

UNIVERSIDAD  
**NACIONAL**  
DE COLOMBIA

**Terapia génica y microambiente tumoral:  
Efecto de los cambios en la proliferación celular sobre la  
expresión y localización del cotransportador sodio/yodo en un  
modelo in vitro de cáncer de colon.**

**Lorena Xiomara González Acero**

Universidad Nacional de Colombia  
Facultad de Medicina  
Departamento de Ciencias Fisiológicas  
Bogotá, Colombia  
2017



**Terapia génica y microambiente tumoral:  
Efecto de los cambios en la proliferación celular sobre la  
expresión y localización del cotransportador sodio/yodo en un  
modelo in vitro de cáncer de colon.**

**Lorena Xiomara González Acero**

Tesis presentada para optar por el título de:  
**Magister en Bioquímica**

Director:  
**Alejandro Oyono Ondo Méndez, Ph. D.**

Codirectora:  
**Yuly Edith Sanchez, Ph. D.**

Línea de Investigación:  
**Mecanismos Bioquímicos y moleculares de respuesta celular a estrés**

Grupo de Investigación:  
**Bioquímica y Biotecnología (Bio-Bio), Universidad del Rosario**

Universidad Nacional de Colombia  
Facultad de Medicina  
Departamento de Ciencias Fisiológicas  
Bogotá, Colombia  
2017



*"I have a friend who's an artist and has sometimes taken a view which I don't agree with very well. He'll hold up a flower and say "look how beautiful it is," and I'll agree. Then he says "I as an artist can see how beautiful this is but you as a scientist take this all apart and it becomes a dull thing," and I think that he's kind of nutty. First of all, the beauty that he sees is available to other people and to me too, I believe..."*

*I can appreciate the beauty of a flower. At the same time, I see much more about the flower than he sees. I could imagine the cells in there, the complicated actions inside, which also have a beauty. I mean it's not just beauty at this dimension, at one centimeter; there's also beauty at smaller dimensions, the inner structure, also the processes. The fact that the colors in the flower evolved in order to attract insects to pollinate it is interesting; it means that insects can see the color. It adds a question: does this aesthetic sense also exist in the lower forms? Why is it aesthetic? All kinds of interesting questions which **the science knowledge only adds to the excitement, the mystery and the awe of a flower. It only adds. I don't understand how it subtracts."***

**Richard Feynman**

*“Tengo un amigo artista y él en ocasiones adopta una postura con la que yo no estoy muy de acuerdo. Él sostiene una flor y dice: -Mira que bonita es-, y en eso coincidimos. Pero sigue diciendo: -Ves, yo como artista, puedo ver lo bello que es esto, pero tú como científico, lo desmontas todo y lo conviertes en algo insustancial- (o aburrido). Y entonces pienso que él está diciendo tonterías. Para empezar, la belleza que él ve también es accesible para mí y para otras personas, creo yo.*

*Puedo apreciar la belleza de una flor, al mismo tiempo, yo veo mucho más en la flor que lo que ve él. Yo puedo imaginar las células que hay en ella, las complicadas acciones que tienen lugar en su interior y que también tienen su belleza. Lo que quiero decir es que no sólo hay belleza en la dimensión que capta la vista, sino que se puede ir más allá, hacia la estructura interior, ¡también los procesos. El hecho de que los colores en las flores hayan evolucionado y atraigan a los insectos, significa que los insectos pueden apreciar el color. Eso añade preguntas: ¿el sentido de la estética también lo tienen las formas de vida menores de la naturaleza? ¿Por qué razón les resulta estético?. **Toda clase de interesantes cuestiones procedentes del conocimiento científico no hacen sino sumarle misterio e interés a la impresión que deja una simple flor, no entiendo cómo podría restárselo.**”*

**Richard Feynman**

# Agradecimientos

En primer lugar, agradezco a mi familia Má, Pá, Che, por estar siempre presentes a lo largo del desarrollo de este proyecto y por brindarme apoyo incondicional en este camino de buenas y malas decisiones que tomé.

A los docentes que me formaron en la Universidad Nacional de Colombia, por enseñarme el valor del conocimiento y por motivar la curiosidad y amor por la labor científica y la investigación en ciencias básicas.

A todos los integrantes del grupo de investigación en Bioquímica y Biotecnología (Bio-Bio) de la Universidad del Rosario, por abrirme la puerta de su laboratorio y permitirme desarrollar este proyecto. En especial a Ruth Garzón, por hacerme enamorar del Western Blot y por tener la paciencia suficiente para soportarme durante dos años.

A Alejandro Ondo, por cumplir su rol de director y guía a lo largo de este proceso, por confiar en mí y por transmitirme su serenidad, tranquilidad y alegría en los momentos más difíciles.

A mis compañeros y amigos que compartieron sus opiniones a lo largo de todo el proceso y a todos aquellos que se interesaron y aportaron de una u otra manera a este trabajo.

A Daniel López por hacer parte integral de este proceso y por brindarme su apoyo incondicional y alegría.

A Alejandro Restrepo, por su apoyo incondicional.

A Leo, por enseñarme la belleza oculta de las bajas expectativas, por caminar junto a mí y por el amor incondicional ninja-payaso-oso que me brindó.

A la Universidad Nacional de Colombia por otorgarme las Becas Asistente Docente y Mejores Promedios Académicos de Posgrado las cuales me permitieron continuar en el proceso académico de trasfondo a este trabajo de tesis.

