



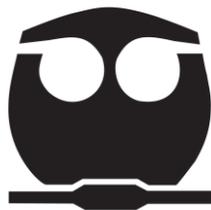
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**IMPLICACIÓN DE ETV5 EN LA PROLIFERACIÓN
CELULAR Y SUS GENES BLANCO**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

**PRESENTA
FLORENCIA CÁZARES TREJO**



CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX

2017



Universidad Nacional
Autónoma de México



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

Prof. José Pedraza Chaverri

Presidente

Profa. Martha Patricia Coello Coutiño

Vocal

Profa. Ruth Gutiérrez Aguilar

Secretaria

Prof. Félix Morales Flores

1er. Suplente

Profa. Francisca Morayna Gutiérrez Luna

2da. Suplente

Sitio donde se desarrolló el tema:

Hospital Infantil de México “Federico Gómez” (HIMFG)

Laboratorio de Enfermedades Metabólicas: Obesidad y Diabetes

Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México

Apoyos recibidos:

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

Dra. Ruth Gutiérrez Aguilar

Asesor del tema

Florencia Cázares Trejo

Sustentante

Agradecimientos y dedicatoria

A ti mamá por estar siempre presente con tu amor incondicional, cariño y comprensión y que gracias a ti soy la persona que soy. A ti papá por cuidarme, por tu eterno cariño y por ser el pilar fundamental en toda mi educación, tanto académica como de vida. A ambos, por su apoyo y motivación constante que me permitieron ser perseverante y alcanzar mis metas, pero más que nada, por su amor.

A mi padrino Ricardo y madrina Rebeca que me han guiado con consejos y cariño y que siempre se han mantenido presentes en todo momento.

A Armando Zazueta, por su compañía, comprensión y paciencia, por estar a mi lado en esta etapa y por crecer juntos.

Un agradecimiento muy especial a la Dra. Ruth Gutiérrez Aguilar por su orientación, su gran apoyo, motivación y cada momento dedicado para aclarar cualquier tipo de duda que me surgiera, permitieron la culminación de mis estudios profesionales y para la elaboración de esta tesis. Gracias también a la Dra. María Eugenia Frigolet, que también estuvo presente en este proceso. A ambas por su enseñanza y por hacer esta etapa de mi vida una experiencia enriquecedora personal.

A mi país y a la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México, mi alma máter, espero regresar un poco de lo mucho que me han brindado.

Agradecimientos académicos

Agradezco al Dr. Guillermo Aquino, al Dr. Genaro Patiño, al Dr. Ricardo Valle y a la Dra. María de Carmen Maldonado, quienes me apoyaron con diferentes equipos y material para la realización de esta tesis.

Gracias a las Dras. Erandi e Ireri, quienes con paciencia y dedicación me ayudaron en el uso del citómetro de flujo, así como su tiempo dedicado en resolver mis dudas a lo largo de este trabajo.

Gracias a mis compañeras de laboratorio Karla, Brenda, Daniela y a Paloma.

Índice general

	Pág.
1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN	3
• <i>ETV5</i>	3
• <i>ETV5</i> en proliferación celular	5
• Ciclo celular	6
• Fase G1, inicio de un nuevo ciclo	7
• Fase S, síntesis de ADN	8
• Fase G2	9
• Mitosis	9
• Regulación de la progresión del ciclo celular	10
• Punto de control transición G1 – S	11
• Proliferación vía mTOR	12
• Apoptosis celular	12
• Genes candidatos de <i>ETV5</i>	13
3. HIPÓTESIS	18
4. OBJETIVOS	18
• Objetivo general	18
• Objetivos particulares	18
5. MATERIALES Y MÉTODOS	19
6. RESULTADOS	26
7. ANÁLISIS DE RESULTADOS	43
8. OBJETIVOS ALCANZADOS	48
9. CONCLUSION	48
10. PERSPECTIVAS	49
11. ANEXOS	50
12. REFERENCIAS	51

Índice figuras y tablas

	Pág.
Figura 1. Células INS-1 (832/13) transfectadas con ARN de interferencia.	6
Figura 2. Fases sucesivas del ciclo celular en una célula eucariota típica.	7
Figura 3. Sitios de unión de la familia ETS en el promotor de <i>Ciclina D2</i> .	16
Figura 4. Sitios de unión de la familia ETS en el promotor de <i>E2F</i> .	16
Figura 5. Sitios de unión de la familia ETS en el promotor de <i>S6K1</i> .	16
Figura 6. Optimización de la transfección del siRNA contra <i>ETV5</i> en células HEK293T.	28
Figura 7. Optimización y calibración viabilidad.	29
Figura 8. Optimización y calibración proliferación.	31
Figura 9. Optimización y calibración apoptosis.	32
Figura 10. Optimización de las condiciones para medir viabilidad, proliferación y apoptosis en las células HEK293T.	35
Figura 11. Transfección de siRNA contra <i>ETV5</i> , en células HEK293T	36
Figura 12. Imagen células HEK293T transfectadas.	37
Figura 13. Conteo celular cámara de Neubauer.	38
Figura 14. Viabilidad de células HEK293T transfectadas.	39
Figura 15. Proliferación celular en células HEK293T transfectadas.	40
Figura 16. Histograma de proliferación celular en células HEK 293T en presencia y ausencia de <i>ETV5</i> .	41
Figura 17. Apoptosis celular en células HEK293T transfectadas.	42
Figura 18. Medición de los diferentes transcritos.	43
Tabla 1. Diferentes ciclinas con CDK asociada.	11
Tabla 2. Optimización de los diferentes parámetros a medir mediante citometría de flujo: viabilidad, proliferación y apoptosis celular en equipo “MUSE Cell Analyzer.”	33

Índice de abreviaturas

ATP	Adenosín trifosfato.
cADN	ADN complementario.
CDK	Cinasas dependientes de ciclinas.
CIP	Proteínas inhibidoras de CDK's.
CKI	Inhibidores de CDK's.
dNTP's	Desoxirribonucleótidos trifosfato.
ERM	"Ets-Related Molecule" - Molécula relacionada a Ets.
ETS	"E-twenty-six" - E-veintiséis.
ETV5	"E-twenty-six variant 5" - E-veintiséis variante 5.
FBS	Suero bovino fetal.
INK4	Proteínas inhibidoras de cinasa 4.
PBS	"Phosphate Buffered Saline" - solución salina amortiguada por fosfatos.
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa.
PEA3	Potenciador de poli-omavirus 3.
PS	Fosfatidilserina.
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real.
Rb	Proteína de retinoblastoma.
RT	Reacción de transcripción reversa.
siC	siRNA control.
siETV5	siRNA contra ETV5.
siRNA	"Small interfering RNA" - ARN de interferencia pequeño.
S6	Proteína ribosomal 6.
S6K	Proteína ribosomal S6 cinasa.
WT	"Wild type" - tipo silvestre.
7-AAD	7-aminoactinomicina.

1. Resumen

Recientemente se demostró que el factor de transcripción ETV5/ERM juega un papel muy importante en la homeostasis de la glucosa. El factor de transcripción ETV5 controla la secreción de la insulina, regulando la transcripción de varios genes involucrados en la exocitosis de la insulina. Por otra parte, se observó que en la línea celular INS1 (832/13) al suprimir el gen *ETV5* se redujo el número de células.

Al verse afectado el número de células con la disminución de *ETV5*, esto podría indicar otro mecanismo por el cual este factor transcripcional influiría en la secreción de insulina. Se sabe que una adecuada masa de células β se obtiene por medio de la proliferación celular. Es por esto, que es importante conocer el impacto de *ETV5* sobre la proliferación celular y su implicación en la secreción de la insulina.

Por otra parte, *ETV5* se ha visto involucrado en diferentes tipos de cáncer. Su silenciamiento provoca una reducción en proliferación, migración y en la capacidad de invasión de las células cancerígenas. Sin embargo, al encontrarse sobreexpresado *ETV5*, la proliferación celular aumenta, contribuyendo con la progresión del tumor.

Para poder estudiar la implicación de *ETV5* en la proliferación celular, se eligió un modelo de estudio que no fuera secretor de insulina y que tampoco se tratara de células derivadas de tumor. De esta manera, se podría estudiar el efecto de *ETV5* sobre la proliferación celular, independientemente de mitógenos o de modificaciones celulares. Para este proyecto, se utilizó la línea celular HEK293T donde se suprimió al gen *ETV5* y se observó que existe una disminución del número de células. Posteriormente, se evaluó el mecanismo por el cual *ETV5* afecta el número de células, específicamente evaluando la viabilidad celular, la proliferación celular y apoptosis celular.

Se observó que al mantener silenciado a *ETV5*, la proliferación celular es el proceso que se ve afectado. Por lo tanto, se analizaron posibles genes blanco de *ETV5*, tales como *ciclina D2*, *E2F1* y *S6K*. Se demostró que al disminuir la expresión de *ETV5*, el transcrito de *ciclina D2* también disminuyó, sugiriendo un

control transcripcional sobre este gen blanco. Mediante este trabajo se pudo concluir que la disminución de la expresión de *ETV5* redujo el número de células por medio de un proceso que involucra parcialmente a la proliferación celular vía la regulación transcripcional de la *ciclina D2*.

2. Introducción

- **ETV5**

El factor de transcripción ETV5/ERM, por sus siglas en inglés “**E**-twenty-six variant **5**” (E-veintiséis variante 5), ERM “Ets-Related Molecule” (Molécula relacionada a Ets) pertenece a la familia ETS “**E**-twenty-six” (E-veintiséis). Esta familia está conformada por 28 miembros y ETV5 pertenece al subgrupo del activador PEA3 (potenciador de poli-omavirus 3) (Hollenhorst, McIntosh y Graves *et al.*, 2011).

Esta familia de factores de transcripción se encuentra presente en diferentes especies. Pueden actuar como activadores transcripcionales o represores de múltiples genes que regulan los procesos biológicos, tales como la proliferación celular, la diferenciación, la apoptosis y las interacciones célula-célula o célula-matriz (Sementchenko y Watson *et al.*, 2000).

Los tres miembros del grupo PEA3 de ETS son: *ETV5* o *ERM*, *ETV4* o *PEA3* y *ETV1* o *ER81*. Estos factores de transcripción comparten una funcionalidad altamente conservada de unión al ácido desoxirribonucleico (ADN). Generalmente, se caracterizan como activadores de la transcripción al unirse al ADN a través de la secuencia central consensuada GGA [A/T] (Firlej *et al.*, 2008).

Existen estudios de hibridación *in situ*, en los que se ha demostrado que miembros del grupo PEA3 se expresan en múltiples órganos. Estos genes tienen un patrón de expresión específico asociado con la morfogénesis de ramificación de páncreas, pulmón, glándula mamaria, próstata, glándula salival o riñón (Oh Shin y Janknecht *et al.*, 2012). La desregulación de su expresión se ha asociado con carcinogénesis (Llaurado *et al.*, 2012), y por otra parte, se ha estudiado que el silenciamiento de los genes *ETV4* y *ETV5* disminuye la proliferación celular, la migración y la invasión de células derivadas de tumor mamario de ratón tanto *in vivo* como *in vitro* (Firlej *et al.*, 2008).

Se ha estudiado y se ha observado que células que sobre expresan *ETV5* aumentan la migración e invasión de células *in vitro*; se incrementa también la diseminación del tumor en un modelo de cáncer de endometrio (Pedrola Devis *et al.*, 2015).

Además de la implicación de *ETV5* en diferentes tipos de cáncer (Oh Shin y Janknecht *et al.*, 2012) se ha descrito la asociación de *ETV5* a la obesidad en población caucásica (Thorleifsson *et al.*, 2009). Sin embargo, la implicación de *ETV5* en el metabolismo era desconocida en esos momentos. Posteriormente, un estudio llevado a cabo en ratones knockout (*ETV5* KO) e *in vitro* describió por primera vez el papel del factor de transcripción *ETV5* en el metabolismo (Gutierrez-Aguilar *et al.*, 2014), estableciendo su implicación en el metabolismo dentro de la balanza energética y en la homeostasis a la glucosa.

Se observó que ratones silvestres (“wild type”, WT) presentaron un fenotipo diferente a los ratones *ETV5* KO. Los ratones *ETV5* KO tienen un menor peso y menor tamaño, son más delgados, se observó una reducción en el tejido adiposo y masa magra, además presentaron una resistencia a la obesidad inducida por dieta. A pesar de que los ratones *ETV5* KO son más delgados que los WT, los ratones *ETV5* KO presentaron una intolerancia a la glucosa, debido a una hipoinsulinemia provocada por la disminución de la exocitosis de la insulina y por un tamaño reducido de los islotes de Langerhans y de las células β (Gutierrez-Aguilar *et al.*, 2014).

Por lo tanto, se demostró que *ETV5* juega un papel muy importante en la homeostasis de la glucosa y se encuentra implicado en la cantidad y tamaño de los islotes de Langerhans. El factor de transcripción *ETV5* controla la secreción de la insulina regulando la transcripción de varios genes involucrados en la exocitosis de la insulina (Gutierrez-Aguilar *et al.*, 2014).

• **ETV5 EN PROLIFERACIÓN CELULAR**

Los factores de transcripción de ETS actúan como reguladores positivos o negativos de la expresión de genes que están implicados en diversos procesos biológicos. Se ha sugerido que la sobre expresión de *ETV5*, detectada en células de cáncer de ovario, puede contribuir a la progresión del tumor ovárico a través de su capacidad para aumentar la proliferación de células (Llaurado *et al.*, 2012).

Existe evidencia de que al silenciar a *ETV5* en células de cáncer mamario, se reduce la proliferación, la migración y la capacidad de invasión de las células cancerígenas (Firlej *et al.*, 2008).

Por otra parte, también se ha estudiado que la supresión de *ETV5* en células neuronales provoca una disminución en la proliferación celular, reduciendo drásticamente la tasa de proliferación en este tipo de células, lo que sugiere un papel específico de ERM en el control de la progresión del ciclo celular. (Paratore *et al.*, 2002).

Se sabe que para asegurar una buena producción de insulina, es necesario contar con una adecuada masa de células β , la cual se obtiene por medio de una buena proliferación celular y un tamaño apropiado de células β (Dor *et al.*, 2004; Georgia y Bhushan *et al.*, 2004). Se conoce que la masa de células β se encuentra regulada por un complicado equilibrio de proliferación celular, apoptosis e hipertrofia (Rhodes *et al.*, 2005). La proliferación de las células β se considera un componente principal en el mantenimiento de la masa de dichas células (Dor *et al.*, 2004; Teta *et al.*, 2007).

