

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA
AGRONÒMICA I DEL MEDI NATURAL



Papel del sustrato 2 del receptor de insulina (IRS2) como mediador en la señalización de insulina/IGF-1 en hepatocarcinogénesis humana

TRABAJO FIN DE GRADO EN BIOTECNOLOGÍA

AUTORA: Sara Jordá Climent

TUTOR: Luke Noon

TUTOR ACADÉMICO: Francisco Marco Jiménez

Curso Académico: 2015-2016

VALENCIA, Julio de 2016





DATOS PERSONALES

Nombre y apellidos: SARA JORDÁ CLIMENT

DATOS DEL TRABAJO DE FIN DE GRADO

Título: “Papel del sustrato 2 del receptor de insulina (IRS2) como mediador en la señalización de insulina/IGF-1 en hepatocarcinogénesis humana”

Titulación: Grado en Biotecnología

Director: Luke Noon

Tutor académico: Francisco Marco Jiménez

Fecha de lectura: Julio, 2016

RESUMEN

El carcinoma hepatocelular (CHC) o hepatocarcinoma es una enfermedad altamente heterogénea e intratable, provocando una de cada tres muertes que suceden a causa del cáncer en el mundo. Esta gran tasa de mortandad ha sido atribuida por distintos estudios a la alta heterogeneidad de este tipo de cáncer y a la baja efectividad de las terapias actualmente en uso.

Enfermedades metabólicas como la obesidad y la diabetes constituyen factores de riesgo para CHC. Por este motivo, es necesario investigar en profundidad la relación que existe entre una señalización defectuosa de insulina y la hepatocarcinogénesis. En el Laboratorio de Factores de Crecimiento Metabólico y Medicina Regenerativa (CIPF, Valencia) se ha desarrollado un nuevo método para realizar un seguimiento de la expresión de IRS2; una proteína clave necesaria en la transmisión intracelular de la señalización de insulina y del factor de crecimiento insulínico 1 (IGF-1). Nuestros resultados preliminares indican que la expresión de IRS2 está enriquecida tanto en poblaciones de células madre cancerígenas de líneas celulares de CHC, como en tumores obtenidos por xenografts. Esto sugiere que IRS2 podría aumentar el potencial de diferenciación y tumorigenicidad de las células tumorales, y que por tanto, una expresión no-uniforme de IRS2 puede tener consecuencias importantes en el patrón de respuesta celular a insulina/IGF-1.

En base a estos datos, en este proyecto se han generado nuevas líneas celulares de CHC (HuH6 y Hep3B) en las que la expresión de IRS2 se encuentra silenciada o sobre-expresada. Se analizó la expresión génica de esta proteína en las líneas resultantes y se caracterizó el impacto de la expresión de IRS2 sobre el crecimiento celular, la capacidad proliferativa

independiente de anclaje y la capacidad de formación de colonias; con el objetivo de llegar a una mayor comprensión de la implicación de IRS2 en CHC.

PALABRAS CLAVE

IRS2, hepatocarcinoma, señalización de insulina, tumorigénesis

Abstract

Hepatocellular carcinoma (HCC) is an untreatable and highly heterogeneous malignancy responsible for one in three cancer related deaths worldwide. This high mortality rate has been attributed by several studies to the high heterogeneity of this cancer and the low effectiveness of therapies currently in use.

Metabolic diseases such as obesity and diabetes are independent risk factors for HCC and hence the link between aberrant insulin signalling and hepatocarcinogenesis warrant further investigation. In the Metabolic growth signals and regenerative medicine Laboratory (CIPF, Valencia) we have developed a novel method for tracking the expression of insulin receptor substrate 2 (IRS2), a key protein required for the intracellular transmission of insulin and insulin like growth factor-1 (IGF1) signalling. Our preliminary findings indicate that IRS2 is enriched in stem like cells within HCC cell lines and xenograft tumours suggesting they may have increased tumorigenic and differentiation potentials, and that non-uniform expression of IRS2 may have important consequences for the cellular patterning of the insulin/IGF1 response.

In this project we generate new HCC cell lines (HuH6 and Hep3B) in which IRS2 expression was silenced or overexpressed. The gene expression was analyzed and we characterized the impact of IRS2 expression on cell growth, anchorage-independent proliferation and colony formation capacity following the objective of getting a more detailed understanding of the role of IRS2 in HCC.

Key words

IRS2, hepatocellular carcinoma, insulin signaling, tumorigenesis

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar agradecer a Luke la oportunidad de haber realizado mi TFG en su laboratorio. Pero sobre todo, le agradezco su atención continua, sus consejos, y como no... ¡sus explicaciones sobre “campos de patatas”! No he podido tener un mejor tutor.

Gracias a todo el I-23, desde el primer día, me habéis hecho sentir como en casa. Y un nombramiento especial para Fátima, ¡mi profesora particular! Estoy más que encantada de haber coincidido en esto contigo. Muchas gracias por tu tiempo y tu atención, pero sobre todo, por lo mucho que me has enseñado.

Por supuesto, gracias a mis padres por su apoyo incondicional y su optimismo permanente, y por aguantar cada uno de mis discursitos científicos los viernes al volver a casa, intentando explicar qué hago debajo de la campana de cultivos.

En fin...está a punto de finalizar una bonita etapa, que me ha aportado tantísimas cosas, pero... ¡ya estoy intrigada por saber qué me depara la siguiente!

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. CÁNCER HEPATOCELULAR (CHC)	1
1.1.1. Características y factores de riesgo	1
1.1.2. Tratamiento del CHC	1
1.1.3. Heterogeneidad del CHC	2
1.2. OBESIDAD, DIABETES, Y CÁNCER HEPATOCELULAR.....	2
1.2.1. Señalización de insulina/IGF-1 a través del sustrato del receptor de insulina (IRS)....	3
1.2.2. Implicación del sustrato 2 del receptor de insulina (IRS2) en cáncer	4
1.3. MODELOS DE RESISTENCIA A INSULINA Y DE AUMENTO DE LA SENSIBILIDAD A INSULINA	5
1.3.1. Líneas celulares de CHC para establecer los modelos <i>in vitro</i>	6
1.3.2. Ensayos <i>in vitro</i> de tumorigénesis con los modelos establecidos.....	6
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	7
2.1. HIPÓTESIS INICIAL	7
2.2. OBJETIVOS DEL ESTUDIO	7
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	8
3.1. LÍNEAS CELULARES	8
3.2. VALIDACIÓN DEL CAMBIO EN LA EXPRESIÓN DE IRS2 EN CADA LÍNEA CELULAR	9
3.2.1. Obtención del pellet celular	9
3.2.2. Extracción de proteínas	9
3.2.3. Cuantificación de proteínas	9
3.2.3. Western Blot	10
3.2.4. Real-Time PCR	11
3.3. EXPERIMENTOS DE TUMORIGÉNESIS <i>IN VITRO</i>	11
3.3.1. Ensayo de proliferación (MTT).....	11
3.3.2. Ensayo de formación de colonias o clonogénesis.....	12
3.3.3. Ensayo de formación de colonias en agar blando	13
3.4. CARACTERIZACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE MARCADORES EMBRIONARIOS.....	13
3.4.1. Detección de proteínas por Western Blot	13
3.4.2. Ensayo de inmunofluorescencia sobre las colonias formadas por HuH6 con silenciamiento de IRS2	14
3.5. EXPERIMENTO DE DOSIS-RESPUESTA USANDO EL COMPUESTO NT157	15
3.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	16
4. RESULTADOS	16

4.1. VALIDACIÓN DE LAS MODIFICACIONES DE LAS LÍNEAS CHC.....	16
4.2. ENSAYOS DE TUMORIGÉNESIS <i>IN VITRO</i>	18
4.2.1 Caracterización de las líneas HuH6 y Hep3B con sobreexpresión del sustrato 2 del receptor de la insulina (IRS2).....	18
4.2.2. Caracterización de la línea HuH6 con silenciamiento del sustrato 2 del receptor de la insulina (IRS2).....	22
4.3. CARACTERIZACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE MARCADORES EMBRIONARIOS EN LA LÍNEA HuH6 sh-IRS2.....	25
4.4. EXPERIMENTO DE DOSIS-RESPUESTA UTILIZANDO EL COMPUESTO INHIBIDOR NT157 EN HuH6 Y Hep3B	28
5. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS	29
5.1. ANÁLISIS DEL EFECTO DE LA SOBREENPRESIÓN/SILENCIAMIENTO DE IRS2 EN LAS LÍNEAS CELULARES DE CHC.....	29
5.2. LIMITACIONES DE LOS EXPERIMENTOS <i>IN VITRO</i> CON LA LÍNEA HUH6 Y OPTIMIZACIÓN	31
5.3. CARACTERIZACIÓN DEL PERFIL DE DIFERENCIACIÓN DE LAS CÉLULAS HUH6 CON SILENCIAMIENTO DE IRS2.....	31
5.3. RESPUESTA DE HUH6 Y HEP3B FRENTE AL COMPUESTO NT157	32
6. CONCLUSIONES	33
7. BIBLIOGRAFÍA.....	34

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Transducción de señales en respuesta a la insulina..	4
Figura 2. Modelización <i>in vitro</i> de aumento de la sensibilidad a insulina y resistencia a insulina.	6
Figura 3. Esquema del proceso seguido en el ‘ensayo de proliferación (MTT)’	12
Figura 4. Diseño de la placa multipocillo para el experimento de ‘Ensayo de formación de colonias o clonogénesis’	12
Figura 5. Diseño del ensayo de inmunofluorescencia..	15
Figura 6. Resultado del Western Blot que valida las modificaciones de las líneas CHC.	17
Figura 7. Resultados de la RT-PCR que validan el silenciamiento de IRS2 en HuH6 y Hep3B..	17
Figura 8. Resultado promedio obtenido en los experimentos de MTT cuando se sobreexpresa IRS2 en Hep3B y HuH6..	18
Figura 9. Resultados obtenidos en el ensayo clonogénico de Hep3B con sobreexpresión de IRS2..	19
Figura 10. Resultados obtenidos en el ensayo clonogénico de HuH6 sobreexpresión de IRS2	20
Figura 11. Imágenes de los clones de células Hep3B y HuH6 con sobreexpresión de IRS2 fijados con cristal violeta.	22
Figura 12. Resultado promedio obtenido en los experimentos de MTT cuando se silencia IRS2 en HuH6.	23
Figura 13. Resultados obtenidos en el ensayo clonogénico de HuH6 silenciamiento de IRS2	24
Figura 14. Imágenes de los clones de células HuH6 con silenciamiento de IRS2 fijados con cristal violeta..	25
Figura 15. Resultado del estudio de marcadores en las líneas HuH6 con silenciamiento y sobreexpresión de IRS2..	26
Figura 16. Detección de los marcadores albúmina, Ck19 y EpCAM en colonias de HuH6 con silenciamiento de IRS2 por inmunofluorescencia.	28
Figura 17. Resultado del número de colonias obtenido en un experimento independiente, al tratar ambos modelos de CHC con diferentes concentraciones del inhibidor NT157 (0-4 μ M)..	29

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Resumen de las líneas HuH6 y Hep3B modificadas genéticamente utilizadas en este trabajo.....	9
Tabla 2. Relación de anticuerpos primarios utilizados en el Western Blot	10
Tabla 3. Anticuerpo secundario utilizado en el Western Blot.	11
Tabla 4. Relación de anticuerpos primarios utilizados para la detección de marcadores embrionarios en las células de CHC.....	14
Tabla 5. Relación de anticuerpos primarios utilizados en el ensayo de inmunofluorescencia en colonias de la línea celular HuH6 sh.	14
Tabla 6. Concentraciones del compuesto inhibidor NT157 añadidas a cada pocillo.....	15
Tabla 7. Marcadores embrionarios y de diferenciación elegidos para el estudio.	26

NOMENCLATURA Y ABREVIATURAS

BSA	Albúmina sérica bovina
CHC	Cáncer hepatocelular
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMT2	Diabetes mellitus tipo 2
EDTA	Ácido etildiaminotetraacético
FBS	Suero bovino fetal
GFP	Proteína fluorescente verde
HRP	Peroxidasa de rábano
HuH6/Hep3B GFP	Línea celular HuH6 o Hep3B con sobreexpresión de GFP
HuH6/Hep3B IRS2	Línea celular HuH6 o Hep3B con sobreexpresión de IRS2 de ratón
HuH6/Hep3B sh-IRS2	Línea celular HuH6 o Hep3B con silenciamiento del gen IRS2 por <i>small hairpin RNA</i>
HuH6/Hep3B sh-luc	Línea celular HuH6 o Hep3B con silenciamiento del gen luciferasa por <i>small hairpin RNA</i>
IRS2	Sustrato 2 del receptor de insulina
IGF-1	Factor de crecimiento insulínico-1
MTT	Bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5- difeniltetrazol
NaCl	Cloruro sódico
O/N	Overnight
PBS	Tampón fosfato salino
PVDF	Fluoruro de polivinilideno
RPMI	Roswell Park Memorial Institute medium
RT	Temperatura ambiente
RT-PCR	PCR en tiempo real
SD	Desviación estándar
TBST	Tampón salino Tris-Tween 20

1. INTRODUCCIÓN

1.1. CÁNCER HEPATOCELULAR (CHC)

1.1.1. Características y factores de riesgo

El cáncer hepatocelular (CHC) es el sexto tipo de cáncer maligno más común, estimándose que cada año se diagnostican más de medio millón de casos (Figura 1). Además, supone la segunda causa de muerte por cáncer en el mundo, siendo la principal causa de mortalidad en pacientes con cirrosis. Por tanto, la baja tasa de supervivencia de quien padece CHC pone de manifiesto la importancia de investigar en este tipo de cáncer (Ferlay *et al.*, 2014) (Waghray *et al.*, 2015).

Se distinguen varios tipos de cáncer hepático, según cuando se desarrolle el tumor o en qué tipo de células del hígado. El hepatoblastoma (HB) y el hepatocarcinoma o cáncer hepatocelular (CHC) son los dos tipos más comunes, representando hasta el 96% de los tumores hepáticos en humanos (Roebuck y Perilongo, 2006). HB es un tipo de cáncer primario hepático muy raro y agresivo, que afecta generalmente a niños de corta edad, originado a partir de células madre hepáticas. El CHC aparece a partir de la transformación de hepatocitos (células maduras del hígado) en pacientes adultos. Es el cáncer primario de hígado más común, por ello es habitual que para referirse al cáncer hepático se hable directamente de CHC (Di Masi *et al.*, 2010).

Respecto a las características epidemiológicas de este tipo de cáncer, destacan las variaciones en la incidencia de la enfermedad, según la región geográfica y el sexo del paciente: aproximadamente el 83% de los casos de cáncer hepático se dan en los países menos desarrollados, con especial incidencia en Asia y África. Además, el CHC afecta de 2 a 4 veces más a hombres que a mujeres (Ferlay *et al.*, 2014).

Otra condición clave para el desarrollo de la enfermedad es la presencia de determinados factores de riesgo ambientales que han sido definidos de manera precisa. Los mecanismos que conducen a hepatocarcinogénesis no suelen darse en un hígado sano, no obstante, el riesgo de padecer CHC aumenta rápidamente en un contexto de hígado cirrótico; en el que el órgano alcanza un estado de gran deterioro (El-Serag y Rudolph, 2007). La ingesta continuada de alcohol, la hepatitis B y C o la enfermedad del hígado graso no alcohólico (EHGNA), son algunos de los factores más comunes que pueden causar cirrosis. Por tanto, su presencia se convierte en un factor de riesgo potencial para el desarrollo de un CHC (Noureddin y Rinella, 2015).

1.1.2. Tratamiento del CHC

El CHC es una enfermedad con un pronóstico muy poco favorable para la que no existen terapias efectivas de tratamiento. El tratamiento suele estar basado en terapias quirúrgicas, como la resección, el trasplante o la ablación transarterial o percutánea. Existen tratamientos de quimioterapia o radioterapia, pero suelen usarse con un carácter paliativo; como terapias curativas son muy poco efectivas, dado que este tipo de tumor es muy resistente a la quimioterapia convencional. Sin embargo, el CHC suele diagnosticarse en estadios avanzados, cuando el tratamiento quirúrgico tiene una eficacia muy limitada, y se opta por el uso de quimioterapia, muy poco efectiva en estos casos, reduciendo así la tasa de éxito. Por tanto, es evidente la necesidad de desarrollar nuevas estrategias de tratamiento y herramientas terapéuticas más efectivas. (Avila *et al.*, 2006) (Llovet, Burroughs y Bruix, 2003).

1.1.3. Heterogeneidad del CHC

El CHC se describe como un tipo de cáncer muy heterogéneo en el que diversos factores juegan un papel muy importante. Entre estos factores se encuentran el nivel de angiogénesis (determinará el tamaño del tumor), la composición proteica de la matriz extracelular (relacionada con el carácter invasivo del tumor), el microambiente inmunológico y las diferentes poblaciones de células tumorales que se pueden encontrar.

