general	10
5.2. Objetivos particulares	11
6. Materiales y métodos	12
6.1. Cultivo celular	12
6.2. Transfección	12
6.3. Conteo celular	13
6.4. Determinación de la concentración de insulina por ELISA	14
6.5. Viabilidad	14
6.6. Apoptosis	15
6.7. Proliferación	16
6.8. Extracción de RNA	17
6.9. Síntesis de cDNA por transcripción reversa (RT)	17
6.10. Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR)	18
6.11. Extracción y cuantificación de proteínas	18
6.12. Western blot	19
7. Resultados	20
7.1. Optimización del cultivo celular en placas de 6 pozos	20

7.2. Optimización de la transfección con siRNA contra <i>ETV5</i> en la línea celular INS-1 (832/13)	20
7.3. Optimización de los ensayos para determinar viabilidad y apoptosis en el analizador de células Muse® utilizando la línea celular INS-1 (832/13)	21
7.3.1. Optimización del ensayo para la determinación de viabilidad celular	22
7.3.2. Optimización del ensayo para la determinación de apoptosis celular	24
7.4. Optimización del ensayo de proliferación celular (EdU-Click 594) en la línea celular INS-1 (832/13)	26
7.5. Expresión de <i>ETV5</i> y observación de la línea celular INS-1 (832/13) posterior al silenciamiento de <i>ETV5</i>	28
7.6. Determinación de la concentración de insulina en la transfección de la línea celular INS-1 (832/13)	30
7.7. Efecto del silenciamiento de <i>ETV5</i> en la viabilidad celular	32
7.8. Efecto del silenciamiento de <i>ETV5</i> en la apoptosis celular	33
7.9. Efecto del silenciamiento de <i>ETV5</i> en la proliferación celular	35
7.10. Expresión relativa de <i>ETV5</i> y sus posibles genes blanco <i>ciclina D2 (CCND2)</i> , <i>S6K1</i> y <i>E2F1</i>	37
7.11. Optimización de anticuerpos para el ensayo de western blot en extractos proteicos de células INS-1 (832/13)	38
7.12. Detección de <i>ETV5</i> , <i>E2F1</i> y <i>ciclina D2</i> mediante ensayos de western blot	40
8. Análisis de resultados	43
8.1. Disminución del número de células por silenciamiento de <i>ETV5</i>	43
8.2. Influencia de <i>ETV5</i> sobre viabilidad, apoptosis y proliferación celular	43
8.3. Efecto del silenciamiento de <i>ETV5</i> sobre sus posibles genes blanco	44
9. Conclusión	47
10. Perspectivas	47
11. Anexos	48
11.1. Lista de materiales	48
12. Referencias	50

Índice de figuras

Contenido	Página
Figura 1. Fases del ciclo celular en una célula eucarionte.	7
Figura 2. Resumen de la vía mTOR.	8
Figura 3. Optimización del número de células en placas de 6 pozos.	20
Figura 4. Optimización de la transfección a diferentes concentraciones de siRNA contra <i>ETV5</i> en la línea celular INS-1 (832/13).	21
Figura 5. Optimización de los parámetros en la interfaz del analizador de células Muse® para el ensayo de viabilidad celular en un control positivo.	23
Figura 6. Optimización de los parámetros en la interfaz del analizador de células Muse® para el ensayo de viabilidad celular en un control negativo.	23
Figura 7. Optimización de los parámetros en la interfaz del analizador de células Muse® para el ensayo de apoptosis celular en un control positivo.	25
Figura 8. Optimización de los parámetros en la interfaz del analizador de células Muse® para el ensayo de apoptosis celular en un control negativo.	25
Figura 9. Optimización del ensayo de proliferación EdU-Click 594.	27
Figura 10. Silenciamiento de <i>ETV5</i> en la línea celular INS-1 (832/13) y la disminución del número de células.	29
Figura 11. Concentración de insulina a diferentes tiempos de la transfección.	31
Figura 12. Ensayo de viabilidad en la línea celular INS-1 (832/13).	33
Figura 13. Ensayo de apoptosis celular en la línea celular INS-1 (832/13).	34
Figura 14. Ensayo de proliferación EdU en la línea celular INS-1 (832/13).	36
Figura 15. Expresión relativa de <i>ETV5</i> y sus genes blanco en la línea celular INS-1 (832/13).	37
Figura 16. Optimización de anticuerpos para el ensayo de western blot en extractos de las líneas celulares INS-1 (832/13) y HEK293T.	39
Figura 17. Ensayo de western blot en extractos de las líneas celulares INS-1 (832/13) y HEK293T.	42

Índice de abreviaturas.

Abreviatura	Significado	Abreviatura	Significado
ETV5	E- veintiséis variante 5	eIF4E	Factor de iniciación de traducción
ETS	E- veintiséis	RI	Receptor de insulina
PEA3	Potenciadores del poliomavirus 3	CCND2	Ciclina D2
CDK	Cinasa dependiente de ciclina	siRNA	RNA corto de interferencia
CDK2	Cinasa dependiente de ciclina 2	RISC	Complejo de RNA inductor de silenciamiento
CDK4	Cinasa dependiente de ciclina 4	siC	siRNA control
CDK6	Cinasa dependiente de ciclina 6	siE	siRNA <i>ETV5</i>
Rb	Proteína del retinoblastoma	HRP	Peroxidasa de rábano
APC	Complejo promotor de la anafase	TMB	3,3',5,5'-tetrametilbencidina
mTORC1	Complejo mTOR 1	EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
mTORC2	Complejo mTOR 2	FBS	Suero fetal bovino
S6K1	Cinasa 1 ribosomal S6	PBS	Amortiguador de sales de fosfato
S6K2	Cinasa 2 ribosomal S6	EdU	5-etinil-2'-desoxiuridina
4E-BP1	Factor de iniciación de la traducción eucariota 4E de unión a la proteína 1	PVDF	Difluoruro de polivinilideno
RT	Reacción de transcriptasa reversa	DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real	7-ADD	7-aminoactinomicina D
ELISA	Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas	cdc20	Homólogo de proteína 20 del ciclo de división celular
hRad21	Homólogo de proteína rad21 de reparación de doble hebra	SHC	Proteína transformante SHC
SOS	Homólogo de la proteína hijo de siete	GRB	Proteína de unión al factor de crecimiento
TWIST1	Factor de transcripción 1 twist básico hélice-bucle-hélice	MAPK	Proteínas cinasas activadas por mitógenos
DNA	Ácido desoxirribonucleico	TAZ	Tafazzina
INK4	Inhibidores de CDK4	YAP1	Homólogo de la proteína Yorkie
mTOR	Diana de rapamicina en células de mamífero	CIP	proteína de interacción con CDK
		KIP	proteína inhibidora de cinasa
		BSA	Albúmina de suero bovino
		RNA	Ácido ribonucleico

1. Resumen

El factor transcripcional ETV5 está implicado en el metabolismo, específicamente en la homeostasis de la glucosa ya que regula la secreción de insulina. En ensayos *in vivo* se compararon ratones silvestres contra ratones *knockout* para ETV5 (ETV5 KO). Se ha descrito que los ratones ETV5 KO son más delgados y pequeños, presentan un páncreas disminuido y una tendencia a una masa de células beta reducida. Además, se demostró que ETV5 está involucrado en la secreción de insulina, específicamente regulando la transcripción de genes de la exocitosis de la misma. Para una buena secreción de insulina se necesita una adecuada masa de células beta, la cual está dada por el apropiado número y tamaño de las mismas.

Por otra parte, se ha descrito que ETV5 se encuentra sobreexpresado en diversos tipos de cáncer y que está involucrado en la proliferación celular. La proliferación celular está regulada por genes involucrados en el ciclo celular, tales como *ciclina D2*, *E2F1* y *S6K1*, los cuales tienen secuencias de unión para ETV5 dentro de su promotor.

En este trabajo, se realizaron ensayos en la línea celular INS-1 (832/13) de células beta pancreáticas de rata. Se encontró que al silenciar parcialmente a ETV5, se reduce el número de células a las 72 h post-transfección. Se demostró que al disminuir el transcrito de ETV5, no se afectaron la viabilidad y la apoptosis; sin embargo, la proliferación celular está reducida. Posteriormente, se estudió la implicación de ETV5 en la regulación de genes implicados en la proliferación celular. Se observó que al suprimir a ETV5, el transcrito de E2F1 se encuentra sobreexpresado y no existe diferencia en la expresión de *ciclina D2* y *S6K1*.

Por lo tanto se demostró, que al silenciar a ETV5 en la línea celular INS-1 (832/13), disminuye la cantidad de células a través de la reducción de la proliferación celular, vía la regulación transcripcional de E2F1. Esto sugiere que E2F1 pueda estar regulando al gen *p27^{KIP1}*, el cual es un inhibidor del complejo CDK-ciclina D de la fase G1 del ciclo celular, impidiendo así la proliferación celular.

2. Introducción

2.1. El factor transcripcional ETV5

El factor de transcripción E-veintiséis variante 5 (ETV5) pertenece a la familia de factores de transcripción E-veintiséis (ETS) y se clasifica dentro de la subfamilia de activadores potenciales del poliomavirus 3 (PEA3) por su conformación estructural (Oikawa y Yamada 2003; Sangphil Oh, Sook Shin 2012).

La familia ETS está compuesta por 28 factores de transcripción en humanos, los cuales promueven la transcripción de genes. A su vez, están involucrados en diversos procesos, tales como el desarrollo celular, la proliferación, la diferenciación, la angiogénesis y la apoptosis (Fry, Mallakin, e Inoue 2018).

La subfamilia PEA3 está conformada por tres miembros: ETV1 (nombrado también ER81, en relación a E-veintiséis 81), ETV4 (también nombrado E1AF o PEA3) y ETV5 (Sangphil Oh, Sook Shin 2012).

El factor de transcripción ETV5 posee un dominio conservado, característico de la familia ETS, a través del cual se une al DNA por la secuencia consenso de unión 5'-GGA(A/T)-3' (Eo, Song, y Lim 2012).

2.2. Función de ETV5 en el metabolismo

Se ha descrito que ETV5 está implicado en el metabolismo, particularmente en la homeostasis a la glucosa (Gutierrez-Aguilar et al. 2014).

A través de un ensayo *in vivo*, donde se compararon ratones silvestres contra ratones *knockout* para *ETV5* (*ETV5 KO*), se encontró que los ratones *ETV5 KO* tienen un menor peso, tamaño, masa magra y masa grasa, resultando ser más delgados. También, los ratones *ETV5 KO* presentaron un páncreas con un menor número y tamaño de islotes de Langerhans, así como una tendencia a la reducción de masa de células beta (Gutierrez-Aguilar et al. 2014).

Los ratones *ETV5 KO* presentaron una intolerancia a la glucosa. Esto se debió, a una hipoinsulinemia por disminución en la secreción de la insulina y se comprobó

que ETV5 regula transcripcionalmente a genes de la exocitosis de la insulina (Gutierrez-Aguilar et al. 2014).

2.3. Función de ETV5 en la proliferación celular

Una adecuada masa de células beta está dada por el apropiado número y tamaño de las mismas, lo cual es esencial para que exista una buena secreción de insulina (Szabat et al. 2016; Böni-Schnetzler et al. 2018). Por lo tanto, la proliferación celular es un mecanismo necesario para que haya una adecuada masa de células beta.

Se ha identificado que los integrantes de la familia ETS, participan en diversos mecanismos fisiológicos y del desarrollo, incluidos el control del ciclo celular, la proliferación, la diferenciación, la apoptosis, la remodelación del tejido y la angiogénesis (Sizemore et al. 2017)

Se ha encontrado que *ETV5* se encuentra sobreexpresado en diversos tipos de cáncer, tales como cáncer de esófago, cáncer de cabeza y cuello, leucemia, linfoma y melanoma, entre otros; particularmente, su sobreexpresión en cáncer colorrectal, se ha correlacionado a un mal pronóstico. Por otra parte, sus mecanismos de acción involucran la proliferación celular, la promoción de angiogénesis y migración celular (Cheng et al. 2019; Haoran et al. 2019).

Se ha reportado que *ETV5* se encuentra sobreexpresado en cáncer tiroidal papilar y que su presencia es crítica para el crecimiento y proliferación celular. Además, se encontró que se expresa río abajo de la vía de proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK) e interviene directamente en la sobreexpresión del factor de transcripción 1 twist básico hélice-bucle-hélice (TWIST1), un marcador de infiltración vascular y metástasis (Puli et al. 2018).

En un modelo *in vitro* de cáncer de vejiga, se evidenció que *ETV5* se sobreexpresa y aumenta la proliferación al participar en la inducción de la proteína tafazzina (TAZ), que junto con el homólogo de la proteína Yorkie (YAP1) regulan la transcripción de genes de proliferación y antiapoptóticos (di Martino et al. 2019).

2.3.1. Ciclo celular

El ciclo celular es un proceso complejo que involucra una serie de etapas, a través de las cuales una célula madre duplica su contenido y se divide en dos células hijas idénticas (Baserga 1968; Evan y Vousden 2001).

La proliferación celular involucra una secuencia de pasos que aseguran un ambiente celular adecuado para poder duplicarse y dividirse, llevando a cabo las diferentes etapas del ciclo celular (Golias, Charalabopoulos y Charalabopoulos 2004).

El ciclo celular se divide en 5 diferentes etapas que son: G0, G1, S, G2 y M (Figura 1) (Ivanchuk et al. 2004).

2.3.1.1. Fase G0

Durante la fase G0 ocurre un arresto del ciclo celular, ya que la célula permanece en un estado de reposo (Wenzel y Singh 2018). La fase G0 o estado de dormancia se mantiene activo a través de la represión transcripcional de genes necesarios para la replicación del ácido desoxirribonucleico (DNA) y activación de la mitosis. Además, hay una expresión activa de genes antiapoptóticos, antisenescencia y antidiferenciación (Cook y Matson 2017)

2.3.1.2. Fase G1

Durante la fase G1, la célula se prepara para la replicación del DNA, acumulando proteínas y aumentando de tamaño. Durante esta etapa, hay señales que estimulan la expresión de ciclinas tipo D, las cuales funcionan como sensores de los factores de crecimiento (Bertoli, Skotheim y De Bruin 2013).

A través de estímulos mitogénicos, se desencadena una serie de eventos de fosforilación, regulados por cinasas dependientes de ciclina (CDK) que forman un complejo con su ciclina (Bertoli, Skotheim y De Bruin 2013).

En esta fase existe un punto de control que permite regular el paso de la fase G1 a la fase S. De esta forma, se asegura que el ambiente celular es favorable y que existen los insumos necesarios para la síntesis del nuevo material genético. (Ivanchuk et al. 2004).

La cinasa dependiente de ciclina 4 (CDK4) y la cinasa dependiente de ciclina 6 (CDK6) se encuentran activas en estado temprano de G1 y tienen unión específica a ciclinas tipo D. En contraste, la cinasa dependiente de ciclina 2 (CDK2) actúa en un estado tardío de G1 uniéndose a ciclina E y ciclina A (Ivanchuk et al. 2004).

La proteína del retinoblastoma (Rb) se mantiene unida a E2F, inhibiendo así su función como factor transcripcional. La fosforilación de Rb, dada por los complejos CDK-ciclina D, libera a E2F, lo que permite que se transcriban genes requeridos para la síntesis del DNA y la transición de la fase G1 a S (Giacinti y Giordano 2006). Por lo tanto, la transición de la fase G1 a S es altamente regulada por los complejos CDK-ciclina.

Por otra parte, existe la modulación de los complejos CDK-ciclina, la cual se controla a través de la unión con inhibidores de CDK, lo cual permite que haya una estricta regulación del ciclo celular. Los integrantes de familia Inhibidores de CDK4 (INK4): p16^{INK4a}, p15^{INK4b}, p18^{INK4c} y p19^{INK4d}, se unen a CDK4 y CDK6, evitando su unión a ciclinas tipo D e inhibiendo su actividad de cinasa. Además, los miembros de la familia de proteínas de interacción con CDK/proteínas inhibidoras de cinasa (CIP/KIP): p21^{CIP1}, p27^{KIP1} y p57^{KIP2}, son capaces de unirse a diferentes complejos CDK-ciclina, inhibiendo también su acción de cinasa (Besson, Dowdy y Roberts 2008).

Se ha encontrado que en una línea celular de pulmón, E2F1 es capaz de inducir la expresión de p27^{KIP1} por unión directa a su región promotora. Se demostró que al sobreexpresar a E2F1 hay una mayor presencia de p27^{KIP1} y las células disminuyeron su avance a través del ciclo celular, comparadas con las que se silenció p27^{KIP1} (Wang et al. 2005).

2.3.1.3. Fase S

Durante la fase S, la célula duplica su contenido de DNA con la finalidad de tener dos copias del material genético que recibirán las células hijas (Jain et al. 2015).

La expresión de ciclinas A y E aumenta durante el estado tardío de G1 y estas permanecen activas durante la fase S. La progresión a través del punto de control

de G1/S, depende de los complejos CDK2-ciclina E y CDK2-ciclina A que mantienen a Rb fosforilado, permitiendo que E2F transcriba a sus genes blanco (Du et al. 2016).