Se ha observado que en la línea celular INS1 (832/13) (células pancreáticas de rata, secretoras de insulina) hay una reducción en el número de células después de suprimir al gen *ETV5* (Figura 1) (Gutiérrez-Aguilar *et al.*, datos no publicados). Estos datos sugieren la implicación que *ETV5* podría tener en la proliferación celular.

Todo lo mencionado anteriormente, pudiera sugerir la implicación de *ETV5* en la proliferación celular, otro mecanismo por el cual *ETV5* sería capaz de regular la secreción de la insulina.

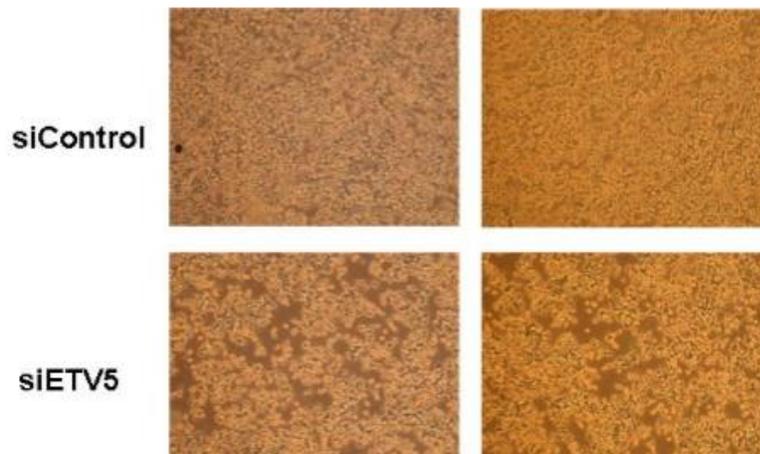


Figura 1. Células INS-1 (832/13) transfectadas con ARN de interferencia, siControl o siETV5, al cabo de 72 horas. (siC=siRNA Control, siETV5=siRNA contra ETV5).

- **Ciclo celular**

Los organismos multicelulares requieren un apropiado control de la división y la diferenciación celular para coordinar las múltiples funciones que desarrollan los tejidos, esto supone la adecuada regulación de la transducción de señales mitógenas a la maquinaria bioquímica que controla la duplicación de la molécula del ácido desoxirribonucleico (ADN) y su apropiada segregación (Malumbres y Barbacid *et al.*, 2001) incluso modular la senescencia y la muerte celular programada (Burhans y Heintz *et al.*, 2009).

De tal manera que la proliferación celular es el proceso por el cual las células monitorean las condiciones para poder llevar a cabo la progresión del ciclo celular, implicando una continua y controlada división celular, que involucra la replicación del material genético de la célula (Alberts *et al.*, 2002). El ciclo celular es una serie de pasos altamente regulados mediante los cuales una célula madre da origen a

dos células hijas a las que hereda una copia idéntica de su material genético (Jocelyn E. Krebs *et al.*, 2014). Para células eucariotas, este proceso se divide en diferentes pasos o fases: G₀, G₁, S, G₂ y mitosis (Figura 2).

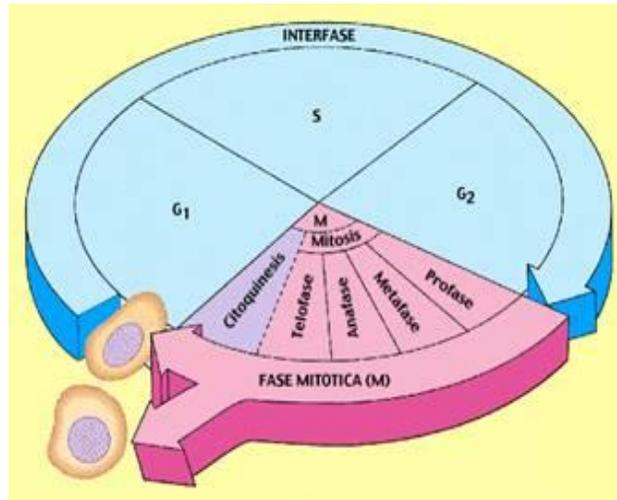


Figura 2. Fases sucesivas del ciclo celular en una célula eucariota típica.

Durante la interfase, la célula crece continuamente; durante la fase M se divide. La replicación del ADN se produce durante la fase S de la interfase. (Alberts B. *et al.*, 2002).

Durante la fase G₀, la célula se encuentra en un estado dormante o en reposo, el cual difiere de todos los estados que experimenta el ciclo celular. En esta fase, la célula espera que el ambiente sea adecuado y que los nutrientes sean los suficientes para empezar la división celular. La ausencia de las condiciones apropiadas de crecimiento, lleva a las células a un estado de latencia en el ciclo celular (Lomanto Díaz *et al.*, 2003).

Las células que se encuentran en la Fase G₀ permanecen viables y activas metabólicamente, pero no se dividen (Alberts *et al.*, 2002).

- **Fase G₁, inicio de un nuevo ciclo.**

Durante esta fase, la célula incrementa su material enzimático, sus organelos se replican, así como otras moléculas citoplasmáticas también aumentan en número; en consecuencia la célula aumenta de tamaño. Algunas de

las estructuras son sintetizadas por la célula, también hay replicación de mitocondrias y cloroplastos. (Lomanto Díaz *et al.*, 2003).

G1 es un período de actividad química intensa en donde aumenta el tamaño de la célula preparándose con el fin de contar con el ambiente necesario para poder asegurar una síntesis de ADN más adelante (Blomen y Boonstra *et al.*, 2007; Malumbres *et al.*, 2011).

En un momento tardío de G1, todas las células siguen uno de estos caminos: a) A falta de las condiciones apropiadas de crecimiento, las células abandonan el ciclo y entran en fase de reposo, Fase G0; b) Bajo condiciones ideales de crecimiento, las células son obligadas a iniciar la síntesis de ADN y completar el ciclo. El momento en que se toma esta decisión se denomina punto de control G1 (Alberts *et al.*, 2002).

- **Fase S, síntesis de ADN.**

Durante la fase S, ocurre la síntesis o duplicación del ADN, momentos después de que se sintetizan las histonas y demás proteínas asociadas a la replicación del ADN. Todo esto ocurre con el objetivo de que la célula tenga dos copias de su material genético para repartir en el momento de la mitosis (Blomen y Boonstra *et al.*, 2007; Malumbres *et al.*, 2011).

El proceso clave de la replicación de ADN ocurre durante esta fase del ciclo celular, fase S. En esta fase, la célula adquiere el tamaño suficiente, las proteínas necesarias se han sintetizado (ADN polimerasas, primasas, ligasas, topoisomerasas, etc.) y se cuenta con el ATP necesario para poder llevar a cabo la replicación de ADN (Lomanto Díaz *et al.*, 2003).

La síntesis de ADN es el principal evento de la fase S y en esta fase, la regulación se da principalmente para asegurar que solamente se lleve a cabo una ronda de replicación de ADN por ciclo celular (Johnson & Walker *et al.*, 1999; Duursma & Agami *et al.*, 2005).

- **Fase G2**

En esta fase, las estructuras necesarias para la división celular empiezan a montarse y los cromosomas empiezan a condensarse. Durante esta fase, ocurre la preparación para la mitosis, donde todos los organelos y la maquinaria necesaria para la división celular de las dos células hijas idénticas se terminan de adquirir. La cromatina, recién duplicada, comienza a condensarse. Además la célula realiza una revisión completa del ADN duplicado anteriormente para asegurar que no haya aberraciones genéticas provocadas durante la síntesis del ADN (Blomen y Boonstra *et al.*, 2007; Malumbres *et al.*, 2011).

- **Mitosis**

Finalmente, la célula pasa a la fase M o mitosis, período muy dinámico en el cual la membrana nuclear se desensambla, el citoesqueleto se reorganiza y los cromosomas se mueven a los polos opuestos. La segregación cromosómica es seguida por la división celular (citocinesis). La mitosis se encuentra dividida en cuatro etapas: profase, metafase, anafase y telofase, las cuales tienen como función promover y regular la repartición equitativa del material genético (Alberts *et al.*, 2002).

La ruptura de la envoltura nuclear marca el inicio de la profase. Cada cromosoma está formado por dos cromátidas conectadas por el centrómero. Durante la metafase, los cromosomas se mueven mediante el huso mitótico y finalmente se colocan en el plano ecuatorial de la célula. En anafase, las cromátidas hermanas se separan y son conducidas a los polos opuestos en la célula, proceso mediado por el acortamiento del huso mitótico y la acción de múltiples proteínas. Al iniciar la telofase, los cromosomas alcanzan los polos opuestos y el huso comienza a dispersarse. Finalmente, se re-ensambla la envoltura nuclear alrededor de los conjuntos de cromosomas y las células pueden volver a entrar a una fase G1 (Blomen y Boonstra *et al.*, 2007; Malumbres *et al.*, 2011).

- **Regulación de la progresión del ciclo celular**

El conjunto de procesos que ocurren durante el ciclo celular llevan un orden y supervisión estrictos. Las señales provenientes del medio y algunos controladores dentro de la célula, se encargan de dirigir el progreso de ésta a través de las distintas fases del ciclo celular.

Para dividirse, la célula recibe señales, las transmite y las interpreta como expresión de genes específicos para poder pasar por cada una de las fases del ciclo celular mediante señalización (W.S. Klug & M. Cummings *et al.*, 2006).

El ciclo celular es controlado a través de la fosforilación o desfosforilación de proteínas que inician o regulan la replicación de ADN, la mitosis y la citocinesis. Las reacciones de fosforilación que controlan el ciclo celular se llevan a cabo por un conjunto específico de proteínas cinasas, enzimas que catalizan la transferencia de un grupo fosfato desde el adenosín trifosfato (ATP) hasta un determinado aminoácido de una cadena lateral de la proteína diana.

Las proteínas cinasas del sistema de control del ciclo celular se encuentran presentes en las células proliferantes a lo largo de todo el ciclo celular. Sin embargo, sólo se activan en el momento que se requiere su función desactivándose posteriormente. Esta activación y desactivación de las proteínas cinasas, se debe al segundo conjunto de proteínas que forman parte del sistema de regulación, las ciclinas (Jocelyn E. Krebs *et al.*, 2014). Es por esto que estas cinasas se llaman cinasas dependientes de ciclinas (CDK) y forman un complejo con una ciclina. Dependiendo de la fase de ciclo celular, los complejos CDK-ciclina formados en cada fase son específicos como se presenta en la Tabla1.

Tabla 1. Diferentes ciclinas con su CDK asociada dependiendo de la fase en distintas etapas del ciclo celular en mamíferos.

Fase	Ciclina	CDK asociada
G1	Ciclina D	CDK4, CDK6
G1/S	Ciclina E	CDK2
S	Ciclina A	CDK2, CDK1
M	Ciclina B	CDK1

Por otra parte, los complejos CDK-ciclinas son regulados por proteínas inhibidoras como otro punto de control para el avance del ciclo celular. Estas proteínas inhibidoras se han agrupado en dos: las proteínas INK4 (inhibidoras de cinasa 4) y las CIP (proteínas inhibidoras de cdk's). Las proteínas INK4 y CIP, llamadas en conjuntos inhibidores de cdk (CKI) y algunos factores de transcripción (como el p53) tienen la función de impedir la proliferación celular (Alberts *et al.*, 2002).

Resumiendo, el paso ordenado por cada una de las fases del ciclo celular está altamente regulado por: a) los complejos formados entre las CDK-ciclinas, b) sus inhibidores y c) la fosforilación de proteínas blanco para el avance del ciclo celular.

- **Punto de control transición G1 – S**

La transición G1 - S representa el punto de compromiso con la división celular (Pardee *et al.*, 2000). La célula registra que el material genético esté intacto y que su entorno es favorable para comenzar a duplicar el ADN. Reunidas estas condiciones, los complejos CDK's/ciclinas son capaces de regular el progreso del ciclo celular de G1 - S. Si las condiciones no son óptimas, las células en G1 pueden detener la progresión del ciclo y entrar en el estado latente G0, donde pueden permanecer durante días, semanas o años hasta que se presenten las condiciones adecuadas para su replicación (Vidales *et al.*, 1993; Jocelyn E. Krebs *et al.*, 2014).

En mamíferos, el paso de la fase G1 a S se inicia mediante la síntesis *de novo* de las ciclinas tipo D, la cual forma complejos ciclinaD/CDK's (cinasas dependientes de ciclinas: CDK4 y CDK6). Durante la fase G1 temprana, la actividad de E2F es reprimida por la proteína retinoblastoma (Rb). Tras la estimulación del crecimiento, Rb es fosforilada al final de G1 por el complejo ciclina D/CDK perdiendo su afinidad por E2F. E2F, es un factor de transcripción, el cual provocará que se transcriban genes importantes en la fase S del ciclo celular, comprometiéndose irreversiblemente a las células a replicar su ADN (durante fase S) (Shen *et al.*, 2002; Jocelyn E. Krebs *et al.*, 2014).

- **Proliferación celular vía mTOR**

Además de la regulación del ciclo celular por medio de los complejos ciclinas/CDK's, existe otra vía involucrada en la proliferación celular: la vía mTOR. La vía de señalización por la proteína mTOR, regula la proliferación celular por medio de la proteína ribosomal S6 cinasa (S6K) y 4eBP (el F4E, factor de iniciación eucariótico 4E-binding protein) quienes son fosforiladas por mTORC1. Posteriormente, S6K fosforila a la proteína ribosomal S6 (S6) provocando así la síntesis de proteínas y regulando la proliferación celular y el tamaño celular (Meyuhas y Drazzen *et al.*, 2009; Magnuson y Ekim *et al.*, 2012).

- **Apoptosis celular**

En los organismos, el número de células se mantiene relativamente constante debido a dos procesos: el ciclo celular y la apoptosis o muerte celular programada. Estos procesos permiten que el organismo se encuentre en balance (homeostasis) (Jocelyn E. Krebs *et al.*, 2014).

La apoptosis o muerte celular programada es un proceso altamente regulado bajo condiciones normales. La apoptosis es un proceso en el que las células se inactivan, se desensamblan y degradan su propia estructura y componentes de manera ordenada (Ameisen *et al.*, 1996).