Pero no sólo se ha descrito su heterogeneidad a nivel fenotípico (tisular), sino que también existe heterogeneidad intratumoral. Entre las células que forman un mismo tumor, se encuentran diferencias de expresión génica y variaciones genéticas, que alteran rutas de señalización intracelular relacionadas con la proliferación, apoptosis y crecimiento celular; que podrían inducir a las células madre cancerosas y contribuir a la progresión tumoral. Esta peculiaridad dificulta aún más el tratamiento de este tipo de cáncer, por lo que comprender la heterogeneidad del CHC y los mecanismos moleculares que rigen su progresión, ayudará en el desarrollo de estrategias de tratamientos personalizados (Jeng *et al.*, 2015).

1.2. OBESIDAD, DIABETES, Y CÁNCER HEPATOCELULAR

Estudios epidemiológicos sugieren que la obesidad y la diabetes mellitus tipo 2 (DMT2) están relacionadas positivamente con el riesgo de padecer varios cánceres, entre ellos, cáncer de hígado. Estas enfermedades metabólicas pueden provocar el desarrollo de EHGNA y la aparición de cirrosis, el principal factor de riesgo para el desarrollo de CHC. (Ampuero y Romero-Gómez, 2015). Pero además, la resistencia a insulina, la hiperinsulinemia (concentración elevada de insulina en sangre), y los niveles altos de IGF-1; característicos de estos desórdenes metabólicos, parecen establecer una asociación entre obesidad, diabetes, y cáncer.

La insulina secretada por las células β pancreáticas regula la homeostasis de la glucosa mediante la estimulación de la incorporación de la glucosa por tejidos periféricos, la supresión de la secreción de ácidos grasos por el tejido adiposo y la inhibición de la producción de glucosa por el hígado. La resistencia a la acción periférica de la insulina está asociada a una gran variedad de desajustes metabólicos que incluyen obesidad y diabetes tipo II. En el caso de la obesidad, la resistencia a insulina se correlaciona de manera muy significativa con esta enfermedad, pero todavía no se ha determinado si es la causa o la consecuencia de la obesidad. En la DMT2 la resistencia a insulina es un paso previo a la aparición de la enfermedad, ya que al verse reducido el paso de glucosa en las células, los pacientes con resistencia a insulina presentan también niveles altos de glucosa en sangre (hiperglucemia) y pueden llegar a desarrollar diabetes. En ambas enfermedades, la resistencia a insulina conduce a una hiperinsulinemia crónica. Los niveles de insulina aumentan, como respuesta del páncreas frente a la resistencia a insulina, que produce más insulina; para tratar de mantener un nivel homeostático de glucosa en sangre y evitar así la hiperglucemia. (Font de Mora Saínz y Burks, 2001).

Debido al aumento drástico de pacientes con estos trastornos metabólicos en las últimas décadas, intentar esclarecer la relación que existe entre cambios en la respuesta a insulina y el riesgo de desarrollar cáncer, así como su impacto en la progresión tumoral; se ha convertido en una investigación de gran interés (Cohen y LeRoith, 2012).

1.2.1. Señalización de insulina/IGF-1 a través del sustrato del receptor de insulina (IRS)

Cambios en la señalización de insulina y de IGF-1 están estrechamente relacionados con la aparición de enfermedades metabólicas, el crecimiento y la proliferación celular, así como el desarrollo de cáncer hepatocelular (Boissan *et al.*, 2005). La insulina y el factor de crecimiento insulínico-1 (IGF-1) son hormonas estructural y funcionalmente similares, involucradas en la regulación de vías metabólicas y procesos de desarrollo. La insulina es producida por las células β del páncreas y su síntesis está principalmente regulada por los niveles de glucosa presentes en la sangre, para mantener una homeostasis metabólica. El IGF-1 es producido sobretodo en el hígado. Estas moléculas median sus efectos celulares a través de la activación del receptor de la insulina (IR), expresado en hígado, músculo y tejido adiposo; y el receptor de IGF-1 (IGF-1R), que se expresa en la mayoría de los tejidos del cuerpo. Cada hormona se une con elevada afinidad a su receptor principal, aunque debido a la homología entre receptores y también entre los sustratos, el IGF-1 puede unirse, con menor afinidad al receptor de la insulina, y la insulina al IGF-1R (Enguita-Germán M., 2014).

La unión de la insulina/IGF-1 con su receptor, que posee una actividad tirosín-quinasa intrínseca, provoca su autofosforilación. A continuación, se desencadena el reclutamiento y la activación de las proteínas celulares transductoras de señal, principalmente miembros de la familia del sustrato del receptor de insulina (IRS). Las proteínas IRS (1-4) son una familia de proteínas mediadoras citoplasmáticas que transmiten señales desde IR e IGF-1R, provocando una respuesta celular. La familia de proteínas IRS está integrada por al menos cuatro miembros, pero en humano sólo se ha detectado la expresión de IRS-1,2 y 4. IRS-1 e IRS-2 están expresadas de manera ubicua, y son los principales mediadores de la mitogénesis como respuesta a la señal de insulina, y la regulación del metabolismo de la glucosa (Shaw, 2011). Las proteínas IRS-1 y IRS-2 actúan como moléculas enlazantes entre el receptor de insulina y el receptor de IGF-1 y una red compleja de moléculas de señalización intracelular que presentan dominios SH2. Tras su fosforilación, las IRS se unen a las proteínas efectoras. Entre ellas, destacan la subunidad reguladora de la quinasa lipídica fosfatidilinositol-3-quinasa (PI3K), Grb2, Nck y la fosfatasa SHP2. Los productos de PI3K activan a su vez, vías relacionadas con la activación de procesos metabólicos, antiapoptóticos y de síntesis proteica, entre otros. Así, el entramado de señalizaciones mediadas por las proteínas IRS regulan los efectos pleiotrópicos de la insulina y el IGF-I en las distintas funciones celulares. (Font de Mora Saínez y Burks, 2001) (Sesti, 2001) (Cohen y LeRoith, 2012).

Por tanto, cambios en la expresión o función de las proteínas IRS, pueden dar lugar a una señalización aberrante con múltiples consecuencias en las vías en las que están involucradas.

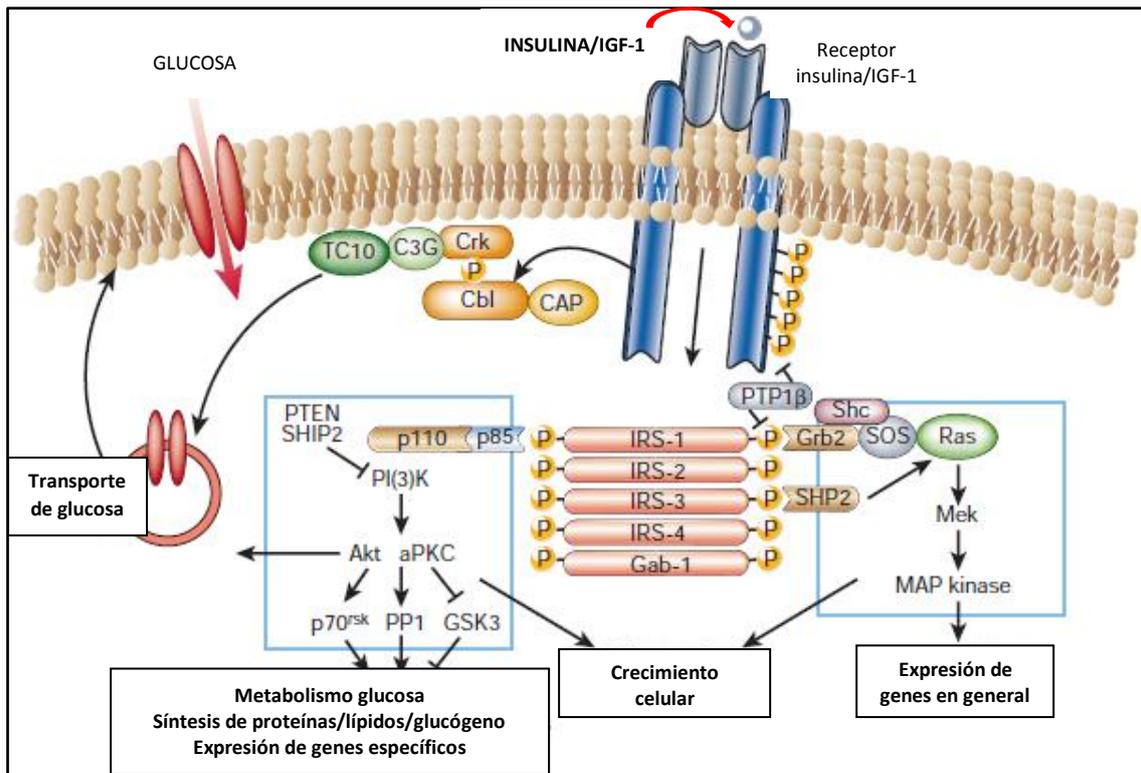


Figura 1. Transducción de señales en respuesta a la insulina. El receptor de insulina se autofosforila y cataliza la fosforilación de proteínas celulares de la familia IRS, entre otros. Una vez son fosforiladas por el receptor, estas proteínas interactúan con moléculas efectoras, a través de dominios SH2, desencadenando la activación de varias vías de señalización, incluyendo la activación de PI(3)K y PIP3, Ras y la cascada de MAPK. Estas rutas actúan de forma coordinada en la síntesis de proteínas, en la activación/desactivación de enzimas, y expresión génica; que resultan en la regulación del metabolismo de la glucosa, lípidos y proteínas (Adaptado de Saltiel y Kahn, 2001).

1.2.2. Implicación del sustrato 2 del receptor de insulina (IRS2) en cáncer

La sobreexpresión de IRS2 se ha relacionado con una mayor agresividad en distintos tipos de cáncer, confiriéndoles mayores capacidades de movilidad e invasión. Este comportamiento se ha descrito en cáncer de mama (Dearth *et al.*, 2006), cáncer gástrico (Zhao *et al.*, 2012) y de colon (Zhang *et al.*, 2015), entre otros.

El sustrato 2 del receptor de insulina (IRS2) es el principal efector de la señalización de insulina en el hígado, sin embargo, su papel en el desarrollo de cáncer hepático (hepatocarcinogénesis), no se ha establecido. Estudios realizados por Boissan *et al.* (2005), determinaron que IRS2 está sobreexpresado en dos modelos murinos de hepatocarcinogénesis, durante las etapas iniciales preneoplásicas; y también en muestras humanas de pacientes con CHC, lo que sugiere que IRS2 contribuye a la progresión del tumor hepático.

Por otro lado, también se han estudiado los efectos de la supresión de este gen en varios cánceres. Se ha visto que una menor expresión de IRS2 reduce la progresión de osteosarcomas y de cáncer de próstata, tanto *in vitro* como en modelos *in vivo* (Garofalo *et al.*, 2015). El efecto de la ausencia de IRS2 en cáncer hepatocelular no se conoce.

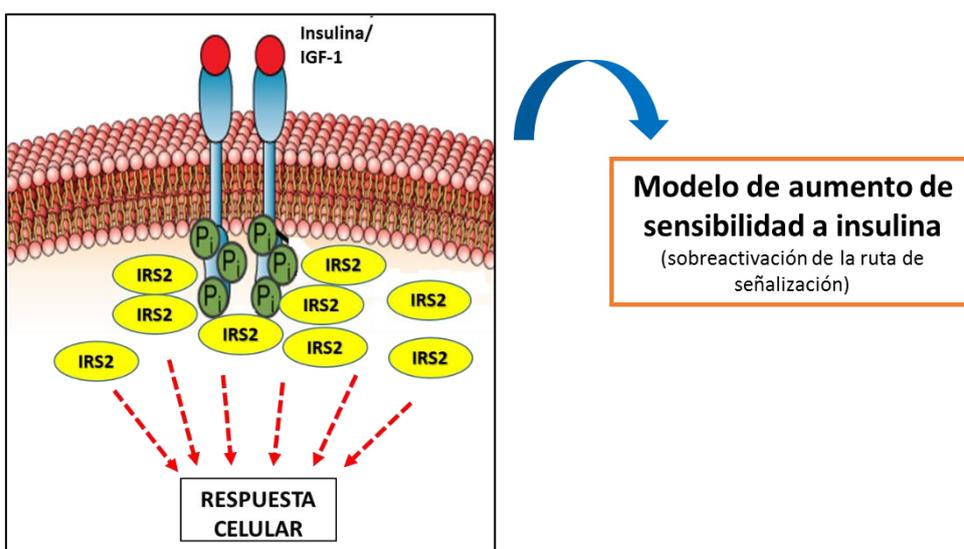
Todos estos estudios revelan que IRS2 juega un papel importante en el desarrollo y en la progresión tumoral, por ello, es interesante el estudio de su papel en hepatocarcinogénesis humana, así como en la progresión y la agresividad del CHC.

1.3. MODELOS DE RESISTENCIA A INSULINA Y DE AUMENTO DE LA SENSIBILIDAD A INSULINA

Diversos estudios avalan que la modificación de la expresión génica de IRS2 en las células, resulta en cambios en la sensibilidad/resistencia a insulina. En el estudio realizado por Withers D.J. et al. (1998) se obtuvieron ratones *knock-out* para IRS2 (IRS2^{-/-}) y éstos, ya en etapas tempranas de desarrollo, desarrollaron resistencia a insulina periférica y diabetes, debido a la pérdida de función de las células-β del páncreas. En cambio, no presentaban un tamaño menor, lo que sugiere que la proteína IRS2 endógena ejerce su función principalmente debajo del receptor de insulina. Estos resultados demuestran que IRS2 juega un papel fundamental como mediador en esta ruta de señalización de insulina y que su presencia en la célula es necesaria para poder generar una respuesta normal a la señal. Por otro lado, una sobreexpresión de IRS2 provocará un aumento de la respuesta celular a la señal, sobreactivando las vías aguas abajo en la señalización, de igual manera que sucede cuando una célula se vuelve más sensible a la señal de insulina.

En este contexto, en el presente estudio se propone el establecimiento de dos modelos *in vitro* de CHC que, mediante la regulación de la expresión de IRS2 en las células, se imite una respuesta celular a insulina aberrante (mayor o menor respuesta celular).

Nuestro modelo de aumento de sensibilidad a insulina, en el que la señalización de insulina/IGF-1 está hiper-activada; se obtiene mediante la sobreexpresión de IRS2 exógena (IRS2 de ratón). En este estudio se asume que, una mayor concentración de IRS2 en las células causará una sobreactivación de las vías de señalización aguas abajo de los receptores de insulina (y de los receptores de IGF-1, probablemente), sin necesidad de la presencia de elevadas concentraciones de los sustratos. Por otro lado, se asume que el modelo de resistencia a insulina presenta una inhibición de la señal de insulina, al silenciar el gen endógeno de IRS2 (haciendo un '*knockdown*'). La Figura 2 representa los dos modelos *in vitro* asumidos en este trabajo al modificar la expresión génica de IRS2.



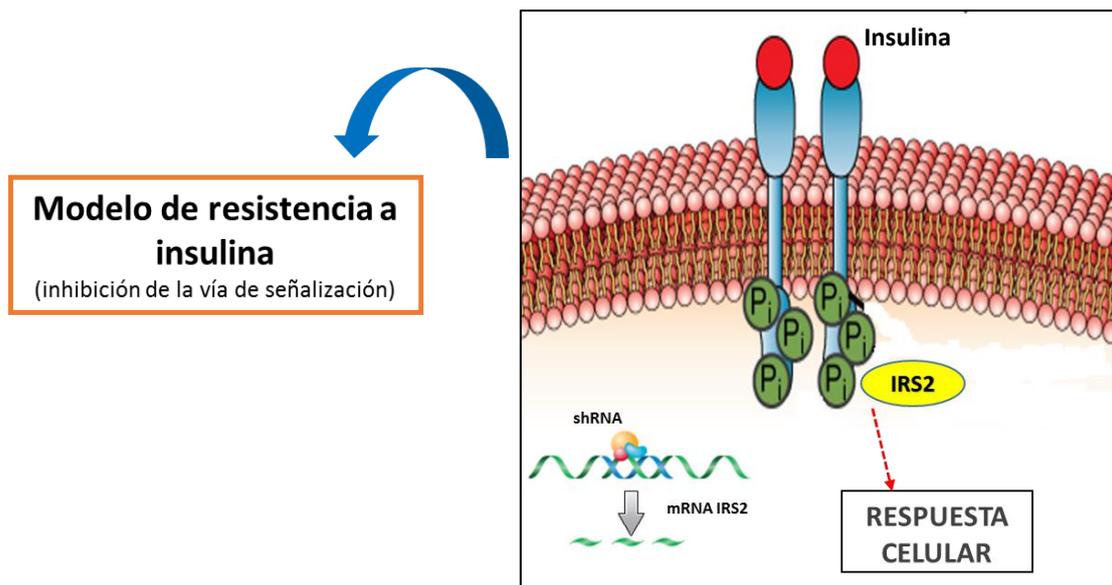


Figura 2. Modelización *in vitro* de aumento de la sensibilidad a insulina y resistencia a insulina. Una hiper-activación de la ruta de señalización de insulina se consigue mediante la sobreexpresión del sustrato 2 del receptor de insulina. La inhibición de la señal, se consigue gracias a un silenciamiento del gen endógeno IRS2.