Finalmente, no puedo estar mas agradecida con la vida que me tocó, que con sus altos y bajos me ha mostrado lo que resulta del esfuerzo, las lagrimas, las risas y un equipo de travesías inolvidable.

## Resumen

El cotransportador sodio-yodo (NIS) es una proteína que cataliza un transporte activo de yodo, hacia el interior de la célula, aprovechando el gradiente de sodio creado por la bomba sodio/potasio. Se localiza a nivel basolateral en diferentes tipos celulares, pero principalmente en células foliculares de tiroides. Por su capacidad de acumulación de yodo, esta proteína ha sido ampliamente utilizada como herramienta diagnóstico-terapéutica contra el cáncer de tiroides. Dada su funcionalidad, la utilización de radioisótopos de yodo es una herramienta altamente efectiva. Hoy en día su aplicabilidad en otros tipos de cáncer es prometedora debido a la implementación de la terapia génica. con el fin de evaluar la efectividad de la terapia génica basada en la introducción heteróloga de la proteína NIS, investigadores de la unidad TIRO de la Université de Nice – Sophia Antipolis, generaron una línea celular a partir de células de la línea de carcinoma de colon HT29, transfectándolas establemente con el transportador NIS (HT29-NIS). Esta línea ha sido utilizada para generar tumores en ratones con el fin de evaluar la efectividad de esta herramienta. Los resultados de estos estudios permitieron establecer que la función del transportador no es homogénea a lo largo de los tumores generados, observándose una mayor captación de yodo en las zonas externas del tumor, y una captación muy baja o nula al interior del mismo. Una de las posibles fuentes de variación puede ser la heterogeneidad tumoral, un fenómeno que hace referencia a la variedad de fenotipos de las células tanto cancerígenas como de los otros tipos celulares que conforman el microambiente tumoral. Dado este contexto, el objetivo de este trabajo fue determinar los posibles efectos de cambios en la proliferación celular sobre la expresión y localización de NIS *in vitro*. Para ello, las diferencias en la proliferación se simularon mediante la disminución de suero en el medio de cultivo. Por otro lado, para evaluar la expresión y localización de NIS se aplicaron metodologías de Western Blot e Inmunocitoquímica. Los cambios en el estado de proliferación de las células HT29-NIS generaron variaciones en el

patrón de expresión y en la localización intracelular del transportador, posiblemente asociados con variaciones en su estado de glicosilación. Esta observación, sugiere que posiblemente una o más rutas de señalización asociadas a la proliferación celular pueden ser responsables de algún tipo de regulación sobre el transporte de yoduro en los tumores de células HT29-NIS generados en ratones. Con base en lo anterior, se realizó una búsqueda de posibles rutas de señalización asociadas tanto con la regulación de la proliferación como con la regulación del transportador. Una de las rutas de señalización que sobresalió fue la ruta PI3K/AKT, ya que en diferentes modelos celulares puede regular la expresión de NIS y además es una ruta de señalización ampliamente asociada a la proliferación celular. Por ello, se utilizó Wortmanina, inhibidor de ésta para tener una aproximación al efecto de su inhibición sobre la expresión del transportador. La acción de tal inhibidor no mostró diferencias significativas sobre la expresión ni el patrón de expresión del cotransportador. En conjunto, estos experimentos permiten un acercamiento inicial a uno de los fenómenos que puede estar afectando negativamente la aplicación de radioterapia metabólica basada en NIS: el estado proliferativo de las células, nunca dejando de lado los conceptos de heterogeneidad tumoral y microambiente tumoral.

**Palabras Clave:** terapia génica, microambiente tumoral, células HT29, co-transportador sodio/yodo

## Abstract

Sodium-Iodide symporter (NIS) a protein that actively cotransports sodium and iodide has been widely used as a diagnostic and therapeutic tool against thyroid cancer. Mostly, NIS is expressed in thyroid follicular cells as a transmembrane protein. Because of its functional mechanisms the utilization of iodide radioisotopes as thyroid cancer therapy is a highly effective tool. Nowadays its usability in other cancer types becomes promising due to the utilization of genetic therapy. Previous to this research work, researches at TIRO unit in Université Sophie Antopolis generated an HT29 cell line transfected with NIS symporter (HT29-NIS). This cell line has been used to generate xenografts in order to assess the effectivity of this tool. However, the function of the symporter is not homogeneous along the xenografts. One of the possible sources of variation might be the tumor heterogeneity. This phenomenon is described as the variety of phenotypes present in the tumor forming cells and the tumor stroma and microenvironment cells. Given this context, the aim of this study was to assess the possible effect of proliferation changes on NIS symporter expression and localization *in vitro*. In order to do so, decreasing serum supplementation percentage in the culture media simulated the different proliferation states. Western Blot and Immunocytochemistry determined NIS expression and subcellular localization. Changes in the proliferation state of HT29-NIS cells generated variations on the expression pattern and intracellular localization of NIS protein, possibly associated with its glycosylation state. These results suggest that proliferation-related pathways might be associated with the heterogeneous transport of iodide on HT29-NIS xenografts. Having in mind the suggestion above, a wide search about signaling pathways regulating proliferation and NIS expression was held. As a result the PI3K/AKT pathway was one of the signaling pathways that meet our criteria. In order to test the effects of inhibiting this pathway we apply Wortmannin as the inhibitory agent. It didn't yield significant variations on the expression or expression pattern of the transporter. As a hole,

this experiments shed a light into one of the different phenomenon negatively affecting the application of NIS-based metabolic radiotherapy: the cellular proliferative state, never leaving appart its association with tumor heterogeneity and tumoral microenvironment.