2.3.1.4. Fase G2

Durante la fase G2, la célula se prepara para realizar la mitosis y la división celular. Se verifica que el nuevo DNA sintetizado no contenga mutaciones y que la célula cuente con la maquinaria necesaria (Oakes et al. 2014).

Durante la transición de la fase S a G2, hay formación de complejos CDK1-ciclina B. Además, existe una disminución en la actividad del complejo de G1/S, CDK2/ciclina E, que se inactiva debido a la degradación de ciclina E, por procesos de ubiquitinación (Ivanchuk et al. 2004).

2.3.1.5. Fase M

Durante esta fase, la célula reparte de forma equivalente su material genético y componentes, dando origen a dos células hijas (Lara-Gonzalez, Westhorpe, and Taylor 2012).

Durante la transición G2 a M, se da la formación de nuevos complejos CDK-ciclina, que son importantes para el inicio, progresión y término de la fase M. El complejo CDK1-ciclina B contribuye a la activación del complejo promotor de la anafase (APC), así como, a la descomposición de la envoltura nuclear y montaje del huso mitótico (Lara-Gonzalez, Westhorpe, and Taylor 2012).

Por otra parte, existe un blanco crítico del control mitótico que es una proteasa, conocida como separasa, la cual desencadena la anafase por rompimiento del homólogo de proteína rad21 de reparación de doble hebra (hRad21), proteína que mantiene unida a las cromátidas hermanas (Ivanchuk et al. 2004).

La proteína separasa, se mantiene inactiva por su asociación a securina. Al activarse el complejo APC por unión con el homólogo de proteína 20 del ciclo de

división celular (*cdc20*), sucede la degradación de securina, vía ubiquitinación, lo que da inicio a la anafase (Ivanchuk et al. 2004).

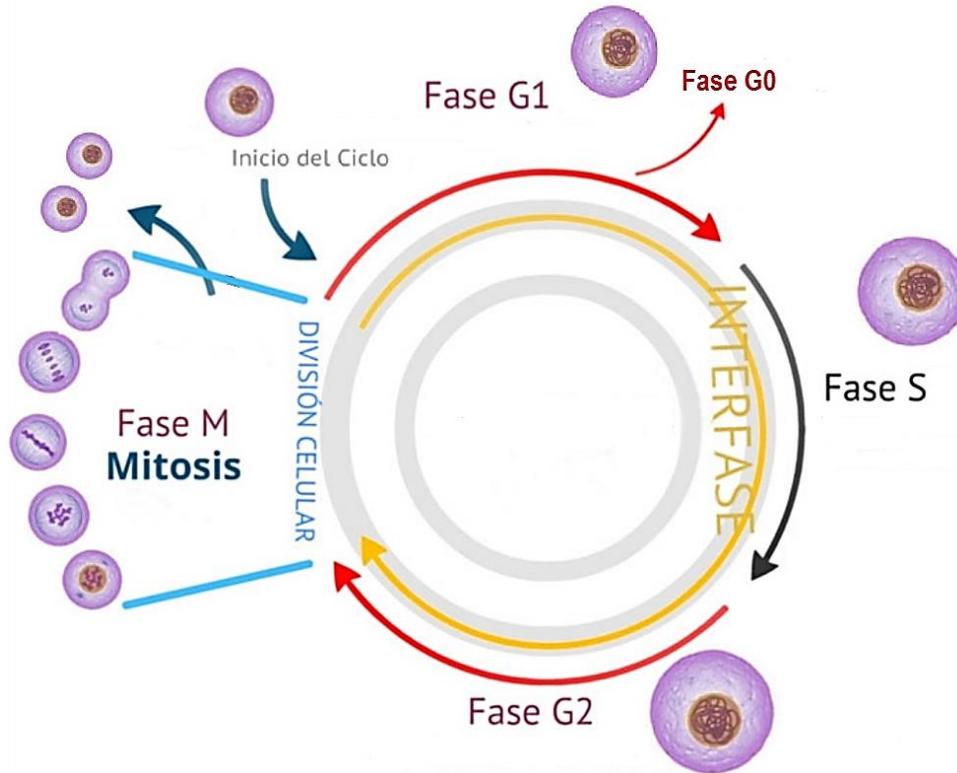


Figura 1. Fases del ciclo celular en una célula eucarionte. Durante la fase G1, la célula crece y se prepara para la síntesis del DNA. En la fase S sucede la replicación del DNA. Posteriormente, en la fase G2 la célula se prepara para la división celular. Finalmente, en la fase M la célula madre da origen a dos células hijas idénticas (Menéndez Valderrey, J. L. 2019).

2.3.2. Proliferación vía mTOR

Convergente a la vía de proliferación mediada por complejos CDK-ciclina, existe la vía diana de rapamicina en células de mamífero (mTOR) que se involucra también en la proliferación celular (Morita et al. 2015).

La vía de señalización por mTOR forma dos distintos complejos, el complejo mTOR 1 (mTORC1) y el complejo mTOR 2 (mTORC2). El complejo mTORC1 se involucra en la síntesis de proteínas y otros procesos anabólicos, como el crecimiento celular y la proliferación. Por otra parte, mTORC2 regula la organización

del citoesqueleto, modula la fosforilación de proteínas cinasas y se le ha relacionado la degradación de polipéptidos (Figura 2) (Morita et al. 2015; Gao et al. 2012).

mTORC1 puede fosforilar a la cinasa 1 ribosomal S6 (S6K1), cinasa 2 ribosomal S6 (S6K2) y al factor de iniciación de la traducción eucariota 4E de unión a la proteína 1 (4E-BP1). Posteriormente, S6K1 y S6K2 fosforilan a la proteína S6 o el factor 4E-BP1, el cual puede liberar al factor de iniciación de traducción (eIF4E). Ambas situaciones, inducen la síntesis de proteínas, crecimiento y proliferación celular (Vicary and Roman 2016; Kurgan et al. 2017).

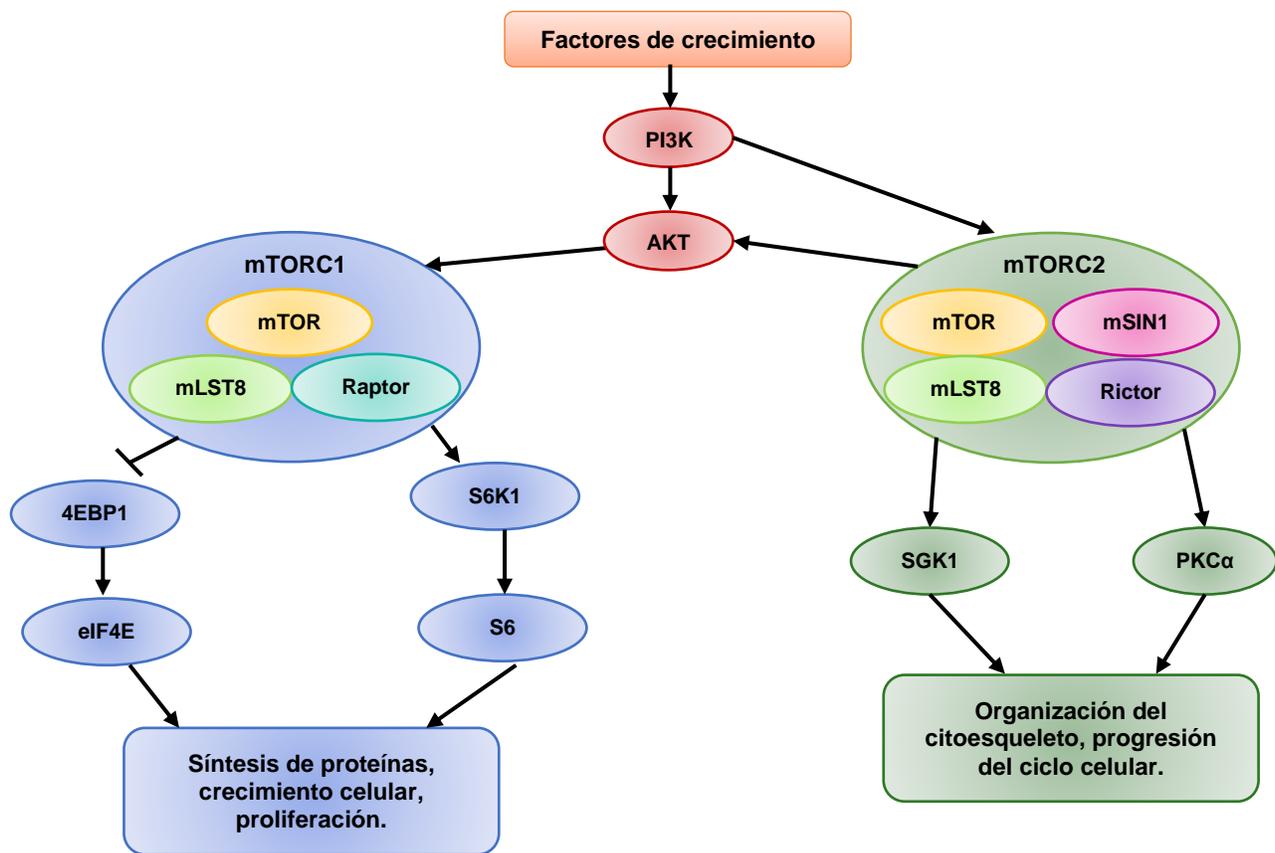


Figura 2. Resumen de la vía mTOR. Los factores de crecimiento activan la vía mTOR, mTORC1 favorece la proliferación celular, la síntesis de proteínas y el crecimiento celular. mTORC2 está involucrado en la organización del citoesqueleto y la progresión del ciclo celular, entre otras funciones. Abreviaturas: PI3K (Fosfoinositol 3 cinasa), AKT (Proteína cinasa B), mLST8 (proteína asociada a mTOR, homólogo de LST8), Raptor (Proteína reguladora asociada al complejo 1 de mTOR), mSIN1 (proteína cinasa activada por mitógeno asociada a la proteína 1), Rictor (proteína de mTOR insensible a la rapamicina), SGK1 (proteína cinasa SGK), PKCα (proteína cinasa C α) (Gao, et al. 2012).

2.4. La línea celular INS-1 (832/13) como modelo de estudio

La línea celular INS-1 proviene de células de insulinoma de rata, inducida por rayos X. Estas células son capaces de sintetizar y secretar insulina (Hohmeier et al. 2000).

Para realizar el aislamiento de la clona INS-1 (832/13), las células INS-1 fueron transfectadas con un plásmido conteniendo el gen de insulina humano, el promotor de citomegalovirus y un marcador de selección de resistencia a la neomicina. La selección clonal convirtió a estas células en un mejor modelo de estudio, el cual se utiliza para comprender genes implicados en la secreción de insulina, haciendo posible semejar la exocitosis de insulina como la de islotes pancreáticos recién aislados (Hohmeier et al. 2000).

2.5. Intervención de la insulina en la proliferación celular

La insulina es una hormona que tiene funciones reguladoras del metabolismo y además es considerada un mitógeno, que promueve el crecimiento celular (Taniguchi, Emanuelli, y Kahn 2006).

Al estimular al receptor de insulina (RI), se activan principalmente dos cascadas de señalización. Una de ellas es la vía fosfoinositol 3 cinasa/proteína cinasa B (PI3K/AKT), la cual tiene efectos predominantes sobre metabolismo y la otra es la vía GTPasa RAS/Serina-treonina cinasa RAF/Proteína cinasa activada por mitógeno MEK/ Proteína cinasa activada por mitógeno ERK (RAS/RAF/MEK/ERK), que provoca efectos mitogénicos (Vigneri, Goldfine, y Frittitta 2016).

La insulina puede controlar el mecanismo de proliferación celular por medio de la vía RAS/RAF/MEK/ERK. Cuando la insulina se une a RI provoca que se fosforile la proteína transformante SHC (SHC) y en consecuencia se reclute un complejo formado por la proteína de unión al factor de crecimiento (GRB) y el homólogo de la proteína hijo de siete (SOS). Esto desencadena la activación de la GTPasa RAS y subsecuentemente a las isoformas de RAF, así como sus efectores río abajo de la vía, MEK1/2 y ERK1/2. Una vez activados ERK1/2, se produce la fosforilación de proteínas citosólicas, que se translocan al núcleo, regulando la expresión de genes

que favorecen el crecimiento y proliferación celular (Vigneri, Goldfine, and Frittitta 2016).

3. Antecedentes

Se ha descrito que al suprimir el gen *ETV5* en la línea celular INS-1 (832/13) disminuye la secreción de insulina, debido a la regulación transcripcional de genes involucrados en la exocitosis de esta hormona (Gutierrez-Aguilar et al. 2014). Para poder estudiar el efecto de *ETV5* sobre la proliferación, independientemente de la estimulación de insulina, se utilizó la línea celular HEK293T (Cázares-Trejo 2017).

Utilizando la línea celular HEK293T y suprimiendo al gen *ETV5*, se observó que existe una disminución del número de células. Posteriormente, se realizaron ensayos de viabilidad, apoptosis y proliferación celular. Se encontró que *ETV5* regula la proliferación celular y no afecta a la apoptosis ni a la viabilidad (Cázares-Trejo 2017).

Realizando un análisis *in silico* se demostró que los genes *ciclina D2*, *S6K1* y *E2F1* presentan sitios de unión en sus promotores para *ETV5*. Al silenciar parcialmente a *ETV5* por medio de un siRNA en las células HEK293T se confirmó la disminución de la expresión de *ETV5* y un menor número de células, debido a la reducción de la proliferación celular y se encontró un descenso en el transcrito de *ciclina D2*, lo que sugiere un control transcripcional de *ETV5* sobre este gen (Cázares-Trejo 2017).

4. Hipótesis

El silenciamiento de *ETV5* disminuirá la proliferación de la línea celular INS-1 (832/13), vía la regulación transcripcional de sus posibles genes blanco (*ciclina D2*, *S6K1* o *E2F1*).

5. Objetivos

5.1. Objetivo general

Evaluar el efecto del factor transcripcional *ETV5* en la proliferación celular y demostrar su regulación sobre la expresión de posibles genes blanco como *ciclina D2*, *E2F1* y *S6K1*.

5.2. Objetivos particulares

- Optimizar el ensayo de transfección para el silenciamiento de *ETV5* en la línea celular INS-1 (832/13).
- Realizar el conteo de células posterior al ensayo de transfección.
- Evaluar la viabilidad de la línea celular INS-1 (832/13) posterior al silenciamiento de *ETV5*.
- Evaluar la apoptosis de la línea celular INS-1 (832/13) posterior al silenciamiento de *ETV5*.
- Evaluar la proliferación de la línea celular INS-1 (832/13) posterior al silenciamiento de *ETV5*.
- Realizar la extracción de RNA total y síntesis de cDNA por transcripción reversa.
- Cuantificar la expresión relativa de diferentes transcritos mediante qPCR.
 - *ETV5*
 - *Ciclina D2*
 - *S6K1*
 - *E2F1*
 - *L32*
- Realizar extracción de proteínas de la línea celular INS-1 (832/13) posterior al ensayo de transfección y cuantificar proteínas de interés:
 - *ETV5*
 - *ciclina D2*
 - *E2F1*
 - β -actina

6. Materiales y métodos

6.1. Cultivo celular

Como modelo de estudio se utilizó la línea celular INS-1 (832/13) entre los pasajes 20 y 34. Los cultivos se mantuvieron en ambiente húmedo a 37°C y con 5% de CO₂. Se utilizó medio completo que contiene: medio de cultivo RPMI-1640 (SIGMA R8758, al cual se añadieron antibióticos o GIBCO 11875-093 sin antibióticos), suplementando con FBS (suero fetal bovino) inactivado por calor al 10% (GIBCO 10082), amortiguador HEPES 10 mM (GIBCO 15630-080), L-glutamina 2 mM (GIBCO 25030-081), piruvato sódico 1mM (SIGMA S8636), 2- mercaptoetanol 0.05 mM (GIBCO 21985023) y penicilina-estreptomina 100 U/mL-10mg/mL (HyClone™ SV30010).

6.2. Transfección

Las células INS-1 (832/13) fueron transfectadas con un RNA corto de interferencia (siRNA). El siRNA es un segmento de 20 a 30 nucleótidos, que al internalizarse en la célula, tiene por objetivo silenciar un gen específico. El siRNA se une al complejo de RNA inductor de silenciamiento (RISC), guiando así la unión a su secuencia complementaria del transcrito del gen de interés, provocando su degradación a través de la acción catalítica de RISC (Dana et al. 2017).

Para la transfección, se plaquearon las células en cajas de 6 pozos, con una cantidad de 6×10^5 células por pozo con 2 mL de medio sin antibiótico. Transcurridas 24 h después del plaqueo, se transfectaron las células con 20 nM de siRNA control (siC, Dharmacon™ D-001810-10-05) o con 20 nM de siRNA *ETV5* (siE, Dharmacon™ L-087219-02). Se utilizó el agente de transfección (Thermo Scientific T-2001-02) y se siguió el protocolo indicado por el proveedor.