Al entrar en proceso de apoptosis, las células presentan una serie de eventos bioquímicos que conducen a cambios característicos en la morfología de las células y eventualmente a su muerte. Estos cambios incluyen la ruptura de la envoltura nuclear y la fragmentación del ADN. La superficie celular se altera presentando propiedades que provocan que la célula sea fagocitada inmediatamente, ya sea por sus vecinas o bien, por macrófagos (Alberts *et al.*, 2002).

- **Genes Candidatos de *ETV5***

El factor transcripcional *ETV5* regula genes de ciclo celular. Se ha reportado que *ETV5*, se encuentra implicado en la proliferación de células madre embrionarias e inducción de genes asociados a diferenciación en este tipo de células (potencialmente a través de la regulación de *Gbx2* y *Tcf15*) (Monge *et al.*, 2007).

La sobre expresión de *ETV5* regula el aumento de la proliferación celular en células cancerígenas, la inhibición *in vitro* de *ETV5* disminuyó la proliferación celular, indujo migración celular y disminuyó la adhesión celular a componentes de matriz extracelular. La inhibición de *ETV5* disminuyó la adhesión celular (Llaurado *et al.*, 2012). Sin embargo, no se ha descrito la implicación de *ETV5* en la proliferación celular de células no cancerígenas.

Anteriormente, se había mencionado que al suprimir al gen *ETV5* en la línea celular INS1 (832/13) disminuye la secreción de insulina (Gutierrez-Aguilar *et al.*, 2014) y además se observó un menor número de células (Gutiérrez-Aguilar *et al.*, no publicado). Las células INS1 (832/13) secretan endógenamente insulina, ya que provienen de células β de páncreas de rata (Hohmeier *et al.*, 2000).

La insulina es una hormona indispensable para la proliferación celular. Es por esta razón, que no se sabe si el menor número de células observado en las células INS1 (832/13) en ausencia de *ETV5* se deba a: 1) la falta de insulina para poder proliferar, o b) a la regulación transcripcional directa de *ETV5* sobre genes de proliferación celular.

Es por eso, que para realizar este proyecto se buscó un modelo en el cual se pudiera demostrar la implicación de *ETV5* en la proliferación celular independientemente de insulina y de cáncer, por lo que se utilizó a la línea celular HEK293T. Las células HEK293T provienen de células embrionarias de riñón humano y no son secretoras de insulina.

Por otra parte, se buscaron genes que pudieran estar regulados transcripcionalmente por *ETV5*. Para tal motivo, se analizaron modelos animales que presentan un fenotipo similar al de los ratones *ETV5* KO (Gutierrez-Aguilar *et al.*, 2014). Se encontró en bibliografía que los ratones KO de ciclina D2, *E2F1* y *S6K1* comparados con los ratones WT presentan un menor peso, muestran resistencia a la obesidad inducida por dieta, son intolerantes a la glucosa, tienen un número reducido de islotes, la masa de las células β es menor, y la secreción de insulina también disminuye (Kushner *et al.*, 2005; Georgia *et al.*, 2004; Fajas y Landsberg *et al.*, 2002; Fajas, Annicotte *et al.* 2004; Shima *et al.*, 1998; Pende *et al.*, 2000). Estas características son similares a los ratones *ETV5* KO, lo cual convierte a estos tres genes como buenos candidatos para ser regulados transcripcionalmente por *ETV5*.

Por otra parte, en un microarreglo realizado en el músculo esquelético de los ratones *ETV5* KO, se observó que los transcritos de genes involucrados en el ciclo celular, tales como *ciclina D2*, *E2F1* y *S6K1* se encuentran disminuidos (Hippenmeyer *et al.*, 2007).

Anteriormente, se ha demostrado que los factores de transcripción *E2F* y *ETS* coordinan de forma ordenada la progresión del ciclo celular y se regulan mutuamente. *ETV5* es inducido por *E2F* durante la progresión del ciclo celular y requerido para la expresión de un subconjunto de genes del ciclo celular (Taylor-Harding *et al.*, 2015).

Por otra parte, se ha estudiado que CDK4 es activado por glucosa a través de la vía de la insulina, resultando en la activación de *E2F*. Esto es evidencia de que E2F1-pRB-CDK4-ciclina D regulan la homeostasis de la glucosa y la secreción de la insulina, definiendo una nueva interacción entre la proliferación celular y el metabolismo (Annicotte, Blanchet *et al.*, 2009).

Recientemente, se ha descrito que *E2F1* regula el crecimiento celular por medio de la vía de señalización de mTORC1, debido a la activación de S6K1 (Real, MeoEvoli *et al.*, 2011). Por lo tanto, las vías de proliferación (E2F1/ ciclina D2), así como la de mTOR se encuentran interconectadas.

Además de identificar algunos genes blanco de *ETV5* por medio de la comparación del fenotipo entre los KO y del microarreglo de músculo de los ratones *ETV5* KO, se analizaron los promotores de estos posibles genes blanco: *Ciclina D2*, *E2F1* y *S6K1*, utilizando el programa Genomatix. Los resultados de este análisis (Figuras 3, 4 y 5) demuestran que los promotores de los tres genes presentan sitios de unión para factores de transcripción de la familia ETS, a la cual pertenece *ETV5*, sugiriendo un control transcripcional y regulación de *ETV5* sobre estos genes.

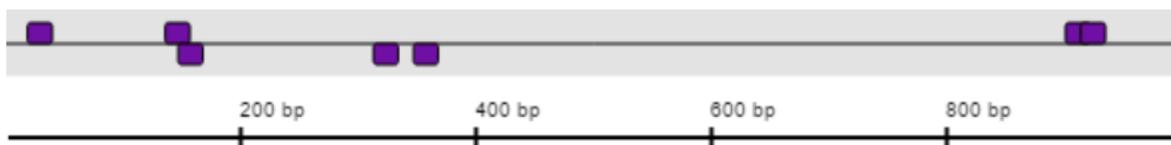


Figura 3. Diferentes sitios de unión de la familia ETS en el promotor de *Ciclina D2* (Genomatix, 2017).



Figura 4. Diferentes sitios de unión de la familia ETS en el promotor de *E2F* (Genomatix, 2017).



Figura 5. Diferentes sitios de unión de la familia ETS en el promotor de *S6K1* (Genomatix, 2017).

Se propone que los genes *ciclina D2*, *E2F1* y *S6K1* sean genes blancos de *ETV5*, ya que:

- 1) Existen sitios de unión para *ETV5* en los promotores de *ciclina D2*, *E2F1* y *S6K1* (*Genomatix, 2017*).
- 2) La expresión de transcritos de la *ciclina D2*, de *E2F1* y de *S6K1* están disminuidos en músculo de ratones *ETV5* KO (*Hippenmeyer et al., 2007*).
- 3) Se ha observado que el fenotipo de los ratones KO de todos estos genes es muy similar, lo cual sugiere que *ETV5* pudiera controlar la transcripción de estos genes (*Kushner et al., 2005*; *Georgia et al., 2004* ; *Fajas y Landsberg et al., 2002*; *Fajas y Annicotte et al., 2004*; *Shima et al., 1998*; *Pende et al., 2000*).
- 4) Se ha demostrado que *E2F1*-pRB-CDK4-ciclina D regulan la homeostasis de la glucosa y la secreción de la insulina, indicando la implicación de *ciclina D2* y de *E2F1* en el ciclo celular y en el metabolismo (*Annicotte, Blanchet et al., 2009*).

Todo lo anterior pudiera sugerir que genes del ciclo celular tales como *ciclina D2*, *E2F1* y *S6K1* pudieran ser regulados transcripcionalmente por *ETV5*, lo que demostraría la implicación de *ETV5* en la proliferación celular.

5. Materiales y métodos

- **Cultivo Celular**

Para el desarrollo del presente trabajo, se empleó la línea celular HEK293T, la cual proviene de células embrionarias de riñón humano.

Estas células se crecieron en medio de cultivo (DMEM Advanced GIBCO), suplementado con 5% de suero bovino fetal (FBS). Los cultivos celulares, se mantuvieron en un ambiente húmedo al 5% de CO₂ y a una temperatura de 37°C. El medio DMEM Advanced se suplementó con L-glutamina (40mM, GIBCO) y antibióticos: penicilina y estreptomina (100 U/mL, Hyclone).

- **Transfección**

La transfección consiste en la introducción y expresión de material genético ajeno a un organismo eucarionte, utilizando la maquinaria transcripcional del organismo receptor (Lewin B. *et al.*, 2010). La transfección que se llevó a cabo fue transitoria, introduciendo un siRNA a la línea celular HEK293T. La transfección es una herramienta esencial para evaluar la función de genes *in vitro*, ya sea sobre expresando o silenciando el gen de nuestro interés.

El nombre siRNA, por sus siglas en inglés “small interfering RNA” (ARN de interferencia pequeño) es una clase de ARN bicatenario. El siRNA es un tipo de ARN interferente con una longitud de 20 a 25 nucleótidos que es altamente específico para la secuencia de nucleótidos de su ARN mensajero diana. El siRNA participa en el mecanismo denominado interferencia de ARN, donde interfiere y reduce la expresión de un gen específico (Lewin B. *et al.*, 2010).

En todos los experimentos que se desarrollaron en este trabajo, se emplearon cultivos entre los pasajes 21 y 29. Se sembraron en cajas de seis pozos las células con una densidad de 8×10^5 por pozo (confluencia 30-40%). Al siguiente día del plaqueo de las células, se preparó cada siRNA control, Qiagen (1027281) y siETV5, Dharmacon (L-008894-00-0005) a una concentración de 20 nM y se mezcló con 1 μ L de agente de transfección

(Dharmaphect T-2001-02). Esta mezcla se dejó incubando a temperatura ambiente por 20 minutos. Una vez transcurrido este tiempo, se añadió la mezcla a los diferentes pozos gota a gota, como lo recomienda el fabricante. Las células se incubaron por 72 horas más.

- **Extracción de ARN**

La extracción de ARN total de las diferentes muestras, se llevó empleando el estuche de purificación para ARN total (Jena Bioscience, PP-2105). Este estuche se eligió debido a que se obtienen buenas concentraciones de ARN y una buena pureza. El procedimiento fue el siguiente:

Se quitó el medio de cultivo y se añadieron 500 μ L de amortiguador de lisis (con 2-mercaptoetanol añadido previamente) con el objetivo de lisar a las células. Se recolectaron las diferentes muestra en tubos eppendorf y se homogenizaron, cuidando que las muestras estén en hielo para evitar degradación de ARN. Posteriormente, se adicionaron 360 μ L de isopropanol al tubo que contiene el lisado celular y se mezcló perfectamente. Esta mezcla se transfirió directamente a una columna y se centrifugó a 10,000 xg por 30 segundos, descartando el filtrado.

Se realizó un primer lavado añadiendo 700 μ L de amortiguador de lavado primario, se centrifugó a 10,000 xg por 30 segundos y se descartó nuevamente el filtrado. Se repitió este paso una vez más. Se descartó el filtrado y se centrifugó nuevamente a 10,000 xg por 2 minutos para remover residuos de EtOH.

Por último, se realizó la elución del ARN colocando la columna en un tubo nuevo libre de ADNsa/ARNsa y se añadieron 30 μ L de amortiguador de elución en la columna. Se incubó a temperatura ambiente por 1 min y se centrifugó a 10,000 xg por 1 minuto, obteniendo el ARN.

El ARN obtenido se cuantificó utilizando el equipo MultiSkanGo (Thermo Fisher Scientific) y su pureza se determinó con el cociente 260/280.

- **Reacción de retro-transcripción (RT)**

La reacción de retrotranscripción consiste en utilizar el ARN como molde para generar el ADN complementario (cADN). Una vez transcurridas las 72 horas de la transfección, el ARN total se extrajo utilizando el estuche de purificación para ARN total mencionado anteriormente.

Partiendo de ARN mensajero, se generó el cADN, mediante una reacción de transcripción reversa empleando el estuche de síntesis de cADN (Jena Bioscience, PCR-511XS) con oligo dT como cebador y utilizando el termociclador (Axygen Maxygene II, PCR convencional). Las condiciones empleadas fueron: incubación de la mezcla de reacción a 42°C por 10 minutos, seguida de una segunda incubación de 50°C por 60 minutos, finalmente se inactiva a la enzima transcriptasa reversa por 10 minutos a 70°C.

- **PCR en tiempo real (qPCR)**

La PCR cuantitativa (qPCR, por sus siglas en inglés “quantitative polymerase chain reaction”) o PCR en tiempo real (“real time PCR”) es una variante de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizada para amplificar y simultáneamente cuantificar de forma absoluta el cADN obtenido por la reacción reversa del ARN. Para ello, esta técnica de biología molecular, emplea un molde de cADN, un par de cebadores (sondas o primers) específicos para el gen de interés, desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTP’s), un amortiguador de reacción adecuado y una polimerasa termoestable.

Los cebadores se encuentran marcados con un fluoróforo que, mediante un termociclador que alberga sensores para medir fluorescencia, permiten medir la amplificación del cADN sintetizado en cada momento. La emisión de la fluorescencia producida en la reacción es proporcional a la cantidad de ADN formado y por lo tanto refleja la cuantificación del ARNm. Esto permite conocer y registrar en todo momento la cinética de la reacción de amplificación de genes específicos (Bustin *et al.*, 2000), para cuantificar la expresión de un gen.

Para medir la cantidad de transcrito se realizó un PCR cuantitativo utilizando el termociclador (Agilent Stratagene MX30005P, PCR en tiempo real) y las sondas (Taqman “gene expression assays”, ensayos de expresión de genes) correspondientes a cada gen *Etv5* (Hs00927557_m1), *CCND2* o *ciclina D2* (Hs00153380_m1), *E2F1* (Hs00153451_m1), *RPS6KB1* o *S6K1* (Hs00177357_m1) y el gen constitutivo *RPL32* o *L32* (Hs00851655_g1).

Se utilizó el método $\Delta\Delta C_t$ y los valores son expresados en porcentaje del control siRNA. Esta técnica se utiliza para obtener la magnitud de los cambios fisiológicos en los niveles de expresión de un gen en estudio en comparación con uno o más genes de referencia (Michael W. Pfaffl *et al.*, 2004). Hay que tomar en cuenta que la expresión de los genes de referencia debe ser constante en las células estudiadas, por lo que generalmente se utilizan genes expresados constitutivamente ("housekeeping") como los genes de referencia. Para conocer la expresión relativa del gen de interés, se compara con un gen control, como es *L32*, implicado en codificar proteína ribosomal (componente de la subunidad 60S), el cual no se modifica bajo los tratamientos realizados (Bustin *et al.*, 2000).