**Key words:** genetic therapy, tumoral microenvironment, HT29 cell line, sodium/iodide symporter.

## Contenido

<b>Resumen</b> .....	<b>i</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>ii</b>
<b>Contenido</b> .....	<b>1</b>
<b>Lista de Figuras</b> .....	<b>5</b>
<b>Introducción</b> .....	<b>7</b>
<b>Capítulo 1: El cotransportador Sodio/Yodo (NIS), su regulación, la terapia génica y el microambiente tumoral</b>	
1.1 ¿Qué es el cotransportador sodio/yodo (NIS)? .....	11
1.2 ¿Qué relación pueden tener la terapia génica y NIS? .....	12
1.3 ¿Por qué es importante la regulación de NIS? .....	13
1.4 ¿Qué otros elementos hay que involucrar? .....	15
1.4.1 La heterogeneidad tumoral	
1.4.2 ¿Cuál es el efecto del microambiente tumoral?	
1.5 Punto de partida: Antecedentes .....	18
1.6 Justificación: ¿Cuál es la pregunta con respecto a estos factores? .....	21
1.7 Objetivos .....	23
1.6.1 General	
1.6.2 Específicos	
<b>Capítulo 2. Establecimiento de las condiciones de proliferación y quiescencia en las células HT29-NIS</b>	
2.1 Metodología .....	26
2.1.1 Cultivo celular	

2.1.2 Condiciones de quiescencia	
2.1.3 Curvas de crecimiento	
2.2 Resultados .....	29
2.2.1 Morfología celular bajo diferentes condiciones de suplementación del medio con SFB	
2.2.2 Índice Ki-67 de las células HT29-NIS	
2.2.3 Seguimiento del crecimiento y viabilidad	
2.3 Conclusiones .....	34

### **Capítulo 3. Evaluación de la expresión y localización del cotransportador NIS en condiciones alteradas de proliferación**

3.1 Metodología .....	36
3.1.1 Extracción de Proteína	
3.1.2 SDS-PAGE	
3.1.3 Western blot	
3.1.1 Inmunocitoquímica	
3.2 Resultados .....	39
3.2.1 Efecto de la quiescencia sobre la expresión de NIS	
3.2.2 Efecto de un gradiente de suero y de la presencia de Insulina sobre la expresión de NIS.	
3.2.3 Efecto de un gradiente de suero sobre la localización de NIS	
3.3 Conclusiones .....	42

### **Capítulo 4. Evaluación del efecto de la ruta de señalización PI3K/AKT sobre la expresión y localización del cotransportador NIS**

4.1 Metodología .....	48
4.1.1 Extracción de Proteína	
4.1.2 SDS-PAGE	
4.1.3 Western blot	
4.1.4 Inhibición con Wortmanina	
4.2 Resultados .....	50
4.2.1 Comportamiento de AKT 1, 2 y 3 en el tratamiento con insulina y diferentes concentraciones de suero.	

4.2.2 Comportamiento de AKT 1, 2 y 3 en el tratamiento con insulina y diferentes concentraciones de Wortmanina.

4.2.3 Inhibición por medio de Wortmanina de la ruta de señalización PI3K/AKT

4.2.2 Efecto de la inhibición de la ruta PI3K/AKT mediada por Wortmanina sobre la expresión de NIS

4.3 Conclusiones ..... 55

**Capítulo 5. Discusión**

**Capítulo 6. Perspectivas**

**Referencias**



## Lista de Figuras

<b>Figura 1</b> Células tumorales HT29-NIS inyectadas subcutáneamente en ratones .....	19
<b>Figura 2</b> Evaluación morfológica de las células HT29-NIS bajo diferentes tratamientos de suplementación de SFB en el medio de cultivo .....	31
<b>Figura 3</b> Inmunocitoquímica y conteo del marcador de proliferación Ki67 .....	32
<b>Figura 2</b> Tasa de Crecimiento y Viabilidad de las células HT29-WT y HT29-NIS bajo condiciones de Proliferación (P) o Quiescencia (Q) .....	32
<b>Figura 3</b> Western Blot de NIS bajo condiciones de proliferación (P) y quiescencia (Q) .....	41
<b>Figura 4</b> Western Blot de NIS bajo diferentes concentraciones de SFB en el medio y en presencia o ausencia de Insulina (100mM) .....	43
<b>Figura 5</b> Inmunocitoquímica de NIS .....	44
<b>Figura 8</b> Western blot de Akt1, 2, 3 en células HT29-NIS bajo diferentes tratamientos de SFB en el medio de cultivo .....	53
<b>Figura 9</b> Western blot de Akt1, 2, 3 en células Ht29-NIS bajo diferentes concentraciones de Wortmanina en el medio de cultivo .....	53
<b>Figura 10</b> Western blot de Akt1, 2, 3 y p-AKT en diferentes líneas celulares bajo el tratamiento con y sin Wortmanina (100nM) .....	54
<b>Figura 11</b> Western blot de Nis bajo diferentes concentraciones de Wortmanina en presencia o ausencia de Insulina (100uM) .....	55
<b>Figura 12</b> Diagrama general de la estrategia empleado para generar células que expresan NIS y que pueden ser utilizadas como herramientas de diagnóstico y terapia .....	58