Por cada 99 µL de medio sin suplementos se colocó 1 µL de agente de transfección y se dejó incubar por 5 minutos a temperatura ambiente. Simultáneamente, se preparó la cantidad de siRNA control o siRNA *ETV5* a ocupar, a partir de stocks de 20 µM. Para 99 µL de medio sin suplementos, se colocó 1 µL de siRNA y se dejó incubar por 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se añadieron 100

μL del agente de transfección por cada 100 μL de siRNA, incubando durante 20 minutos a temperatura ambiente.

Por otra parte, se retiró el medio de los pozos y se colocaron 800 μL del medio completo a cada pozo. Una vez concluida la última incubación de los reactivos de transfección, se añadieron 200 μL por pozo de la mezcla de agente de transfección con siRNA control o siRNA *ETV5* (concentración final del siRNA es de 20 nM por pozo), según correspondiera.

Después de 24 h de la transfección, se retiró el medio de los pozos y se colocó medio completo fresco con antibióticos. Las células se dejaron incubar hasta las 72 h después de la transfección, tiempo en el que se encontró el mayor descenso del transcrito de *ETV5*.

6.3. Conteo celular

Para el conteo de las células, se retiró el medio de los pozos y se enjuagó con 500 μL de PBS (amortiguador de sales de fosfato, pH= 7.4) cada pozo. Posteriormente, se añadieron 500 μL de tripsina (HyClone™ SH30042.02) por pozo y se incubó a 37°C por 2 min. Las células se colectaron en tubos Falcón de 15 mL y fueron centrifugadas 3 min a 900 x g. Se desechó el sobrenadante y las células se resuspendieron en 500 μL de medio con antibiótico.

De la suspensión anterior de células, se realizó una dilución 1:100 y de esta se tomaron 10 μL para el llenado de la cámara de Neubauer (MARIENFELD® 0610010). Se realizó el conteo del número de células en 3 campos diferentes con un área de 1 mm² y se utilizó la siguiente fórmula para calcular la cantidad de células por microlitro:

$$\frac{\sum (\text{N}^\circ \text{ de células})}{\text{N}^\circ \text{ campos} \times \text{Área de conteo}(\text{mm}^2) \times \text{Profundidad} (\text{mm}) \times \text{Factor dilución}} = \text{Células}/\mu\text{L}$$

Donde: Profundidad = 0.1 mm, N° campos = 3, Área de conteo = 1 mm²,
Factor dilución=1/100

6.4. Determinación de la concentración de insulina por ELISA

Se recolectó el medio de las células durante el ensayo de transfección. Las muestras se tomaron a las: (a) 0 h (antes de la transfección), (b) 24 h post-transfección, (c) 24 h (del periodo de 24 a 48 h post-transfección), d) 24 h (del periodo de 48 a 72 h post-transfección) y e) 48 h (correspondiente al periodo de 24 a 72 h post-transfección), para cada tratamiento.

Se cuantificó la concentración de insulina secretada por las células, utilizando un estuche (ALPCO 80-INSRT-E01) que emplea el ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA).

Se realizaron las siguientes diluciones de las muestras para correrlas en el ELISA: 1:15 para los medios recolectados cada 24 h y 1:30 para los recolectados a las 48 h.

Para el ensayo de ELISA se pipetearon 10 μ L de estándar o muestras diluidas. Posteriormente, se colocaron 75 μ L de la solución con anticuerpo conjugado a peroxidasa de rábano (HRP) y se incubó por 2 h en agitación a temperatura ambiente.

Se decantó el contenido de los pozos y se lavó 6 veces con 350 μ L de amortiguador de lavado. Después, se colocaron 100 μ L de 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB) y se incubó por 15 minutos en agitación a temperatura ambiente. Seguido de esto, se añadieron 100 μ L de la solución de paro y se midió la absorbancia a 450 nm.

Para calcular la concentración de insulina, se ajustó el modelo de la recta con las absorbancias de los estándares y sus concentraciones. Finalmente, se interpolaron las absorbancias de las muestras a la recta y se obtuvieron las concentraciones.

6.5. Viabilidad

La determinación de viabilidad celular se realizó mediante el equipo analizador de células Muse (Guava[®] Muse[®], Luminex), utilizando el estuche de conteo y viabilidad (Luminex MCH100102).

Durante este procedimiento, las células viables como no viables se tiñen en función de su permeabilidad a dos colorantes de unión al DNA que están presentes en el reactivo. El primer colorante (yoduro de propidio), tiñe las células que perdieron la

integridad de su membrana, lo cual permite diferenciar las células viables y no viables. Por otra parte, el segundo colorante (LDS-751) es capaz de teñir cualquier célula con núcleo, lo cual permite diferenciar las células nucleadas del debris (Phi-Wilson J, et al. 2001)

Para este ensayo, se realizó una suspensión homogénea de células con una concentración de 5×10^4 células/mL en un medio de PBS suplementado con $2 \mu\text{M}$ EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) y 3% FBS. Se tomaron $80 \mu\text{L}$ de la suspensión de células y se añadieron $150 \mu\text{L}$ de reactivo de conteo y viabilidad. Se incubó a temperatura ambiente por 5 minutos y se procedió a la lectura de la muestra en el analizador de células Muse.

6.6. Apoptosis

Este ensayo se realizó en el equipo analizador de células Muse (Guava® Muse®, Luminex), implementando el estuche de anexina V y muerte celular (Luminex MCH100105).

Durante este proceso, el analizador de células Muse, detecta la unión de anexina V a fosfatidilserina (marcador de muerte celular) externalizada por las células apoptóticas. Además, en la reacción se encuentra el marcador 7-aminoactinomicina D (7-ADD), que indica la integridad estructural de la membrana (Koopman G, et al. 1994). De acuerdo a la presencia o ausencia de estos dos marcadores, el equipo clasifica 4 diferentes poblaciones celulares:

- Células no apoptóticas: Anexina V (-), 7-ADD (-).
- Células en apoptosis temprana: Anexina V (+), 7-ADD (-).
- Células en apoptosis tardía y células muertas: Anexina V (+), 7-ADD (+).
- Debris nuclear: Anexina V (-), 7-ADD (+).

Para este ensayo, se realizó una suspensión homogénea de células con una concentración de 5×10^4 células/mL en un medio de PBS suplementado con $2 \mu\text{M}$ EDTA y 3% FBS. Se tomaron $100 \mu\text{L}$ de la suspensión de células y se añadieron $100 \mu\text{L}$ de reactivo anexina V y muerte celular. Se incubó a temperatura ambiente

por 20 minutos en oscuridad y se procedió a la lectura de la muestra en el analizador de células Muse.

6.7. Proliferación

El ensayo de proliferación celular se realizó por medio del estuche EdU-Click 594 (Sigma-Aldrich, BCK-EdU594-1), que se basa en la detección de un análogo de timidina, 5-etinil-2'-desoxiuridina (EdU). Este análogo se incorpora durante la replicación del DNA, al cual posteriormente se une el fluorocromo 5/6-sulforodamina-101-PEG3-azida. De esa forma, si las células están proliferando, fluorescerán al ser observadas en el microscopio.

Para esta determinación, las células fueron incubadas y transfectadas sobre cubreobjetos de 18 x 18 mm. A las 72 h post-transfección, se realizó el ensayo de proliferación. Para dicho ensayo, las células se incubaron a 37°C con 5 µM de EdU por 3 h. Después las células se fijaron con una solución de formaldehído al 3.7% en PBS a temperatura ambiente por 15 min. Se enjuagaron dos veces con una solución de BSA (albúmina de suero bovino) al 3% en PBS y se permeabilizaron por 20 min con una solución de Triton® X-100 al 0.5% en PBS, enjuagando nuevamente con solución de BSA al 3% en PBS.

Posteriormente, se preparó una solución de reacción que contenía 379 µL de agua desionizada, 50 µL de amortiguador de reacción, 20 µL de solución de catálisis, 1 µL de 5/6-Sulforodamina-101-PEG-Azida y 50 µL de amortiguador aditivo, por reacción, para la unión del fluorocromo con EdU. Las células se incubaron por 30 minutos a temperatura ambiente en oscuridad y después se enjuagaron 3 veces con solución de BSA al 3% en PBS.

Finalmente, los cubreobjetos se colocaron en medio de montaje con 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI), colorante de unión al DNA que facilita la visualización de las células nucleadas (Abcam ab104139) y se observaron en el microscopio invertido con iluminador de fluorescencia (OLYMPUS IX83). Se tomaron sistemáticamente 3 campos representativos por laminilla. Las imágenes fueron guardadas y procesadas

a través del software Olympus cellSens V2.3. Para el conteo de células se utilizó el software ImageJ v1. 52o.

6.8. Extracción de RNA

Este ensayo se realizó mediante un estuche de purificación de ácido ribonucleico (RNA) total (Jena Bioscience PP-210S).

Se retiró el medio de los pozos que contenía las células transfectadas. Se agregaron 500 μ L de amortiguador de lisis con 1% de 2-mercaptoetanol, se homogeneizaron las muestras y se mantuvieron las placas en todo momento sobre hielo, para evitar que el RNA se degradara. Posteriormente, se añadieron 300 μ L de isopropanol a las muestras y se homogeneizó. Simultáneamente, se realizó la activación de las columnas utilizando 100 μ L del amortiguador de activación por columna. Se centrifugó a 10,000 x g por 30 s. Se desechó el amortiguador eluído. Una vez activadas las columnas, se colocaron las muestras y se centrifugaron a 10 000 x g por 30 s, desechando el filtrado.

Después se añadieron 700 μ L de amortiguador de lavado primario y se centrifugó a 10 000 x g por 30 s, desechando el eluído. Se repitió nuevamente este paso. Finalmente, se centrifugó nuevamente a 10 000 x g por 2 min para secar la columna.

Para eluir al RNA de la columna, se colocó la columna en un tubo Eppendorf de 1.5 mL y se añadieron 30 μ L de agua libre de RNAsas. Se incubó por 1 min y se eluyó el RNA de la columna, centrifugando a 10 000 x g por 1 min.

Para establecer la concentración y pureza del RNA total, se utilizaron 2 μ L del RNA purificado para la lectura de absorbancia por medio de un espectrofotómetro (Thermo Scientific, Multiskan GO) a 260 y 280 nm.

6.9. Síntesis de cDNA por transcripción reversa (RT)

A partir del RNA total extraído de las células, se realizó la reacción de transcripción reversa, para la cual se ocupó un estuche de síntesis de cDNA (Jena Bioscience PCR-511S). El procedimiento se realizó como lo indica el fabricante, utilizando oligo-dT₁₅₋₂₅ como cebador y 1000 ng de RNA total por reacción.

Las reacciones se incubaron en un termociclador (Axygen Maxygene II, PCR convencional) utilizando las siguientes condiciones: 10 min a 42°C, seguido de 60 min a 50°C y 10 min a 70°C.

6.10. Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR)

A partir del cDNA sintetizado, se analizó la expresión de los genes de interés. Se utilizó un termociclador (Agilent AriaMX, PCR en tiempo real) y sondas Taqman® para los genes: *ETV5* (Rn00465814_g1), *ciclina D2* (Rn03020897_m1), *E2F1* (Rn01536222_m1), *S6K1* (Rn00579546_m1) y *L32* (Rn00820748_g1).

Para las reacciones de qPCR, se utilizó una mezcla maestra (Applied Biosystems™ 4440038) y 1 µL del cDNA para cada uno de los genes, haciendo las reacciones por triplicado. Los parámetros de incubación en el termociclador fueron: 2 min a 50°C, 10 min a 95°C, posteriormente 40 ciclos de 15 s a 95°C y 1 min a 60°C.

Los datos obtenidos se procesaron por el método $\Delta\Delta C_t$, con la finalidad de obtener valores de expresión relativa, normalizados por el gen de referencia *L32*.

6.11. Extracción y cuantificación de proteínas

Se realizó la extracción de proteínas de las muestras a partir de una mezcla de amortiguador de ensayo de radioinmunoprecipitación (RIPA, Thermo Scientific 89900) con inhibidor de proteasas al 1% (Thermo Scientific 78410), inhibidor de fosfatasas al 1% (Thermo Scientific 1862495) y bensonaza al 0.1% (Sigma E1014-25KU), utilizando un volumen de 250 µL de esta mezcla.

Posteriormente, se realizó la cuantificación de proteínas de los extractos por medio de un estuche (Biorad 500-0116) que emplea un ensayo colorimétrico tipo Lowry. Este ensayo consiste en la reacción de la proteína con tartrato de cobre en medio básico, lo que genera especies reducidas del reactivo de Folin, que producen un color azul característico (Lowry, et al. 1951).

Las muestras fueron cuantificadas en una dilución 1:3. Los reactivos fueron preparados como lo indica el fabricante y las reacciones se leyeron en un espectrofotómetro (Thermo Scientific, Multiskan GO) a 750 nm.

6.12. Western blot

La electroforesis se realizó cargando 75 µg de proteína por muestra, en geles de poliacrilamida al 14%. Se corrió la electroforesis a 80 V por 30 min y después a 120 V por 6 h.

Posteriormente, se hizo la transferencia del gel a una membrana de difluoruro de polivinilideno (PVDF) por medio de un sistema de transferencia (Bio-rad, Trans-Blot® Turbo™) durante 20 minutos a 25 V y 1.0 A. Posteriormente, se tiñó el gel de poliacrilamida con azul de Coomassie y la membrana con rojo de Ponceau.

Las membranas se bloquearon con una mezcla de leche al 5% y TWEEN al 1.2% en PBS por 1 h. Después, se incubaron con el anticuerpo primario durante toda la noche a 4°C en las siguientes diluciones: ETV5 (Santa Cruz Biotechnology sc-100941) dilución 1:200, ciclina D2 (GeneTex GTX32545) dilución 1:7000, E2F1 (Santa Cruz Biotechnology sc-56662) dilución 1:100 y β-actina (Cell Signaling 4967S) dilución 1:5000.

Posterior a la incubación, se realizaron 3 lavados con PBS por 10 minutos y se incubó con un anticuerpo secundario unido a peroxidasa de rábano. Para ETV5 y E2F1, se utilizó IgG de ratón (Cell Signaling 7076P2) dilución 1:5000, para ciclina D2 y β-actina, se utilizó IgG de conejo (Cell Signaling 7074P2) dilución 1:5000.

Las membranas se lavaron nuevamente y se agregó el reactivo de revelado para quimioluminiscencia (Millipore WBKLS0100). Se incubó por 2 minutos a temperatura ambiente y se reveló en un fotodocumentador (VILBER Fusion Fx). La densitometría de las imágenes fue procesada a través del software ImageJ v1. 52o.

7. Resultados

7.1. Optimización del cultivo celular en placas de 6 pozos

El cultivo celular se realizó en placas de 6 pozos. Se determinó la cantidad de células necesarias para que al cabo de las 96 h posteriores al plaqueo de las células, se tuviera una confluencia cercana al 90%.

En este ensayo, se incubaron 5 cantidades diferentes de células por pozo: 3×10^5 , 4.5×10^5 , 6×10^5 , 7.5×10^5 y 1×10^6 ; se encontró que las dos primeras cantidades de células fueron insuficientes para lograr la confluencia necesaria. Las dos últimas concentraciones rebasaron la confluencia que se requería y las células comenzaron a desprenderse. Finalmente, se observó que al plaquear 6×10^5 células por pozo, se logró obtener una confluencia cercana al 90% al cabo de las 96 h (Figura 3). Por lo tanto, esta cantidad de células fue la adecuada para realizar los ensayos de transfección posteriores.

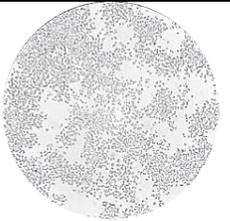
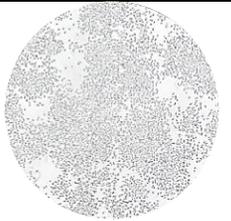
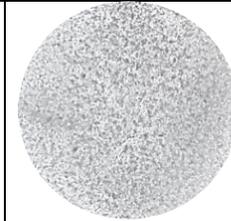
Tiempo	INS-1 (3×10^5 cél./pozo)	INS-1 (4.5×10^5 cél./pozo)	INS-1 (6×10^5 cél./pozo)	INS-1 (7.5×10^5 cél./pozo)	INS-1 (1×10^6 cél./pozo)
96 h					

Figura 3. Optimización del número de células en placas de 6 pozos. Comparación de diferentes cantidades de células por pozo a las 96 h de incubación.

7.2. Optimización de la transfección con siRNA contra *ETV5* en la línea celular INS-1 (832/13)

Este ensayo tuvo como objetivo evaluar la concentración necesaria de siRNA contra *ETV5* para poder obtener una disminución en la expresión relativa de este gen y así poder evaluar su efecto en la viabilidad, apoptosis y proliferación de las células INS-1 (832/13). Se probaron diferentes concentraciones de siRNA contra *ETV5*: 10 nM, 20 nM y 40 nM, realizando simultáneamente una transfección con siRNA

control a 20 nM. Para todos los tratamientos se colocó 1 μ L de agente de transfección.