1.3.1. Líneas celulares de CHC para establecer los modelos *in vitro*

Con la finalidad de establecer estos modelos se utilizaron dos líneas celulares de cáncer hepático: HuH6 y Hep3B. Las células **HuH6** son un modelo de hepatoblastoma humano que proceden de un niño de corta edad. Se trata de células precursoras de hepatocitos (hepatoblastos) transformadas. En cultivo son adherentes, crecen en monocapa y generalmente presentan una morfología epitelial, no obstante, según la densidad a la que se encuentren las células en cultivo, presentan cierta heterogeneidad morfológica, observándose células que adoptan una morfología mesenquimal. **Hep3B** es una línea celular derivada de un hepatocarcinoma humano (son hepatocitos transformados). Las células en cultivo presentan una morfología epitelial, y crecen en monocapa adheridas al sustrato. Como productos celulares destaca la síntesis de α -fetoproteína (AFP), el antígeno de superficie de la Hepatitis B, y albúmina, entre otros. Esta línea tiene integrado el genoma del virus de la Hepatitis B y presenta una mutación en el gen supresor de tumores p53.

La elección de estas dos líneas celulares de CHC de distinto origen, permitirá estudiar *in vitro* el efecto que producen los cambios en la señalización de insulina/IGF-1 sobre células procedentes de los dos tipos de cáncer hepático más comunes.

1.3.2. Ensayos *in vitro* de tumorigénesis con los modelos establecidos

Para evaluar la tumorigenicidad *in vitro* de los modelos de CHC establecidos se eligieron los siguientes ensayos, cada uno de ellos relacionado con alguno de los aspectos clave de las células cancerosas:

- **Ensayo de MTT:** relacionado con la proliferación y supervivencia celular. El MTT es un ensayo colorimétrico basado en la reducción metabólica del Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-

2,5-difeniltetrazol (MTT) en un compuesto azul insoluble (formazán), por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa de células metabólicamente activas. La cantidad de células vivas es proporcional a la cantidad de formazán producido, por tanto, mediante este ensayo se puede hacer una aproximación de cómo cambiar el perfil proliferativo de las células tener IRS2 sobreexpresada o silenciada.

- **Ensayo de formación de colonias o clonogénesis.** Permite determinar la capacidad de dividirse sin permanecer en contacto con otras células, es decir, sin señalización intercelular. Las células se siembran a una densidad celular muy baja y se estudia su capacidad de proliferación en estas condiciones, imitando lo que ocurre cuando una célula transformada escapa del órgano e invade otros órganos y sigue proliferando. Es por tanto, una aproximación *in vitro* al proceso de metástasis. El ensayo clonogénico permitirá evaluar diferencias, al modificar la expresión de IRS2, en la capacidad de formar colonias de ambas líneas de CHC.
- **Ensayo de formación de colonias en agar blando (*soft agar*).** Permite evaluar la capacidad de una célula de formar una colonia *in vitro* sin estar adherida a un sustrato. Es una manera de imitar *in vitro*, a las células tumorales que se separan del tumor y viajan por el torrente sanguíneo, sin estar en contacto con la matriz extracelular. Las células normales no son capaces de crecer sin mantener uniones con otras células y con la matriz extracelular, es decir, son anclaje-dependientes. Si pierden las uniones entran en un proceso apoptótico particular llamado anoikis. Sin embargo, las células transformadas (cancerosas) tienen la capacidad de crecer y dividirse sin estar unidas a un sustrato e independientemente del ambiente que las rodea. En este ensayo, las células crecen sobre una capa de agar mezclada con medio de cultivo que yace sobre otra capa de agar blando, también mezclada con medio de cultivo, pero con una concentración mayor de agar. Esto previene que las células se adhieran a la placa de cultivo, y permite que las células tumorales formen colonias visibles en el agar. El objetivo es determinar si hay cambios en estas líneas de CHC, en la capacidad de crecer sobre agar, al tener una sobreexpresión o un silenciamiento de IRS2.

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1. HIPÓTESIS INICIAL

El presente trabajo se diseñó con la siguiente hipótesis: la hiperactivación de la señalización de insulina/IGF-1 en líneas celulares CHC (sobreexpresión de IRS2) provocará un aumento en la tumorigenicidad de las mismas. Mientras que, la reducción o supresión de la señalización de insulina/IGF-1 (silenciamiento del gen IRS2), reducirá el carácter tumorigénico de estas células cancerosas.

2.2. OBJETIVOS DEL ESTUDIO

El objetivo principal de este trabajo es estudiar cómo afectan cambios en la señalización de insulina a la tumorigenicidad de líneas celulares procedentes de cáncer hepático humano,

estableciendo dos modelos *in vitro* para el estudio: un modelo de aumento de la sensibilidad a insulina y un modelo de resistencia a insulina.

Con este fin, se plantean los siguientes objetivos concretos:

- 1) Desarrollar y validar en las líneas celulares HuH6 y Hep3B (i) una expresión estable de IRS2 exógena y (ii) un silenciamiento (*knockdown*) estable del gen IRS2 endógeno.
- 2) Establecer las condiciones óptimas para analizar el crecimiento de HuH6 y Hep3B mediante los ensayos de (i) MTT, (ii) clonogénesis y (iii) formación de colonias sobre agar blando.
- 3) Analizar el efecto del silenciamiento/sobreexpresión de IRS2 en la proliferación celular, la capacidad de formar colonias y el crecimiento independiente de anclaje, de HuH6 y Hep3B.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. LÍNEAS CELULARES

En este trabajo se utilizaron las siguientes líneas celulares:

- **HuH6 y Hep3b con sobreexpresión de IRS2 de ratón (HuH6 IRS2 y Hep3B IRS2).** Estas células eran portadoras de un plásmido con la construcción del promotor de IRS2 seguido del gen de IRS2 de ratón, introducido en las células mediante infección con lentivirus.
- **HuH6 y Hep3B con silenciamiento del gen IRS2 (HuH6 sh-IRS2 y Hep3B sh-IRS2) con silenciamiento del gen IRS2.** Estas células presentaban un silenciamiento de la expresión de IRS2 endógena mediante shRNA introducido en las células por infección lentiviral. Además, estas células expresan GFP y un gen que les confiere resistencia a puromicina que sirve como selección positiva de las células en cultivo. Conseguir un silenciamiento estable en el tiempo en la línea Hep3B fue más difícil, así que en este estudio se validó la modificación genética de esta línea, pero no se llegaron a realizar los ensayos *in vitro* por falta de tiempo.

Para cada caso se utilizó una determinada línea como control de infección, es decir, una línea celular que ha sufrido el mismo proceso de infección pero sin causar variaciones en la expresión basal de IRS2 de la misma.

- Control de la sobreexpresión: líneas HuH6 y Hep3B infectadas por lentivirus portadores de un plásmido con la construcción promotor de IRS2 seguido del gen de la proteína fluorescente verde (GFP).
- Control del silenciamiento: líneas HuH6 y Hep3B con el shRNA que provoca el silenciamiento del gen de la luciferasa (gen ausente en el genoma de estas células). Las células expresan también GFP y el gen de resistencia a puromicina.

La tabla 1 recoge el resumen de las líneas celulares utilizadas en este trabajo y sus respectivas líneas control.

Tabla 1. Resumen de las líneas HuH6 y Hep3B modificadas genéticamente utilizadas en este trabajo.

	SOBREEXPRESIÓN IRS2 (Modelo <i>in vitro</i> de aumento de sensibilidad a insulina)	SILENCIAMIENTO IRS2 (Modelo <i>in vitro</i> de resistencia a insulina)
Línea modificada:	HuH6/Hep3B IRS2	HuH6 sh-IRS2
Línea control:	HuH6/Hep3B GFP	HuH6 sh-luc

Las células se mantuvieron en cultivo usando medio Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) en el caso de las líneas HuH6 y medio Roswell Park Memorial Institute (RPMI 1640) para las células Hep3B; ambos suplementados con un 10% de suero bovino fetal inactivado por calor (FBS) y 1X de antibiótico-antimitótico (10.000U/ml penicilina y 10.000ug/ml estreptomycin) a 37°C en atmósfera húmeda con 5% CO₂. Realizando pases 1:20 para HuH6 y 1:6 para Hep3b cada 2-3 días. En el caso de HuH6 sh-luc y sh-IRS2 se añadió también 3-5 µl de puromicina en cada pase o cambio de medio, para asegurar la selección positiva de las células infectadas con los lentivirus. Todos los reactivos fueron adquiridos de la casa comercial Life Technologies.

3.2. VALIDACIÓN DEL CAMBIO EN LA EXPRESIÓN DE IRS2 EN CADA LÍNEA CELULAR

3.2.1. Obtención del pellet celular

Las células en cultivo se levantaron usando tripsina 0.05% (try/EDTA 1X; Life Technologies) dejándola actuar en el incubador a 37°C durante 6 min. Se centrifugaron durante 5 min a 1.000 rpm, el pellet se lavó con PBS 1X y se almacenó a -80°C.

3.2.2. Extracción de proteínas

Las proteínas se extrajeron de los pellets celulares que se mantuvieron continuamente en hielo para mantener su integridad. Los pellets se resuspendieron en una solución de lisis (Tris-HCl 1M pH 7.5, NaCl 1M, NP40 Lp Gul, Tween 20) con inhibidores de proteasas. A continuación, las muestras se sonicaron (3 ciclos de 10 s de sonicación, 15 s en hielo). Después de 40 min de reposo en hielo, se centrifugaron los lisados durante 15 min a 4°C y 13.000 rpm y el sobrenadante se almacenó a -80°C.

3.2.3. Cuantificación de proteínas

La cuantificación proteica se llevó a cabo usando un ensayo colorimétrico (BCA Protein Assay Kit; Thermo Scientific). De manera simultánea, se cuantificaron una serie de diluciones estándar con BSA a diferentes concentraciones, para establecer una curva patrón. La placa se incubó a 37°C en oscuridad durante 30 min y se midió la absorbancia a 560 nm en un lector de placas (Multiskan FC; Thermo Scientific). Las concentraciones proteicas se determinaron usando el método de la curva estándar de BSA.

3.2.3. Western Blot

Electroforesis: Las proteínas se diluyeron con tampón de carga 6X (TrisHCl 1M pH 6.8, SDS, Glicerol, Azul de bromofenol 0,03%, β -mercaptoetanol) normalizando hasta una concentración final de 50 μ g. A continuación, se desnaturalizaron hirviéndolas a 96°C durante 10 min. Para separar las proteínas mediante electroforesis, se preparó un gel de acrilamida (4,5% la fase inicial y 7% la fase de separación de las proteínas) y se utilizó el sistema Mini Protean (Bio-Rad) en tampón de electroforesis (Tris 25 mM, glicina 192 mM, SDS 3,5 mM). Inicialmente se dejó correr las muestras a 60 V hasta que el conjunto de proteínas recorrió la primera fase del gel. Una vez entraron en la segunda fase, la corriente eléctrica se ajustó hasta los 120 V durante 1:30 h controlando el avance de las proteínas y finalizando el proceso cuando el frente salió del gel. Como marcador de peso molecular se utilizó Precision Plus Protein Kaleidoscope (Bio-Rad).

Transferencia: Las proteínas embebidas en el gel se transfirieron a una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF; Bio-Rad) previamente activada con metanol durante 5 min y equilibrada en tampón de transferencia (Tris 25 mM, glicina 192 mM, 10% metanol, 0,1% SDS (v/v)). El gel y la membrana se prepararon juntos en un “sándwich” cubiertos con papel Whatmann y esponjas. La cubeta de transferencia se rellenó con el mismo tampón y las proteínas fueron electrotransferidas a 120 V durante 2 h en cámara fría a 4°C.

Bloqueo y detección: Una vez realizada la transferencia, la membrana se bloqueó con solución de bloqueo BSA 3% con TBS-T 1X (Tris 20 mM ph 7.5, NaCl 0,15 mM, Tween 20 0,1%) durante 1 h aproximadamente a temperatura ambiente (RT). Posteriormente, se fragmentó para incubar cada región de la membrana con el anticuerpo primario correspondiente (Tabla 2) diluidos en solución de bloqueo. A continuación se realizaron 6 lavados de las membranas con TBST 1X cada 5 min. Tras los lavados, la membrana se incubó con el anticuerpo secundario anti-IgG de ratón conjugado a peroxidasa de rábano (HRP) (Tabla 3), diluido también en solución de bloqueo, y se realizó otra serie de lavados con TBST 1X. Se añadió a la membrana la solución de sustrato quimioluminiscente (Pierce ECL Western Blotting Substrate; Thermo Scientific) dilución 1:1 y se dejó reaccionar en oscuridad durante 1 min. Se utilizaron películas de fotografía para exponer la membrana y detectar la señal. Tras revelar las películas, se visualizaron las bandas y la cuantificación proteica se evaluó por densitometría (indica la intensidad de las bandas) mediante el software de análisis de imagen ImageJ. Los niveles de proteína IRS2 detectados en cada línea celular se normalizaron con respecto a los niveles de la proteína de expresión constitutiva β -actina.

Tabla 2. Relación de anticuerpos primarios utilizados en el Western Blot.

ANTICUERPOS PRIMARIOS					
Antígeno	Peso molecular (kDa)	Organismo huésped	Dilución	Tiempo de incubación	Referencia
IRS2	175-185	Ratón	1:300	O/N, 4°C	sc-8299 Santa Cruz Biotechnology
β -actina	42	Ratón	1:20.000	30 min, RT	sc-47778 (Santa Cruz Biotechnology)

*El PM es aproximado ya que puede variar debido a las fosforilaciones de la proteína.

Tabla 3. Anticuerpo secundario utilizado en el Western Blot.

ANTICUERPO SECUNDARIO				
Antígeno	Organismo huésped	Dilución	Tiempo de incubación	Referencia
IgG de ratón	Cabra	1:2.000	1 h, RT	31430 Thermo Scientific

3.2.4. Real-Time PCR

Extracción de RNA: La extracción de RNA de los pellets celulares se llevó a cabo utilizando el RNeasy Mini Kit (Qiagen) siguiendo las instrucciones indicadas por la casa comercial. La concentración y pureza del RNA se determinó usando NanoDrop (Thermo Scientific).

Síntesis de cDNA: El cDNA de cada línea se obtuvo a partir de 3 µg del RNA extraído previamente. La reacción de retro-transcripción se llevó a cabo usando el mix liofilizado RNA to cDNA EcoDry Premix (Doubled Primed) (Clontech Laboratories).

PCR: Se preparó un mix de PCR (cebador directo 10 mM, cebador reverso 10 mM) al que se añadieron 4,2 µl de cDNA para la amplificación del gen IRS2 en cada una de las líneas. En una placa multipocillo de 96 se cargó cada muestra por triplicado, un gen de expresión constitutiva (gen ribosomal RPL19) para la posterior normalización, un control negativo (mix de PCR sin cDNA) y un control positivo (línea CHC HepG2 con la expresión de IRS2 previamente caracterizada en el laboratorio). El equipo LightCycler 480 (Roche) siguió el siguiente programa de PCR: etapa de desnaturalización del cDNA a 93°C durante 5 min seguida de 45 ciclos de amplificación (95°C 15s - 54°C 20s - 72°C 20s), 1 ciclo de *melting curve* (95°C - 65°C - 7°C) y por último 1 ciclo de enfriamiento que disminuye la temperatura gradualmente de 40 hasta 4°C.

3.3. EXPERIMENTOS DE TUMORIGÉNESIS *IN VITRO*

Al llegar a una confluencia del 60-70%, las células se tripsinizaron y disgregaron mecánicamente con la pipeta, hasta conseguir células individuales. El cálculo de la concentración celular para sembrar cada uno de los experimentos se realizó mediante tinción con el colorante de exclusión azul de tripán (para determinar viabilidad) y contaje en cámara Neubauer.

3.3.1. Ensayo de proliferación (MTT)

Se sembraron en una placa multipocillo de 96 pocillos, 5 réplicas de la línea control y 5 réplicas de la línea modificada a una concentración de 4000 células/pocillo, 100 µl/pocillo, en el medio de cultivo correspondiente a cada línea; y las células se incubaron durante 48h. Tras pasar este tiempo, se añadió a cada pocillo 20 µl de MTT 5mg/ml y la placa se incubó 4 h. A continuación, el medio fue aspirado, las células se resuspendieron en 100 µl de dimetilsulfóxido (DMSO 99,5% GC; Sigma Life Science) y se leyó la absorbancia de la placa a 570 nm con un lector de placas (Wallac Victor2 1420; Perkin Elmer). El esquema del proceso aparece representado en la Figura 3.

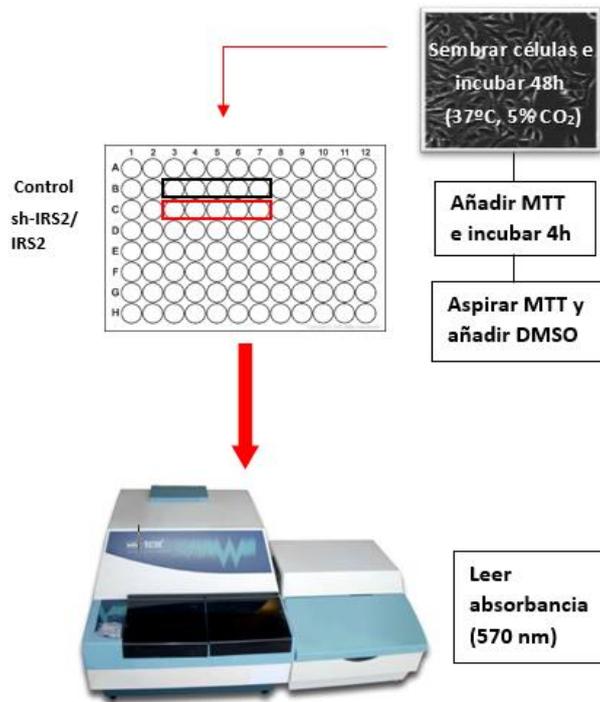


Figura 3. Esquema del proceso seguido en el ‘ensayo de proliferación (MTT)’.