## Introducción

Según la Organización Mundial de la Salud, el cáncer “es un proceso de crecimiento y diseminación incontrolado de células que puede aparecer prácticamente en cualquier lugar del cuerpo y que suele invadir el tejido circundante y puede provocar metástasis en puntos distantes del organismo.” En adición a esto, “un porcentaje importante de cánceres pueden curarse mediante cirugía, radioterapia o quimioterapia, especialmente si se detectan en una fase temprana” ([www.who.int/topics/cancer/es](http://www.who.int/topics/cancer/es)). Un ejemplo de cáncer que puede ser curado es el cáncer de tiroides, en el cual la efectividad de la radioterapia metabólica ha permitido su utilización desde hace más de 50 años (Simpson, 1975) (Harmer, 1996) Tal efectividad es dada en gran medida por la presencia del cotransportador sodio/yodo (NIS) (Filetti S. , Bidart, Arturi, Caillou, Russo, & Schlumberger, 1999). Este cotransportador es una glicoproteína de membrana que se expresa principalmente en células foliculares epiteliales de la glándula tiroides. Allí permite el ingreso del yodo a estas células donde se realiza la síntesis de las hormonas tiroideas (Bizhanova & Kopp, 2009).

Sus características funcionales han permitido su utilización en tratamientos contra el cáncer y otras patologías tiroideas, por medio de la utilización de isótopos radiactivos de yodo (Maxon & HS, 1999). Sin embargo, sus mecanismos de regulación son variados y no han sido elucidados por completo. El desarrollo de diversos estudios sobre la proteína NIS ha permitido conocer detalles de su estructura, función y localización, para lograr así optimizar aplicaciones diagnóstico-terapéuticas de NIS, como la terapia génica y la radioterapia metabólica, en tumores no tiroideos, que normalmente no expresan esta proteína (Spitzweg & Morris, The sodium iodide symporter: its pathophysiological and therapeutic implications, 2002).

Por otra parte, uno de los mayores limitantes para el desarrollo de terapias antitumorales es la heterogeneidad tumoral. Las poblaciones de células tumorales presentan una diversidad significativa con respecto a muchas de sus características, incluyendo fenotipos clínicamente importantes como habilidad para generar metástasis y para sobrevivir a diferentes terapias. Estas variaciones pueden ser resultado de interacciones con el microambiente tumoral (Mohanty, Datta, & Venkatraj, 2014). Es por ello que una mejor comprensión de la composición tumoral, así como un monitoreo de los cambios presentados por las poblaciones celulares tumorales durante la progresión y tratamiento del cáncer pueden mejorar el diagnóstico y diseño de nuevas estrategias terapéuticas que logren evitar procesos indeseados como la resistencia a tratamientos (Ajani, Izzo, & Lee, 2009).

Con el fin de estudiar el efecto de la heterogeneidad tumoral en la radioterapia metabólica a base de NIS, la Unidad TIRO (Transporteurs en Imagerie et Radiothérapie Oncologique) de la Universidad de Niza, desarrolló el modelo de células de cáncer de colon modificadas genéticamente con este transportador (HT29-NIS), que han utilizado para generar tumores subcutáneos en ratones. Con la posterior caracterización de los tumores inducidos se ha evidenciado que la captación de yodo es heterogénea a lo largo de la extensión de los tumores. No son claros los motivos por los cuales se presentan variaciones en la funcionalidad de NIS y tampoco se conocen, en este modelo, los posibles mecanismos mediante los cuales se está regulando su expresión, funcionalidad y/o localización en la membrana.

Uno de los posibles factores que regula el comportamiento del transportador en este modelo celular podría estar asociado a las variaciones en la proliferación celular observadas en la mayoría de tumores (Comunicación personal Dr. Thierry Pourcher). Una de las vías de señalización involucradas en los cambios en la proliferación celular es la vía PI3K/AKT que, además, ha sido asociada con la regulación de la expresión de NIS en algunos tipos celulares normales y cancerosos en los que esta proteína se expresa de manera constitutiva (García & Santisteban, 2002) (Knostman, et al., 2004).

Tomando en cuenta lo anterior, el presente trabajo imita *in vitro* los cambios en la proliferación celular presentes en los tumores, y evalúa si existen variaciones en la expresión del transportador bajo dichas condiciones. Se evaluó también el posible rol de la vía de señalización PI3K/AKT en la

regulación de la expresión de NIS en las condiciones de estudio mediante su inhibición con Wortmanina (Powis, et al., 1994) (Walker, et al., 2000). Para esto se realizaron ensayos de inmunocitoquímica y Western Blot evaluando los niveles de expresión tanto del transportador NIS como de la proteína AKT, en condiciones de baja tasa de proliferación y en condiciones de alta tasa de proliferación.

La información obtenida en este trabajo permitió evaluar la importancia de los cambios en la proliferación celular sobre la expresión del transportador NIS, asociada indirectamente con la efectividad de la radioterapia metabólica a base de NIS. Además, permitió realizar una aproximación al rol de la vía de señalización PI3K/AKT sobre la expresión del transportador. Este proyecto complementa otros proyectos de nuestro grupo de investigación, que buscan optimizar las estrategias de diagnóstico y tratamiento contra el cáncer basados en la proteína NIS, teniendo en cuenta los contextos de la heterogeneidad tumoral y el microambiente tumoral.