La reacción de qPCR consistió de una incubación inicial por 2 minutos a 50°C, seguida de la activación de la polimerasa a una temperatura de 95°C por 10 minutos, seguido por 40 ciclos de 15 segundos a 95°C de desnaturalización y 1 minuto a 60°C de hibridación y extensión de la cadena.

- **Conteo y viabilidad celular**

Se realizó el conteo celular mediante una cámara de Neubauer (Marienfeld). Para este conteo se utilizó una placa gruesa de cristal con forma de portaobjetos, de unos 30 x 70 mm y unos 4 mm de grosor. En una cámara simple, la porción central está dividida en tres partes y donde se encuentra grabada una retícula cuadrangular. Para las células HEK293T en confluencia del 90% se tripsinaron y se preparó una dilución 1:100 para su conteo. Posteriormente, de esta dilución se tomó 10 μ L y se introdujo la muestra en la cámara de Neubauer. Se hizo conteo en tres diferentes cuadrante.

Para el cálculo de la concentración, se utilizó la siguiente fórmula:

Células por μL de muestra

$$= \frac{\text{Número de células contadas}}{\text{área contada (mm}^2\text{)} \times \text{profundidad de la cámara (mm)} \times \text{dilución}}$$

Área contada: tres diferentes cuadrantes ($= 3 \times 1 \text{ mm}^2$) = 3 mm^2

Profundidad de la cámara: 0.1 mm

Dilución: 1:100

Posteriormente, por otro método se realizó el conteo de células y la viabilidad celular mediante el equipo Muse analizador de células (Muse, Millipore), con el estuche Muse conteo y viabilidad (EMD Millipore MCH100102). En este estuche, se emplea un agente que tiñe diferencialmente a las células viables de las no viables. El principio de este estuche se basa en la integridad de la membrana celular. Si la membrana se encuentra íntegra, no permitirá el acceso al colorante. Por lo tanto, este estuche se utiliza para poder diferenciar células viables (células vivas que no se encuentran teñidas) de células no viables (células muertas y teñidas) (merckmillipore.com/MX/ 2017).

El sistema y software del equipo Muse (Millipore), cuenta los núcleos teñidos como eventos y utiliza el tamaño celular para poder distinguir núcleos libres de los desechos celulares. Para realizar este ensayo, se utilizó una suspensión celular homogénea con una concentración de 1×10^5 células/mL y de ésta solución se tomaron 50 μL .

A cada ensayo se le añaden 450 μL del reactivo de conteo y viabilidad, el cual se dejó incubando por 5 minutos a temperatura ambiente. Una vez transcurrido este tiempo, se hizo la lectura en el equipo.

- **Proliferación celular**

La proteína Ki-67 humana se encuentra estrictamente asociada con la proliferación celular. La proteína Ki-67 se encuentra presente durante todas las fases activas del ciclo celular (G1, S, G2, y mitosis), pero ausente de las células en reposo (G0). Durante la interfase, el antígeno se puede detectar exclusivamente dentro del núcleo, mientras que en mitosis la mayoría de la proteína se traslada a la superficie de los cromosomas. El ensayo de proliferación Ki-67 utiliza a esta proteína como marcador para identificar células en proliferación y distinguirlas de las células no proliferantes (merckmillipore.com/MX/ 2017).

Dos poblaciones de células se pueden distinguir en este ensayo:

- **Ki-67 (+):** células que se encuentran proliferando.
- **Ki-67 (-):** células que no son proliferativas.

Se midió la proliferación celular en las células HEK293T transfectadas por siRNA de *ETV5* y siRNA control después de 72 horas, utilizando el estuche Muse Ki-67 para proliferación (EMD Millipore MCH100114) mediante el equipo Muse analizador de células (Muse, Millipore). Este estuche permite la determinación del porcentaje de células en proliferación y en no proliferación basado en la cuantificación de Ki-67.

El ensayo consistió en retirar el medio en el que se encontraban las células, se lavaron y se tripsinaron. Posteriormente, se realizó el conteo celular (mediante cámara de Neubauer).

Para este ensayo, es necesario tener una suspensión celular homogénea con una concentración de 1×10^5 células/mL y de ésta solución tomar 200 μ L para cada ensayo.

Se agregó a cada muestra 50 μ L de la solución fijadora, se mezcló y se dejó incubando a temperatura ambiente por 15 minutos. Posteriormente, se añadió 150 μ L de la solución de reacción, se centrifugó (300 xg, 5 minutos) y se retiró el sobrenadante. Se añadió 100 μ L de la solución de permeabilización

y se mezcló e incubó por 15 minutos. Posteriormente, se le adicionó 100 μ L de solución de reacción y se centrifugó, nuevamente se añadió 50 μ L de solución de reacción mezclando y dejando incubar por 15 minutos. Finalmente, se agregó 10 μ L del anticuerpo anti-Ki-67 a cada ensayo dejando en incubación por 30 minutos a temperatura ambiente. Una vez transcurrido este tiempo, se adicionó 150 μ L de solución de reacción y se cuantificó en el equipo.

- **Apoptosis celular**

La apoptosis o muerte celular programada es un proceso altamente regulado bajo condiciones normales. Durante la apoptosis, las células responden a señales de inducción específicas mediante el inicio de procesos intracelulares que producen cambios fisiológicos característicos tales como: la externalización de la fosfatidilserina (PS) a la superficie de la célula, la escisión y la degradación de proteínas. Además existe la compactación y la fragmentación de la cromatina nuclear y pérdida de la integridad de la membrana (en últimas etapas), entre otras (Van England *et al.*, 1998).

La anexina V tiene una alta afinidad por PS, un componente de la membrana, normalmente localizado en la cara interna de la membrana celular.

Al comienzo de la vía apoptótica, las moléculas de PS son trasladadas a la superficie exterior de la membrana célula, en donde la anexina V se puede unir fácilmente y de esta manera esta proteína puede identificar células en apoptosis (Van England *et al.*, 1998).

Además de anexina V, otro componente que ayuda a la identificación de células apoptóticas es la 7-aminoactinomicina D (7-AAD), que es un marcador químico fosforescente con una fuerte afinidad al ADN. Para que 7-AAD pueda unirse y teñir al ADN es necesario que la membrana celular se encuentre permeable o rota, lo que indicaría cierto grado de apoptosis en la célula.

Para la medición de apoptosis celular, se utilizó el equipo Muse analizador de células (Muse, Millipore) con el estuche anexina V y muerte celular Muse (EMD Millipore MCH100105).

Mencionado lo anterior, con este ensayo es posible distinguir cuatro poblaciones diferentes de células:

- **Anexina V (-) y 7-AAD (-):** células no apoptóticas o células vivas.
- **Anexina V (+) y 7-AAD (-):** células en temprana apoptosis.
- **Anexina V (+) y 7-AAD (+):** células apoptóticas.
- **Anexina V (-) y 7-AAD (+):** desechos nucleares (“debris”).

Para este ensayo, se preparó una suspensión celular homogénea con concentración de 1×10^5 células/mL y de esta solución se tomaron 100 μ L para cada ensayo. Posteriormente, se añadieron 100 μ L del reactivo anexina V y 7-AAD a cada muestra y se dejó incubando por 20 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido dicho tiempo, se realizó la lectura en el equipo.

6. Resultados

Anteriormente, se había observado que en las células INS1 (832/13) al silenciar el gen *ETV5*, existía una menor cantidad de células (Gutierrez-Aguilar *et al.*, no publicado).

En las células INS1 (832/13) que tienen suprimido al gen *ETV5*, se desconoce si el menor número de células observado se debe a la falta de insulina para poder proliferar, o sea debido a la regulación transcripcional directa de *ETV5* sobre genes de proliferación celular.

A diferencia de las células INS1 (832/13), las cuales secretan endógenamente insulina, la línea celular HEK293T no es secretora de insulina. Es por esta razón, que este proyecto se utilizaron a las células HEK293T como modelo de estudio, con el fin de poder demostrar la implicación de *ETV5* en proliferación celular independientemente de insulina. Por lo tanto, la metodología utilizada en este proyecto se optimizó para las células HEK293T.

Primeramente, se presentan las optimizaciones realizadas para silenciar al gen *ETV5*. Posteriormente, se describen las optimizaciones para los ensayos de viabilidad, proliferación y apoptosis. Finalmente, se muestran los resultados

obtenidos de las células silenciadas de *ETV5* para los ensayos de viabilidad, proliferación y apoptosis, los cuales se realizaron por triplicado.

- **Optimización de la transfección del siRNA contra *ETV5* en células HEK293T**

Para poder estudiar la implicación de *ETV5* en la proliferación celular, fue necesario optimizar la transfección del siRNA contra *ETV5* en las células HEK293T. Esto tuvo como objetivo conocer las condiciones más adecuadas para transfectar a dichas células para conseguir una menor expresión relativa del gen *ETV5*, asegurando el silenciamiento del mismo. Para este propósito, se evaluó el silenciamiento del siRNA contra *ETV5* (si*ETV5*) probando diferentes concentraciones 20 nM y 40 nM de si*ETV5* y del siRNA control (siC) a 20 nM. Además se utilizaron diferentes cantidades del agente de transfección (1 y 2 μ L). En este caso, se realizó solamente un experimento para conocer las condiciones óptimas de transfección del siRNA a las células.

Después de la transfección con siC y si*ETV5* por 72 horas con diferentes concentraciones, se observó que la expresión del mRNA de *ETV5* disminuyó en un 50% aproximadamente con la concentración de 20 nM y con la cantidad de 1 μ L del agente de transfección, comparada con las mismas condiciones utilizadas para control (Figura 6A). Esto se confirmó al utilizar las mismas concentraciones antes mencionadas a diferentes tiempos de transfección 24, 48 y 72 horas. Se observó que a las 72 horas se alcanza una disminución en la expresión relativa del 70% (Figura 6B). Por lo tanto, estos resultados revelan que las condiciones óptimas de transfección del siRNA son de 72 horas a una concentración de 20 nM de siRNA con la cantidad de 1 μ L del agente de transfección, obteniendo un silenciamiento aproximado entre el 50-70% del transcrito de *ETV5*.

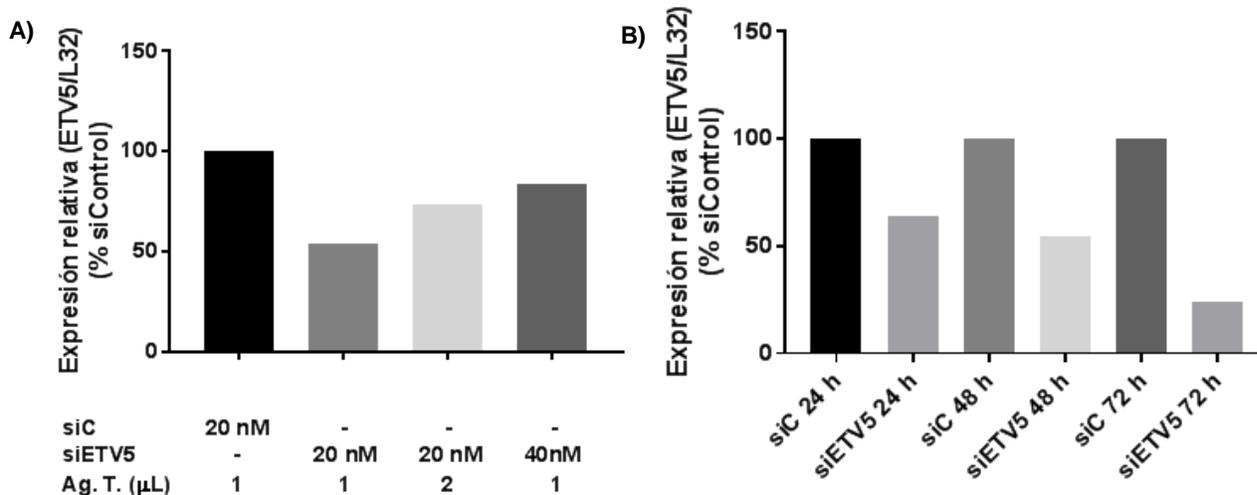


Figura 6. Optimización de la transfección del siRNA contra ETV5 en células HEK293T. Medición de la expresión relativa de ETV5 mediante qPCR en células HEK 293T.

A) Optimización concentraciones de siRNA (20 y 40 nM) y diferentes cantidades del agente de transfección (1 y 2 µL).

B) Optimización tiempos de transfección (24, 48 y 72 horas) con 20 nM de siETV5 y 1 µl de agente de transfección.

(siC=siRNA Control, siETV5=siRNA contra ETV5).

- **Optimización de la cuantificación de viabilidad, proliferación y apoptosis en el equipo analizador de células (Muse, Millipore)**

Para llevar a cabo la medición de la viabilidad, la proliferación y la apoptosis, a través de citometría de flujo, fue necesario optimizar los diferentes estuches con el objetivo de alcanzar una familiarización tanto del equipo como de estos. Para ello, se optimizaron los siguientes parámetros: número de células a utilizar para cada ensayo, el tiempo de incubación y el blanco a utilizar.

- **Optimización de la viabilidad celular**

Para este ensayo, se utilizaron 5,000 células y se añadió el colorante dejando incubar por 5 minutos a temperatura ambiente. Para llevar a cabo la calibración del equipo y del protocolo es importante conocer la población celular con la que se trabaja. En este caso, se utilizó como calibración o blanco a las células vivas teñidas, donde el tamaño celular se fijó en un rango de valores que va desde 0.5 a 4.0, considerando por debajo de 0.5 al desecho celular (Figura 7A). Se observó que las células se dispersan mayoritariamente entre valores de 0.5 a 2.5 del tamaño celular (Figura 7A) y por abajo de 1.0 en eje de viabilidad (Figura 7B). Esto indicó que la mayoría de las células se encuentran vivas. Una vez calibrado el equipo y fijados los parámetros, se hicieron las lecturas de las demás muestras.