3.3.2. Ensayo de formación de colonias o clonogénesis

En este tipo de ensayo era necesario sembrar una cantidad de células baja y asegurar así, que cada futura colonia formada procede de la división de una única célula inicial (clon de célula). Se consultó en la bibliografía a qué concentración celular se sembraba generalmente el ensayo de clonogénesis para estas líneas CHC, y paralelamente, se hizo una prueba de puesta a punto del ensayo, sembrando diferentes concentraciones celulares (100, 200 y 400 células/pocillo) con tal de determinar qué concentración era la adecuada en cada caso. Finalmente, en una placa multipocillo de 6 pocillos, se sembraron 200 células/pocillo (2 ml) para HuH6 y 150 células/pocillo para Hep3B (Figura 4).

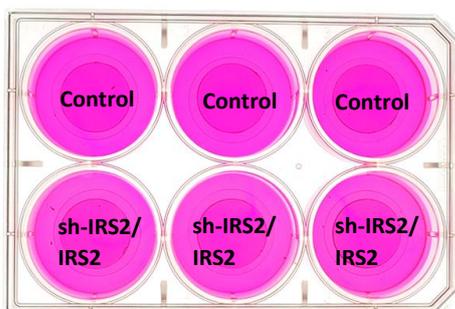


Figura 4. Diseño de la placa multipocillo para el experimento de ‘Ensayo de formación de colonias o clonogénesis’. La fila superior son células control y la fila inferior son células con la expresión de IRS2 modificada (silenciamiento o sobreexpresión). En ambos casos se sembró la misma concentración celular.

Dependiendo de la línea celular, la placa se mantuvo en cultivo un número de días determinado (HuH6 sobreexpresión IRS2: 8 días; Huh6 silenciamiento IRS2: 12 días; Hep3B sobreexpresión IRS2: 13 días) pero en todos los casos el experimento se paró cuando las colonias se visualizaban macroscópicamente (sin que se llegara a unir una colonia con otra cercana).

Durante los días de incubación, se cambió el medio de cultivo a las células 1-2 veces por semana. Una vez formadas las colonias, para finalizar el experimento, se aspiró el medio, los pocillos se lavaron con PBS 1X y las colonias se tiñeron con cristal violeta 0,5% disuelto en metanol y agua (1:1) durante al menos 15 min en agitación suave. Las placas se dejaron secar durante varias horas y se escanearon para analizar las imágenes con el software ImageJ. Para cada experimento, se contó el número de colonias formadas y el área media de éstas. Se tomaron fotografías de las colonias en cultivo y después de teñir.

3.3.3. Ensayo de formación de colonias en agar blando

Para este ensayo, se prepararon dos tipos de agar de diferente concentración: un agar base 6% y un agar superior 3% (SeaPlaque soft agar; BMA) diluidos en 50 ml de PBS 1X y H₂O. En primer lugar se calentó el agar base durante 2-3 min hasta disolverlo de manera homogénea, y se preparó un mix formado por medio de cultivo (DMEM o RPMI 1640) y el agar a una concentración del 0,6%, y se añadió a cada pocillo 4 ml. Una vez solidificada esta capa de agar base, se añadieron 2 ml de un mix de medio de cultivo, agar superior al 0,3% y medio con células.

Se hizo una búsqueda bibliográfica para determinar qué concentración celular era la más adecuada en cada caso, y en base a esto, se sembraron 10.000 células/2 ml en los experimentos con HuH6 y 6000 células/ 2 ml en los de Hep3B.

Las células se dejaron crecer durante mínimo 15 días añadiendo 0,5 ml de medio de cultivo sobre la capa superior de agar 1-2 veces por semana. Para fijar las células, se añadió 0,5 ml de cristal violeta 0,01% disuelto en PBS 1X a cada uno de los pocillos, durante unas horas o incluso un día.

3.4. CARACTERIZACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE MARCADORES EMBRIONARIOS

3.4.1. Detección de proteínas por Western Blot

La membrana de PVDF del Western Blot inicial en el que se establecieron los niveles de IRS2 en cada línea celular, fue sometida a una exploración secundaria utilizando otros anticuerpos primarios (Tabla 4). Fue necesario llevar a cabo un tratamiento de azida 2% para eliminar la enzima conjugada al anticuerpo secundario usado, y así no detectar una señal anterior. En uno de los casos, para una nueva detección, se eliminaron los anticuerpos de la membrana (*stripping*) con un tratamiento de Tris 62,5 mM, SDS 2% y un 0,8% (v/v) de mercaptoetanol durante 50 min a 37°C en agitación y a continuación, la membrana se bloqueó y se incubó de nuevo con otro anticuerpo diferente.

Para el anticuerpo primario procedente de ratón, se utilizó el anticuerpo secundario utilizado previamente y en las mismas condiciones (Tabla 3). Para los anticuerpos procedentes de conejo, se utilizó un anticuerpo secundario anti-IgG-conejo-HRP siguiendo las mismas condiciones que en el caso del anti-IgG-ratón.

Tabla 4. Relación de anticuerpos primarios utilizados para la detección de marcadores embrionarios en las células de CHC. SOX9, Factor de transcripción SOX-9; EpCAM, Molécula de adhesión epitelial celular.

ANTICUERPOS PRIMARIOS					
Antígeno	Peso molecular (kDa)	Organismo huésped	Dilución	Tiempo de incubación	Referencia
Albúmina	69	Ratón	1º) 1:50.000 2º) 1:5.000	1 h; RT O/N, 4°C	A6684 (Sigma-Aldrich)
SOX9	60	Conejo	1:1.000	O/N, 4°C	ab26414 (Abcam)
EpCAM	39	Conejo	1:1.000	O/N, 4°C	ab32392 (Abcam)

3.4.2. Ensayo de inmunofluorescencia sobre las colonias formadas por HuH6 con silenciamiento de IRS2

En primer lugar se colocaron los cubreobjetos en una placa de 24 pocillos y se trataron con poli-lisina para permitir la adhesión de las células. Se sembraron las células HuH6 sh-IRS2 y su control, (8 réplicas de cada condición) a una concentración de 50 células/pocillo (0,5 ml) y se dejaron crecer durante 7 días, cambiando el medio de cultivo 2-3 veces. Esta concentración es la equivalente a la sembrada en el “Ensayo de formación de colonias o clonogénesis” por lo que, tras el tiempo de incubación, se obtuvieron pequeñas colonias sobre los cubreobjetos. A continuación las células se fijaron añadiendo paraformaldeído (PFA) 4% y dejándolo actuar 10 min a temperatura ambiente. Se realizaron 3 lavados con PBS 1X y se añadió a cada pocillo una solución de permeabilización (0,5% Triton 100X en PBS) durante 15 min para permitir el paso de los anticuerpos a través de la membrana plasmática de las células. Los pocillos se lavaron de nuevo con PBS 1X y se añadió una solución de bloqueo (1% BSA; 5% suero de caballo; 0,2% Triton 100X) para evitar uniones inespecíficas durante 1 h. El siguiente paso fue colocar los cubreobjetos sobre las gotas de anticuerpos primarios diluidos en solución de bloqueo (o/n a 4°C) a cámara oscura y manteniendo la humedad. La Tabla 5 recoge los tres anticuerpos distintos utilizados, las diluciones y sus características comerciales.

Tabla 5. Relación de anticuerpos primarios utilizados en el ensayo de inmunofluorescencia en colonias de la línea celular HuH6 sh.

ANTICUERPOS PRIMARIOS INMUNOFLUORESCENCIA			
Antígeno	Organismo huésped	Dilución	Referencia
Albúmina	Ratón	1:1000	A6684 (Sigma-Aldrich)
CK19	Ratón	1:200	sc-53258 Santa Cruz Biotechnology
EpCAM	Conejo	1:200	ab32392 (Abcam)

Seguidamente los cubres se lavaron con PBS 1X y H₂O destilada y se colocaron sobre la gota con el anticuerpo secundario fluorescente correspondiente: anti-ratón Alexa-594 (A21201, Invitrogen) y el anti-conejo Alexa-568 (A11011, Invitrogen) ambos de emisión en el rojo y diluidos 1:500 en solución de bloqueo. A cada dilución de anticuerpo secundario se añadió Hoescht (Life Technologies) diluido 1:2500 para teñir el ADN y permitir la visualización de los núcleos de las células.

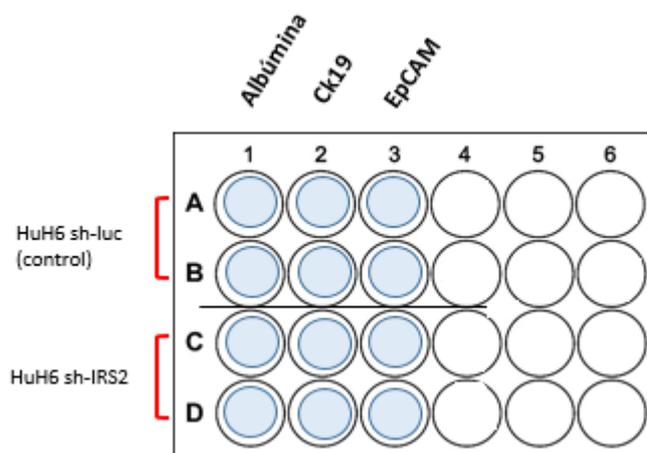


Figura 5. Diseño del ensayo de inmunofluorescencia. Los pocillos A y B (1-4) corresponden a las células control y los pocillos C y D (1-4) a las células HuH6 con silenciamiento de IRS2.

3.5. EXPERIMENTO DE DOSIS-RESPUESTA USANDO EL COMPUESTO NT157

En este experimento se quiso evaluar la resistencia de las líneas celulares HuH6 y Hep3B al compuesto inhibidor NT157. Para cada línea de CHC, se utilizaron dos placas de 6 dónde se sembraron las células a una densidad de 200 células/2 ml. Al transcurrir 24 h, se añadió a cada pocillo una concentración distinta del compuesto (cada 48 h durante 10 días), para evaluar su efecto sobre las células en la capacidad de proliferar y formar colonias (Tabla 6).

Tabla 6. Concentraciones del compuesto inhibidor NT157 añadidas a cada pocillo.

[NT157] μ M	
Placa 1	Placa 2
0	1
0,05	1,5
0,1	2,5
0,2	4
0,5	6
0,7	8

3.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

La validación de las líneas CHC con las dos modificaciones de la expresión de IRS2, realizada por Western Blot y RT-PCR, se realizó una vez (n=1). Cada uno de los experimentos *in vitro* de tumorigénesis se realizaron por triplicado, como mínimo (n=3). Cada ensayo constaba, a su vez, de tres réplicas de cada condición (clonogénesis y ensayo de formación de colonias en agar blando) y de cinco réplicas, en el ensayo de MTT. Los resultados aparecen representados como la media de los datos crudos de cada experimento independiente y las barras de error corresponden a la desviación estándar (s) que aporta información sobre la dispersión que existe entre las réplicas de una misma condición. Las diferencias entre condiciones se determinaron mediante un Test-T, con un nivel de confianza del 95% ($p < 0.05$). Los datos fueron analizados mediante el software estadístico del programa GraphPad Prism 7 (GraphPad Software, Inc. La Jolla, CA, USA).

En el experimento de clonogénesis, en primer lugar, se analizaron los datos brutos obtenidos en cada experimento independiente (número de colonias y promedio del área de todas las colonias) y a continuación, se realizó un segundo análisis normalizando a 1 el número de colonias y el tamaño medio de las colonias obtenidas en los controles, con el objetivo de eliminar la variabilidad interexperimental observada. De este modo, se determinó la frecuencia de formación de colonias y de aumento del tamaño de las colonias con sobreexpresión o silenciamiento de IRS2.

4. RESULTADOS

4.1. VALIDACIÓN DE LAS MODIFICACIONES DE LAS LÍNEAS CHC

El primer paso en este trabajo fue comprobar que la modificación genética en las líneas celulares de partida, se había realizado con éxito y que realmente las células estaban sobreexpresando IRS2 o tenían su gen silenciado. Para su validación, como se explica en Materiales y métodos, se determinó la cantidad de IRS2 en las células a nivel de proteína, mediante un Western Blot; y a nivel de expresión génica, mediante la técnica RT-PCR.

Tras analizar por densitometría las bandas obtenidas en el Western Blot y normalizar la cantidad de IRS2 con las bandas de actina, se detectó una banda de IRS2 más intensa en el caso de las líneas modificadas para sobre-expresar IRS2, y una banda significativamente menos intensa (prácticamente no visible), en el caso de las líneas con silenciamiento (Figura 6).

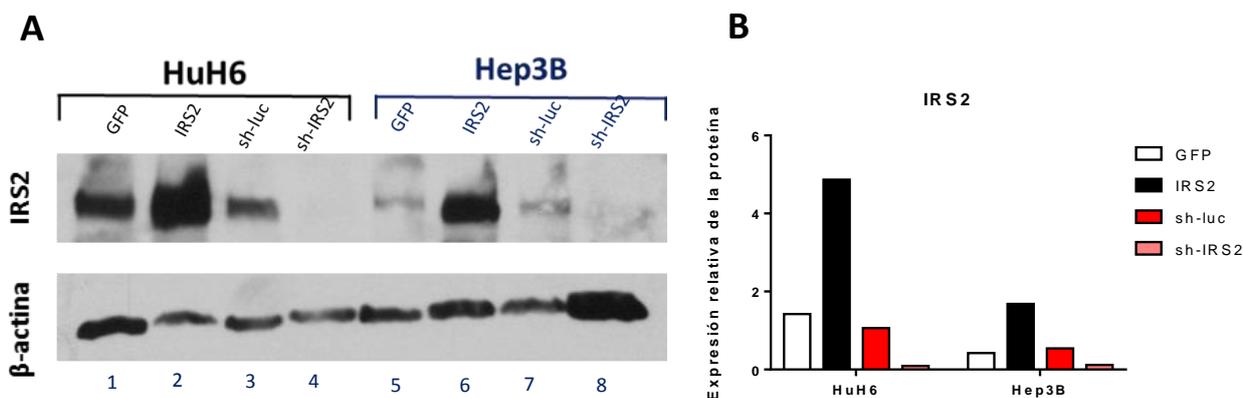


Figura 6. Resultado del Western Blot que valida las modificaciones de las líneas CHC. (A) Las carreras 1-4 corresponden a la línea celular HuH6 y las carreras 5-8 a Hep3B. **(B)** Expresión relativa de la proteína IRS2 respecto a la expresión de β -actina en cada una de las líneas CHC. GFP, línea control de la sobreexpresión de IRS2; IRS2, línea con sobreexpresión de IRS2; sh-luc, línea control del silenciamiento de IRS2; sh-IRS2, línea con silenciamiento de IRS2.

La línea HuH6 con sobre-expresión tiene 3,4 veces más IRS2 que su control; mientras que HuH6 sh-IRS2 tiene una expresión relativa de la proteína 11,4 veces menor que a su línea control. Hep3B sobre-expresión presenta aproximadamente 4 veces más IRS2 que su control; mientras que la línea Hep3B con silenciamiento del gen IRS2 presenta 4,7 veces menos proteína que su control (Figura 6-B). Además, se caracterizó la expresión de IRS2 en cada línea celular: HuH6 presenta unos niveles endógenos de IRS2 más altos que Hep3B (2,6 veces más). Las cantidades relativas de IRS2 de las líneas control (GFP y sh-luciferasa) debieran ser las mismas, no obstante, se observa una ligera variación en ambos modelos celulares. Esto podría deberse a que los lentivirus utilizados para sobre-expresar o silenciar la proteína, no son los mismos y cada tipo de infección podría afectar de manera distinta a la expresión génica en general de la célula.

Mediante RT-PCR se comprobó únicamente el silenciamiento de IRS2. La sobreexpresión no fue comprobada debido a que los cebadores disponibles en el laboratorio eran complementarios a la secuencia de IRS2 humana y no de ratón (las líneas de sobreexpresión expresan IRS2 de ratón), por tanto, esta no era una buena técnica para observar un aumento en la expresión génica de dicha proteína. En la Figura 7 se observa la expresión de IRS2 de cada línea celular, normalizada respecto al gen de expresión constitutiva RPL19.