# **Capítulo 1: El cotransportador Sodio/Yodo (NIS), su regulación, la terapia génica y el microambiente tumoral.**

## **1.1 ¿Qué es el cotransportador sodio/yodo (NIS)?**

NIS es una proteína de membrana que permite la acumulación de yodo en diferentes tejidos, y cumple un rol clave en la tiroides ya que a partir del yodo internalizado se realiza la biosíntesis de las hormonas tiroxina y tri-yodotironina. Estas hormonas están involucradas en la regulación del metabolismo y también cumplen papeles importantes en la maduración del sistema nervioso, los músculos y los pulmones en los fetos en desarrollo y en los recién nacidos. La clonación de este gen en ratas en el año de 1996 (Day, Levy, & Carrasco, 1996) (Smanik, Liu, Furmiger, Ryu, Xing, & Mazzaferri, 1996) no fue solo un gran paso para el estudio del transporte de yodo sino que también permitió la caracterización del rol de NIS en cáncer de tiroides y la investigación de otros desordenes relacionados con NIS (enfermedades autoinmunes de la tiroides, hipotiroidismo congénito, entre otros) (Everett & Green, 1998) (Spitzweg & Morris, 2012) (Vijlder, 2003).

El gen que codifica para esta proteína presenta un marco de lectura de 1929 nucleótidos que codifican para la glicoproteína de 643 amino ácidos. Esta proteína se encarga del cotransporte de un ion yoduro en contra de su gradiente electroquímico junto con dos iones sodio a favor de su gradiente electroquímico. Su peso molecular se encuentra entre 70 – 90 kDa debido a los variables niveles de glicosilación que presenta. Tres de sus residuos pueden ser glicosilados: Asn225, Asn485 y Asn497 localizados en loops de la proteína expuestos al medio extracelular, y presenta también otros residuos que pueden ser fosforilados (De la Vieja, Dohan, Levy, &

Carrasco, 2000) (Levy, et al., 1997) (Riedel, Dohán, De la Vieja, Ginter, & Carrasco, 2001) (Riedel, Dohán, De la Vieja, Ginter, & Carrasco, 2001).

Con base en su funcionamiento y características moleculares, este transportador cumple un rol importante en la evaluación, diagnóstico y tratamiento de varias condiciones patológicas de la tiroides, ya que permite la implementación de técnicas de visualización con yodo radiactivo y asimismo el direccionamiento de radioisótopos de manera específica. Por ejemplo, es posible utilizarlo para el diagnóstico y aplicación terapéutica con sustratos radioactivos como yoduro ( $I^{123}$ ,  $I^{124}$ ,  $I^{131}$ ), y otros aniones monovalentes como el perclorato ( $ClO_4^-$ ), clorato ( $ClO_3^-$ ), tiocianato ( $SCN^-$ ) y nitrato ( $NO_3^-$ ) y diferentes radioisótopos tales como el pertecnato ( $TcO_4^-$ ), perrenato ( $ReO_4^-$ ) y astatina (At) (Van Sande, et al., 2003) (Eskandari, Loo, Day, Levy, Wright, & Carrasco, 1997) (Lindencrona, Nilsson, & Forssell-Aronsson, 2001). Es claro que el estudio de NIS, más allá de sus intereses bioquímicos y fisiológicos inherentes, podría también presentar grandes implicaciones en el desarrollo de nuevos tratamientos contra el cáncer en una amplia variedad de tejidos (Levy, et al., 1997) (Filetti S., Bidart, Arturi, Caillou, Russo, & Schlumberger, 1999) (Riedel, Dohán, De la Vieja, Ginter, & Carrasco, 2001).

## 1.2 ¿Qué relación pueden tener la terapia génica y NIS?

Con base en los avances con respecto a su funcionalidad y estructura, la implementación de NIS en sistemas de transferencia genética utilizando promotores tejido-específicos que permitan la expresión del gen en células tumorales, maximizando la citotoxicidad específica es ahora una realidad (Urnauer, et al., 2016) (Spitzweg, et al., 2003). Para implementar este tipo de terapias una de las metodologías utilizadas es la transfección o transducción estable de las células con un constructo genético que contenga la secuencia del transportador, cuya regulación esté dada por promotores específicos para cada tipo de cáncer. Por ejemplo, Klutz et. al ha trabajado en un modelo celular de cáncer de hígado (HCC – Hepato cellular carcinoma, por sus siglas en inglés) mediante el cual inducen la generación de tumores en ratones, para luego probar la eficiencia de terapias basadas en el tratamiento con adenovirus con la secuencia del transportador NIS regulado por el promotor de la  $\alpha$ -fetoproteína (Ad5-AFP-NIS). Sus resultados en ensayos *in vivo*, sugieren que el volumen del tumor fue controlado a partir de la terapia con Ad5-AFP-NIS seguida por el tratamiento con yodo radiactivo. Así mismo, la supervivencia de los ratones con este

tratamiento aumento significativamente con respecto a los controles, indicándose así la funcionalidad del tratamiento, particularmente con respecto a la estabilización del crecimiento del tumor, como al aumento del tiempo de vida de los individuos tratados (Klutz, et al., 2011).

Este tipo de estrategias han sido útiles en diferentes modelos de cáncer en los cuales las terapias usualmente implementadas no han sido efectivas (Kogai, et al., 2004) (Scholz, Cengic, Göke, Morris, & Spitzweg, 2004) (Cengic, Baker, Schütz, Göke, Morris, & Christine, 2005). Complementario a esto, hoy en día es posible aplicar otro tipo de estrategias como la generación de células madre mesenquimales modificadas con NIS. Estas células debido a sus características particulares son capaces de migrar hacia diferentes tipos de tumores con base a señalizaciones generados en el tumor y en cercanía a él. Dada esta migración y dada la funcionalidad adquirida de transportar diversos radioisótopos (debida a la transfección con NIS) es posible aplicar terapias dirigidas específicamente al foco o focos tumorales (Knoop, et al., 2011).