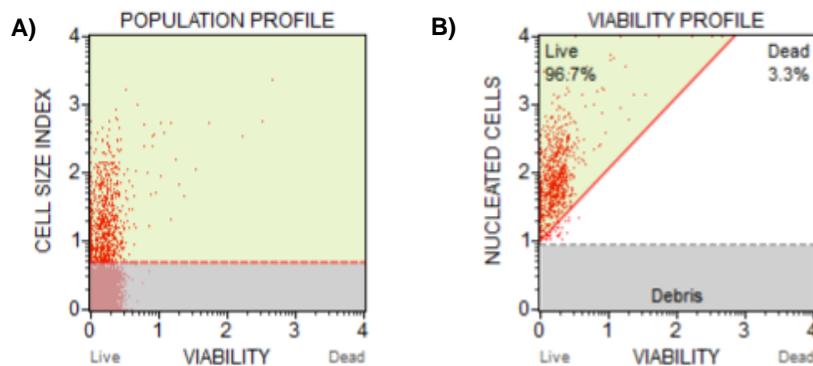


Figura 7. Optimización y calibración viabilidad celular.

A) Células vivas teñidas. Tamaño celular de 1.0 a 4.0

B) Células vivas teñidas. Viabilidad con un rango por arriba de 0-1.0

- **Optimización de la medición de proliferación celular**

El ajuste o calibración del equipo se realizó con células vivas sin estar marcadas con el anticuerpo de Ki-67 (Ki-67 (-) (negativas). Se observó que el tamaño celular (Figura 8A) va de un rango de 1.0 a 4.0. Las células Ki-67 (-) (en azul) presentaron una auto fluorescencia que alcanza un valor de Ki-67 de hasta 1.0 (Figura 8B). Sin embargo, no se observaron células Ki-67 (+) positivas después del valor de 1.0 en el histograma, ya que éstas no son detectadas debido a que no se encuentran marcadas.

Posteriormente, se midieron las células vivas ahora marcadas con Ki-67. Se seleccionó el mismo valor de tamaño celular que va de 1.0 a 4.0. Se obtuvieron algunas células esparcidas (Figura 8C) y se observó que ambos histogramas (Figura 8C y 8D) se desplazan hacia la derecha en comparación con las células sin tratar Ki-67 (-) negativas (Figura 8A y 8B) y se registra que el histograma muestra células Ki-67 (+) positivas en valores mayores a 1.0 y en color rojo (Figura 8D).

Además, otra alícuota de las mismas células se incubó con el anticuerpo anti-Ki-67 (Figura 8E y 8F), esto con el objetivo de valorar y comprobar que la tinción de las células con Ki-67 está siendo bien leída por el equipo. El tamaño celular también fue seleccionado de 1.0 a 4.0 y el valor para Ki-67 (+) positivas fue igualmente mayor a 1.0 (Figura 8E). En cuanto a la figura 8F, se observó que el histograma muestra células Ki-67(+) en valores mayores a 1.0 y de igual manera en color rojo. Por lo tanto, la medición de una muestra pudo ser tomada bajo las condiciones optimizadas para este estuche.

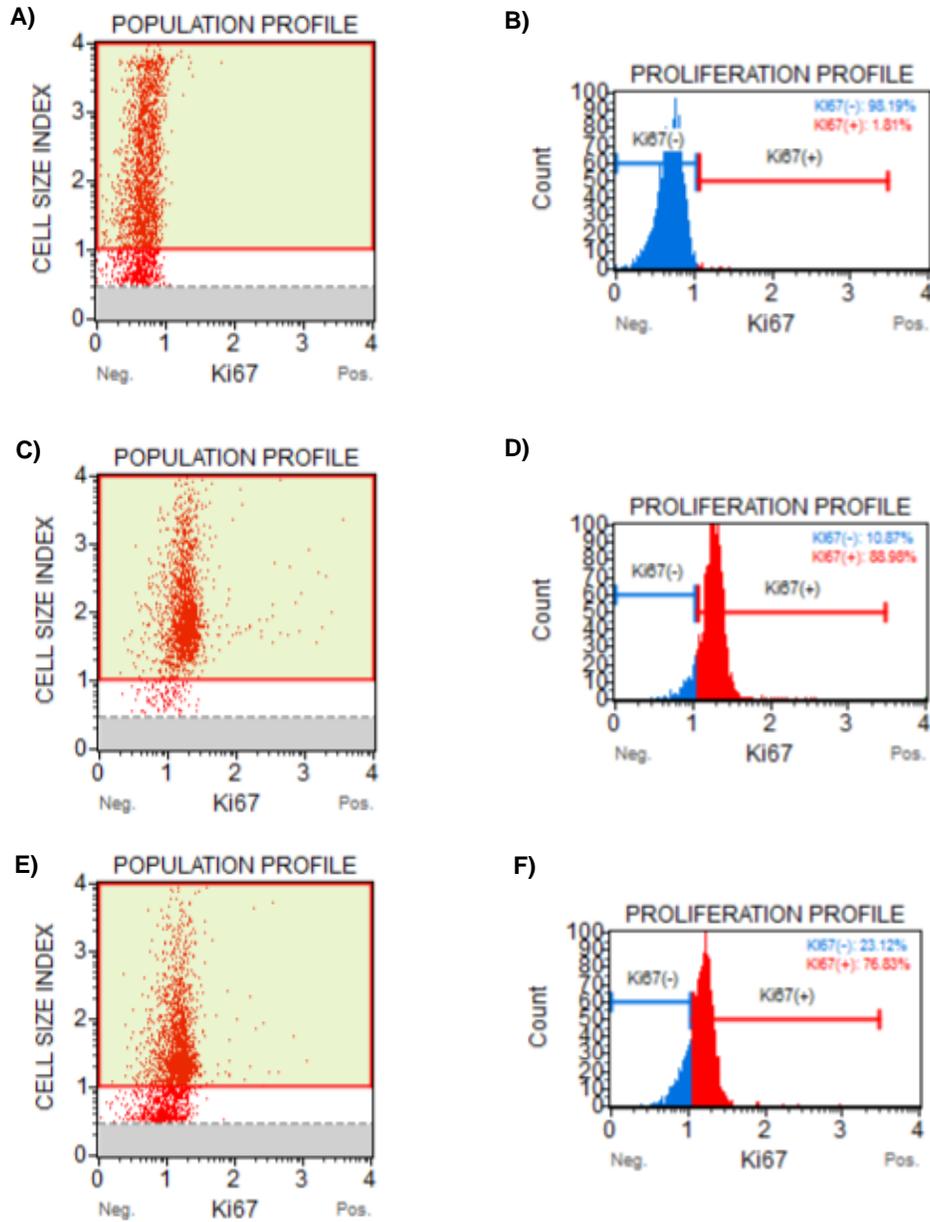


Figura 8. Optimización y calibración proliferación celular.

A) Células HEK293T vivas sin tratar, tamaño celular de 1.0 a 4.0

B) Células HEK293T vivas sin tratar, células Ki-67 (-) que alcanzan un valor de 1.0

C) Células HEK293T vivas marcadas con Ki-67, tamaño celular de 1.0 a 4.0

D) Células HEK293T vivas marcadas con Ki-67, células Ki-67 (+) (ROJO) que rebasan valor de 1.0

E) Células HEK293T vivas marcadas anti-Ki-67, tamaño celular de 1.0 a 4.0

F) Células HEK293T vivas marcadas anti-Ki-67, células Ki-67 (+) (ROJO) que rebasan valor de 1.0

- **Optimización de la medición de apoptosis celular**

Utilizando 5,000 células por ensayo e incubando a las células con anexina V por veinte minutos, se calibró el equipo con células teñidas, tomando como población celular a las células que presentan un tamaño que va de 0.5 a 4.0, dejando por debajo de estos valores el desecho celular (Figura 9A). Se observó también que las células se encuentran en diferentes tamaños celular y con diferentes valores de anexina V teniendo un máximo de 3.0. En la figura 9B, se observó que la mayoría de las células se encuentran en el cuadrante de células vivas con un 93.80%, pocas en apoptosis tempranas 5.65%, apoptosis tardía 0.55% y muertas 0.0%.

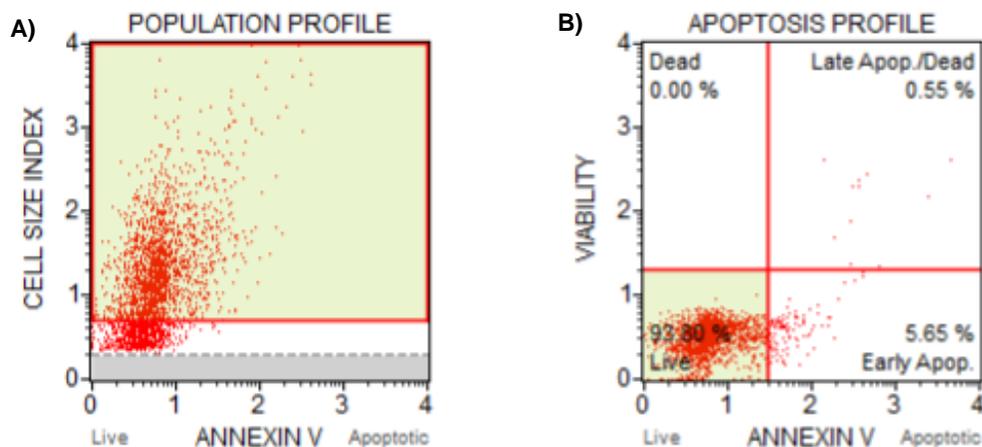


Figura 9. Optimización y calibración apoptosis celular.

Las células vivas teñidas con anexina V fueron consideradas como blanco.

A) Células vivas teñidas con anexina V, tamaño celular de 1.0 a 4.0

B) Células vivas teñidas con anexina V, perfil de apoptosis donde se divide en cuadrantes las células vivas (93.80%), apoptosis temprana (5.65%), apoptosis tardía (0.55%) y células muertas (0.0%).

A continuación se presentan las condiciones optimizadas para las tres diferentes variables a medir (conteo celular/viabilidad, proliferación celular y apoptosis).

Tabla 2. Optimización de los diferentes parámetros a medir mediante citometría de flujo: viabilidad, proliferación y apoptosis celular en equipo “MUSE Cell Analyzer.”

	VIABILIDAD	PROLIFERACIÓN	APOPTOSIS
No. células	5,000 células/ensayo	3,000 células/ensayo	5,000 células/ensayo
Tiempo de incubación	5 min	2 horas	20 min
Blanco	células teñidas	células sin teñir	células teñidas

En la Tabla 2, se presentan las condiciones de las células que serán utilizadas como blanco, así como el número de células necesarios para cada uno de los ensayos. Se logró conocer las características de las células (tamaño celular) y su comportamiento en citometría de flujo.

Posteriormente, se optimizaron condiciones especiales que ayudan como controles positivos y negativos para la medición de la viabilidad, proliferación y apoptosis celular. Para el caso del ensayo de viabilidad celular, se utilizó como blanco a las células vivas teñidas, tomando éste como control positivo de viabilidad. En la figura 10A, se observa que alcanzan un porcentaje de viabilidad cercano al 100%. Además, se evaluaron las células en diferentes condiciones no óptimas para su crecimiento, lo cual permitió observar la forma en que responden a un cambio brusco de temperatura, sin nutrientes, en cloro o en ácido acético. Se observa (Figura 10A) que las células reducen ligeramente su viabilidad con el tratamiento de alta temperatura por 15 minutos; sin embargo, a los 30 minutos se observa una disminución en su porcentaje de viabilidad del 35%. Para los tratamientos en que se dispuso a las células en un medio no óptimo para su crecimiento, se dispusieron en una solución salina amortiguada por fosfatos (PBS por sus siglas en inglés "Phosphate Buffered Saline"), se observó una disminución de su capacidad para mantenerse viables con el transcurso del tiempo, viéndose una disminución en la viabilidad del 25% a las 2 horas y del 45% a las 24 horas. Finalmente, se trataron a las células en dos medios que afectan su viabilidad: cloro y ácido acético en una dilución 1:1. Se observó que con el cloro,

las células redujeron su viabilidad en un 70% y con el ácido acético las células pierden casi por completo su capacidad para mantenerse viables (Figura 10A).

En el caso del ensayo en el cual, se evaluó proliferación celular, se utilizó como blanco a las células vivas marcadas con el anticuerpo Ki-67, de tal manera que no se obtuviera un falso positivo. Se observó que al someter a las células en un ambiente con temperatura o de falta de suministros necesarios para su viabilidad, éstas se ven más afectadas mientras más transcurre el tiempo (Figura 10B). También se muestra (Figura 10B) a las células sin estar marcadas con el anticuerpo Ki-67, siendo éste el control negativo del ensayo.

En la figura 10C, en la cual se midió apoptosis celular, se observó que al someter a las células por más tiempo a una temperatura alta o encontrarse en un medio no óptimo para su crecimiento, el número de células en estado de apoptosis aumenta.

Tanto en el ensayo de proliferación como de apoptosis, no se evaluó a las células en el ambiente de cloro y ácido acético, ya que estas sustancias anulaban la lectura del fluoróforo lo que llevaba a obtener falsos negativos.