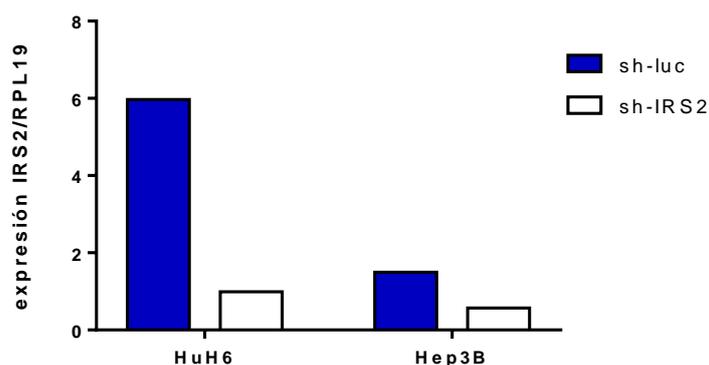


Figura 7. Resultados de la RT-PCR que validan el silenciamiento de IRS2 en HuH6 y Hep3B. sh-luc, línea con silenciamiento del gen luciferasa (control); sh-IRS2, línea con silenciamiento génico de IRS2.

4.2. ENSAYOS DE TUMORIGÉNESIS *IN VITRO*

A partir de estos ensayos, se obtuvo información acerca de la proliferación/supervivencia celular, la capacidad de formación de colonias a baja densidad celular, el tamaño medio de los clones formados y la morfología característica que presentan en cultivo; de cada una de las líneas establecidas. También se sembraron experimentos para determinar la capacidad de las células de crecer en suspensión sobre agar blando, como se explica en “Materiales y métodos”, pero no obstante, no fue posible obtener datos ya que se encontraron varios problemas: en el caso de Hep3B, tras pasar suficientes días de incubación no se observaron colonias visibles, en el microscopio sí se detectó alguna agrupación celular discreta, pero no llegaba a formarse una colonia. En los ensayos realizados con HuH6 sí que se detectaron células creciendo en el agar, pero crecían en monocapa (estaban dispuestas en el mismo plano). De modo que, si el tiempo lo hubiera permitido, se hubiera llevado a cabo una puesta a punto de la técnica para ambas líneas celulares: probar distintas concentraciones celulares de partida, distintos % de agar en cada una de las capas y optimizar los días de incubación.

4.2.1 Caracterización de las líneas HuH6 y Hep3B con sobreexpresión del sustrato 2 del receptor de la insulina (IRS2)

Ensayos de MTT

En el Anexo I se recogen los datos obtenidos en cada experimento individual para cada una de las líneas. En general, se observa un ligero perfil de aumento de la proliferación/supervivencia celular en las células que sobreexpresan IRS2; en algunos ensayos las diferencias fueron significativas, pero en otros no. La Figura 8 recoge el promedio del total de ensayos realizados y la dispersión entre los datos (barras de error). En ambos modelos de CHC, el resultado final muestra que no existen diferencias significativas entre las células control y las que sobreexpresan IRS2 (p-valor > 0,05).

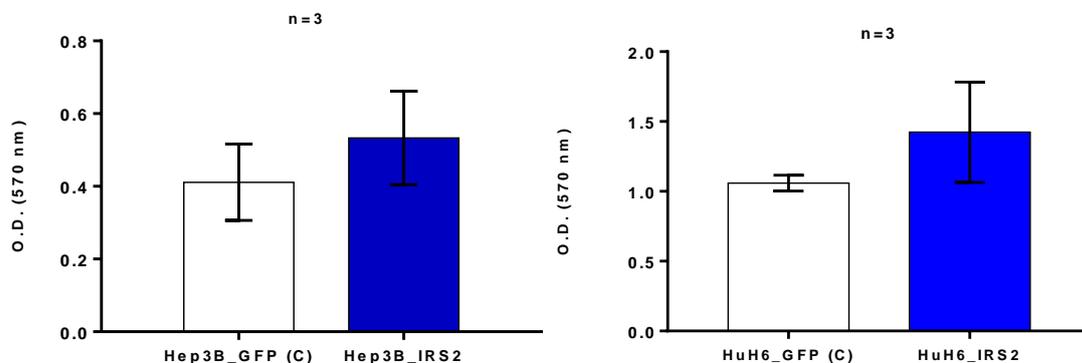


Figura 8. Resultado promedio obtenido en los experimentos de MTT cuando se sobreexpresa IRS2 en Hep3B y HuH6. Los datos corresponden a los valores de absorbancia representados como la media \pm SD. *Hep3B/HuH6_GFP*: células control de infección; *Hep3B/HuH6_IRS2*: células con sobreexpresión de IRS2.

Ensayo de clonogénesis

El resultado promedio de los ensayos clonogénicos realizados con el modelo de hepatocarcinoma y con el modelo de hepatoblastoma, se recogen en las Figuras 9 y 10, respectivamente. Los resultados en crudo, obtenidos en cada experimento individual, pueden consultarse en el Anexo I.I (Hep3B) y I.II (HuH6).

En primer lugar, cuando el modelo de hepatocarcinoma (Hep3B) sobreexpresa la proteína IRS2, se contó que se formaron casi el doble de colonias de media, respecto a la línea control (46 clones frente a 26), y además, estos clones de células presentaban un tamaño medio significativamente mayor que los clones control. Al normalizar los controles a 1, eliminando la variabilidad entre experimentos, las diferencias en el número y tamaño de las colonias, siguen siendo significativas; mostrando un aumento por parte de las células que sobreexpresan IRS2.

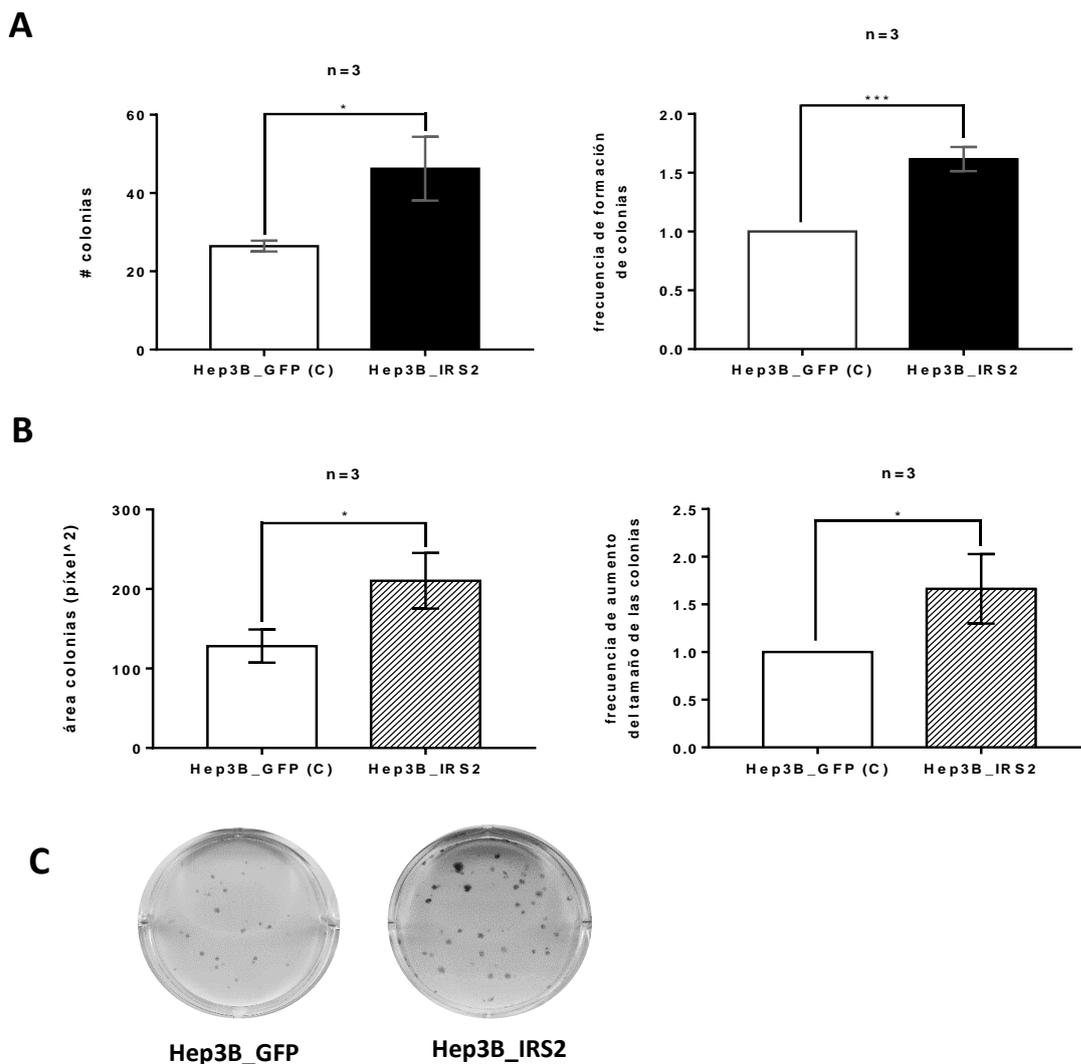


Figura 9. Resultados obtenidos en el ensayo clonogénico de Hep3B con sobreexpresión de IRS2. (A) El gráfico de la izquierda compara la media del número de colonias control vs. el número de colonias con sobreexpresión, el de la derecha, la frecuencia de formación de colonias (valores relativos). En ambos análisis las diferencias son significativas. (B) Los gráficos representan el área media/frecuencia de aumento de las colonias control vs. el área/frecuencia de aumento de las colonias con sobreexpresión de IRS2. La diferencia de tamaño de las colonias es también estadísticamente significativa (p-valor 0.025) (C) Pocillos representativos de colonias control y colonias con sobreexpresión de IRS2. *Hep3B_GFP*: células control de infección; *Hep3B_IRS2*: células con sobreexpresión de IRS2.

En el modelo de hepatoblastoma (HuH6), se observó la misma tendencia anterior: una sobreexpresión de IRS2 se relaciona con un aumento en el número y tamaño de las colonias que forman las células individuales (Figura 10). Se contó, en promedio, 34 clones de células control y 51 clones de células con sobreexpresión, generalmente más grandes. No obstante, como se aprecia por las barras de error de los gráficos, en este caso, la variación entre los resultados de los experimentos independientes, es mayor que en el caso anterior, por lo que el análisis de los datos brutos no es significativo (p -valor $> 0,05$).

Sin embargo, si se analizan los valores relativos al control normalizado a 1, sí se observa una diferencia significativa en el número y tamaño de colonias. Se obtiene un aumento en ambos parámetros cuando las células HuH6 sobreexpresan IRS2.

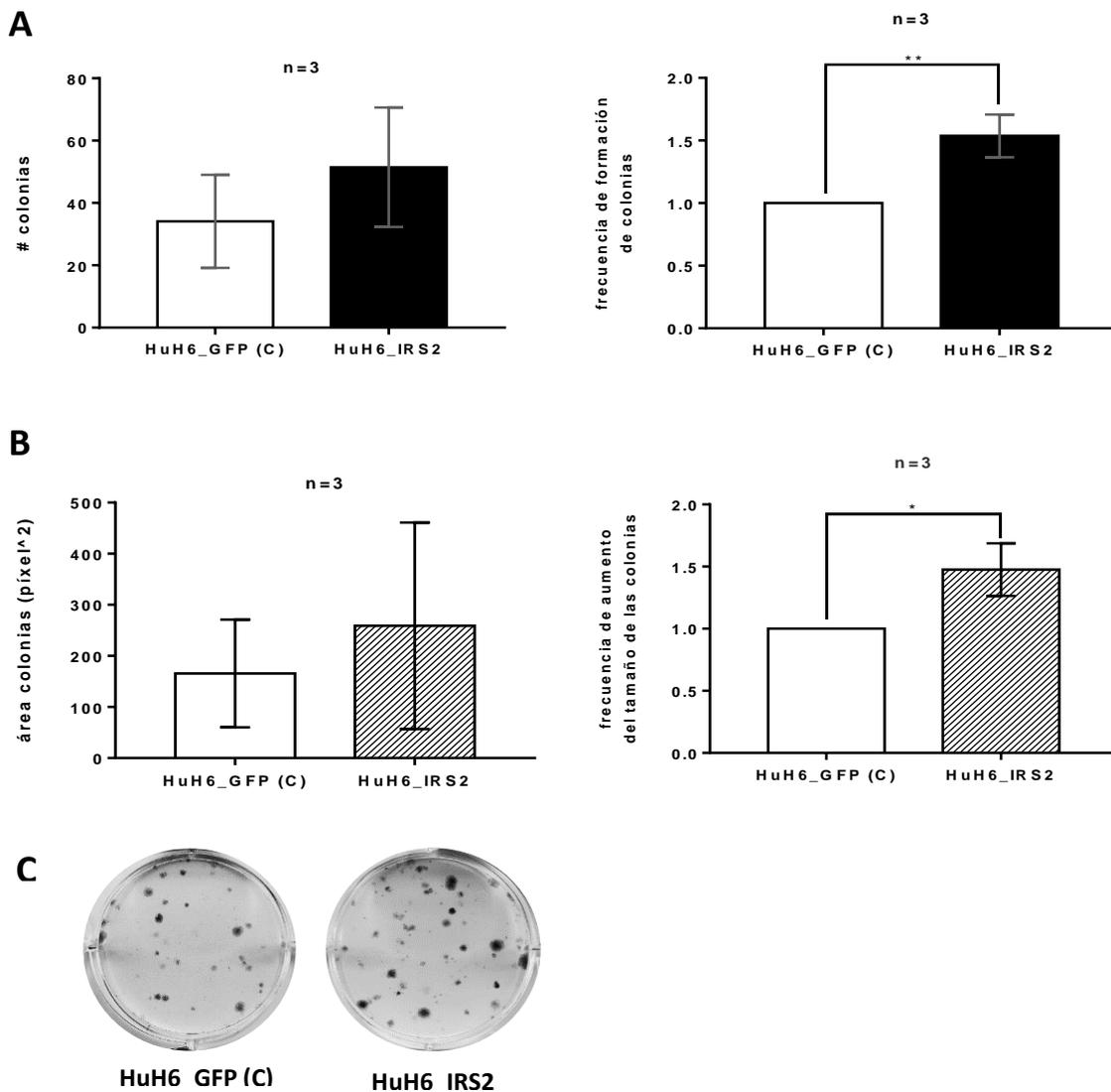
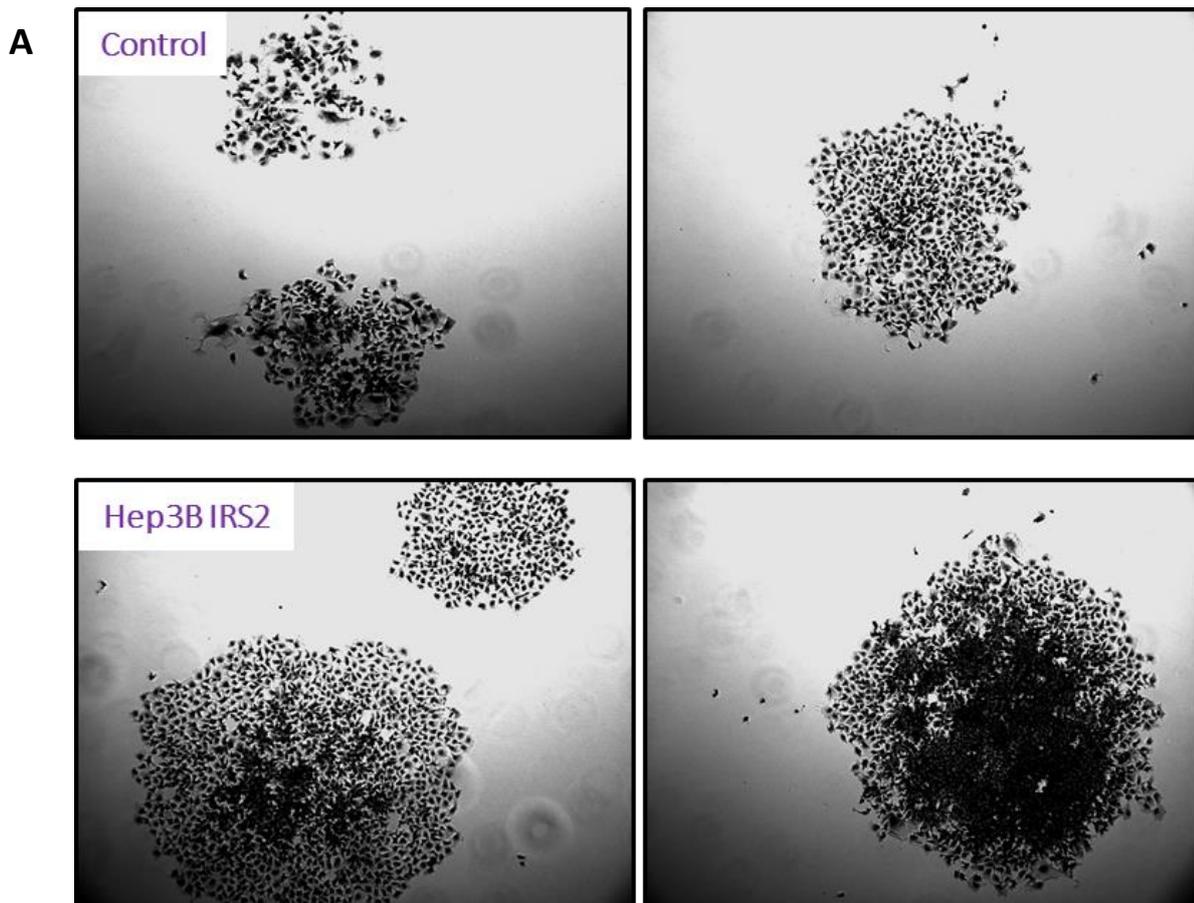


Figura 10. Resultados obtenidos en el ensayo clonogénico de HuH6 sobreexpresión de IRS2. (A) El gráfico de la izquierda compara el promedio del número de colonias control vs. el número de colonias con sobreexpresión. El gráfico derecho representa los resultados normalizados. **(B)** El gráfico de la izquierda representa el promedio del área de las colonias control vs. el área de las colonias con sobreexpresión calculada a partir de los datos brutos. El gráfico derecho indica la frecuencia de aumento del tamaño. **(C)** Pocillos representativos de colonias control y colonias con sobreexpresión de IRS2. *HuH6_GFP*: células control de infección; *HuH6_IRS2*: células con sobreexpresión de IRS2.