Con base en los ejemplos anteriores es posible tener una visión en la que la combinación de la terapia génica con el transporte de radioisótopos por parte del transportador NIS es un campo promisorio para el desarrollo de estrategias específicas, dirigidas y con menores efectos colaterales enfocadas al diagnóstico y tratamiento de diferentes tipos de cáncer, aproximaciones que propondrían una solución a la invasividad y efectos no dirigidos como los observados en tratamientos como la quimioterapia y la radioterapia donde se ven afectadas células sanas y tumorales indistintamente.

### **1.3 ¿Por qué es importante la regulación de NIS?**

Si la finalidad es la implementación de la terapia génica combinada con el transportador NIS como herramienta diagnóstico-terapéutica, es necesario tener en cuenta la regulación a la que se somete esta proteína tanto en contextos fisiológicos como en contextos en los cuales se induzca su expresión. Este punto es de vital importancia ya que la efectividad de estas terapias depende fundamentalmente de la adecuada expresión, funcionalidad y localización del transportador y, en el caso de que algún mecanismo de regulación ejerza sobre alguno de estos factores es muy posible que la terapia planeada no funcione como se espera. Actualmente, además de explorar los mecanismos de regulación negativa de la expresión y localización de NIS para tratar de

solventarlos, existen investigaciones en las que se buscan mecanismos a partir de los cuales aumente la eficiencia del sistema, para mejorar la efectividad de los tratamientos (Kelkar, Senthilkumar, Jadhav, Gupta, Ahn, & De, 2016).

En el caso de contextos fisiológicos, la hormona estimulante de tiroides (TSH, por sus siglas en inglés) es el principal factor estimulante para la función asociada con la captación de yodo en las células de tiroides. La regulación mediada por TSH se apoya en señalizaciones relacionadas con el AMPc y se ha observado que muchos de los efectos de esta regulación se presentan a nivel de la transcripción del gen que codifica para la proteína (Kogai, Endo, Saito, Miyazaki, Kawaguchi, & Onaya, 1997). Sin embargo, se conoce que la regulación medida por TSH no se centra solamente en el nivel transcripcional sino además en procesos incluso postraduccionales como la redistribución de la localización de NIS en la membrana celular (Kaminsky, Levy, Salvador, Dai, & Carrasco, 1994).

Sin embargo, la hormona estimulante de tiroides, TSH, no es el único factor regulador de NIS. Otros mecanismos de regulación del transportador son la concentración de yodo, la tiroglobulina e incluso señalizaciones generadas por TGF- $\beta$ 1, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$  e INF- $\gamma$ . Este último tipo de regulación por lo general se relaciona con modificaciones en las rutas de señalización activadas por TSH, por lo que constituyen mecanismos más complejos de regulación (Jhiang, 2000). Por otra parte, existen reportes en los cuales se observa que la captación de yodo puede ser re-inducida por el tratamiento con ácido retinoico (RA, por sus siglas en inglés) en células de carcinoma de tiroides que han perdido su capacidad de captación de yodo tras su transformación maligna (Van Herle, et al., 1990). A pesar de esto, en otros modelos celulares de tiroides no-malignos los efectos del RA en la captación de yodo han sido opuestos. Por ello, los mecanismos de regulación mediados por este compuesto pueden ser variables dependiendo del tipo celular del que se trate incluyendo variaciones clave como la transformación maligna o no (Schmutzler, Winzer, Meissner-Weigl, & Kohtle, 1997) .

En contextos donde se ha inducido su expresión, los mecanismos de regulación del transportador presentados anteriormente también han sido observados. Por ejemplo, en células de cáncer de próstata ha sido evidenciada la efectividad del RA para estimular la expresión de NIS y asimismo la captación de yodo (Spitzweg, et al., 2003) y de la dexametasona (Scholz, Cengic, Göke, Morris,

& Spitzweg, 2004). A pesar de que se tiene un acercamiento a los posibles reguladores de NIS, actualmente los mecanismos no han sido completamente elucidados, complicando así aproximaciones certeras y precisas que expliquen la regulación de esta proteína en todos los niveles (transcripcional, postranscripcional, postraduccionál).

Entre los estudios realizados, existe evidencia que demuestra que la activación de la vía de señalización PI3K/AKT, disminuye significativamente la captación de yodo en células tiroideas de ratón y su inhibición en diferentes niveles cascada abajo genera un aumento en la expresión de mRNA de NIS, así como un aumento en la captación de yodo en este mismo modelo. Tal efecto ha sido evidenciado también en líneas celulares de tiroides transformadas malignamente, pero es posible que los dos mecanismos moleculares sean diferentes (García & Santisteban, 2002) (Kogai, Sajid-Crockett, Newmarch, Liu, & Brent, 2008). Esta ruta de señalización podría constituir un mecanismo más detallado de las señalizaciones que afectan a NIS, a pesar de esto, el efecto de esta ruta de señalización en otros modelos celulares es desconocido.