Después de 72 h de haber realizado la transfección, se cuantificó la expresión relativa de *ETV5*. Se comprobó que el transcrito desciende aproximadamente en un 40% con el tratamiento de 10 nM de siRNA contra *ETV5* y en los tratamientos con 20 nM y 40 nM de siRNA contra *ETV5*, descendió en un 50% (Figura 4). Por lo tanto, las condiciones óptimas de transfección son: 20 nM de siRNA contra *ETV5*, añadiendo 1 μ L de agente de transfección e incubando a un tiempo de 72 h.

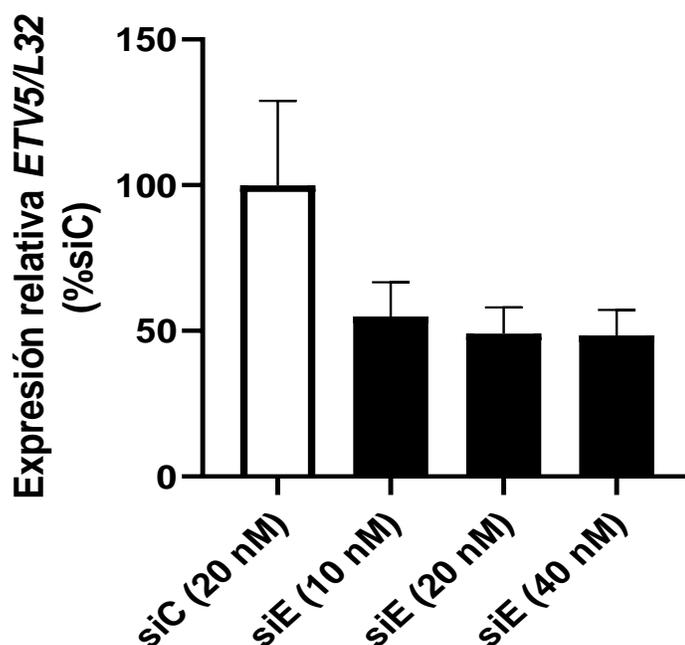


Figura 4. Optimización de la transfección a diferentes concentraciones de siRNA contra *ETV5* en la línea celular INS-1 (832/13). Expresión relativa del gen *ETV5* posterior a las 72h de la transfección con concentraciones de: 10, 20 y 40 nM de siE (siRNA contra *ETV5*), comparado con 20 nM de siC (siRNA control).

7.3. Optimización de los ensayos para determinar viabilidad y apoptosis en el analizador de células Muse[®] utilizando la línea celular INS-1 (832/13)

Se optimizaron los parámetros del equipo Muse[®] para la lectura de estos ensayos de las células INS-1 (832/13). Estos parámetros son: la cantidad de células por prueba, el número de eventos analizados por el equipo y los controles positivos y negativos.

7.3.1. Optimización del ensayo para la determinación de viabilidad celular

Para este ensayo se realizó una suspensión de 5×10^4 células/mL, de la cual se utilizaron 80 μ L por reacción, con la finalidad de tener una concentración final para el ensayo entre 1×10^4 y 5×10^5 células/mL, como lo recomienda el fabricante.

Una vez optimizada la cantidad de células a analizar, se encontró que el equipo alcanzó una lectura de hasta 1000 eventos por muestra.

Para el control positivo, se utilizaron células sin tratamiento, esto es, células que solamente se dejaron crecer con medio completo. Se obtuvo el perfil poblacional de estas células, el cual está definido en un tamaño celular de 1 a 3.1, delimitando los desechos celulares por debajo de 1 y con una población viable de 0.1 a 1.3 (Figura 5-A). Por otra parte, se obtuvo que en el perfil de viabilidad (Figura 5-B), las células nucleadas se encuentran de 1 a 3.2, con una población viable de 0 a 1.2 por arriba de la línea transversal; los desechos celulares se delimitaron nuevamente por debajo de 1.

Posteriormente, se evaluó como control negativo a células parcialmente muertas, las cuales se incubaron en PBS durante 48 h previo al ensayo. Se obtuvo un perfil poblacional para estas células definido en un tamaño celular de 1 a 3.0, delimitando los desechos celulares abajo de 1 y se definió una población no viable de 2.3 a 3.2 (Figura 6-A). Por otro lado, el perfil de viabilidad se define en células nucleadas de tamaño de 1 a 3.2, con una población no viable de 0.1 a 3.3 por debajo de la línea transversal; los desechos celulares se delimitaron por debajo de 1 (Figura 6-B).

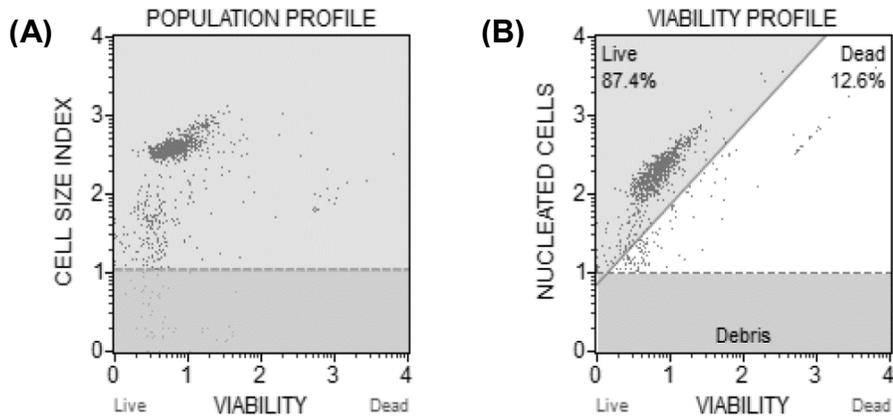


Figura 5. Optimización de los parámetros en la interfaz del analizador de células Muse® para el ensayo de viabilidad celular en un control positivo. Las células sin tratamiento se refieren a células incubadas con medio completo. **(A)** Células sin tratamiento, tamaño celular de 1 a 3.1. **(B)** Células sin tratamiento, células nucleadas de 1 a 3.2; población viable de 0 a 1.2 (sobre la línea transversal).

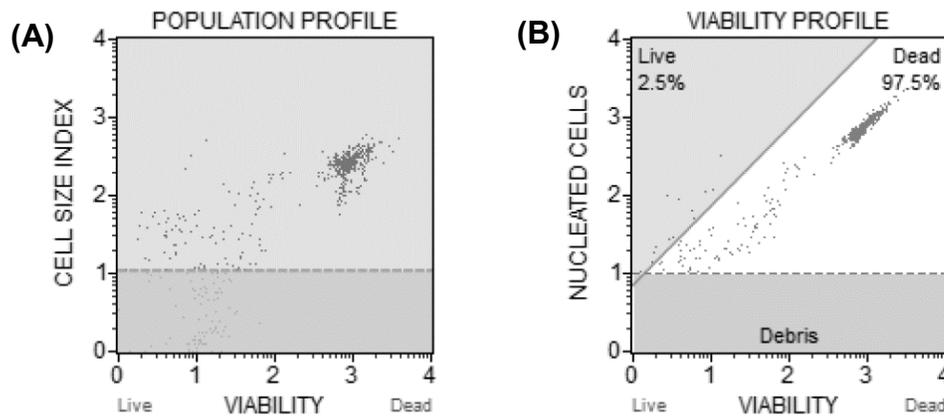


Figura 6. Optimización de los parámetros en la interfaz del analizador de células Muse® para el ensayo de viabilidad celular en un control negativo. **(A)** Células en PBS por 48 h, tamaño celular de 1 a 3.0. **(B)** Células en PBS por 48 h, células nucleadas de 1 a 3.3; población no viable de 0.1 a 3.3 (por debajo de la línea transversal).

7.3.2. Optimización del ensayo para la determinación de apoptosis celular

Para esta prueba se realizó una suspensión de 5×10^4 células/mL, utilizando 100 μ L por reacción para lograr una concentración final de 1×10^4 a 5×10^5 células/mL, como lo recomienda el fabricante. Una vez establecida la cantidad de células a analizar, el equipo logró completar una lectura de hasta 1000 eventos por muestra.

Se evaluó como control positivo para apoptosis a células incubadas en PBS durante 48 h, obteniendo un perfil poblacional definido en un tamaño celular de 1 a 3.1, marcando desechos celulares abajo de 1 (Figura 7-A). Respecto al perfil de apoptosis, se encontraron 4 poblaciones delimitadas: células vivas (29.93%), células en apoptosis temprana (31.36%), células en apoptosis tardía (38.61%) y restos nucleares (0.1%) (Figura 7-B).

Posteriormente, se evaluó como control negativo de este ensayo células sin tratamiento, solamente incubadas en medio completo. Se obtuvo un perfil poblacional de estas células que se define en un tamaño celular de 1 a 3.1, delimitando los desechos celulares por debajo de 1 (Figura 8-A). Por otra parte, el perfil de apoptosis reveló 4 poblaciones: células vivas (61.72%), células en apoptosis temprana (31.73%), células en apoptosis tardía (5.63%) y restos nucleares (0.92%) (Figura 8-B).

Al comparar las células parcialmente muertas con las células incubadas en medio completo, se observó que en las células muertas hay una población que se ubica predominantemente en el cuadrante de apoptosis tardía, mientras que las células incubadas en medio completo, éstas mantienen una población mayoritaria en el cuadrante de células viables.

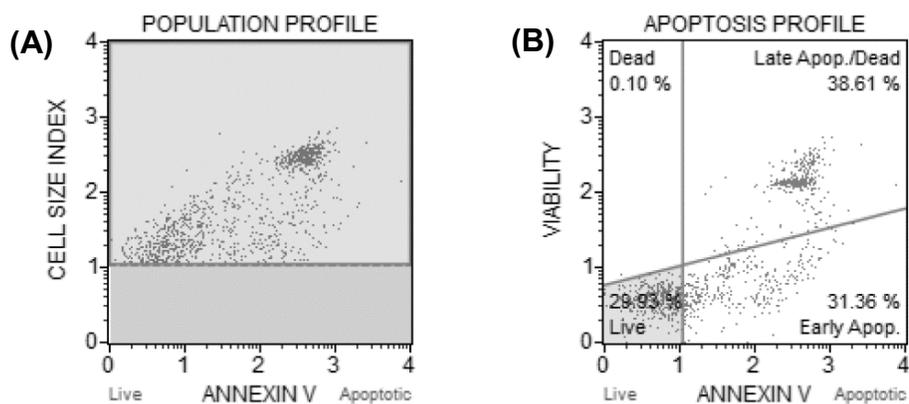


Figura 7. Optimización de los parámetros en la interfaz del analizador de células Muse® para el ensayo de apoptosis celular en un control positivo. (A) Células en PBS por 48 h con tamaño celular de 1 a 3.1. (B) Células en PBS por 48 h. El histograma se divide en 4 cuadrantes: células vivas (29.93%), células en apoptosis temprana (31.36%), células en apoptosis tardía (38.61%) y restos nucleares (0.1%).

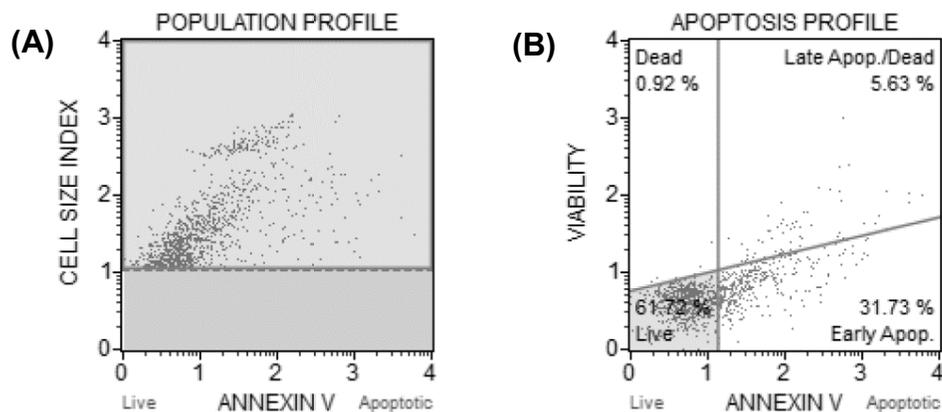


Figura 8. Optimización de los parámetros en la interfaz del analizador de células Muse® para el ensayo de apoptosis celular en un control negativo. Las células sin tratamiento se refieren a células incubadas con medio completo. (A) Células sin tratamiento con tamaño celular de 1 a 3.1. (B) Células sin tratamiento. El histograma se divide en 4 cuadrantes: células vivas (61.72%), células en apoptosis temprana (31.73%), células en apoptosis tardía (5.63%) y restos nucleares (0.92%).

7.4. Optimización del ensayo de proliferación celular (EdU-Click 594) en la línea celular INS-1 (832/13)

El objetivo de esta optimización fue establecer el tiempo de incubación y la concentración de EdU para realizar esta prueba en la línea celular INS-1 (832/13). Para este experimento, se utilizaron células adheridas a cubreobjetos, incubadas en medio completo. Se eligieron concentraciones de 5 y 10 μM de EdU, con tiempos de incubación de 3 y 6 h. Se encontró que las condiciones óptimas fueron con 5 μM de EdU, a un tiempo de incubación de 3 h. Con este tratamiento las células que se encontraban proliferando se observaron delimitadas, además de que se observó la tinción del núcleo con DAPI. En cambio, al aumentar el tiempo y la concentración de EdU, se observó ruido de fondo en la imagen, lo cual dificulta la observación de las células positivas en este ensayo y su conteo (Figura 9).

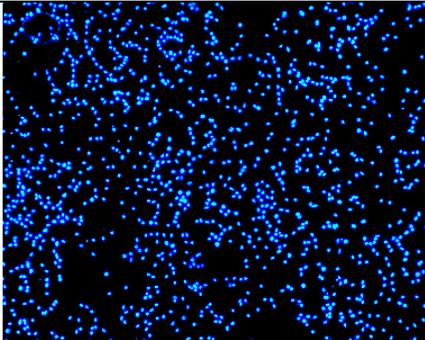
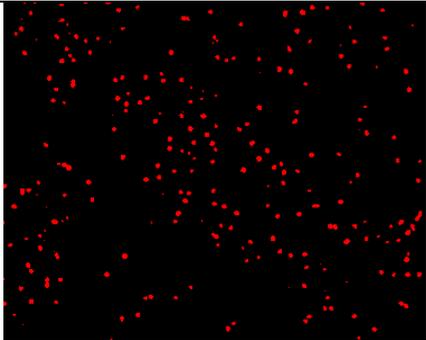
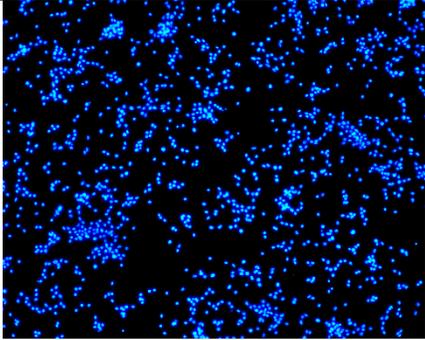
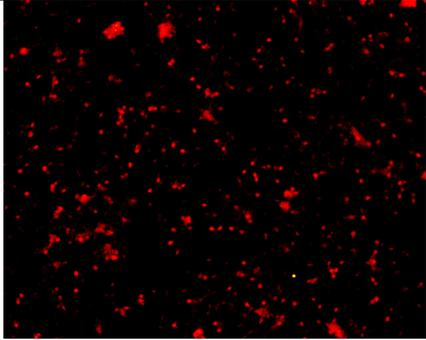
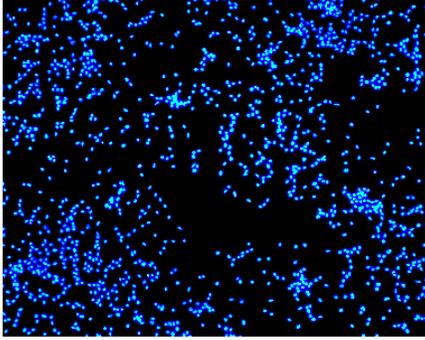
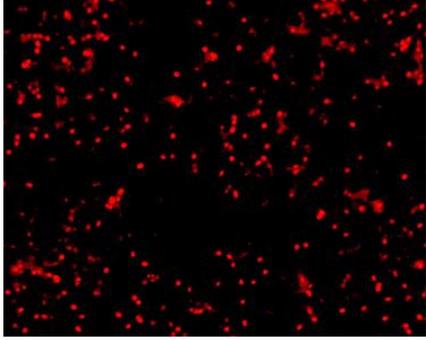
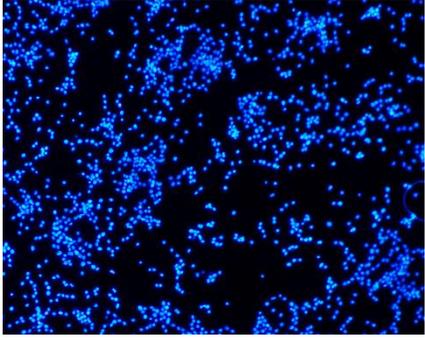
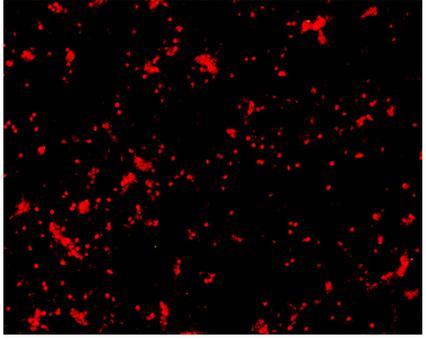
Tratamiento	DAPI	EdU
5 μ M EdU 3 h		
5 μ M EdU 6 h		
10 μ M EdU 3 h		
10 μ M EdU 6 h		

Figura 9. Optimización del ensayo de proliferación EdU-Click 594. Comparación del ensayo de proliferación con concentraciones de 5 y 10 μ M de EdU a tiempos de incubación de 3 y 6 h. Imágenes tomadas a través del microscopio invertido con iluminador de fluorescencia, en objetivo 10X.