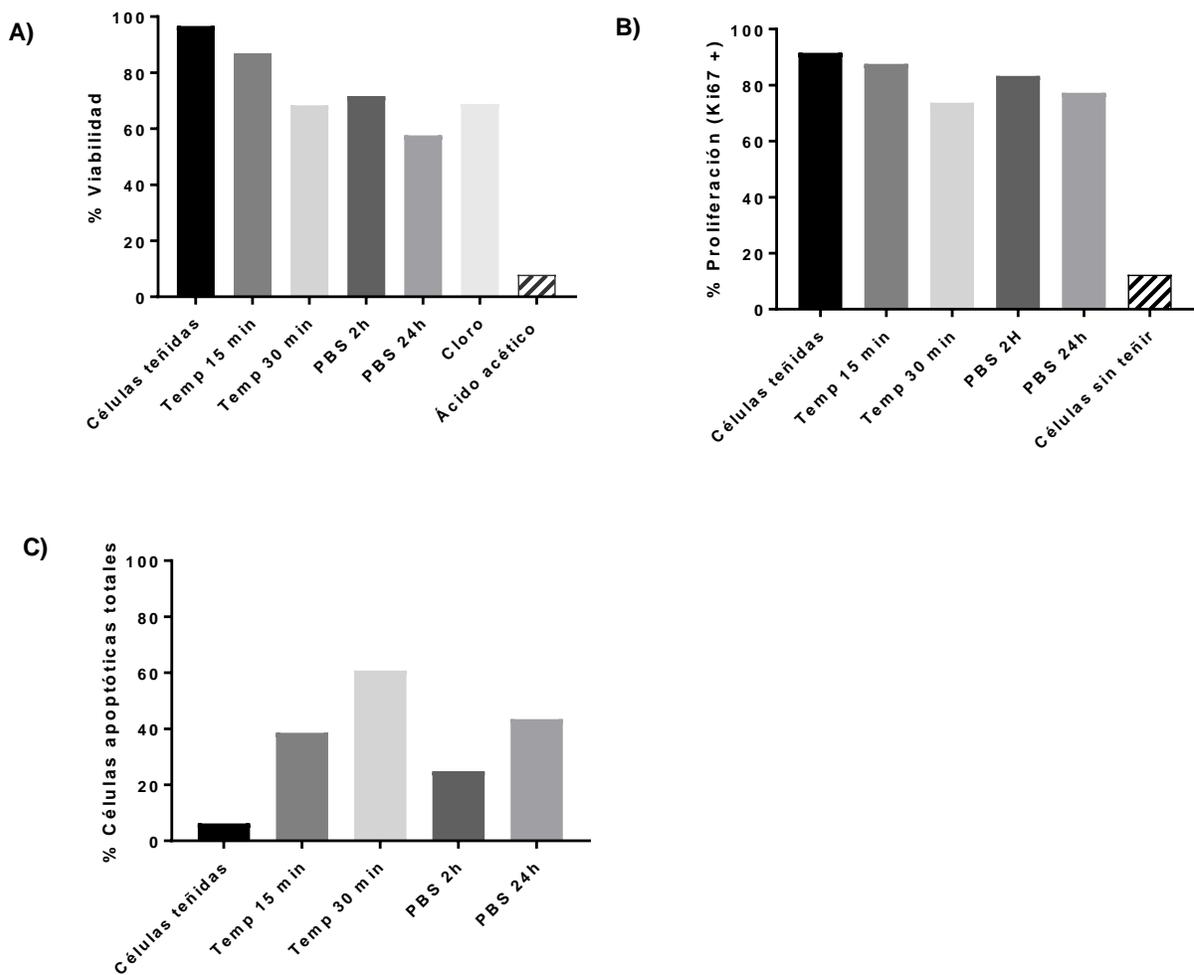


Figura 10. Optimización de las condiciones para medir viabilidad, proliferación y apoptosis en las células HEK293T. **A)** Controles para viabilidad, **B)** Controles para proliferación y **C)** Controles para apoptosis celular.

A partir de las optimizaciones de las condiciones de silenciamiento de *ETV5* y del uso del citómetro de flujo, se realizaron los experimentos con sus réplicas, lo cual permitió hacer un análisis estadístico de los resultados, presentados a continuación.

- **Silenciamiento de *ETV5***

Con las condiciones de transfección optimizadas (20 nM siRNA, 1 μ L del agente de transfección, 72 horas), en la figura 11 se muestran los resultados de cuatro experimentos realizados en diferentes días, donde se logró una disminución de *ETV5* de aproximadamente un 60%.

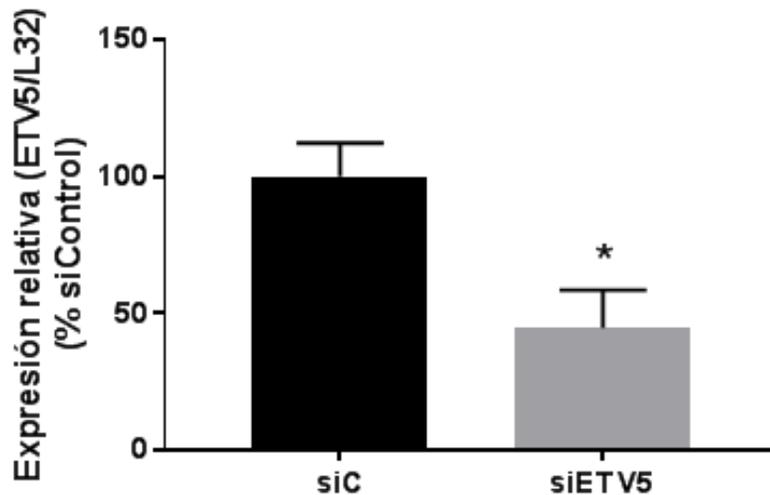


Figura 11. Transfección de siRNA contra *ETV5*, en células HEK293T. Condiciones de transfección: 20 nM siRNA + 1 μ L agente de transfección, 72 horas. (siC=siRNA Control, siETV5=siRNA contra *ETV5*, n= 4 experimentos, *p<0.05 t-Student).

- **Influencia de *ETV5* en el número de células**

En las células con *ETV5* reprimido se observó presentan una menor cantidad de las mismas en comparación con las células control. Las células control se extienden a lo largo del pozo, mientras que las células con *ETV5* disminuido se propagan de forma limitada, presentando un menor número de células (Figura 12A y 12B).

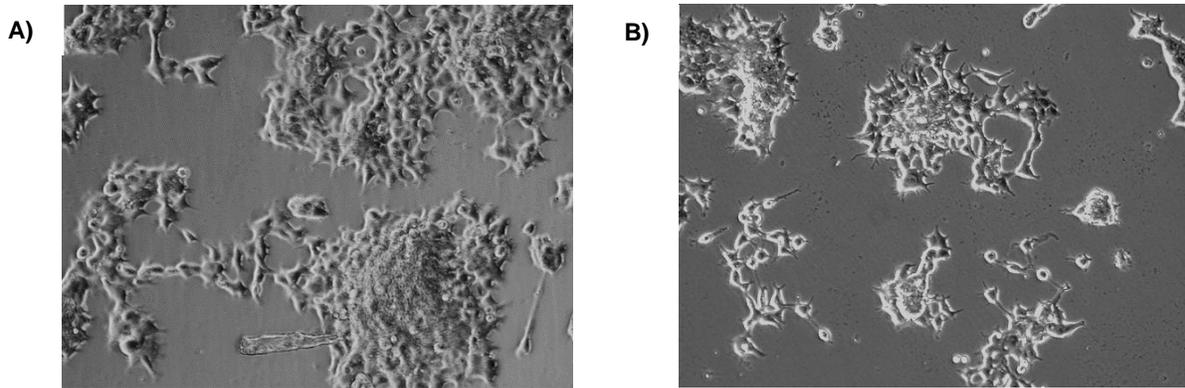


Figura 12. Imagen tomada de células HEK293T transfectadas.

A) Células HEK293T en presencia de *ETV5* (siC).

B) Células HEK293T en ausencia de *ETV5* (siETV5).

Fotos tomadas mediante microscopio 20X.

(siC=siRNA Control, siETV5=siRNA contra *ETV5*).

Para corroborar el efecto en el número celular que se observaba, se realizó el conteo celular mediante la cámara de Neubauer en células transfectadas y tripsinadas posteriormente.

En la figura 13, se observa que las células con *ETV5* silenciado, contienen un menor número de células que las células controles, presentando una reducción del 40%.

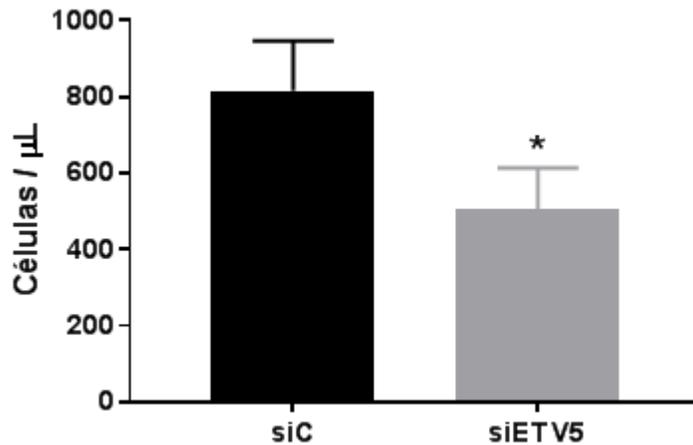


Figura 13. Conteo celular mediante cámara de Neubauer de los diferentes tratamientos en células HEK293T en presencia de *ETV5* (siC) y ausencia de *ETV5* (siETV5) después de 72 horas. (siC=siRNA Control, siETV5=siRNA contra *ETV5*, $n= 4$ experimentos, $*p<0.05$ t-Student).

Al observarse una disminución en el número de células con *ETV5* disminuido, se evaluó si era a causa de: la viabilidad, la proliferación o la apoptosis celular.

- Efecto de *ETV5* sobre viabilidad celular

Al observarse un menor número de células totales en las células con *ETV5* disminuido (Figura 12 y 13), se evaluó la viabilidad celular. Se observó que no hay diferencia significativa en el número de células viables entre las células control y las silenciadas de *ETV5* (Figura 14A), por lo que el porcentaje de viabilidad en ambos tratamientos es del 90% (Figura 14B). Por lo tanto, al encontrarse reducida la expresión de *ETV5* en células HEK293T, el menor número de células totales no se debe a la pérdida de la capacidad de mantenerse viables.

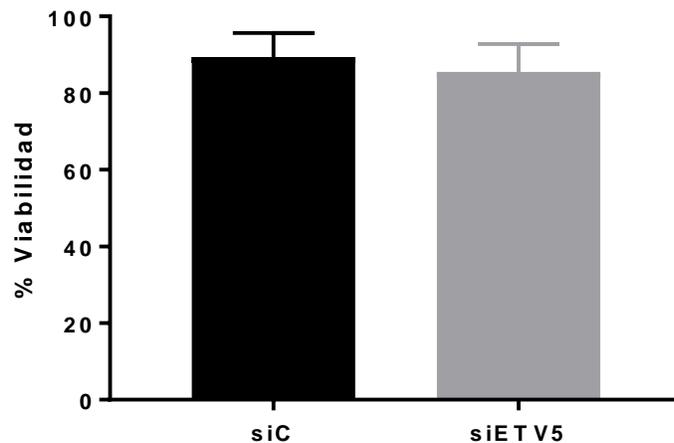


Figura 14. Viabilidad de células HEK293T de los diferentes tratamientos en células HEK293T en presencia de *ETV5* (siC) y ausencia de *ETV5* (siETV5) después de 72 horas. (siC=siRNA Control, siETV5=siRNA contra *ETV5*, $n= 3$ experimentos, $*p<0.05$ *t-Student*).

- **Proliferación celular**

La disminución en el número de células totales en ausencia de *ETV5* se comprobó que no se debía a la disminución de la viabilidad de las células. Por lo tanto, se decidió medir la proliferación celular en presencia y ausencia de *ETV5* en las células HEK293T.

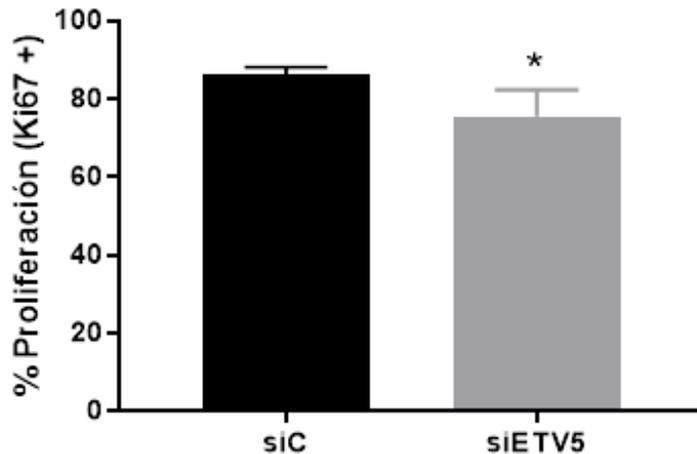


Figura 15. Proliferación celular de células HEK293T en presencia de *ETV5* (siC) y ausencia de *ETV5* (siETV5).

Las células fueron transfectadas con siRNA y se midió la proliferación después de 72 horas. (siC=siRNA Control, siETV5=siRNA contra *ETV5*, $n= 3$ experimentos, * $p<0.05$ *t-Student*).

En la figura 15 se observa que las células que mantienen reducido al gen *ETV5*, presentan una menor proliferación celular, comparado a las células control. Las células que se encuentran en presencia de *ETV5* muestran un porcentaje de proliferación de casi el 90%, mientras que las células con *ETV5* disminuido presentan un 73% de proliferación celular, es decir, la proliferación celular se afecta en un porcentaje del 27% en ausencia de *ETV5*.

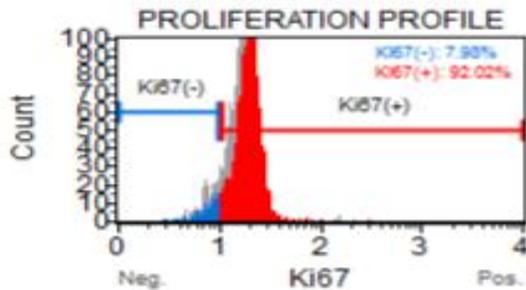


Figura 16. Comparación de la proliferación celular en células HEK 293T en presencia de *ETV5* en rojo (siC) y ausencia de *ETV5* en gris (siETV5) después de 72 horas. (siC=siRNA Control, siETV5=siRNA contra *ETV5*, $n=3$ experimentos, $*p<0.05$ t-Student).

Al comparar los histogramas de las células HEK293T (Figura 16) en presencia o en ausencia de *ETV5*, se observó que el histograma que representa a las células en ausencia de *ETV5* (gris) se desplaza hacia la izquierda, indicando una menor proliferación en comparación a las células en presencia de *ETV5* (rojo). Por lo tanto, partiendo del mismo número de células para este ensayo, se observó que manteniendo a *ETV5* disminuido, la proliferación se reduce.

- **Apoptosis**

Otra explicación por la cual la cantidad del número de células en ausencia de *ETV5* estuviera afectada pudiera ser que las células entran en el proceso de apoptosis. Es por esto que se evaluó el porcentaje de células que estuvieran en apoptosis en presencia o ausencia de *ETV5*.

Se observó que en ambos tratamientos, el porcentaje de células apoptóticas es muy similar (Figura 17), indicando que en presencia o ausencia del gen *ETV5*, las células entran en un proceso de muerte celular natural, de manera que se descarta que mediante esta vía se esté afectando la cantidad de células.