Tras fijar las células con cristal violeta, se observó la morfología de las colonias con tal de determinar posibles diferencias a nivel microscópico. Los clones de células Hep3B sobreexpresión de IRS2, presentaban una morfología definida. En la zona central de las colonias, donde el número de células (nivel de confluencia) es mayor, se observa un crecimiento tridimensional. Además, se percibe que las colonias son de mayor tamaño al compararlas con las colonias control (Figura 11-A).

Las colonias de HuH6 con sobreexpresión, presentaban una característica interesante: su morfología era más dispersa respecto a las colonias control, tal y como se muestra en la Figura 11-B, las células de la periferia de las colonias tienen tendencia a escapar de ella. En lugar de proliferar “dentro” de la colonia, en contacto con las células adyacentes, migran y siguen proliferando fuera de la colonia de la que proceden, formando así, una colonia nueva.



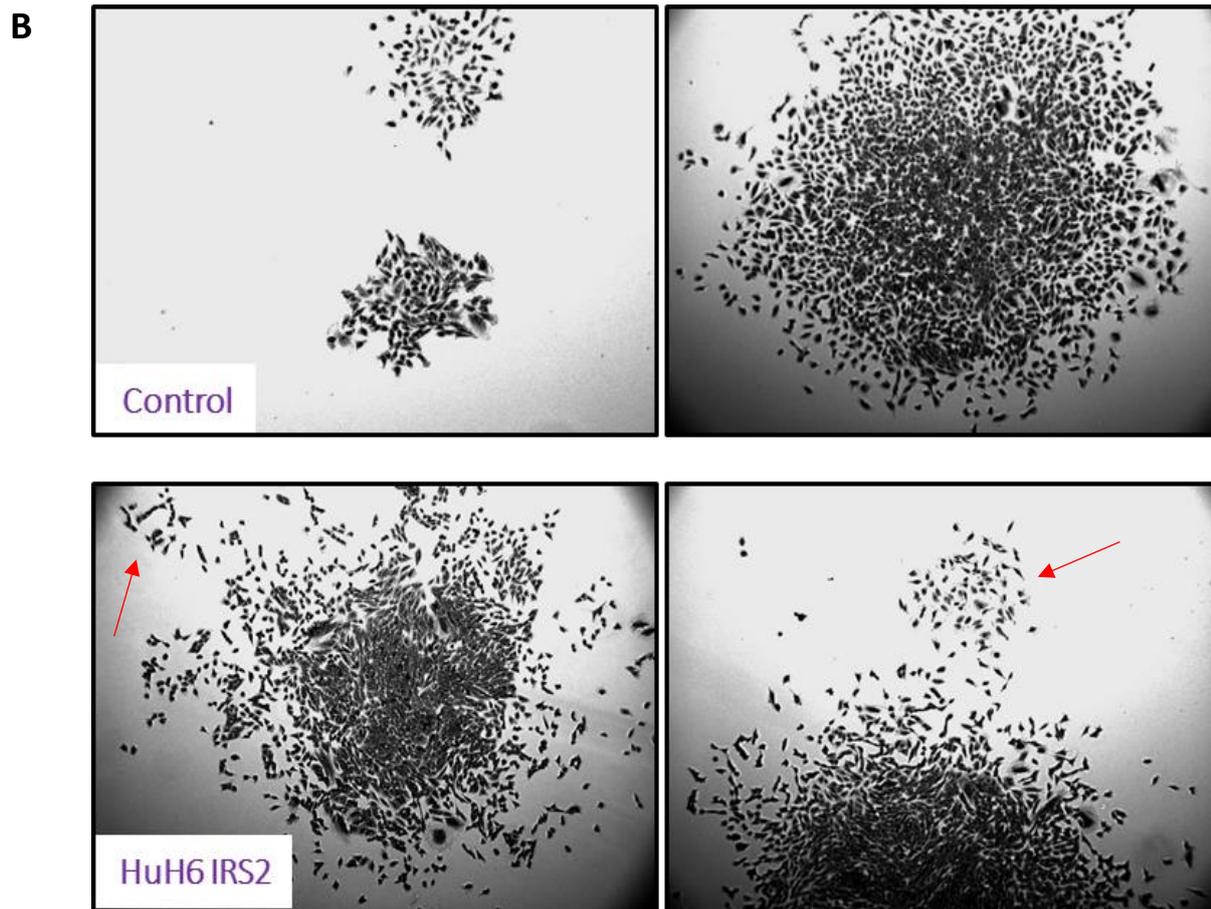


Figura 11. Imágenes de los clones de células Hep3B y HuH6 con sobreexpresión de IRS2 fijados con cristal violeta. (A) Hep3B forma colonias de morfología definida en general. Los clones de células con sobreexpresión de IRS2 son más grandes que los controles. **(B)** Las colonias procedentes de células que sobreexpresan IRS2 tienen una morfología más dispersa, las células periféricas “escapan” de la colonia. Las flechas rojas indican células periféricas migratorias. Imágenes tomadas en el microscopio con el aumento 5X (la 2ª foto del control corresponde al aumento 10X). *Hep3B/HuH6 IRS2*: línea Hep3B/HuH6 que sobreexpresa IRS2.

4.2.2. Caracterización de la línea HuH6 con silenciamiento del sustrato 2 del receptor de la insulina (IRS2)

Ensayo de MTT

Los resultados obtenidos en los experimentos independientes de MTT con esta línea celular no permitieron observar una tendencia reproducible (Anexo II.I). Por ello, el resultado final no muestra diferencias significativas entre la proliferación de las células control y las células con silenciamiento de IRS2 (Figura 12).

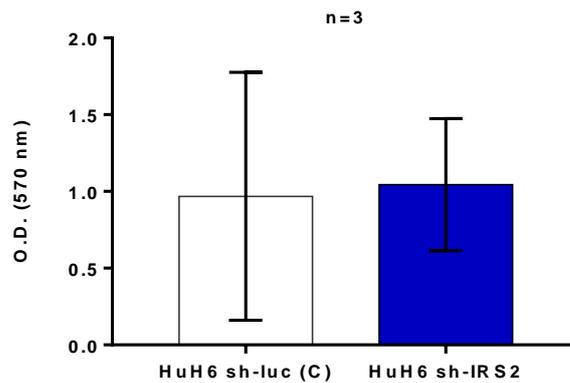


Figura 12. Resultado promedio obtenido en los experimentos de MTT cuando se silencia IRS2 en HuH6. Los datos corresponden a los valores de absorbancia representados como la media \pm SD. No hay diferencias significativas HuH6 (p -valor $>$ 0,05). *sh-luc*: células control; *HuH6 sh-IRS2*: células con sobreexpresión de IRS2.

Ensayo de clonogénesis

Al sobreexpresar IRS2 en HuH6, no se observaron diferencias en la frecuencia de formación de colonias (Figura 13-A). En cambio, las colonias formadas presentaban un tamaño macroscópicamente mayor que las control. Si se analizan los datos brutos obtenidos en cada uno de los experimentos (Anexo II.II) no hay diferencias significativas, pero no obstante, este patrón de aumento se observaba en todos los experimentos independientes. Por ello, se re-analizaron los datos eliminando la variabilidad que existe entre los controles (que no aportan información sobre el silenciamiento o la sobreexpresión de IRS2) normalizando sus valores a 1. Este segundo análisis muestra un aumento significativo en la frecuencia de aumento del tamaño de las colonias con sobreexpresión de IRS2 (Figura 13-B).

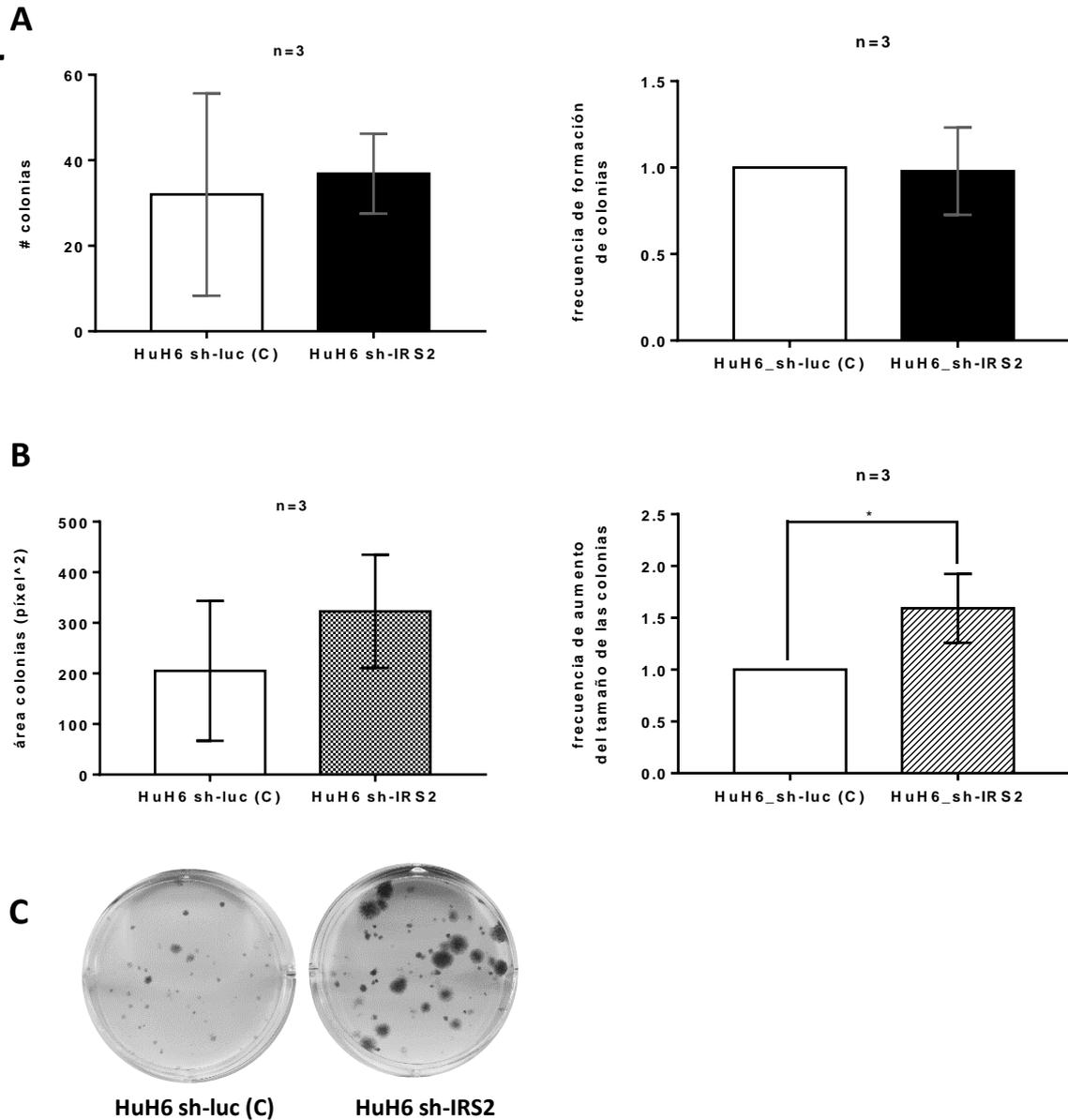


Figura 13. Resultados obtenidos en el ensayo clonogénico de HuH6 silenciamiento de IRS2. (A) El gráfico de la izquierda, compara el promedio del número de colonias control vs. el número de colonias con silenciamiento. El gráfico derecho representa los resultados normalizados. (B) El gráfico izquierdo representa el promedio del área de las colonias control vs. el área de las colonias con silenciamiento calculada a partir de los datos brutos. El gráfico derecho indica la frecuencia de aumento del tamaño. (C) Pocillos representativos de colonias control y colonias con silenciamiento de IRS2.

Las colonias de esta línea celular presentaban una característica morfológica muy interesante que se visualizó en el microscopio: los grandes clones de células con silenciamiento de IRS2, mostraban una morfología extremadamente dispersa. Se detectaron células periféricas migrando de la colonia de la que proceden y también, muchas células individuales entre las colonias. Todas estas características pusieron de manifiesto el marcado carácter migratorio de estas células (Figura 14).

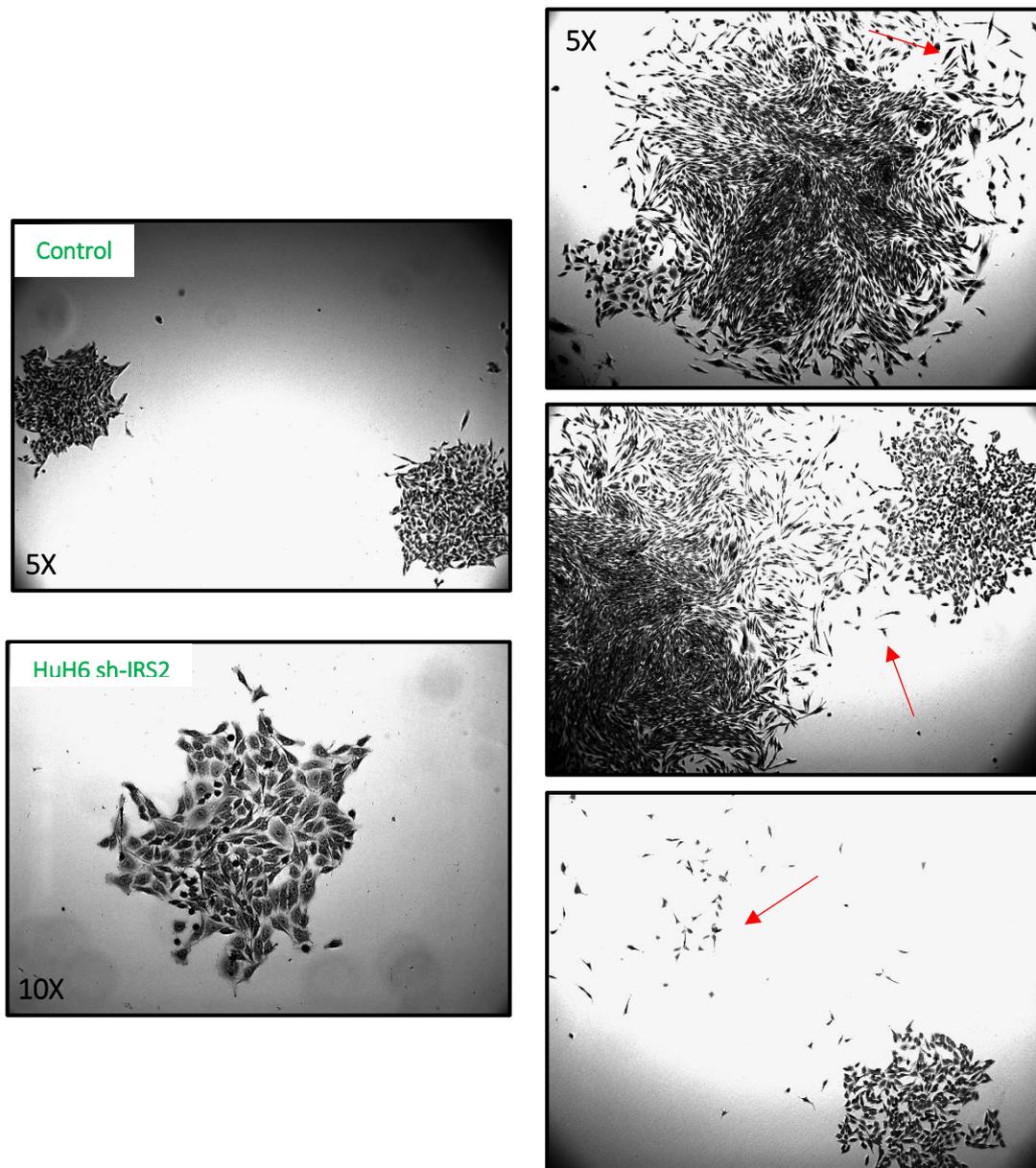


Figura 14. Imágenes de los clones de células HuH6 con silenciamiento de IRS2 fijados con cristal violeta. Se observa que los clones con silenciamiento son más grandes y presentan una morfología más dispersa; las células migran de la colonia. Las flechas rojas indican células periféricas migratorias. Imágenes tomadas en el microscopio con el aumento 5X (la 2ª foto del control corresponde al aumento 10X). *HuH6 sh-IRS2*, células con silenciamiento de IRS2.