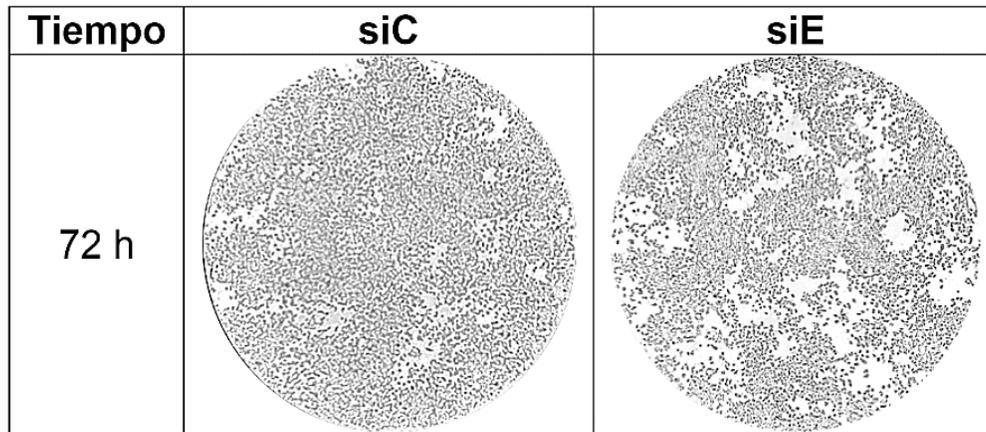
7.5. Expresión de *ETV5* y observación de la línea celular INS-1 (832/13) posterior al silenciamiento de *ETV5*

Posterior a las 72 h de haber realizado la transfección en la línea celular INS-1 (832/13), se observó que existe una disminución de la confluencia en las células silenciadas de *ETV5* respecto a las células transfectadas con el siRNA control (Figura 10-A).

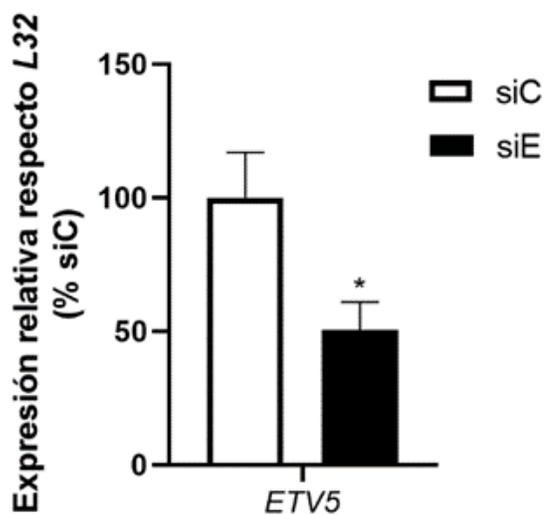
Al observar el cambio en la confluencia de las células transfectadas con siRNA contra *ETV5*, se comprobó que hubiese un cambio en la cantidad de células de ambos tratamientos, contándolas por medio de la cámara de Neubauer.

Se observó que al suprimir 50% el gen de *ETV5* (Figura 10-B), se redujo en 25% el número de células respecto al tratamiento control (Figura 10-C).

(A)



(B)



(C)

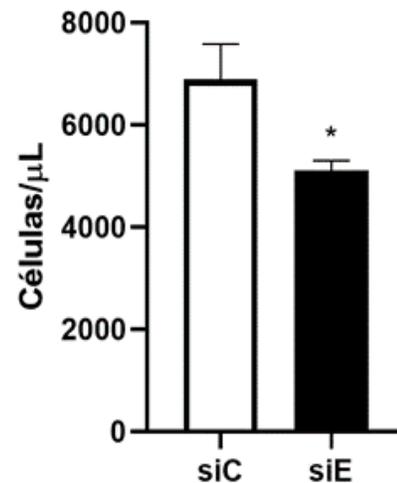


Figura 10. Silenciamiento de *ETV5* en la línea celular INS-1 (832/13) y la disminución del número de células. Ensayo de transfección con tratamientos de 20 nM de siC (siRNA control) y siE (siRNA *ETV5*), posterior a las 72 h de incubación. **(A) Diferencia en la confluencia celular en presencia o ausencia parcial de *ETV5*.** Imágenes capturadas a través de microscopio óptico invertido, con objetivo 10X. **(B) Expresión relativa de *ETV5*.** Evaluación de la presencia de transcrito de *ETV5* posterior a las 72 h de su silenciamiento. T-Student, * $p < 0.05$, $n = 3$ **(C) Conteo de células en la cámara de Neubauer.** Comparación del número de células en los ensayos de transfección con siC (siRNA control) y siE (siRNA *ETV5*). T-Student, * $p < 0.05$, $n = 3$

7.6. Determinación de la concentración de insulina en la transfección de la línea celular INS-1 (832/13)

Anteriormente se había descrito que *ETV5* regula la secreción de insulina vía la exocitosis. Se reportó que en ausencia de *ETV5*, existe una disminución de la secreción de la insulina, después de haber dejado las células en ayuno por una hora y estimularlas con glucosa por una hora (Gutierrez-Aguilar et al. 2014). Sabiendo que la insulina es un mitógeno, que estimula la proliferación celular, se quiso comprobar que la diferencia en la cantidad de células no se debiera a una variación en la concentración de insulina. Por esta razón, se cuantificó la concentración de insulina secretada acumulada a diferentes tiempos después de la transfección con siE y siC.

La concentración de insulina secretada se midió por medio de un ensayo de ELISA. Para este procedimiento, se recolectó el medio de las células. Las muestras se obtuvieron a las: A) 0 h (antes de la transfección), B) 24 h post-transfección, C) 24 h (del periodo de 24 a 48 h post-transfección), D) 24 h (del periodo de 48 a 72 h post-transfección) y E) 48 h (correspondiente al periodo de 24 a 72 h post-transfección), para cada tratamiento. (Figura 11-a).

Se encontró que en la recolección antes de la transfección (A) existe una menor concentración de insulina respecto a las muestras obtenidas en intervalos de 24 h (B, C, D). Esto puede correlacionarse con la cantidad de células presentes al momento de la recolección, ya que había una menor cantidad respecto a las células en horas posteriores. Por otra parte, la concentración de insulina aumenta en la última recolección de medio (E), respecto a los anteriores muestreos (A, B, C, D). Esto se debe a que el medio no fue cambiado desde las 24 h a las 72 h post-transfección, lo cual favorece la acumulación de insulina en el medio. Al comparar los tratamientos entre siC y siE, se encontró que no hay diferencia significativa en la concentración de insulina secretada a diferentes tiempos de la transfección (Figura 11-b). Por lo tanto, al no existir diferencia en la concentración de insulina en células controles (siC) y donde *ETV5* está suprimido (siE), la disminución del número de células no se debe a la concentración de insulina presente en el medio.

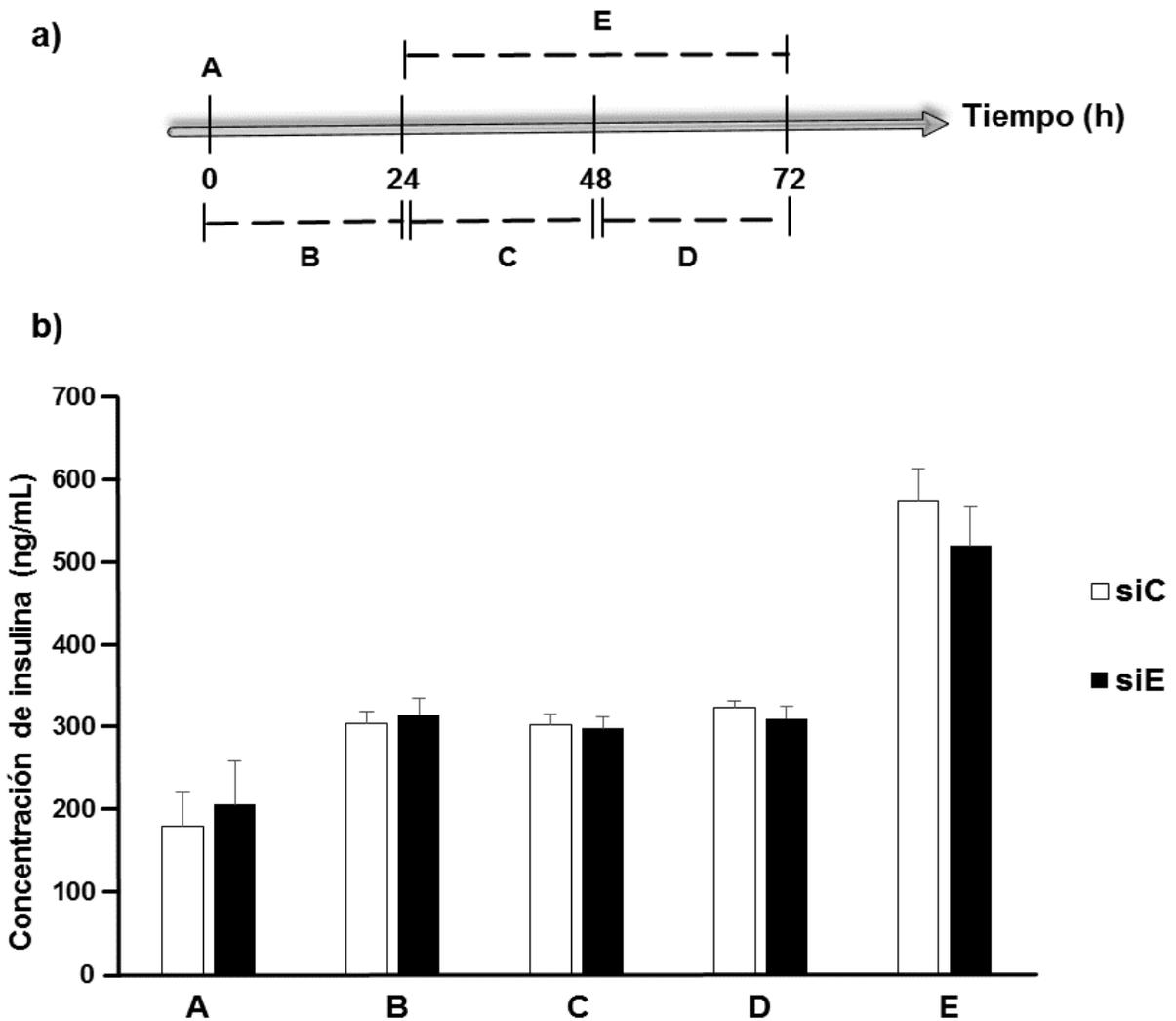


Figura 11. Concentración de insulina a diferentes tiempos de la transfección. a) Tiempos de recolección del medio durante el ensayo de transfección. **b)** Concentración de insulina presente en el medio de células transfectadas con siC (siRNA control) y siE (siRNA *ETV5*) a diferentes intervalos de tiempo durante las 72 h del ensayo. T-Student, $*p < 0.05$, $n = 3$.

7.7. Efecto del silenciamiento de *ETV5* en la viabilidad celular

Después de observar la disminución en el número de células al suprimir a *ETV5* y comprobar que no se debe a una disminución en la secreción de insulina acumulada durante las 72 h post-transfección, se quiso analizar la viabilidad de las células.

Se evaluó la viabilidad celular utilizando: (a) células sin tratamiento, incubadas con medio completo (control positivo), (b) células transfectadas con siC, (c) células transfectadas con siE, (d) células tratadas con PBS por 48 h (control negativo) (e) células tratadas con calor (control negativo) y (f) mezcla de células de control positivo y negativo

Se observó que el control positivo de células sin tratamiento, tienen una viabilidad promedio del 75%. Para los controles negativos, en el caso de las células tratadas con PBS por 48 h, estas conservaron una viabilidad del 15%; por otro lado, las células tratadas con calor conservaron una viabilidad del 40%. Además, se observó que las mezclas de células sin tratamiento y tratadas con PBS por 48 h, la viabilidad fue del 35%. Sin embargo, las células que fueron transfectadas con siC y siE mostraron una viabilidad cercana al 75%, sin diferencia entre ambos tratamientos, similar a las células vivas del control positivo (Figura 12).

Por lo tanto, a través de este ensayo, se demostró que no existe una diferencia entre las células en presencia o ausencia parcial de *ETV5*. Por lo cual, la disminución de células en la ausencia de *ETV5*, no se debe a la pérdida de viabilidad

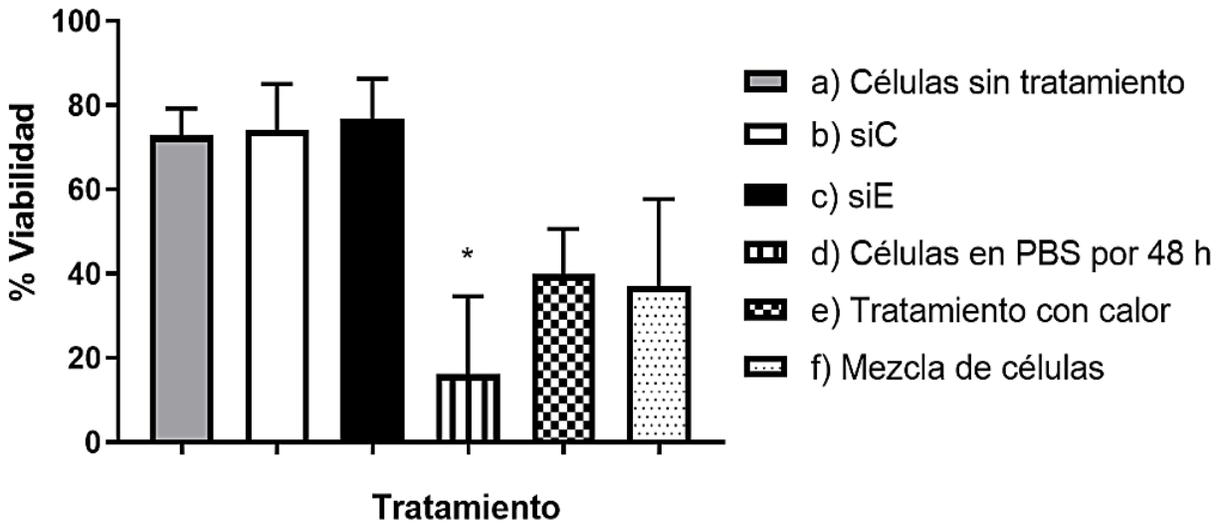


Figura 12. Ensayo de viabilidad en la línea celular INS-1 (832/13). Viabilidad de: **a)** Células sin tratamiento, incubadas con medio completo (control positivo), **b)** Células transfectadas con siC (siRNA control), **c)** células transfectadas con siE (siRNA *ETV5*), **d)** células tratadas con PBS por 48h (control negativo), **e)** células tratadas con calor (control negativo) y **f)** mezcla de células tratadas con PBS 48 h más células sin tratamiento. ANOVA de una vía, * $p < 0.05$, $n = 3$.

7.8. Efecto del silenciamiento de *ETV5* en la apoptosis celular

La disminución en la cantidad de células, cuando *ETV5* se suprimió parcialmente, podría deberse a un incremento de la muerte celular. Por lo tanto, se realizó el ensayo para la determinación de apoptosis celular.