## **1.4 ¿Qué otros elementos hay que involucrar?**

Habiendo establecido la importancia de la regulación del transportador sobre la implementación de terapias combinadas (terapia génica y NIS), la aplicabilidad de este tipo de estrategias aparenta ser sencilla debería ser casi un hecho. Sin embargo, a pesar de que en principio esta estrategia es un modelo simple, los sistemas biológicos son más complejos que la interacción entre dos o tres factores. Es por ello que en casos como el desarrollo de estrategias de diagnóstico y terapia contra el cáncer existen otros factores clave que deben tenerse en cuenta, factores que hacen más difícil la aplicabilidad de estas terapias, dentro de los muchos que hay, un par son: la heterogeneidad tumoral y el microambiente tumoral.

### **1.4.1 La heterogeneidad tumoral**

La heterogeneidad intra-tumoral hace referencia a los diferentes fenotipos celulares dentro de los tumores y ha sido reconocida desde hace muchos años, desde investigaciones de patólogos que visualizaban dicha heterogeneidad (Brown & Fee, 2006) hasta estudios de la variabilidad genética en tumores de animales en los años 50s (Makino, 1955). Posteriores estudios en la

década de los 70s demostraron la existencia de diferentes subpoblaciones de células dentro de los tumores que diferían en términos de tumorigenicidad, resistencia al tratamiento y habilidad para realizar metástasis (Heppner & Miller, 1983) (Fidler & Kripke, 1977). De esta manera, con el paso de los años y el desarrollo tecnológico que ha permitido la evaluación detallada de células tumorales, se ha adquirido mayor evidencia que soporta esta condición de heterogeneidad tumoral (Almendro, Marusyk, & Polyak, 2013).

Actualmente, se han definido características “obligadas” durante los procesos de iniciación y progresión del cáncer que diferencian a las células transformadas malignamente de las células sanas. Dentro de estas características se encuentran la habilidad de mantener señales de proliferación celular, habilidad de evadir supresores de crecimiento, evasión de la respuesta inmune, inmortalidad replicativa, movilidad aumentada, habilidad metastásica, potencial angiogénico, inestabilidad genómica y alteración del metabolismo celular (Hanahan & Weinberg, 2011). A pesar de que estas propiedades son asignadas al grupo general de células transformadas malignamente, células individuales y subpoblaciones de células tumorales presentan cierta variabilidad en estas características. Incluso, existe variabilidad en subpoblaciones de las células pertenecientes al estroma tumoral. Algunas de las variaciones observadas corresponden a la activación de rutas de señalización, evasión de la inmunidad antitumoral, inducción de la senescencia y activación de rutas metabólicas (Guernot, et al., 2006) (Richman, et al., 2011) (Allen, et al., 2013). Además, la heterogeneidad intratumoral aplica no sólo para las células tumorales sino también para diferentes componentes del microambiente tumoral (Tlsty & Coussens, 2006) .

La heterogeneidad de las poblaciones celulares de los tumores y las condiciones del microambiente tumoral generan algunos inconvenientes para las estrategias de tratamiento utilizadas, dado que un tratamiento puede ser efectivo en cierta subpoblación del tumor pero no en las otras, e incluso puede que otro paciente no presente la subpoblación susceptible al tratamiento aplicado (Mohanty, Datta, & Venkatraj, 2014). Es por ello que es necesario tener en cuenta este factor clave de las células tumorales a la hora de estudiarlas y a la hora de diseñar estrategias diagnóstico-terapéuticas.

### 1.4.2 ¿Cuál es el efecto del microambiente tumoral?

Cuando se lleva a cabo el proceso de formación del tumor, no solo se involucran las variaciones genéticas de las células tumorales sino también de la matriz extracelular, del endotelio vascular y estromal y de las células inmunes. Por lo anterior es posible definir al nicho tumoral como una topografía física dinámica en la cual el soporte estructural, acceso a factores de crecimiento, suministro vascular e interacciones de células inmunes pueden variar drásticamente entre sí generando mayores variaciones intercelulares que las generadas en sus procesos de división (Junttila & de Sauvage, 2013).

La heterogeneidad tumoral comprende entonces el concepto de microambiente tumoral (TME) en donde es posible distinguir varios tipos celulares. Por ejemplo, células del sistema inmune como Natural Killers (NK), linfocitos T y B, macrófagos asociados al tumor (TAM), células supresoras derivadas mieloides (MDSC), células dendríticas (DC), neutrófilos asociados al tumor (TAN), fibroblastos asociados a cáncer (CAF), adipocitos y pericitos (Balkwill, Capasso, & Hagemann, 2012). También debido a estas variaciones se ven afectados factores adicionales como la acidez, la disponibilidad de oxígeno y de nutrientes que influyen drásticamente la supervivencia, comportamiento y repoblación de las células cancerígenas (Chang, et al., 2015).

En un sistema *in vitro*, simular las características propias del microambiente tumoral o incluso lograr las condiciones para poder observar la heterogeneidad tumoral presenta dificultades a nivel experimental, por lo que tomar una de ellas primero es una de las opciones en la búsqueda de un mejor entendimiento de este tipo de modelos. En el caso de este estudio, uno de los factores a tener en cuenta fue el estado proliferativo de las células, y como estrategia para alcanzarlo se utilizó la disminución de suero en el medio de cultivo. Bajo estas condiciones se esperó establecer diferencias entre un estado proliferativo y un estado quiescente.