4.3. CARACTERIZACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE MARCADORES EMBRIONARIOS EN LA LÍNEA HuH6 sh-IRS2

La elección de los marcadores se basó en el estudio llevado a cabo por Schmelzer *et al.* (2007) en el que se establecen diferencias en la expresión de distintos marcadores entre células madre hepáticas de humanos (hHpSCs) y hepatoblastos. Para caracterizar la expresión en las células HuH6 con silenciamiento de IRS2, se eligieron los siguientes marcadores: **SOX9**, un factor de transcripción involucrado en el mantenimiento de las células madre adultas; **EpCAM**, una molécula de adhesión que se expresa en varios carcinomas; **albúmina**, un marcador de

diferenciación hepatocítica; y **CK19**, un marcador específico de hígado. La Tabla 7 recoge la expresión que se espera de estos marcadores en cada tipo celular (según los resultados de la investigación citada) y mediante la técnica que fueron detectados en este trabajo.

Tabla 7. Marcadores embrionarios y de diferenciación elegidos para el estudio. Se esperan unos niveles de expresión u otros según el grado de diferenciación de la célula hepática. *WB= Western Blot; IF= inmunofluorescencia.* (Adaptado de Schmelzer *et al.*, 2007)

Marcador	Técnica de detección	Expresión en células madre hepáticas	Expresión en hepatoblastos
AFP	WB	-	+++
Albúmina	WB/IF	-/+	++
EpCAM	WB/IF	+++	++
Ck19	IF	+++	++
SOX9	WB	++	+

Se observó un aumento en la expresión de SOX9 al silenciar IRS2 en la línea HuH6, respecto a su línea control. En cambio, no se detectó expresión de los marcadores EpCAM ni albúmina, pero se sabe que el Western Blot funcionó correctamente ya que se detectó banda en Hep3B para ambos marcadores, por lo que sirve de control positivo de la técnica (Figura 15).

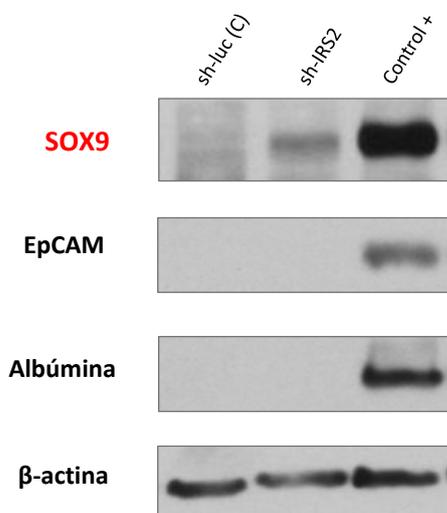
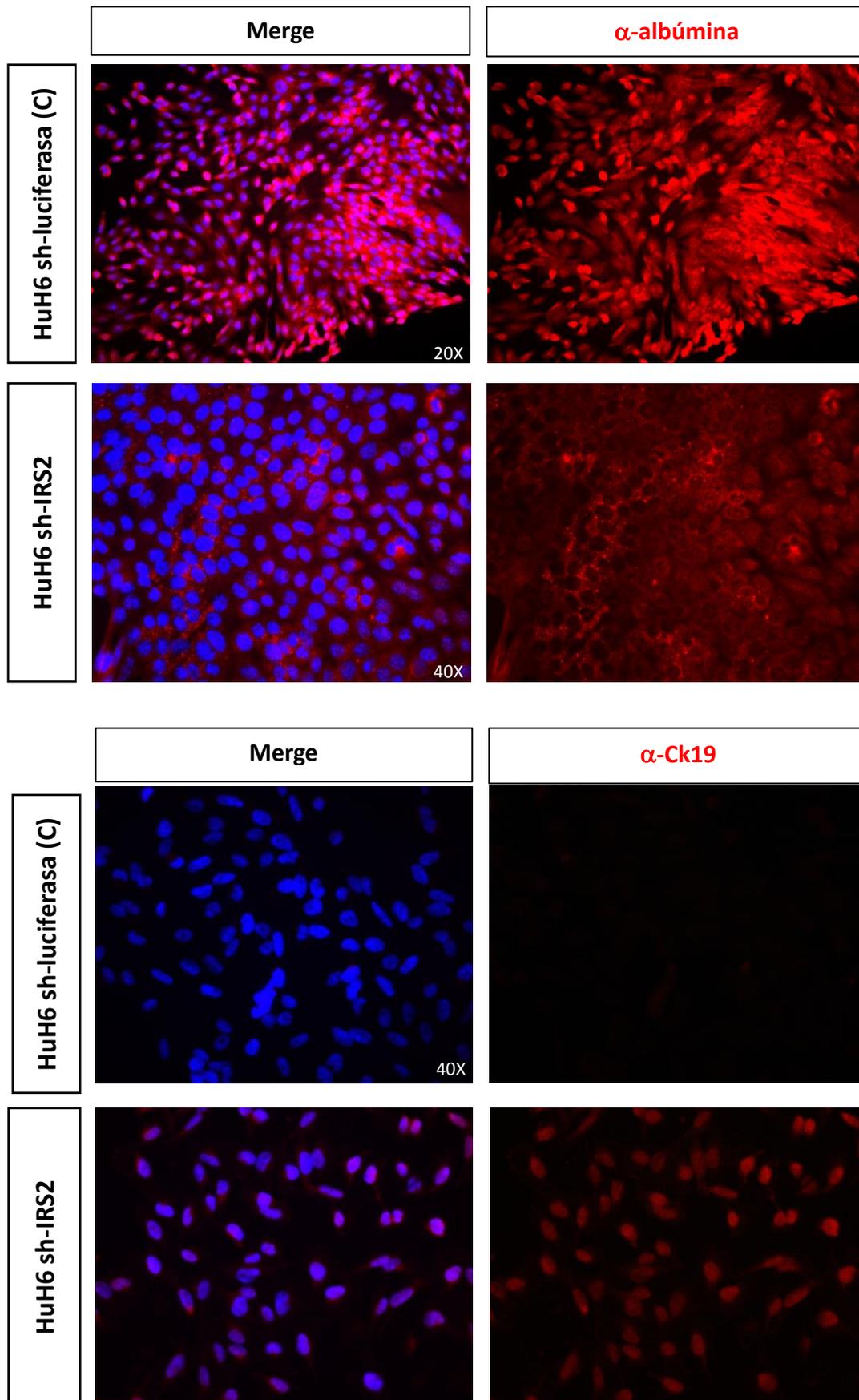


Figura 15. Resultado del estudio de marcadores en las líneas HuH6 con silenciamiento y sobreexpresión de IRS2. Las carreras 1 y 2 corresponden a la línea celular HuH6 control y silenciamiento de IRS2, respectivamente. La carrera 3 corresponde con la línea control Hep3B y nos sirve como control positivo de la técnica. GFP(C): línea control de la sobreexpresión de IRS2; IRS2: línea con sobreexpresión de IRS2; sh-luc: línea control del silenciamiento de IRS2; sh-IRS2: línea con silenciamiento de IRS2.

El hecho de no detectar EpCAM ni albúmina por Western Blot puede deberse a las características de línea celular. Los niveles de expresión de muchas proteínas cambian a lo largo del desarrollo, y teniendo en cuenta que la línea HuH6 procede de un cáncer de un niño de corta edad, es posible que la cantidad de estas proteínas sea tan baja en estas células, que se necesite una mayor cantidad de muestra para su detección.

Por este motivo, se optó por otro enfoque experimental y se llevó a cabo un ensayo de inmunofluorescencia sobre las colonias de HuH6 con silenciamiento de IRS2; con el objetivo de detectar la expresión de estos dos marcadores, y también de Ck19. Mediante esta técnica se observó que, las células HuH6 con silenciamiento de IRS2, expresaban menos albúmina en comparación con células que presentan niveles endógenos de IRS2. Además, se detectó la

expresión de Ck19 cuando IRS2 estaba silenciado, mientras que con una expresión endógena de IRS2, la señal fluorescente detectada es mínima. También se detectó la expresión del marcador EpCAM, con una mayor intensidad de señal en las células sh-IRS2 (Figura 16).



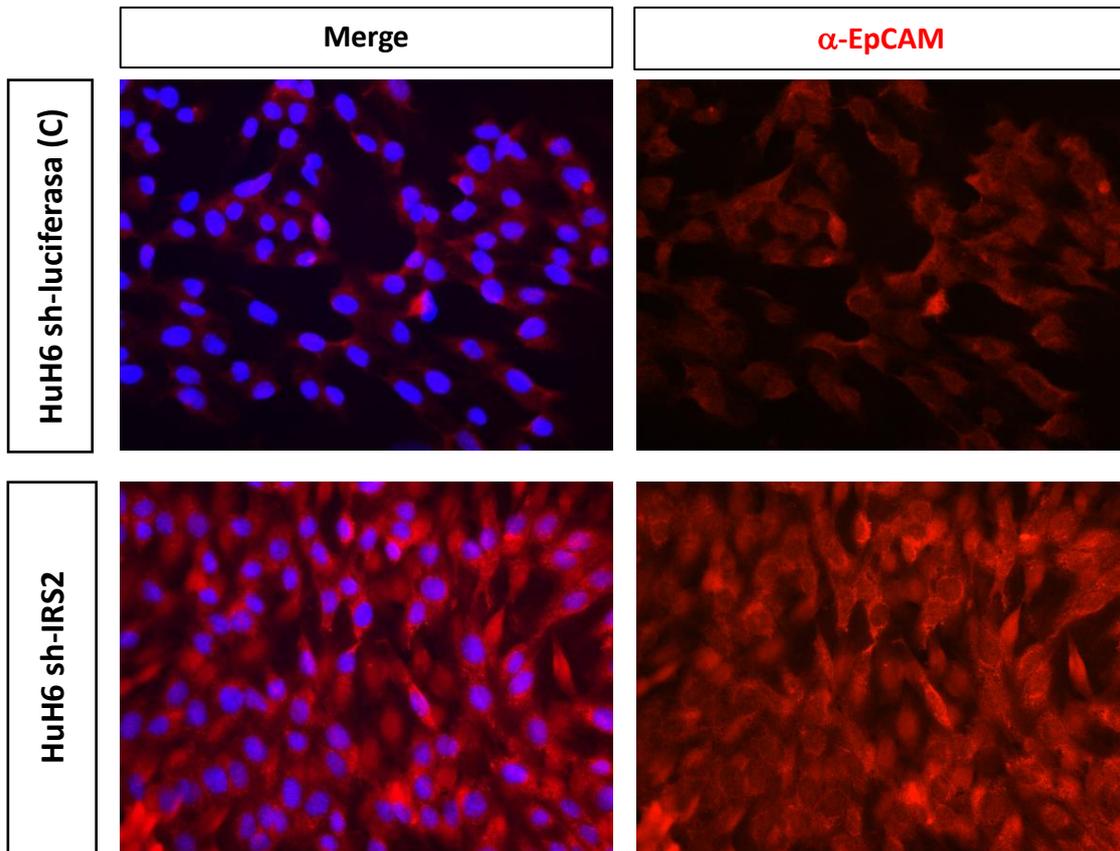


Figura 16. Detección de los marcadores albúmina, Ck19 y EpCAM en colonias de HuH6 con silenciamiento de IRS2 por inmunofluorescencia. Se detecta una mayor expresión de EpCAM y Ck19, mientras que la señal de albúmina se reduce, en las colonias HuH6 con sobreexpresión. *HuH6 sh-luciferasa*: línea control; *HuH6 sh-IRS2*: línea HuH6 con silenciamiento de IRS2.

4.4. EXPERIMENTO DE DOSIS-RESPUESTA UTILIZANDO EL COMPUESTO INHIBIDOR NT157 EN HuH6 Y Hep3B

Tanto en HuH6 como en Hep3B, la capacidad de formar colonias *in vitro* se vio significativamente reducida mediante el uso del compuesto NT157. No obstante, frente a las mismas concentraciones de NT157 y días de tratamiento, la línea Hep3B se mostró más resistente que HuH6, ya que es necesaria una mayor concentración del inhibidor para alcanzar los mismos efectos que en HuH6 (Figura 17).

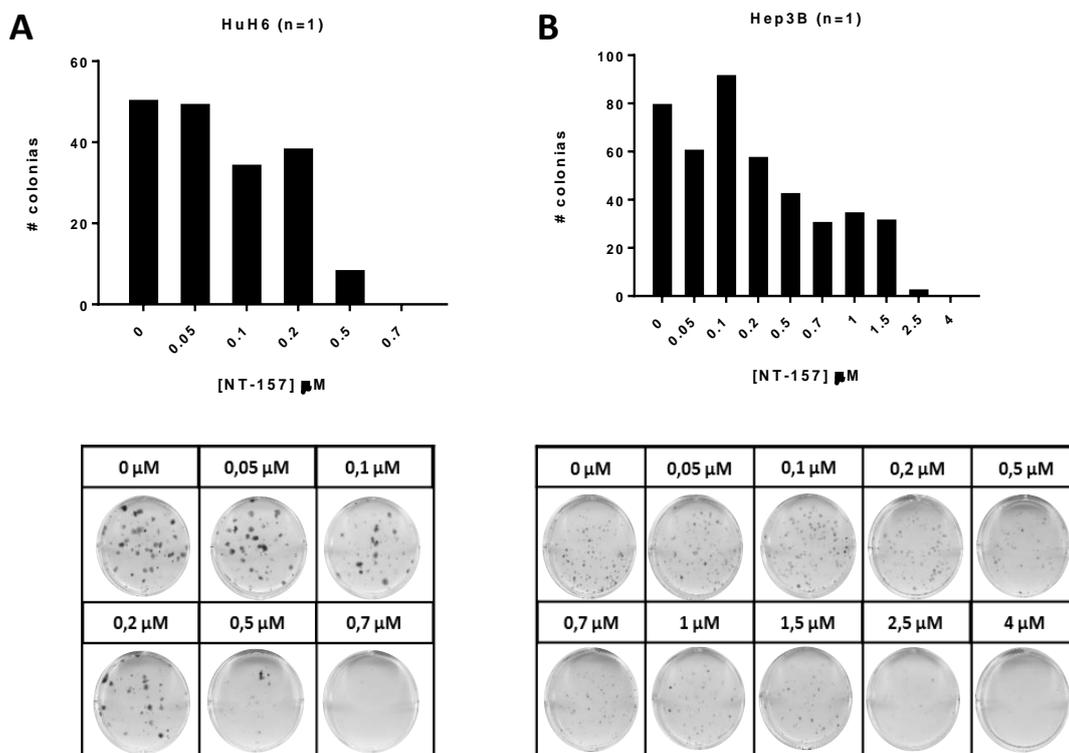


Figura 17. Resultado del número de colonias obtenido en un experimento independiente, al tratar ambos modelos de CHC con diferentes concentraciones del inhibidor NT157 (0-4 μM). (A) Las células HuH6 son más sensibles al compuesto, dejan de proliferar a concentraciones menores que 1 μM (B) Las células Hep3B resisten más el efecto del NT157, se detectan colonias hasta 2,5 μM del inhibidor.

5. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

El primer objetivo de este proyecto consiste en validar las líneas HuH6 y Hep3B con sobreexpresión o *knockdown* del sustrato 2 del receptor de insulina (IRS2), gracias a una infección lentiviral. Su validación mediante las técnicas Western Blot y PCR en tiempo real confirman una modificación genética estable en ambos casos. Tras la validación, se procedió a la caracterización de las líneas Hep3B y HuH6 con sobreexpresión de IRS2 y HuH6 con silenciamiento del gen endógeno de IRS2 realizando los experimentos *in vitro* por triplicado.

5.1. ANÁLISIS DEL EFECTO DE LA SOBREEXPRESIÓN/SILENCIAMIENTO DE IRS2 EN LAS LÍNEAS CELULARES DE CHC

El efecto de la sobreexpresión de IRS2 exógena en Hep3B no causa un efecto significativo en la proliferación y viabilidad de las células en un corto periodo de incubación, como se demuestra en los ensayos de MTT. En cambio, resulta en un aumento del carácter tumorigénico de las células en el experimento de clonogénesis, que se confirma mediante el incremento significativo en el número y tamaño de colonias. Analizando los datos se puede concluir que, en la línea Hep3B se consigue establecer un experimento de clonogénesis reproducible en gran medida, observándose el mismo patrón de comportamiento en los experimentos independientes, sin una variabilidad marcada entre ellos. De este modo, ya sea analizando datos brutos o los valores

relativos tras la normalización, las diferencias entre el comportamiento tumorigénico de las células control y las de sobreexpresión, es estadísticamente significativa.

Se demuestra, para esta línea de CHC, que la sobreexpresión de IRS2 exógena aumenta la capacidad proliferativa de estas células cuando crecen a una densidad celular muy baja. Además, el aumento del tamaño de las colonias, sugiere una mayor proliferación de estas células cuando crecen en colonia. Asumiendo el modelo que se establece con la sobreexpresión de IRS2 de aumento de la sensibilidad a insulina, estos resultados sugieren que, la sobre-activación de la señalización de insulina/IGF-1 aumenta la tumorigenicidad de células procedentes de hepatocarcinoma.

La sobreexpresión de esta proteína en HuH6, tampoco causa un efecto significativo en la proliferación y supervivencia celular en los ensayos de MTT. No obstante, en el ensayo de clonogénesis se observa el mismo patrón de aumento que en Hep3B. Analizando los datos brutos obtenidos en cada réplica, la diferencia no es significativa; pero si se elimina la variabilidad inter-experimental, se observa como las células HuH6 con sobreexpresión, aumentan significativamente la frecuencia de formación de colonias y el tamaño de las mismas.