Se evaluó la apoptosis celular utilizando: (a) células sin tratamiento, incubadas con medio completo (control negativo), (b) células transfectadas con siC, (c) células transfectadas con siE, (d) células tratadas con PBS por 48 h (control positivo) (e) células tratadas con calor (control positivo) y (f) mezcla de células de control positivo y negativo

Dentro de los resultados que se obtuvieron, se encontró que las células tratadas con PBS por 48 h tuvieron una media del 70% de células apoptóticas totales, mientras que, para el caso de las células tratadas con calor se obtuvo hasta un 60%

de células apoptóticas totales, siendo estos dos tratamientos los controles positivos para la apoptosis. En el caso de las células sin tratamiento, se obtuvo una media del 50% de células apoptóticas totales, siendo el control negativo. La mezcla de células de control positivo y negativo, tuvieron un 50% de células apoptóticas totales. Se encontró que el porcentaje de células apoptóticas totales es muy similar entre siC y siE, lo cual indica que no existe diferencia significativa entre las células con presencia de *ETV5* y células ausentes de *ETV5*, por lo que, no existe evidencia de que la disminución de células que observamos en ausencia de *ETV5* se deba por apoptosis celular (Figura 13).

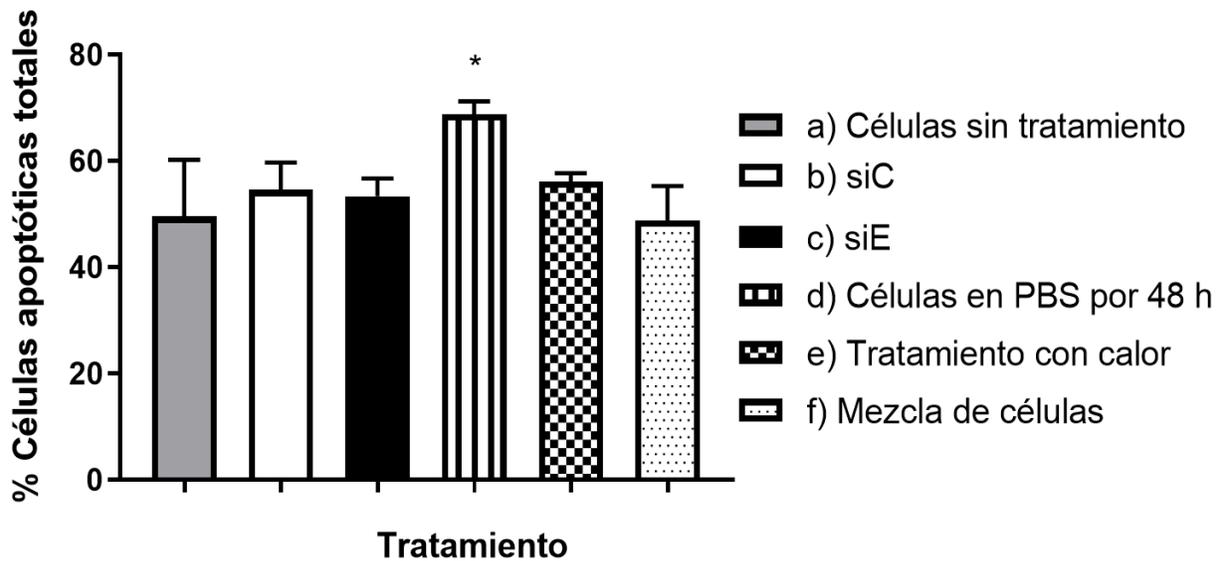


Figura 13. Ensayo de apoptosis celular en la línea celular INS-1 (832/13). Células apoptóticas totales de células sin tratamiento, células transfectadas con siC (siRNA control) y siE (siRNA *ETV5*), tratadas con PBS por 48 h, con calor y mezcla de células viables y no viables; se presentan en orden de izquierda a derecha. ANOVA de una vía, * $p < 0.05$, $n = 3$.

7.9. Efecto del silenciamiento de *ETV5* en la proliferación celular

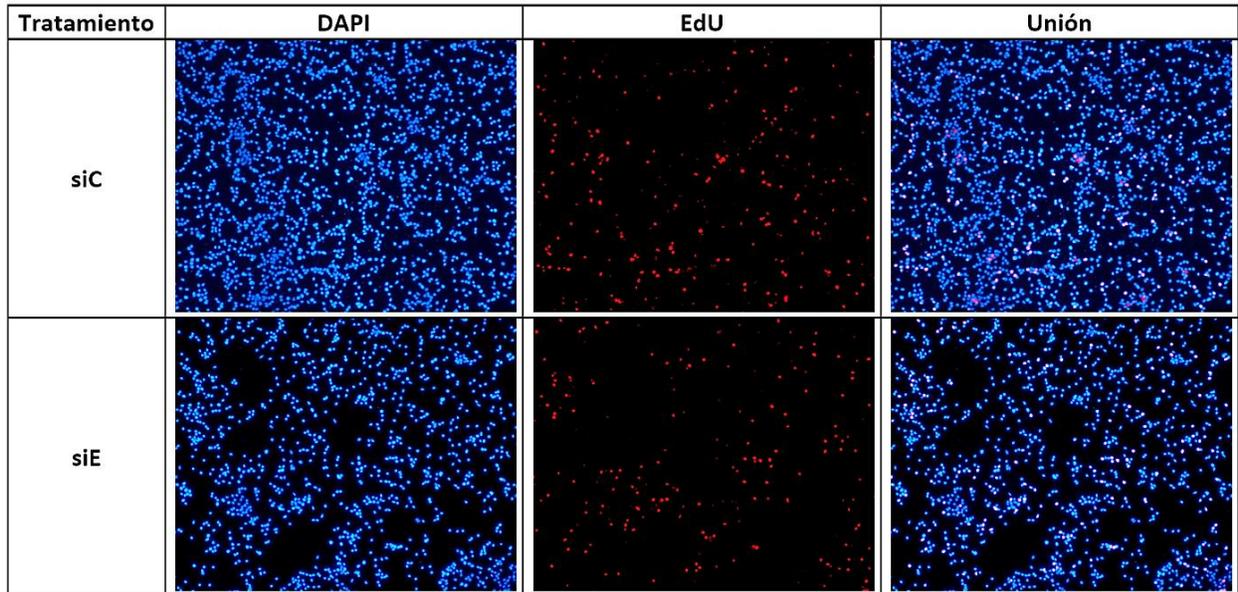
Al haber comprobado que la disminución de células en ausencia parcial de *ETV5* no es por menor viabilidad o por apoptosis, se evaluó la proliferación celular. Al teñir los núcleos de las células con DAPI, se evidenció nuevamente la diferencia entre la confluencia y la cantidad de células en presencia o ausencia de *ETV5*, siendo menor en las células donde *ETV5* está suprimido parcialmente.

El ensayo con EdU indica las células que están activamente proliferando. Al realizar esta evaluación, se observó una menor cantidad de células proliferando en el tratamiento donde se silenció *ETV5*. Al unir las imágenes de las tinciones con DAPI y EdU, se evidencia una diferencia en la cantidad de células que proliferaron en cada tratamiento (Figura 14-A).

Para el conteo de las células, se obtuvieron 3 imágenes representativas tomadas de manera sistemática por cada tratamiento. Posteriormente, se utilizó el software ImageJ v1. 52o, con el que se contabilizó el número de células y se calculó el porcentaje de células proliferando en cada tratamiento (Figura 14-B).

Al realizar este análisis, se confirmó que existe una disminución del 23% en la cantidad de células proliferando cuando *ETV5* se encuentra silenciado parcialmente.

(A)



(B)

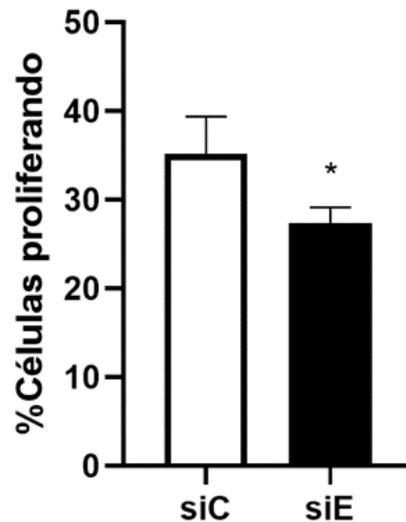


Figura 14. Ensayo de proliferación EdU en la línea celular INS-1 (832/13).

(A) Comparación del ensayo de proliferación en células transfectadas con siC (siRNA control) y siE (siRNA *ETV5*). Se muestra la tinción de los núcleos de las células con DAPI (en azul) y la presencia de células proliferantes teñidas con EdU (de color rojo), tratamiento realizado a 3 h con 5 μ M de EdU. Se presenta la unión de ambas imágenes, en donde las células que proliferaron se marcan en puntos rosas. **(B)** Cuantificación de las células proliferando en los tratamientos de transfección con siC (siRNA control) y siE (siRNA *ETV5*). T-Student, * $p < 0.05$, $n = 3$.

7.10. Expresión relativa de *ETV5* y sus posibles genes blanco: *ciclina D2 (CCND2)*, *S6K1* y *E2F1*

Después de silenciar a *ETV5* en un 50% en la línea celular INS-1 (832/13), se demostró que existe una disminución en el número de células y que esto se debe a una reducción en la proliferación celular. Sabiendo que *ETV5* es un factor transcripcional, se puede inferir que esta proteína pudiera intervenir en la regulación de la transcripción de genes involucrados en el ciclo celular.

Al realizar un ensayo *in silico*, se encontró que *ETV5* tiene sitios de unión a promotores de genes involucrados en ciclo celular, tales como *CCND2*, *S6K1* y *E2F1*. De tal forma, *ETV5* pudiese estar regulando la proliferación celular, vía la transcripción de genes involucrados en este proceso. Debido a esta razón, se cuantificó la transcripción de *ETV5* y sus posibles genes blanco, al cabo de 72 h post-transfección. Se demostró que la expresión relativa de *ETV5* disminuyó en un 50%. En cuanto a la expresión de los posibles genes blanco de *ETV5*, se observó que la transcripción de *CCND2* y *S6K1* no se ve alterada en presencia o ausencia de *ETV5*. Sin embargo, existe una sobreexpresión de *E2F1* en un 180%.(Figura 15).

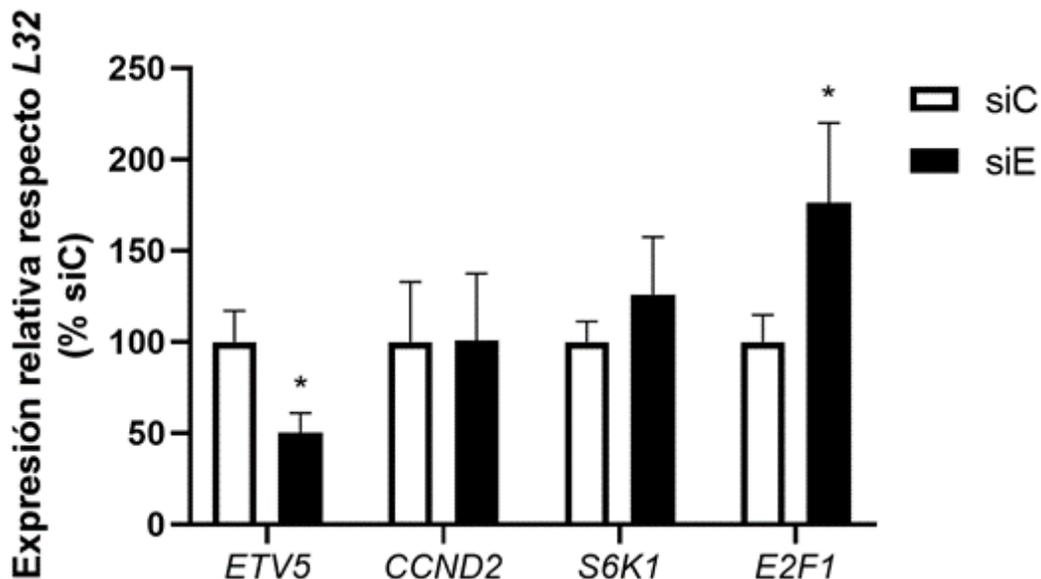


Figura 15. Expresión relativa de *ETV5* y sus genes blanco en la línea celular INS-1 (832/13). Expresión relativa de *ciclina D2 (CCND2)*, *S6K1* y *E2F1* en células transfectadas con siC (siRNA control) y siE (siRNA *ETV5*). T-Student, * $p < 0.05$, $n = 3$.

7.11. Optimización de anticuerpos para el ensayo de western blot en extractos proteicos de células INS-1 (832/13)

Después de obtener la expresión relativa de *ETV5* y de sus posibles genes blanco, se quiso evaluar a nivel proteico la presencia de ETV5, E2F1 y ciclina D2. En el caso de S6K1, no se observó ninguna diferencia en el transcrito en presencia o ausencia de *ETV5*. Para la ciclina D2, anteriormente se había demostrado que en la línea celular HEK293T al silenciar a *ETV5*, disminuyó la transcripción de *ciclina D2*. Por esta razón, se quiso comprobar la presencia de esta proteína en extractos celulares de INS-1 (832/13) y de HEK293T.

La optimización del western blot se realizó utilizando 50 y 100 µg de proteínas y con diferentes concentraciones de anticuerpos: contra ETV5, ciclina D2, E2F1 y β-actina (control interno) (Figura 16-A y 16-B).

Al realizar este experimento, se obtuvo una buena detección de bandas con cantidades de 50 y 100 µg de proteína (Figura 16-C). Por lo que se decidió realizar el cargado de los pozos con 75 µg de proteína.

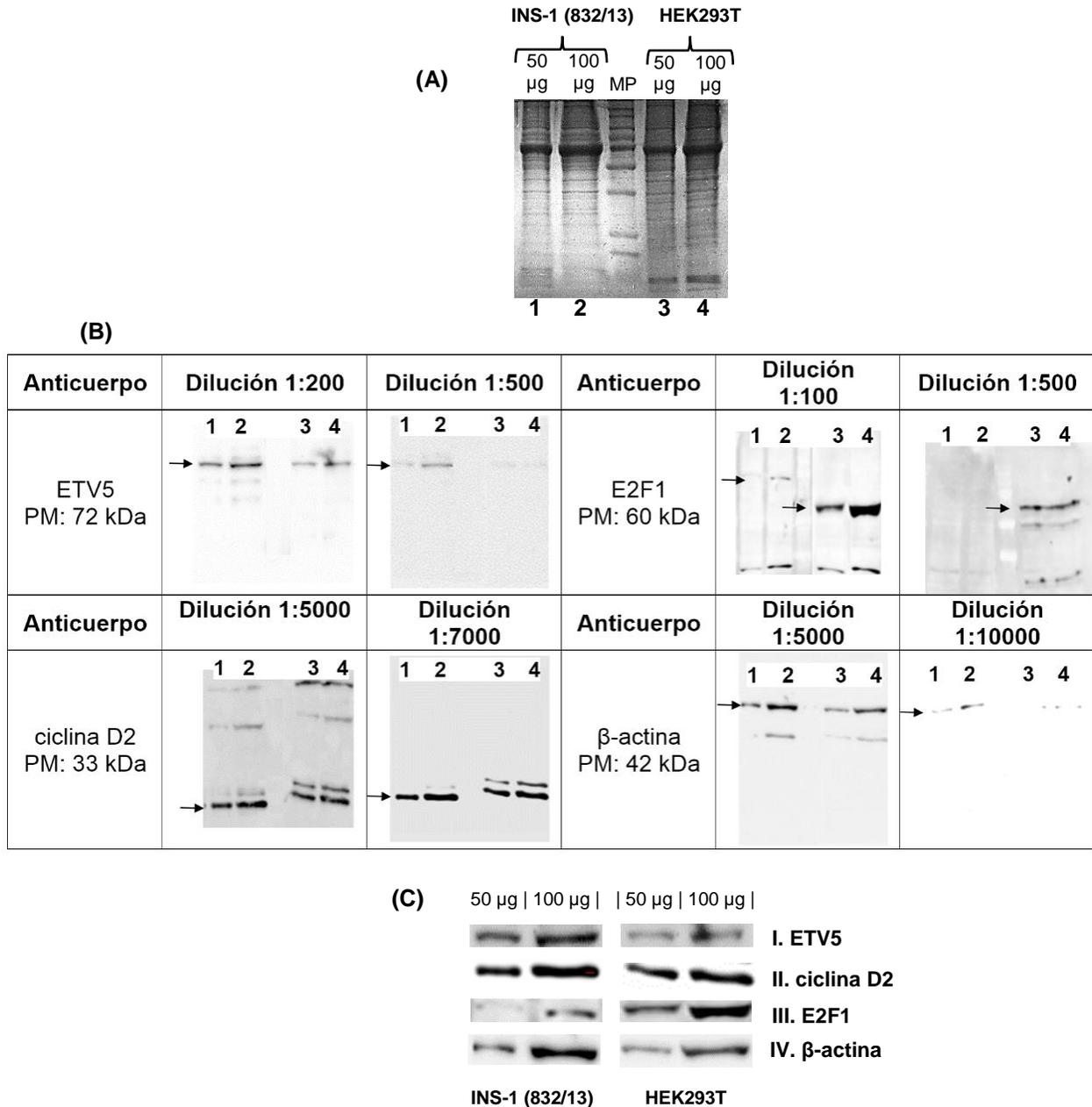


Figura 16. Optimización de anticuerpos para el ensayo de western blot en extractos de las líneas celulares INS-1 (832/13) y HEK293T (A) Gel de poliacrilamida en donde se realizó la electroforesis de proteínas. Tinción con azul de Coomassie. Se observa las bandas del corrimiento electroforético, donde se logra distinguir la variación en la cantidad de proteínas cargadas por pozo (Carriles enumerados de acuerdo al extracto cargado con 50 y 100 µg de proteínas, donde MP, corresponde al marcador de peso molecular). (B) Optimización con dos diferentes concentraciones de los anticuerpos ETV5 (diluciones 1:200 y 1:500), ciclina D2 (diluciones 1:5000 y 1:7000), E2F1 (diluciones 1:100 y 1:500) y β-actina (diluciones 1:5000 y 1:10000). (C) I. Señal contra ETV5, dilución 1:200, II. Señal contra ciclina D2, dilución 1:7000, III. Señal contra E2F1 Dilución 1:100, IV. Señal contra β-actina, dilución 1:5000.