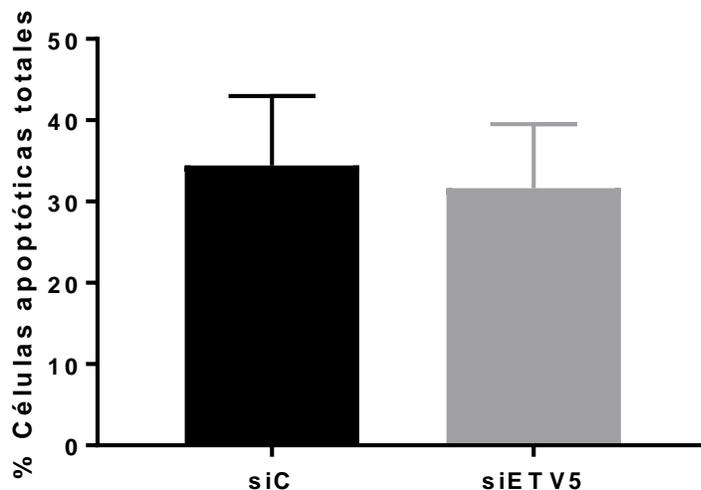


Figura 17. Apoptosis celular en células HEK293T en presencia de *ETV5* (siC) y ausencia de *ETV5* (siETV5) después de 72 horas. (siC=siRNA Control, siETV5=siRNA contra *ETV5*, $n=3$ experimentos, $*p<0.05$ t- Student).

- **Medición de los diferentes transcritos *ETV5*, *ciclina D2*, *E2F1* y *S6K1***

Los resultados previos revelan que con *ETV5* reducido, existe un menor número de células, esto podría deberse a la disminución de la proliferación celular, debido a que *ETV5* al ser un factor transcripcional, pudiera estar controlando genes involucrados en ciclo celular, tales como *ciclina D2*, *E2F1* y *S6K1*.

Mediante un análisis *in silico*, se observó que existen sitios de unión de factores transcripcionales de la familia ETS en promotores de *ciclina D2*, *E2F1* y *S6K1*, por lo que se evaluó la expresión relativa de dichos genes.

Primeramente, se corroboró que después de 72 horas el silenciamiento de *ETV5* haya sido adecuado. Se observó que la expresión de este gen es de aproximadamente 55% (Figura 18), indicando una transfección exitosa y una reducción del gen. Con *ETV5* disminuido, se observó que la expresión de *ciclina D2* se encuentra reducida en un 40% (Figura 18). Por otra parte, se observó que *E2F* y *S6K1* no se afectan (Figura 18).

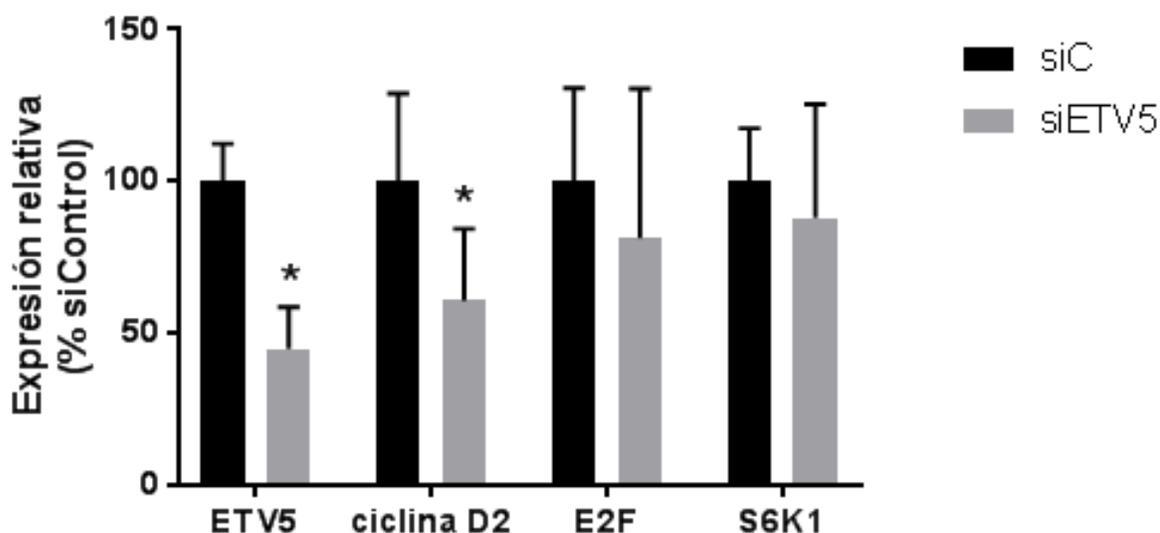


Figura 18. Medición de los diferentes transcritos de células HEK293T transfectadas después de 72 horas. (siC=siRNA Control, siETV5=siRNA contra *ETV5*, $n=4$ experimentos, $*p<0.05$ t- Student).

Por lo tanto, estos datos sugieren que *ETV5* podría regular la proliferación celular, regulando transcripcionalmente la expresión de *ciclina D2*, un gen importante en el ciclo celular.

7. Análisis de resultados

Los factores de transcripción ETS actúan como reguladores positivos o negativos de la expresión de genes que están implicados en diversos procesos biológicos, tales como la proliferación celular, la migración y la capacidad de invasión de las células cancerígenas (Llraudo *et al.*, 2012; Akagi *et al.*, 2015). Se ha estudiado la implicación de *ETV5* en tumores cancerígenos y se ha demostrado que al encontrarse silenciado o sobre expresándose, afecta directamente la migración, proliferación y la adherencia de este mismo tipo de células (Monge *et al.*, 2007; Llaurado *et al.*, 2012).

En este trabajo, se propone que *ETV5* se encuentra implicado en la regulación de la proliferación celular vía la regulación transcripcional de genes *ciclina D2*, *E2F* y *S6K1*.

Para realizar este proyecto se eligió la línea celular HEK293T, que son células embrionarias de riñón humano, sanas (no cancerígenas) donde la viabilidad y la proliferación celular no están afectadas, contrario a lo que pasa en tumores. Por otra parte, mediante esta línea celular se evalúa la proliferación independientemente de la insulina, contrario a lo que podría suceder en las INS1 (832/13).

- **Influencia de *ETV5* en el número de células**

Anteriormente, se había observado que en la línea celular INS1 (832/13) hay una reducción en el número de células después de suprimir al gen *ETV5* (Figura 1). Además, se había descrito que en ausencia de *ETV5*, la secreción de insulina se encuentra disminuida en dicha línea celular. Esta línea celular INS1 (832/13) es secretora de insulina, por lo que la reducción del número de células pudiera deberse a la disminución de la secreción de insulina (Gutierrez-Aguilar *et al.*, 2014), debido a que la insulina es un mitógeno, la cual actúa promoviendo a la proliferación celular. Para asegurarnos de que *ETV5* está implicado en la proliferación celular independientemente de insulina, se utilizó la línea celular HEK293T.

En la línea celular HEK293T, se observó que después de reducir al gen *ETV5*, el número de células era menor a las células controles, al observarse mediante el microscopio (Figura 12). Además, se comprobó el menor número de células por medio de conteo con cámara de Neubauer y del analizador celular Muse. Estos datos sugieren que la reducción de *ETV5* provocan un menor número de células y que esto podría ser regulado por medio de la proliferación celular.

- **Efecto de *ETV5* sobre la viabilidad, proliferación y apoptosis celular**

Al observarse un menor número de células, se evaluaron diferentes procesos celulares que pudieran estar afectados en ausencia de *ETV5*, tales como la viabilidad, la proliferación celular y la apoptosis celular.

Las células HEK293T con *ETV5* reducido, presentan un menor número de células, pero el porcentaje de viabilidad es igual a las células en presencia del gen, por lo que la disminución de células no se debía a la afectación de la viabilidad celular. Por lo tanto, se evaluó posteriormente la proliferación celular, y se encontró que las células en reducción de *ETV5* presentan una disminución de este parámetro en comparación con células en presencia de *ETV5* (Figura 15). Anteriormente, se había demostrado que la supresión de *ETV5* en células neuronales provoca una disminución en la proliferación celular (Paratore *et al.*, 2002). Por otra parte, existe evidencia de que al silenciar *ETV5* en células de cáncer mamario, éste juega un papel en proliferación, migración y la capacidad de invasión de las células cancerígenas (Firlej *et al.*, 2008). Por lo que todos estos datos coinciden con nuestros resultados y confirman la implicación de *ETV5* en la proliferación celular en las células HEK293T.

Los miembros de la familia ETS se han correlacionado con la progresión de tumores mediante la regulación positiva de la expresión de las proteasas degradadoras de la matriz y se ha estudiado que la sobre expresión de *ETV5* induce la difusión en líneas celulares de cáncer de endometrio (Monge *et al.*, 2007). Por otra parte, se ha estudiado que la sobre expresión de *ETV5*, detectada en células de cáncer de ovario, puede contribuir a la progresión del tumor ovárico a través de *ETV5* (Llaurado *et al.*, 2012).

Por medio de las células HEK293T, se pudo determinar que al encontrarse disminuido *ETV5*, la proliferación celular disminuyó en un 27%, esto independientemente de estímulos como la insulina o de factores involucrados en células cancerígenas y que interfieren en el ciclo celular. Esto es parte de la

primera fase de un proyecto; posteriormente se estudiará la implicación de *ETV5* en la proliferación celular en células INS1 (832/13), las cuales son secretoras de insulina.

La implicación de *ETV5* en la proliferación celular, podría ser otro mecanismo por el cual *ETV5* pudiera estar involucrado en el metabolismo y específicamente regular la secreción de la insulina por medio de la exocitosis (Gutierrez-Aguilar *et al.*, 2014). La proliferación celular en células pancreáticas β es importante, ya que para asegurar una buena producción de insulina, es necesario contar con una adecuada masa de células β , la cual se obtiene por medio de una buena proliferación celular y un tamaño apropiado de células β (Dor Brown *et al.*, 2004; Georgia y Bhushan *et al.*, 2004).

Por otra parte, se descartó que con *ETV5* disminuido, el menor número de células se deba a la apoptosis (Figura 17). Se sabe que la apoptosis es una forma de muerte celular programada, por lo que era posible que *ETV5* tuviera un impacto en este proceso. Sin embargo, observamos que no existe diferencia en la apoptosis en presencia o ausencia de *ETV5*. Por el momento no se ha reportado si *ETV5* influye de alguna manera en la apoptosis celular.

- **Posibles genes blanco de *ETV5*: ciclina D2, E2F1 y S6K1**

Al verse afectada la proliferación celular con *ETV5* disminuido, se estudiaron posibles genes blanco involucrados en el ciclo celular, específicamente en la fase G1-S, que pudieran estar regulados transcripcionalmente por *ETV5*.

Mediante un análisis *in silico*, se logró demostrar que los promotores de los tres genes blanco de *ETV5* propuestos: *ciclina D2*, *E2F1* y *S6K1*, presentan sitios de unión para factores de transcripción de la familia ETS, a la cual pertenece *ETV5*, sugiriendo un control transcripcional y regulación de *ETV5* sobre estos genes. Sin embargo, la predicción hecha *in silico* se debe de confirmar *in vitro*, para lo cual se midieron los transcritos de dichos genes por

medio de qPCR. Los resultados demostraron que la reducción de *ETV5* disminuye la expresión de *ciclina D2*. Tanto transcritos de E2F como S6K1, no presentaron un cambio significativo al estar *ETV5* reducido.

Anteriormente se había observado en un microarreglo realizado en músculo esquelético de ratones *ETV5* KO, el transcrito de *ciclina D2* se encuentra disminuido (Hippenmeyer *et al.*, 2007), lo cual podría apoyar el resultado que se obtuvo en la línea celular HEK293T. Por otra parte, se comparó el fenotipo de los ratones *ciclina D2* KO (Kushner *et al.*, 2005; Georgia *et al.*, 2004) con el de los ratones *ETV5* KO (Gutierrez-Aguilar *et al.*, 2014), observando un fenotipo muy similar. Esto sugiere que *ETV5* podría regular transcripcionalmente a *ciclina D2* por lo que los animales presentan el mismo fenotipo. Se pudo observar que efectivamente *ETV5* podría regular transcripcionalmente a *ciclina D2* en la línea celular HEK293. Por otra parte, se ha estudiado que *ETV5* activa varias cascadas de señalización que dan lugar a la expresión de *ciclinas D* y la posterior activación de genes diana *E2F*, promoviendo la progresión del ciclo celular (Taylor-Harding *et al.*, 2015).

Al regular transcripcionalmente *ETV5* a la *ciclina D2*, la progresión de la fase G1/S del ciclo celular se vería afectada, ya que, la proteína del retinoblastoma (pRB), que participa en el mecanismo que mantiene la división celular en G1 si es que existe una lesión en el ADN. La pRB hipofosforilada se une al factor de transcripción E2F, y mientras se mantienen unidos, E2F no puede promover la transcripción de los genes necesarios para la síntesis de ADN, así como de la *ciclina E*. En este estado el ciclo celular no puede pasar de G1 a S, sin embargo, éste mecanismo de bloqueo se elimina cuando la pRB es fosforilada primero por el complejo *ciclina D/Cdk4/Cdk6* y posteriormente por *ciclina E/Cdk2*, lo que ocurre como respuesta a una señal para que el ciclo celular continúe (Johnson y Walker *et al.*, 1999; Shackelford *et al.*, 2000; Bertoli *et al.*, 2013).

De igual manera, en un futuro se evaluará la afectación de la proliferación celular en las células INS1 (832/13), secretoras de insulina, ya que en otros estudios se ha demostrado que *ciclina D2* es esencial para la

expansión de la masa de células β en respuesta a un espectro de resistencia a la insulina (Georgia *et al.*, 2010).

8. Objetivos alcanzados

- ✓ Se logró optimizar la transfección de siRNA contra *ETV5* en las células HEK293T.
- ✓ Se realizó el conteo y medición de la viabilidad celular, así como la optimización de dichos ensayos en las células HEK293T transfectadas con siRNA contra *ETV5*.
- ✓ Se logró la medición de la proliferación celular, así como la optimización de la misma en células HEK293T transfectadas con siRNA contra *ETV5*.
- ✓ Se logró la medición de la apoptosis celular, así como la optimización de la misma en células HEK293T transfectadas con siRNA contra *ETV5*.
- ✓ Se realizó la extracción de ARN total y se realizó la reacción de transcriptasa reversa (RT-PCR).
- ✓ Se midieron diferentes transcritos mediante PCR en tiempo real:
 - *ETV5*
 - *ciclina D2*
 - *E2F1*
 - *S6K1*
 - *L32* (gen control)
- ✓ Se pudo demostrar la participación del factor transcripcional *ETV5* en la proliferación celular a través de sus posibles genes blanco *ciclina D2*.