Estudios previos realizados en nuestro laboratorio confirman el aumento de la tumorigenicidad al sobreexpresar IRS2 en HepG2, una línea extensamente estudiada que procede de un cáncer hepatocelular humano. Por lo que, los resultados obtenidos en los modelos de hepatocarcinoma (Hep3B) y hepatoblastoma (HuH6) de este trabajo, coinciden con los observados en HepG2.

Además, la morfología de las colonias de HuH6 muestra que las células periféricas de la colonia son capaces de migrar, una característica que no se observa en el modelo Hep3B. Esto indica que los hepatoblastos transformados con sobreexpresión de IRS2, tienen un perfil más tumorigénico y agresivo que los hepatocitos transformados con la misma modificación genética.

Por otra parte, el silenciamiento del gen endógeno de IRS2 en la línea HuH6 proporciona interesantes resultados en el experimento de clonogénesis: la frecuencia de formación de colonias no se ve incrementada, pero en cambio, el tamaño de las colonias aumenta significativamente. Es decir, se forma el mismo número de colonias respecto a la línea control, pero las que tienen IRS2 silenciado, son de mayor tamaño. Esto indica que estas células cuando forman una colonia, pueden estar experimentando una inhibición por contacto que provoca la separación entre ellas, creciendo sin necesidad de señalización celular. La morfología de los clones confirma lo anterior: las colonias presentan una mayor dispersión cuando tienen IRS2 silenciado, las células crecen en monocapa y tienen una elevada capacidad migratoria, que se traduce en mayor agresividad. Este hecho contrasta con la hipótesis planteada inicialmente, en la se postuló que el silenciamiento de IRS2 disminuye la tumorigenicidad de estas células. Es por esto que, el perfil observado en estas células, suscita interés a estudiar con mayor profundidad las características tumorigénicas de HuH6 cuando presentan un *knockdown* del gen IRS2.

Finalmente, cabe destacar que, una vez establecidas las condiciones óptimas de cada ensayo *in vitro* para cada línea celular; la continuación del estudio es la comprobación de los resultados obtenidos *in vivo*. Un xenotrasplante de las células cancerosas humanas (previamente modificadas con el *knockdown*/sobreexpresión de IRS2) en ratones, permitiría estudiar la progresión de estas células en un microambiente real, si desarrollan o no tumores malignos y la agresividad de éstos.

5.2. LIMITACIONES DE LOS EXPERIMENTOS *IN VITRO* CON LA LÍNEA HUH6 Y OPTIMIZACIÓN

Debido a la falta de experiencia previa en el laboratorio con la línea celular HuH6, tras su manipulación en este trabajo, se detectaron las limitaciones de los experimentos realizados de clonogénesis. Se observaron grandes diferencias entre los controles de los experimentos independientes (entre el número y tamaño medio de las colonias formadas en cada experimento), lo que indica que la puesta a punto del experimento no es aún la óptima. Esta variabilidad dificulta el análisis: una diferencia tan grande entre los controles podría estar enmascarando el efecto que realmente ejerce la sobreexpresión o el silenciamiento de IRS2 en las células, ya que, al analizar los datos crudos no se observan diferencias significativas, pero en cambio, al normalizar a 1 los controles y eliminar esta variabilidad, se empiezan a detectar esas diferencias. Además, es posible que sea más difícil mantener estas células en cultivo, hay que tener en cuenta su origen progenitor. Las células HuH6 no están diferenciadas a hepatocitos y durante su mantenimiento en cultivo puede ser que algunas células inicien el proceso de diferenciación y otras no; por tanto, se tiene un cultivo heterogéneo en cierta medida, que requiere de un manejo más preciso. Por tanto, para futuros estudios será necesario un mantenimiento más riguroso de las células en cultivo y repetir los experimentos siguiendo exactamente las mismas pautas en cada uno de ellos (en qué momento del cultivo se siembra el experimento, los intervalos de días para realizar los pases, la finalización de los experimentos, etc) con el objetivo de conseguir que el experimento tenga reproducibilidad.

5.3. CARACTERIZACIÓN DEL PERFIL DE DIFERENCIACIÓN DE LAS CÉLULAS HUH6 CON SILENCIAMIENTO DE IRS2

Tras observar la formación de colonias tan característica de las células HuH6 con *knockdown* de IRS2 formando colonia; se decidió estudiar con mayor profundidad esta línea. Retomando la hipótesis que sugiere que el origen del hepatoblastoma se encuentra en las células madre hepáticas, se propuso caracterizar la expresión de marcadores embrionarios y de diferenciación en esta línea celular. La línea HuH6 procede de hepatoblastos transformados, células con un cierto nivel de diferenciación pero que no llegan a ser hepatocíticas (células maduras del hígado). La expresión de los marcadores elegidos en el estudio, cambia con el grado de diferenciación celular, estando más o menos expresados según se trate de células madre del hígado o hepatoblastos (Schmelzer *et al.*, 2007). Por tanto, se quiso determinar si un estado más indiferenciado (*stem-like*) en estas células podría ser la causa del comportamiento más tumorigénico observado en el ensayo de clonogénesis.

La detección por Western Blot de una mayor expresión de SOX9 en las células con silenciamiento de IRS2, sugiere que estas las células han adquirido aparentemente un perfil más '*stem-like*' y por ello, aumentan la expresión de este marcador característico de células madre. En el ensayo de inmunofluorescencia, la disminución de la expresión de albúmina en las células con silenciamiento, coincide con un fenotipo más similar al de una célula madre hepática que al de un hepatoblasto. La expresión de los marcadores Ck19 y EpCAM aumenta en estas células, coincidiendo también con un fenotipo más progenitor que de célula hepatobástica (Tabla 7).

En conclusión, el perfil de expresión de marcadores observado en ambas técnicas, sugiere la des-diferenciación de las células HuH6 cuando se silencia la expresión endógena del sustrato 2 del receptor de insulina (IRS2). Las estrategias experimentales para estudios futuros de la línea HuH6 con la expresión de IRS2 endógena silenciada, sería la siguiente:

- Realización de ensayos de migración e invasión *in vitro*.
- Análisis cuantitativo de las características observadas hasta el momento. Separación de las células (sórtext) en función de la expresión de los marcadores estudiados y a continuación, realización de estudios de expresión génica, con el objetivo de establecer diferencias en el patrón de expresión de estas células y las HuH6 con niveles endógenos de IRS2.
- Estudiar el potencial de diferenciación de estas células en cultivo.

5.3. RESPUESTA DE HUH6 Y HEP3B FRENTE AL COMPUESTO NT157

Por último, se estudió el efecto de NT157 sobre las líneas HuH6 y Hep3B con el propósito de determinar la sensibilidad de las células a esta molécula. El NT157 es un novedoso compuesto alostérico que inhibe la interacción entre las proteínas IRS-1 y 2 y el receptor de IGF-1, impidiendo así la transducción de la señal de IGF-1 a través de estas dos proteínas mediadoras. Un reciente estudio ha demostrado que la capacidad de formar de colonias *in vitro* se ve significativamente reducida, mediante el uso de NT157 en líneas celulares de cáncer de próstata (Ibuki *et. al*, 2014), lo que abre un nuevo camino para estudiar el efecto en líneas CHC.

El IGF-1 es una hormona que desencadena principalmente señales mitogénicas y antiapoptóticas. En este contexto, al inhibir la interacción del receptor de IGF-1 con las proteínas IRS1 e IRS2, la señal del IGF-1 en las células se reduce y como consecuencia, el efecto mitogénico también. Así, a mayor concentración del compuesto inhibidor en el medio de cultivo, menor es la capacidad de las células de entrar en mitosis y proliferar, por lo que acaban entrando en apoptosis. Sin embargo, los dos modelos de CHC mostraron diferencias en cuanto a la resistencia al compuesto: HuH6 es más sensible al efecto del NT157 que Hep3B, ya que en esta última, es necesaria una mayor concentración del inhibidor para alcanzar los mismos resultados. Los niveles endógenos de IRS2 en cada una de las líneas son distintos (son más altos en HuH6 que en Hep3B) pero las diferencias de sensibilidad observadas, no se pueden atribuir exclusivamente a los niveles de expresión de IRS2 en las células. Existen rutas de señalización que no requieren de la acción mediadora de las IRS y por tanto, cuando el receptor de IGF-1 se active, estas vías seguirán también activas. Es posible que alguna de estas rutas esté confiriendo resistencia a las células Hep3B.

En definitiva, se demuestra para ambos modelos, la importancia de las IRS como proteínas efectoras en la transducción de la señal de IGF-1, ya que al bloquear esta interacción, la capacidad de formar colonias *in vitro* disminuye significativamente en ambos casos. Teniendo en cuenta que hasta la identificación de NT157 no se había identificado ninguna molécula cuya diana fueran las proteínas IRS (Ibuki *et al.*, 2014), este inhibidor se convierte en un compuesto potencial anti-cáncer que podría utilizarse en nuevos tratamientos para el CHC.

6. CONCLUSIONES

Del trabajo realizado se obtienen las siguientes conclusiones:

- 1) La sobreexpresión del sustrato 2 del receptor de insulina en las líneas celulares Hep3B y HuH6, aumenta la tumorigenicidad de las células *in vitro*, al observar una mayor capacidad de formación de colonias y un aumento del tamaño de las mismas, en el experimento de clonogénesis.
- 2) El silenciamiento del sustrato 2 del receptor de insulina en la línea celular HuH6 provoca la formación de colonias de gran tamaño en el ensayo de clonogénesis, formadas por células de carácter migratorio; sugiriendo un aumento de la agresividad de estas células cancerosas. Se rechaza la hipótesis inicial de que el silenciamiento de IRS2 siempre causa una disminución de la tumorigenicidad de las células.
- 3) El estudio de marcadores embrionarios en HuH6, sugiere que al silenciar la expresión endógena de IRS2, estas células experimentan un proceso de des-diferenciación.
- 4) El compuesto NT157 es un inhibidor efectivo de la interacción entre el receptor del factor de crecimiento insulínico 1 (IGF-1) y los sustratos 1 y 2 del receptor de insulina (IRS1 y IRS2) que reduce el crecimiento en colonia de dos líneas distintas de cáncer hepatocelular (HuH6 y Hep3B). Además, HuH6 se muestra más sensible al compuesto que Hep3B.

En definitiva, a partir de los experimentos realizados en este trabajo, se demuestra que, la des-regularización en la expresión del sustrato 2 del receptor de insulina, afecta a la tumorigenicidad de dos modelos *in vitro* distintos de cáncer hepatocelular; poniendo de manifiesto que este mediador de la señalización de insulina/IGF-1 juega un papel importante en el progreso de este tipo de cáncer maligno.

7. BIBLIOGRAFÍA

AMPUERO, J., ROMERO-GÓMEZ M. (2015). Prevention of hepatocellular carcinoma by correction of metabolic abnormalities: Role of statins and metformin. *WJH*, 7(8), p.1105.

AVILA, M., BERASAIN, C., SANGRO, B., PRIETO, J. (2006). New therapies for hepatocellular carcinoma. *Oncogene*, 25(27), pp.3866-3884.

BOISSAN, M., BEUREL, E., WENDUM, D., REY, C., LÉCLUSE, Y., HOUSSET, C., LACOMBE, M., DESBOIS-MOUTHON, C. (2005). Overexpression of Insulin Receptor Substrate-2 in Human and Murine Hepatocellular Carcinoma. *The American Journal of Pathology*, 167(3), pp.869-877.

BELFIORE, A., MALAGUARNERA, R. (2011). Insulin receptor and cancer. *Endocrine Related Cancer*, 18(4), pp.R125-R147.

CANCER RESEARCH UK. (2015). *Worldwide cancer incidence statistics*. [En Línea] Disponible en: <http://www.cancerresearchuk.org/health-professional/cancer-statistics/worldwide-cancer/incidence#heading-One> [Consultado el 23 Jun. 2016].

COHEN, D., LEROITH, D. (2012). Obesity, type 2 diabetes, and cancer: the insulin and IGF connection. *Endocrine Related Cancer*, 19(5), pp.F27-F45.

DEARTH, R., CUI, X., KIM, H., KUIATSE, I., LAWRENCE, N., ZHANG, X., DIVISOVA, J., BRITTON, O., MOHSIN, S., ALLRED, D., HADSELL, D., LEE, A. (2006). Mammary Tumorigenesis and Metastasis Caused by Overexpression of Insulin Receptor Substrate 1 (IRS-1) or IRS-2. *Molecular and Cellular Biology*, 26(24), pp.9302-9314.

DI MASI, A., VIGANOTTI, M., ANTOCCIA, A., MAGRELLI, A., SALVATORE, M., AZZALIN, G., TOSTO, F., LORENZETTI, S., MARANGHI, F., MANTOVANI, A., MACINO, G., TANZARELLA, C., TARUSCIO, D. (2010). Characterization of HUH6, HEP3B, HEPG2 and HLE liver cancer cell lines by WNT/Q-catenin pathway, microRNA expression and protein expression profile. *Cellular and Molecular Biology*, 56, pp.1299-1317.

EL-SERAG, H., RUDOLPH, K. (2007). Hepatocellular Carcinoma: Epidemiology and Molecular Carcinogenesis. *Gastroenterology*, 132(7), pp.2557-2576.

ENGUITA-GERMÁN, M. (2014). Targeting the insulin-like growth factor pathway in hepatocellular carcinoma. *WJH*, 6(10), p.716.

FERLAY, J., SOERJOMATARAM, I., DIKSHIT, R., ESER, S., MATHERS, C., REBELO, M., PARKIN, D.,

FORMAN, D., BRAY, F. (2014). Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International Journal of Cancer*, 136(5), pp.E359-E386.

FONT DE MORA SAÍNZ, J. Y BURKS, D.J. (2001). Las rutas de señales de la insulina: mecanismos de integración de la homeostasis energética y la reproducción. *Endocrinología y Nutrición*, 48(10), pp.295-302.

GAROFALO, C., CAPRISTO, M., MANCARELLA, C., REUNEVI, H., PICCI, P., SCOTLANDI, K. (2015). Preclinical Effectiveness of Selective Inhibitor of IRS-1/2 NT157 in Osteosarcoma Cell Lines. *Frontiers in Endocrinology*, 6.

GALBO, T., SHULMAN, G. (2013). Lipid-induced hepatic insulin resistance. *Aging*, 5(8), pp.582-583.

JENG, K., CHANG, C., JENG, W., SHEEN, I., JENG, C. (2015). Heterogeneity of hepatocellular carcinoma contributes to cancer progression. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 94(3), pp.337-347.

LLOVET, J., BURROUGHS, A., BRUIX, J. (2003). Hepatocellular carcinoma. *The Lancet*, 362(9399), pp.1907-1917.

NOUREDDIN, M., RINELLA, M. (2015). Nonalcoholic Fatty Liver Disease, Diabetes, Obesity, and Hepatocellular Carcinoma. *Clinics in Liver Disease*, 19(2), pp.361-379.

ROEBUCK, D., PERILONGO, G. (2006). Hepatoblastoma: an oncological review. *Pediatr Radiol*, 36(3), pp.183-186.

SALTIEL, A, KAHN, C. (2001). Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature*, 414(6865), pp.799-806.

SCHMELZER, E., ZHANG, L., BRUCE, A., WAUTHIER, E., LUDLOW, J., YAO, H., MOSS, N., MELHEM, A., MCCLELLAND, R., TURNER, W., KULIK, M., SHERWOOD, S., TALLHEDEN, T., CHENG, N., FURTH, M., REID, L. (2007). Human hepatic stem cells from fetal and postnatal donors. *The Journal of Experimental Medicine*, 204(8), pp.1973-1987.

SHAW, L. (2011). The insulin receptor substrate (IRS) proteins. *Cell Cycle*, 10(11), pp.1750-1756.

SESTI, G. (2001). Defects of the insulin receptor substrate (IRS) system in human metabolic disorders. *The FASEB Journal*, 15(12), pp.2099-2111.

WAGHRAY, A. (2015). Hepatocellular carcinoma: From diagnosis to treatment. *WJH*, 7(8),

p.1020.

WITHERS D.J., GUTIÉRREZ J.S., TOWERY H, BURKS D.J., REN J.M., PREVIS S., ZHANG Y., BERNAL D., PONS S., SHULMAN G.I., BONNER-WEIR S., WHITE M.F. (1998). Disruption of IRS-2 causes type 2 diabetes in mice. *Nature* 1998; 391: 900-904.

ZHANG, Q., TANG, Q., QIN, D., YU, L., HUANG, R., LV, G., ZOU, Z., JIANG, X., ZOU, C., LIU, W., LUO, J., ZHAO, Z., MUHAMMAD, S., WANG, G., CHEN, Y., WANG, X. (2015). Role of MicroRNA 30a Targeting Insulin Receptor Substrate 2 in Colorectal Tumorigenesis. *Molecular and Cellular Biology*, 35(6), pp.988-1000.

ZHAO, X. (2012). Association between IRS-2 G1057D polymorphism and risk of gastric cancer. *World Journal of Gastrointestinal Oncology*, 4(1), p.9.