7.12. Detección de ETV5, E2F1 y ciclina D2 mediante ensayos de western blot

Para analizar la cantidad de proteínas de ETV5 como de E2F1 y ciclina D2 se utilizaron extractos de las líneas celulares INS-1 (832/13) y HEK293T, en las que se silenció parcialmente a *ETV5*. Al realizar el ensayo de western blot, se lograron visualizar las bandas de proteínas para ETV5, ciclina D2, E2F1 y β -actina (Figura 17-A).

En la figura 15, se había demostrado que al transfectar la línea celular INS-1 (832/13) con siE, la expresión del gen *ETV5* disminuía en un 50% y la de *E2F1* se sobreexpresó 180%. Entonces se cuantificaron las proteínas por medio de un análisis de densitometría, para comprobar que los niveles sigan el mismo patrón que la expresión génica. Utilizando el software ImageJ v1. 52o se cuantificó el área y la intensidad de las bandas. Posteriormente, los datos obtenidos de las proteínas de interés se normalizaron respecto a la señal de β -actina.

Como se mencionó anteriormente, el gen *S6K1* no modificó su expresión ni en la línea celular HEK293T, ni en la línea celular INS-1 (832/13). En cambio, el gen de *ciclina D2* disminuyó su expresión al suprimir a *ETV5* en las células HEK293T y no presentó cambios en las INS-1 (832/13). Por lo tanto, se cuantificaron las proteínas de ETV5, E2F1 y ciclina D2, en ambas líneas celulares, HEK293T e INS-1 (832/13).

En la figura 17-B y 17-C, se presenta la cuantificación de los niveles de proteína presentes en 3 diferentes ensayos en los que se silenció a *ETV5* en la línea celular INS-1 (832/13) y sólo un ensayo en la línea celular HEK293T, debido a que solamente era para corroborar lo obtenido anteriormente y no era parte de este proyecto. El análisis mostró que hay una disminución de ETV5 cercana al 20% en el tratamiento con siE comparado con siC, para los extractos de la línea celular INS-1 (832/13); mientras que, para ciclina D2 no se observó cambio. Respecto a E2F1, se observa que hay un aumento del 27% en la cantidad de proteína cuando se silencia parcialmente a *ETV5*, sin embargo, al realizar el análisis estadístico este aumento no resulta ser significativo (Figura 17-B).

Por otra parte, el ensayo con la línea celular HEK293T muestra que en los tratamientos con siE hay una disminución del 60% en la cantidad de ETV5 y del 30% en la cantidad de ciclina D2, mientras que no se observan cambios para E2F1 comparados con siC. Estos resultados nos sirvieron como controles, sin embargo, deben confirmarse con un número mayor de réplicas. Esto solamente ayuda a confirmar los antecedentes reportados del silenciamiento de *ETV5* en la línea celular HEK293T, donde *ciclina D2* se reducía transcripcionalmente en ausencia parcial de *ETV5*.

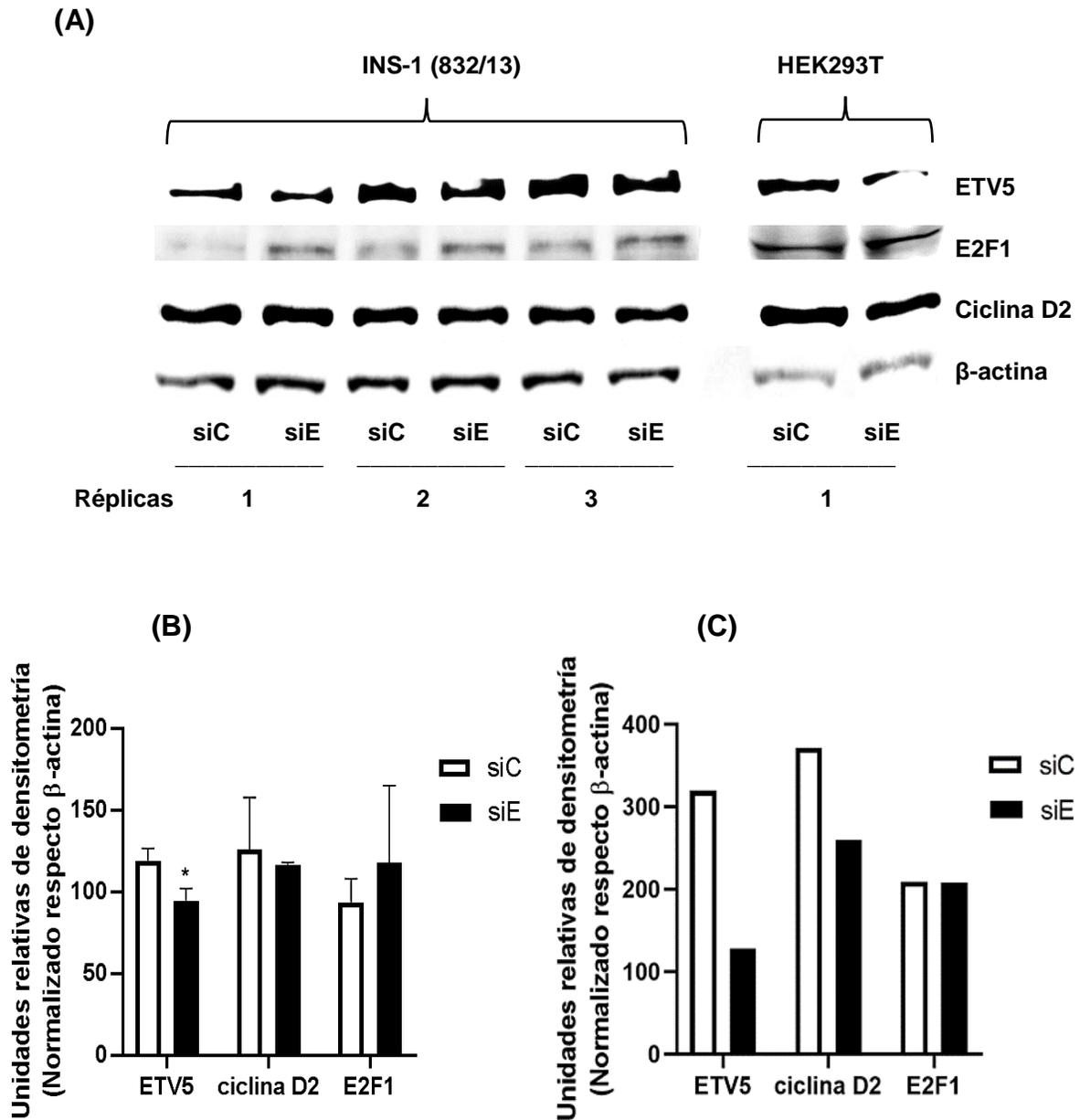


Figura 17. Ensayo de western blot en extractos de las líneas celulares INS-1 (832/13) y HEK293T. (A) western blot de ETV5, E2F1, ciclina D2 y β -actina en presencia (siC) o ausencia parcial de *ETV5* (siE). **(B)** Cuantificación de las proteínas de ETV5, ciclina D2 y E2F1 mediante densitometría en la línea celular INS-1 (832/13). Evaluación de la cantidad de proteína en unidades relativas de densitometría. T-Student, * $p < 0.05$, $n = 3$. **(C)** Cuantificación de las proteínas de ETV5, ciclina D2 y E2F1 mediante densitometría en la línea celular HEK 292T. Evaluación de la cantidad de proteína en unidades relativas de densitometría. $n = 1$.

8. Análisis de resultados

8.1. Disminución del número de células por silenciamiento de *ETV5*

Después de silenciar en un 50% al gen *ETV5* en la línea celular INS-1 (832/13), se observó al microscopio que hay una disminución en el número de las células respecto al tratamiento control (Figura 10-A), lo que se comprobó mediante el conteo de las células, siendo una disminución del 25% (Figura 10-C).

Se ha descrito que en ausencia de *ETV5*, disminuye la secreción de insulina en la línea celular INS-1 (832/13) cuando se estimulan con glucosa por una hora (Gutierrez-Aguilar et al. 2014). Al ser la insulina una hormona que puede promover la proliferación, actuando como mitógeno (Belfiore et al. 2017), se evaluaron las concentraciones de esta hormona a las 72 h post-transfección (Figura 11). Se encontró que los niveles de insulina no cambian en el transcurso de las 72 h de transfección, entre las células controles y con ausencia parcial de *ETV5*. Por lo tanto, se puede descartar que la disminución en el número de células sea por la acción de la insulina como mitógeno.

8.2. Influencia de *ETV5* sobre viabilidad, apoptosis y proliferación celular

Debido a que se encontró una menor cantidad de células, cuando la línea celular INS-1 (832/13) fue silenciada para el gen *ETV5*, se cuantificaron procesos celulares que pudieran explicar la disminución del número de células, tales como la viabilidad, apoptosis y proliferación celular.

Al realizar los ensayos para evaluar la viabilidad celular y apoptosis, se demostró que no existe diferencia entre células ausentes parcialmente de *ETV5* y células control (Figuras 12 y 13). Por lo cual, la disminución de células no se debió a la viabilidad, ni a la muerte celular.

Posteriormente, se realizaron ensayos para evaluar la proliferación celular, encontrando que se reduce un 23% en ausencia parcial de *ETV5* (Figura 14), siendo que corresponde con la reducción del número de células del 25% (Figura 10).

Se ha demostrado que en cáncer colorectal, *ETV5* se encuentra sobreexpresado y que la proliferación se ve abatida al suprimir a este gen (Cheng et al. 2019). También, se ha descrito que en cáncer endometrial, *ETV5* se encuentra sobreexpresado y que promueve las capacidades de invasión, migración y proliferación celular (Pedrola et al. 2015).

Por otra parte, nuestros antecedentes en las células HEK293T demostraron que al silenciar a *ETV5*, la proliferación disminuyó en un 27% independientemente de la insulina.

Se ha descrito que para asegurar una buena producción de insulina es necesario contar con una adecuada masa de células beta pancreáticas, las cuales deben tener un correcto tamaño y proliferación celular (Georgia y Bhushan 2004). Esto sugiere que la implicación que tiene *ETV5* en la proliferación celular, podría actuar como un mecanismo secundario, por el cual disminuyó la secreción de insulina y la cantidad de islotes de Langerhans en el modelo animal.

Nuestros resultados confirman la implicación de *ETV5* en la proliferación celular de la línea celular INS-1 (832/13). Se sabe que la proliferación celular es indispensable para una adecuada masa de células beta pancreáticas (Szabat et al. 2016; Böni-Schnetzler et al. 2018). Este resultado es congruente con lo que anteriormente se había observado en un modelo *in vivo* en los ratones *ETV5 KO* en los que se encontró que había una tendencia a la disminución de la masa de células beta pancreáticas (Gutierrez-Aguilar et al. 2014).

Además, se había descrito anteriormente la sobreexpresión de *ETV5* en diferentes tipos de cáncer (Pedrola et al. 2015; Puli et al. 2018; Cheng et al. 2019; di Martino et al. 2019), que resulta en una proliferación celular descontrolada.

8.3. Efecto del silenciamiento de *ETV5* sobre sus posibles genes blanco

Al demostrar que la línea celular INS-1 (832/13) en ausencia parcial de *ETV5*, disminuye el número de células por medio de la proliferación celular, se cuantificó la expresión de posibles genes blanco de *ETV5* involucrados en la transición G1-S del ciclo celular.

Se analizaron los promotores de los genes de *ciclina D2*, *S6K1* y *E2F1*, los cuales presentan sitios de unión a ETV5. Se encontró que en la línea celular INS-1 (832/13) el transcrito de *E2F1* se encuentra sobreexpresado en un 180% y que no existe una diferencia para la expresión de *ciclina D2* y *S6K1* (Figura 15).

Anteriormente, se había evaluado el efecto de ETV5 en la proliferación de la línea celular HEK293T. En esta línea celular se observó que ETV5 regula también la proliferación celular. Sin embargo, en ausencia de *ETV5*, la expresión de la *ciclina D2* disminuye, sin observar cambios en la expresión de *E2F1* y *S6K1* (Cázares-Trejo 2017). Nuestros resultados sugieren que la concentración de proteína de ciclina D2 en la línea celular HEK293T está disminuida también.

Por otra parte, las diferencias que existen entre las líneas celulares inmortalizadas INS-1 (832/13) (células de insulinoma, beta pancreáticas de rata) y HEK293T (células embrionarias de riñón humano), pueden exhibir diferentes comportamientos, ya que provienen de diferentes modelos animales y diferente estirpe celular. Esta diferencia puede hacer que ETV5 regule de diferente forma sus genes blanco. Sin embargo, ambas líneas celulares sirvieron para demostrar que ETV5 regula la proliferación celular.

Posteriormente, para confirmar que los niveles de proteína corresponden a la cantidad de los transcritos, se realizó la cuantificación de las proteínas ETV5, E2F1, ciclina D2 y β -actina, en extractos proteicos de las líneas celulares INS-1 (832/13) y HEK293T transfectadas con siC comparada con siE. Se encontró que los niveles de ETV5 descendieron en ambas líneas celulares al suprimir al gen *ETV5*, mientras que ciclina D2 se observa reducida en la línea celular HEK293T y sin cambios en la línea celular INS-1 (832/13). Lo anterior confirma los resultados obtenidos anteriormente (Cázares-Trejo 2017), donde la expresión de *ciclina D2* se reduce y en este proyecto, se obtiene como resultados preliminares la disminución a nivel de proteína en la línea celular HEK293T.

En la línea celular HEK293T al suprimir a *ETV5*, la proliferación disminuyó por descenso en el transcrito de *ciclina D2*. Actualmente, se ha reportado en un modelo de cáncer tiroidal papilar, que al silenciar a *ETV5*, la proliferación disminuye, lo cual

se vio asociado a una reducción en la expresión de *ciclina D1* y *ciclina D2* (Puli et al. 2018), lo que se correlaciona con los antecedentes obtenidos en la línea celular HEK293T (Cázares-Trejo 2017).

Con respecto a E2F1, en la línea celular HEK293T no se observan cambios en la cantidad de proteína. Por otro lado, en la línea celular INS-1 (832/13) se observó que hay un aumento del 27% en la cantidad de proteína de E2F1 cuando se silenció parcialmente a *ETV5* respecto al tratamiento control (Figura 17-A y Figura 17-B), esto se correlaciona con la sobreexpresión del gen de *E2F1*; sin embargo, este aumento no resultó ser significativo en el análisis estadístico.

A lo largo del ciclo celular, sucede una regulación estricta del avance del ciclo mediada por la presencia de complejos CDK4-ciclina D y CDK6-ciclina D que se encuentran presentes durante el estadio temprano de la fase G1. Estos complejos fosforilan a la proteína Rb, favoreciendo la liberación del factor transcripcional E2F1, el cual regula la transcripción de los genes requeridos para la síntesis del DNA y con esto el transcurso hacia la fase S (Wenzel y Singh 2018).

Se sabe que existen inhibidores del ciclo celular como la familia INK4 y la familia CIP/KIP, perteneciente a esta última familia, se encuentra $p27^{KIP1}$, el cual es capaz de unirse a los complejos CDK-ciclina, inhibiendo su acción de cinasa (Besson, Dowdy y Roberts 2008). Anteriormente, se reportó que E2F1 es capaz de inducir la expresión de $p27^{KIP1}$ por unión directa a su región promotora. Se demostró que al sobreexpresar a *E2F1* hay una mayor presencia de $p27^{KIP1}$ y las células disminuyeron su avance a través del ciclo celular, comparadas con las que se silenció $p27^{KIP1}$ (Wang et al. 2005).

Esto sugiere que en la línea celular INS-1 (832/13) tras el silenciamiento de *ETV5*, la disminución de la proliferación celular se deba a la sobreexpresión de *E2F1*, que pueda regular la expresión de $p27^{KIP1}$, inhibiendo así el avance del ciclo celular. Sin embargo, la expresión de $p27^{KIP1}$ es un experimento que debemos de realizar en nuestro modelo de estudio para comprobar esta nueva hipótesis.