9. Conclusión

La disminución de la expresión de *ETV5* redujo el número de células por medio de un proceso que involucra parcialmente a la proliferación celular vía la regulación transcripcional de la *ciclina D2*.

10. Perspectivas

Como se mencionó anteriormente, este estudio es parte de un gran proyecto que busca ver la implicación de *ETV5* en proliferación celular de las células INS1 (832/13). Anteriormente, se había visto que hay una reducción en el número de estas células después de suprimir al gen *ETV5* y que la secreción de insulina disminuía (Gutierrez-Aguilar *et al.*, 2014). Siendo la insulina una hormona que favorece la proliferación celular, se utilizó la línea celular HEK293T para ver el efecto de *ETV5* sobre la proliferación celular independientemente de la insulina.

A partir de los resultados obtenidos por este trabajo, donde se observó que *ETV5* pudiera estar afectando directamente la proliferación vía la regulación transcripcional de la *ciclina D2*, se evaluará en un futuro la influencia que tiene la insulina en la proliferación. Para esto se utilizará insulina exógena y se evaluará la proliferación celular en células HEK293T en presencia y ausencia de *ETV5*.

Por otra parte, en las células INS (832/13) en ausencia de *ETV5* se les añadirá insulina exógena para evaluar la proliferación celular. De esta forma, se estudiará si la insulina exógena ayuda a recuperar la proliferación celular en ausencia de *ETV5*. Finalmente, esto se hará con el objetivo de estudiar si la insulina pudiera ser indispensable para que *ETV5* ejerza su función sobre la secreción de insulina vía la modulación de la proliferación celular.

11. Anexos

Listado de reactivos			
Reactivo	No. catálogo	Marca	País de origen
Agente de transfección	T-2001-02	Dharmaphect	E.U.A.
Anexina V y muerte celular	MCH100105	EMD Millipore	E.U.A.
Conteo y viabilidad	MCH100102	EMD Millipore	E.U.A.
Expresión de genes, Taqman sonda CCND2 o ciclina D2	Hs00153380_m1	Thermo Fisher Scientific	E.U.A.
Expresión de genes, Taqman sonda E2F1	Hs00153451_m1	Thermo Fisher Scientific	E.U.A.
Expresión de genes, Taqman sonda EtV5	Hs00927557_m1	Thermo Fisher Scientific	E.U.A.
Expresión de genes, Taqman sonda RPL32 o L32	Hs00851655_g1	Thermo Fisher Scientific	E.U.A.
Expresión de genes, Taqman sonda S6K1	Hs00177357_m1	Thermo Fisher Scientific	E.U.A.
Isopropanol	I9516	Sigma Aldrich	E.U.A.
L-Glutamina	25030-081	GIBCO, Thermo Fisher Scientific	E.U.A.
Medio de cultivo DMEM Advanced	12491-015	GIBCO, Thermo Fisher Scientific	E.U.A.
Penicilina/ Estreptomicina	SV30010	Hyclone	E.U.A.
Proliferación Ki-67	MCH100114	EMD Millipore	E.U.A.
Purificación de ARN total	PP-2105	Jena Bioscience	Alemania
Síntesis de cADN	PCR-511XS	Jena Bioscience	Alemania
siRNA control	1027281	Qiagen	Alemania
siETV5	L-008894-00-0005	Dharmacon INC.	E.U.A.
Suero bovino fetal (FBS)	10438018	GIBCO, Thermo Fisher Scientific	E.U.A.

12. Referencias

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. 2002. Introducción a la biología celular. Omega. Capítulos 17 y 18.

Akagi Tadayuki, Satu Kuure, Kousuke Uranishi, Hiroshi Koide, Frank Costantini, & Takashi Yokota. 2015. ETS-related Transcription Factors ETV4 and ETV5 are involved in proliferation and induction of differentiation associated genes in embryonic stem (ES) cells. *The journal of biological chemistry* Vol. 290, NO. 37, pp. 22460–22473, September 11, 2015.

Ameisen J. 1996. The origin of programmed cell death. *Science*, 272:278 – 1279.

Annicotte, J. S., E. Blanchet, et al. 2009. The CDK4-pRB-E2F1 pathway controls insulin secretion. *Nat Cell Biol* 11(8): 1017-1023.

Bertoli C., Skotheim J.M., de Bruin R.A.M. 2013. Control of cell cycle transcription during G1 and S phases. *Nat. Rev. Mol. Cell. Bio.*14:518-528.

Blomen V. A., Boonstra J. 2007. Cell fate determination during G1 phase progression. *Cel. I Mol. LifeSci.* 64:3084-3104.

Burhans W.C., Heintz N.H. 2009. The cell cycle is a redox cycle: Linking phase-specific targets to cell fate. *Free Radical Bio. Med.*47:1282-1293.

Butler AE, Janson J, Bonner-Weir S, Ritzel R, Rizza RA & Butler PC. 2003. Beta-cell deficit and increased 392 beta-cell apoptosis in humans with type 2 diabetes. *Diabetes* 52 102-110.

Bustin S.A. 2000 Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol.* 2000. Oct;25(2):169-93.

Dor Y, Brown J, Martinez OI & Melton DA. 2004. Adult pancreatic beta-cells are formed by 405 self-duplication rather than stem-cell differentiation. *Nature* 429 41-46.

Duursma, A. y Agami, R. 2005. CDK-Dependent stabilization of Cdc6. *Cell cycle* 4:12. 1725 -1728.

Fajas, L., J. S. Annicotte. 2004. Impaired pancreatic growth, beta cell mass, and beta cell function in E2F1 (-/-) mice. *J Clin Invest* **113**(9): 1288-1295.

Fajas, L., R. L. Landsberg. 2002. E2Fs regulate adipocyte differentiation. *Dev Cell* **3**(1): 39-49.

Firlej, V., Franck Ladam, Guillaume Brysbaert, Patrick Dumont, François Fuks, Yvan de Launoit, Arndt Benecke & Anne Chotteau-Lelievre. 2008. Reduced

tumorigenesis in mouse mammary cancer cells following inhibition of Pea3- or Erm-dependent transcription. *J Cell Sci*, 121(Pt 20), pp.3393–3402.

Georgia, S. and A. Bhushan. 2004. Beta cell replication is the primary mechanism for maintaining postnatal beta cell mass. *J Clin Invest* 114(7): 963-968.

Georgia, Senta Hinault, Charlotte Kawamori, Dan Hu, Jiang Meyer, John Kanji, Murtaza Bhushan, Anil Kulkarni, Rohit N. 2010. Cyclin D2 Is Essential for the Compensatory-Cell Hyperplastic Response to Insulin Resistance in Rodents. *Diabetes*. 2010 Apr;59 (4):987-96. doi: 10.2337/db09-0838. Epub 2010 Jan 26.

Gutierrez-Aguilar, Dong-Hoon Ki, Marina Casimir, Xiao-Qing Dai, Paul T. Pfluger, Jongsun Park, April Haller, Elizabeth Donelan, Jisoo Park, David D'Alessio, Stephen C.Woods, Patrick E. MacDonald & Randy J. Seeley. 2014 The role of the transcription factor ETV5 in insulin exocytosis. *Diabetologia*, 57(2), pp.383–391.

Hippenmeyer, Roland M. Huber, David R. Ladle, Kenneth Murphy, & Silvia Arber. 2007 ETS Transcription Factor Erm Controls Subsynaptic Gene Expression in Skeletal Muscles. *Neuron*, 55(5), pp.726–740.

Hohmeier HE, Mulder H, Chen G, Henkel-Rieger R, Prentki M, Newgard CB. 2000 Isolation of INS-1-derived cell lines with robust ATP-sensitive K⁺ channel-dependent and -independent glucose-stimulated insulin secretion. *Diabetes* 49:424–430.

Hollenhorst, P.C., McIntosh, L.P. & Graves, B.J. 2011. Genomic and biochemical insights into the specificity of ETS transcription factors. *Annual review of biochemistry*, 80(1), pp.437–471.

Jocelyn E. Krebs, Elliott S. Goldstein, Stephen T. Kilpatrick. 2014. *Lewin's Genes XI*. Edición: 11 Har/Psc.

Johnson, D. y Walker, C. 1999. Cyclins and cell cycle checkpoints. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 39:295-312.

Kushner, J. A., M. A. Ciemerych. 2005. Cyclins D2 and D1 are essential for postnatal pancreatic beta-cell growth. *Mol Cell Biol* 25(9): 3752-3762.

Lewin B, Krebs JE, Goldstein ES, Kilpatrick ST. *Lewin's Essential Genes*. Sudbury, Massachusetts: Jones and Bartlett Publishers. 2010.

Lomanto Díaz, L.D., Ortiz Cala, O.L., Bretón Pinto, C.O., Gómez Lizcano, A.I., & Mesa Cornejo, V.M. 2003. Ciclo celular. *Med UNAB* 6 (16): 21-29.

Llaurado, M. Blanca Majem, Josep Castellví, Sílvia Cabrera, Antonio Gil-Moreno, Jaume Reventos, & Anna Ruiz. 2012 *Analysis of Gene Expression*

Regulated by the ETV5 Transcription Factor in OV90 Ovarian Cancer Cells Identifies FOXM1 Overexpression in Ovarian Cancer. *Molecular Cancer Research*, 10(7), pp.914–924.

Llaurado, M. 2012. ETV5 transcription factor is overexpressed in ovarian cancer and regulates cell adhesion in ovarian cancer cells. *International Journal of Cancer*, 130(7), pp.1532–1543.

Magnuson, B., B. Ekim. 2012. Regulation and function of ribosomal protein S6 kinase (S6K) within mTOR signalling networks. *Biochem J* 441(1): 1-21.

Malumbres M. 2011. Physiological relevance of cell cycle kinases. *Physiol. Rev.* 91:973-1007.

Malumbres M., Barbacid M. 2005. Mammalian cyclin-dependent kinases. *TRENDS Biochem. Sci.* 30:630-641.

Michael W. Pfaffl. Quantification strategies in real-time PCR 2004. pp.87–112. Jolla, L.

Meyuhas, O. and A. Dreazen. 2009. Ribosomal protein S6 kinase from TOP mRNAs to cell size. *Prog Mol Biol Transl Sci* 90: 109-153.

merckmillipore.com/MX/ (enero-2017).

Monge, M. 2007. ERM / ETV5 Up-regulation Plays a Role during Myometrial Infiltration through Matrix Metalloproteinase-2 Activation in Endometrial Cancer, (14), pp.6753–6760.

Morgan D. 1997. Cyclin dependent kinases: engines, clocks and microprocessors. *Annual review of cell development biology* 13: 261 – 291.

Murray A. y Marks D. 2001 Can sequencing shed light on cell on cell cycling? *Nature* 409: 844 – 846.

Norgaard GA, Jensen JN, Jensen J. 2003. FGF10 signaling maintains the pancreatic progenitor cell state revealing a novel role of Notch in organ development. *Dev Biol* 264:323–338.

Paratore, C. 2002. The Role of the Ets Domain Transcription Factor Erm in Modulating Differentiation of Neural Crest Stem Cells. *Developmental Biology*, 250(1), pp.168–180.

Pardee AB. G1 events and regulation of cell proliferation. 1989 *Science*. 246, 603 – 608.

Pedrola Davis, Núria Campoy. 2015. Nidogen 1 and Nuclear Protein 1 : novel targets of ETV5 transcription factor involved in endometrial cancer invasion. , pp.467–478.

- Pende, M., S. C. Kozma. 2000. Hypoinsulinaemia, glucose intolerance and diminished beta-cell size in S6K1-deficient mice. *Nature* 408(6815): 994.
- Real, S., N. Meo-Evoli. 2011. E2F1 regulates cellular growth by mTORC1 signaling. *PLoS One* 6(1): e16163.
- Rhodes CJ. 2005. Type 2 diabetes-a matter of beta-cell life and death? *Science* 307 380-384.
- Sangphil Oh, Sook Shin & Ralf Janknecht. 2012. ETV1, 4 and 5: An oncogenic subfamily of ETS transcription factors. Review. *Biochimica et Biophysica Acta* 1826 (2012) 1–12.
- Sementchenko, V.I. & Watson, D.K. 2000. Ets target genes : past , present and future.
- Shackelford R.E., Kaufmann W.K., Paules S.R. 2000. Oxidative stress and cell cycle checkpoint function. *Free Radical Bio. Med.* 28:1387-1404.
- Shen W.H. 2002. The plant E2F – Rb pathway and epigenetic control. *Trends plant sci.* 7,11.
- Shima, H., M. Pende. 1998. Disruption of the p70 (s6k)/p85(s6k) gene reveals a small mouse phenotype and a new functional S6 kinase. *Embo J* 17(22): 6649-6659.
- Taylor-Harding, Aspuria PJ, Agadjanian H, Cheon DJ, Mizuno T, Greenberg D, Allen JR, Spurka L, Funari V, Spiteri E, Wang Q, Orsulic S, Walsh C, Karlan BY, Wiedemeyer WR. 2015. Cyclin E1 and RTK/RAS signaling drive CDK inhibitor resistance via activation of E2F and ETS. *Oncotarget*, 6(2), pp.696–714.
- Teta M, Rankin MM, Long SY, Stein GM & Kushner JA. 2007. Growth and regeneration of adult beta 483 cells does not involve specialized progenitors. *Dev Cell* 12 817-826.
- Thorleifsson G, Walters GB, Gudbjartsson DF. 2009. Genome- wide association yields new sequence variants at seven loci that associate with measures of obesity. *Nat Genet* 41:18–24.
- Van Engeland M, Nieland LJ. 1998. Annexin V-affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. *Cytometry*. 1998 Jan 1;31(1):1-9.
- Vidales, R.N.1993. Ciclo celular, pp.1–9.
- William S. Klug, Michael R. Cummings. 2006. Conceptos de Genética. Ed. Prentice Hall Pearson. 5ª edición. pp: 25-36.