9. Conclusión

Al suprimir la expresión de *ETV5*, se disminuyó la cantidad de células INS-1 (832/13). Se comprobó que dicha disminución sucede por medio de la reducción de la proliferación celular, vía la regulación transcripcional de *E2F1*. Lo anterior sugiere que *E2F1* pueda estar regulando al gen *p27^{KIP1}*, inhibidor de la proliferación celular.

10. Perspectivas

- Realizar ensayos de qPCR para medir el transcrito de *p27^{KIP1}*, en la línea celular INS-1 (832/13) al silenciar parcialmente a *ETV5*.
- Probar mediante el ensayo de inmunoprecipitación de la cromatina la unión de *ETV5* al promotor de *E2F1*.

11. Anexos

11.1. Lista de materiales

Reactivo / Estuche	N° catálogo	Marca	País de origen
Medio de cultivo RPMI-1640	R8758	SIGMA	E.U.A.
Medio de cultivo RPMI-1640	11875-093	GIBCO	E.U.A.
Suero fetal bovino inactivado por calor	10082	GIBCO	E.U.A.
L- glutamina	25030-081	GIBCO	E.U.A.
Piruvato sódico	S8636	SIGMA	E.U.A.
2- mercaptoetanol	21985023	GIBCO	E.U.A.
Penicilina-estreptomina	SV30010	HyClone™	E.U.A.
Amortiguador HEPES	15630-080	GIBCO	E.U.A.
siRNA control	D-001810-10-05	Dharmacon™	E.U.A.
siRNA <i>ETV5</i>	L-087219-02	Dharmacon™	E.U.A.
Agente de transfección	T-2001-02	Thermo Scientific	E.U.A.
Tripsina	SH30042.02	HyClone™	E.U.A.
ELISA para cuantificación de insulina	80-INSRT-E01	ALPCO	E.U.A.
Reactivo de conteo y viabilidad, Muse®	MCH100102	Luminex	E.U.A.
Reactivo anexina V, Muse®	MCH100105	Luminex	E.U.A.
EdU-Click 594	BCK-EdU594-1	Sigma-Aldrich	E.U.A.
Medio de montaje con DAPI	ab104139	ABCAM	E.U.A.
Columnas de purificación de RNA	PP-210S	Jena Bioscience	Alemania
Síntesis de cDNA	PCR-511S	Jena Bioscience	Alemania
Sonda Taqman® <i>ETV5</i>	Rn00465814_g1	Thermo Scientific	E.U.A.
Sonda Taqman® <i>CCND2</i>	Rn03020897_m1	Thermo Scientific	E.U.A.
Sonda Taqman® <i>E2F1</i>	Rn01536222_m1	Thermo Scientific	E.U.A.
Sonda Taqman® <i>S6K1</i>	Rn00579546_m1	Thermo Scientific	E.U.A.
Sonda Taqman® <i>L32</i>	Rn00820748_g1	Thermo Scientific	E.U.A.
Mezcla maestra para qPCR	4440038	Applied Biosystems™	E.U.A.
Amortiguador RIPA	89900	Thermo Scientific	E.U.A.

Reactivo / Estuche	N° catálogo	Marca	País de origen
Inhibidor de fosfatasas	1862495	Thermo Scientific	E.U.A
Bensonaza	E1014-25KU	Sigma	E.U.A
Cuantificación de proteínas	500-0116	Bio-rad	E.U.A
Anticuerpo contra ETV5	sc-100941	Santa Cruz Biotechnology	E.U.A
Anticuerpo contra ciclina D2	GTX32545	GeneTex	E.U.A
Anticuerpo contra E2F1	sc-56662	Santa Cruz Biotechnology	E.U.A
Anticuerpo contra β -actina	4967S	Cell Signaling	E.U.A
Anticuerpo contra IgG de ratón	7076P2	Cell Signaling	E.U.A
Anticuerpo contra IgG de conejo	7074P2	Cell Signaling	E.U.A
Revelador de quimioluminiscencia	WBKLS0100	Millipore	E.U.A

12. Referencias

- A. Fry, Elizabeth, Ali Mallakin, and Kazushi Inoue. 2018. "Translocations Involving ETS Family Proteins in Human Cancer." *Integrative Cancer Science and Therapeutics* 5 (4): 1–26. <https://doi.org/10.15761/icst.1000281>.
- Baserga, Renato. 1968. "BIOCHEMISTRY OF THE CELL CYCLE : A REVIEW." *Cell Proliferation* 1 (2): 167–91. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2184.1968.tb00957.x>.
- Belfiore, Antonino, Roberta Malaguarnera, Veronica Vella, Michael C. Lawrence, Laura Sciacca, Francesco Frasca, Andrea Morrione, and Riccardo Vigneri. 2017. "Insulin Receptor Isoforms in Physiology and Disease: An Updated View." *Endocrine Reviews* 38 (5): 1–84. <https://doi.org/10.1210/er.2017-00073>.
- Bertoli, Cosetta, Jan M. Skotheim, and Robertus A.M. De Bruin. 2013. "Control of Cell Cycle Transcription during G1 and S Phases." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 14 (8): 518–28. <https://doi.org/10.1038/nrm3629>.
- Besson, Arnaud, Steven F. Dowdy, and James M. Roberts. 2008. "CDK Inhibitors: Cell Cycle Regulators and Beyond." *Developmental Cell* 14 (2): 159–69. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2008.01.013>.
- Böni-Schnetzler, Marianne, Stéphanie P. Häuselmann, Elise Dalmas, Daniel T. Meier, Constanze Thienel, Shuyang Traub, Friederike Schulze, et al. 2018. "β Cell-Specific Deletion of the IL-1 Receptor Antagonist Impairs β Cell Proliferation and Insulin Secretion." *Cell Reports* 22 (7): 1774–86. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.01.063>.
- Cheng, Xi, Zhijian Jin, Xiaopin Ji, Xiaonan Shen, Haoran Feng, William Morgenlander, Baochi Ou, et al. 2019. "ETS Variant 5 Promotes Colorectal Cancer Angiogenesis by Targeting Platelet-Derived Growth Factor BB." *International Journal of Cancer* 145 (1): 179–91. <https://doi.org/10.1002/ijc.32071>.

- Cook, Jacob P., and Jeanette G. Matson. 2017. "Cell Cycle Proliferation Decisions: The Impact of Single Cell Analyses." *The FEBS Journal* 284 (3): 362–75. <https://doi.org/10.1111/febs.13898>.Cell.
- Dana, Hassan, Ghanbar Mahmoodi Chalbatani, Habibollah Mahmoodzadeh, Rezvan Karimloo, Omid Rezaiean, Amirreza Moradzadeh, Narges Mehmandoost, et al. 2017. "Molecular Mechanisms and Biological Functions of SiRNA." *International Journal of Biomedical Science : IJBS* 13 (2): 48–57. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28824341><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC5542916>.
- Du, William W., Weining Yang, Elizabeth Liu, Zhenguo Yang, Preet Dhaliwal, and Burton B. Yang. 2016. "Foxo3 Circular RNA Retards Cell Cycle Progression via Forming Ternary Complexes with P21 and CDK2." *Nucleic Acids Research* 44 (6): 2846–58. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw027>.
- Eo, Jinwon, Haengseok Song, and Hyunjung Jade Lim. 2012. "Etv5, a Transcription Factor with Versatile Functions in Male Reproduction." *Clinical and Experimental Reproductive Medicine* 39 (2): 41–45. <https://doi.org/10.5653/cerm.2012.39.2.41>.
- Gao, Wei, John Zeng Hong Li, Jimmy Yu Wai Chan, Wai Kuen Ho, and Tian-Sze Wong. 2012. "MTOR Pathway and MTOR Inhibitors in Head and Neck Cancer." *ISRN Otolaryngology* 2012 (Figure 1): 1–7. <https://doi.org/10.5402/2012/953089>.
- Georgia, Senta, and Anil Bhushan. 2004. "B Cell Replication Is the Primary Mechanism for Maintaining Postnatal B Cell Mass." *Journal of Clinical Investigation* 114 (7): 963–68. <https://doi.org/10.1172/JCI22098>.
- Giacinti, C., and A. Giordano. 2006. "RB and Cell Cycle Progression." *Oncogene* 25 (38): 5220–27. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209615>.
- Golias, C. H., A. Charalabopoulos, and K. Charalabopoulos. 2004. "Cell Proliferation and Cell Cycle Control: A Mini Review." *IJCP THE INTERNATIONAL JOURNAL OF CLINICAL PRACTICE* 58 (12): 1134–1141.

<https://doi.org/10.1111/j.1368-5031.2004.00284.x>.

Gutierrez-Aguilar, Ruth, Dong Hoon Kim, Marina Casimir, Xiao Qing Dai, Paul T. Pfluger, Jongsun Park, April Haller, et al. 2014. "The Role of the Transcription Factor ETV5 in Insulin Exocytosis." *Diabetologia* 57 (2): 383–91.
<https://doi.org/10.1007/s00125-013-3096-5>.

Haoran Feng, Kun Liu, Xiaopin Ji, Yi Peng, You Li, Tao Zhang, Changgang Wang, Yimei Jiang, Yiqing Shi, Zhijian Jin, Xianze Chen, Weihua Qiu, Xi Cheng, Ren Zhao. 2019. "ETV5 Promotes Angiogenesis and Accelerates Bevacizumab Resistance in Colorectal Cancer by Transcriptionally Activating VEGFA 1 . Department of General Surgery , Ruijin Hospital North , Shanghai Jiao Tong University School Financial Support : National Natu."

Hohmeier, Hans E., Hindrik Mulder, Guoxun Chen, Rosemarie Henkel-Rieger, Marc Prentki, and Christopher B. Newgard. 2000. "Isolation of INS-1-Derived Cell Lines with Robust ATP-Sensitive K⁺ Channel-Dependent and -Independent Glucose-Stimulated Insulin Secretion." *Diabetes* 49 (3): 424–30.
<https://doi.org/10.2337/diabetes.49.3.424>.

I. Evan, Gerard, and Karen H. Vousden. 2001. "Proliferation, Cell Cycle and Apoptosis in Cancer." *Nature* 411 (May): 342–48.
<http://www.nature.com/nature/journal/v411/n6835/pdf/411342a0.pdf>.

Ivanchuk, Stacey M., James T. Rutka, Joseph M. Piepmeier, Andrew T. Parsa, and Nicholas Boulis. 2004. "The Cell Cycle: Accelerators, Brakes, and Checkpoints." *Neurosurgery* 54 (3): 692–700.
<https://doi.org/10.1227/01.NEU.0000109534.28063.5D>.

Jain, Rajul K., David S. Hong, Aung Naing, Jennifer Wheler, Thorunn Helgason, Nai Yi Shi, Yash Gad, and Razelle Kurzrock. 2015. "Novel Phase I Study Combining G1 Phase, S Phase, and G2/M Phase Cell Cycle Inhibitors in Patients with Advanced Malignancies." *Cell Cycle* 14 (21): 3434–40.
<https://doi.org/10.1080/15384101.2015.1090065>.

Koopman G, et al. Anexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine

- expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood*. 1994; 84: 1415-1420
- Kurgan, Nigel, Evelyn Tsakiridis, Rozalia Kouvelioti, Jessy Moore, Panagiota Klentrou, and Evangelia Tsiani. 2017. "Inhibition of Human Lung Cancer Cell Proliferation and Survival by Post-Exercise Serum Is Associated with the Inhibition of Akt, Mtor, P70 S6k, and Erk1/2." *Cancers* 9 (5): 1–14. <https://doi.org/10.3390/cancers9050046>.
- Lara-Gonzalez, Pablo, Frederick G Westhorpe, and Stephen S Taylor. 2012. "Review- The Spindle Assembly Checkpoint (Higher Eukaryotes)." *Current Biology* 22 (22): R966–80. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2012.10.006>.
- Lowry, Oliver H, Nira J Rosebrough, Lewis A Farr, and Rose J Randall. 1951. "Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent." *Journal of Biological Chemistry* 193 (1): 265–75.
- Martino, Erica di, Olivia Alder, Carolyn D. Hurst, and Margaret A. Knowles. 2019. "ETV5 Links the FGFR3 and Hippo Signalling Pathways in Bladder Cancer." *Scientific Reports* 9 (1): 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-36456-3>.
- Menéndez Valderrey, J. L. "El ciclo celular", *asturnatura.com* [en línea] Núm. 0, [consultado el 4/11/2019]. Disponible en <<http://www.asturnatura.com> >
- Morita, Masahiro, Simon Pierre Gravel, Laura Hulea, Ola Larsson, Michael Pollak, Julie St-Pierre, and Ivan Topisirovic. 2015. "MTOR Coordinates Protein Synthesis, Mitochondrial Activity." *Cell Cycle* 14 (4): 473–80. <https://doi.org/10.4161/15384101.2014.991572>.
- Oakes, Vanessa, Weili Wang, Brittney Harrington, Won Jae Lee, Heather Beamish, Kee Ming Chia, Alex Pinder, et al. 2014. "Cyclin A/Cdk2 Regulates Cdh1 and Claspin during Late S/G2 Phase of the Cell Cycle." *Cell Cycle* 13 (20): 3302–11. <https://doi.org/10.4161/15384101.2014.949111>.
- Oikawa, Tsuneyuki, and Toshiyuki Yamada. 2003. "Molecular Biology of the Ets Family of Transcription Factors." *Gene*. Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(02\)01156-3](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(02)01156-3).

- Pedrola, Núria, Laura Devis, Marta Llauradó, Irene Campoy, Elena Martinez-Garcia, Marta Garcia, Laura Muinelo-Romay, et al. 2015. "Nidogen 1 and Nuclear Protein 1: Novel Targets of ETV5 Transcription Factor Involved in Endometrial Cancer Invasion." *Clinical and Experimental Metastasis* 32 (5): 467–78. <https://doi.org/10.1007/s10585-015-9720-7>.
- Phi-Wilson J, Harvey J, Goix P, O'Neill R. A technology for rapid acquisition of cell number and viability. *Am Biotechnol Lab*. 2001:34-36
- Puli, Oorvashi Roy, Brian P. Danysh, Elena McBeath, Deepankar K. Sinha, Nguyet M. Hoang, Reid T. Powell, Heather E. Danysh, Maria E. Cabanillas, Gilbert J. Cote, and Marie Claude Hofmann. 2018. "The Transcription Factor ETV5 Mediates BRAFV600E-Induced Proliferation and TWIST1 Expression in Papillary Thyroid Cancer Cells." *Neoplasia (United States)* 20 (11): 1121–34. <https://doi.org/10.1016/j.neo.2018.09.003>.
- Sangphil Oh, Sook Shin, and Ralf Janknecht. 2012. "ETV1, 4 and 5: An Oncogenic Subfamily of ETS Transcription Factors." *Biochim Biophys Acta*. 23 (1): 1–12. <https://doi.org/10.1038/jid.2014.371>.
- Sizemore, Gina M., Jason R. Pitarresi, Subhasree Balakrishnan, and Michael C. Ostrowski. 2017. "The ETS Family of Oncogenic Transcription Factors in Solid Tumours." *Nature Reviews Cancer* 17 (6): 337–51. <https://doi.org/10.1038/nrc.2017.20>.
- Szabat, Marta, Melissa M. Page, Evgeniy Panzhinskiy, Søs Skovsø, Majid Mojibian, Juan Fernandez-Tajes, Jennifer E. Bruin, et al. 2016. "Reduced Insulin Production Relieves Endoplasmic Reticulum Stress and Induces β Cell Proliferation." *Cell Metabolism* 23 (1): 179–93. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2015.10.016>.
- Taniguchi, Cullen M., Brice Emanuelli, and C. Ronald Kahn. 2006. "Critical Nodes in Signalling Pathways: Insights into Insulin Action." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 7 (2): 85–96. <https://doi.org/10.1038/nrm1837>.
- Tesis: Cázares-Trejo, Florencia. 2017. "Implicación de ETV5 en la regulación de la

proliferación celular y sus genes blanco".

Vicary, Glenn W., and Jesse Roman. 2016. "Targeting the Mammalian Target of Rapamycin in Lung Cancer." *American Journal of the Medical Sciences* 352 (5): 507–16. <https://doi.org/10.1016/j.amjms.2016.08.014>.

Vigneri, R., I. D. Goldfine, and L. Frittitta. 2016. "Insulin, Insulin Receptors, and Cancer." *Journal of Endocrinological Investigation* 39 (12): 1365–76. <https://doi.org/10.1007/s40618-016-0508-7>.

Wang, Chuangui, Xinghua Hou, Subhra Mohapatra, Yihong Ma, W. Douglas Cress, W. Jack Pledger, and Jiandong Chen. 2005. "Activation of P27Kip1 Expression by E2F1: A Negative Feedback Mechanism." *Journal of Biological Chemistry* 280 (13): 12339–43. <https://doi.org/10.1074/jbc.C400536200>.

Wenzel, Elizabeth S., and Amareshwar T.K. Singh. 2018. "Cell-Cycle Checkpoints and Aneuploidy on the Path to Cancer." *In Vivo* 32 (1): 1–5. <https://doi.org/10.21873/invivo.11197>