Aunque la quiescencia es un estado celular común para muchas células somáticas, se conoce muy poco acerca de su regulación a nivel celular. De hecho, es más fácil reconocer a una célula quiescente por aquello en lo que no está especializada (síntesis de DNA, generación de husos mitóticos) que en lo que sí. Actualmente, son usadas señales que permiten el arresto en el

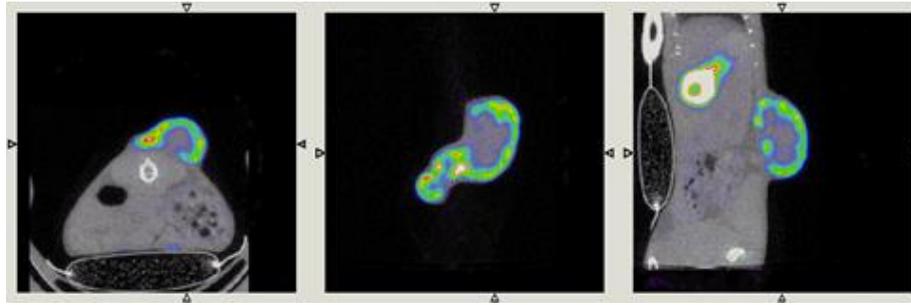
crecimiento y división celular tales como la privación de mitógenos, el crecimiento a alta densidad y la disrupción de las adhesiones célula-sustrato (Coller, Sang, & Roberts, 2006).

Una definición comúnmente aceptada de quiescencia es: “una ausencia **reversible** de proliferación”, de esta manera una célula que no se pueda dividir, pero que posee la facultad de readquirir su división es considerada como una célula quiescente. Sin embargo, esta definición es muy amplia y probablemente pueda cubrir varias situaciones celulares, por lo cual es importante diferenciarla de estados senescentes o apoptóticos en los cuales la posibilidad de reversibilidad no existe y el único camino posible que tiene la célula es la muerte. (Laporte, et al., 2011).

### **1.5 Punto de partida: Antecedentes.**

Para establecer como herramienta diagnóstico-terapéutica del cáncer la expresión del transportador de yodo NIS, se ha desarrollado una modificación de la línea celular HT29 logrando la expresión estable del transportador de yodo NIS. Esta modificación fue realizada mediante la transfección estable de las células HT29 con un vector de expresión eucariótico pcDNA3.1-mNIS. Los clones estables fueron seleccionados tres días post-transfección adicionando al medio el antibiótico de selección. La expresión de NIS fue verificada con ensayos de captación de  $I^{125}$ , western blot y experimentos de inmunodetección evidenciando una alta localización del transportador en la membrana plasmática. Finalmente se seleccionó un clon de células HT29-NIS obteniendo así la línea celular HT29-NIS de trabajo.

Con el fin de estudiar y caracterizar el modelo desarrollado, en la Unidad TIRO de la Universidad de Niza, Francia, se han obtenido imágenes SPECT (Single-Photon Emission Computed Tomography) de la captación de yodo en tumores inducidos en ratones con células HT29-NIS. Los resultados de estos experimentos muestran que en la parte externa del tumor se presenta una mayor captación del yodo mientras que en la sección interna del tumor se observa una captación de yodo disminuida o nula (Figura 1). Tales observaciones se relacionan con un aumento en la inmunodetección positiva del transportador en la parte externa del tumor, así como una disminución en la expresión del mismo en la parte interna (Datos no mostrados). Hasta el momento no se han determinado las causas de la disminución del transporte de yodo en ciertas zonas del tumor.



**Figura 1** Células tumorales HT29-NIS inyectadas subcutáneamente en ratones. Inyección de células HT29-mNIS en ratones NOD SCID 27 días post-inyección. (Comunicación personal Dr. Thierry Pourcher)

Se ha observado que los patrones de captación de yodo en los tumores inducidos tienen una distribución similar a diferentes marcadores de proliferación y quiescencia (Comunicación personal Dr. Thierry Pourcher), adicionalmente, a partir de estudios *in vitro*, se ha observado que en este modelo celular existe una disminución en la captación de yodo en condiciones de hipoxia comparada con la captación de yodo en condiciones de normoxia (Datos no publicados Fabio Castillo). Por lo anterior, que se plantea la posible existencia de alguna relación entre estos fenómenos (variación en los patrones de captación de yodo, proliferación e hipoxia)



## **1.6 Justificación: ¿Cuál es la pregunta con respecto a estos factores?**

Considerando los antecedentes presentados, la justificación de este trabajo radica en la necesidad de determinar los efectos de la variación en el estado proliferativo de las células sobre la localización y expresión del transportador NIS. Además, se busca realizar una aproximación a uno de los posibles mecanismos de regulación de NIS en este modelo. Existen varios posibles mecanismos involucrados en ésta regulación evidenciados en modelos de tiroides como se ha mencionado anteriormente (Arturi, et al., 2005) (Kogai, Endo, Saito, Miyazaki, Kawaguchi, & Onaya, 1997). En modelos de expresión exógena inducida uno de los mecanismos posibles sobresale: la ruta de señalización PI3K/AKT, en primer lugar, por lo reportado con respecto a su influencia sobre la expresión del transportador y en segundo lugar por su estrecha relación con los procesos de división celular (los cuales involucran fenómenos asociados al microambiente tumoral como la proliferación y la quiescencia).

En este trabajo se busca la caracterización de dos factores importantes en el desarrollo de terapias combinadas (terapia génica y NIS): 1) el modelo de estudio HT29-NIS, permitiendo evaluar la correcta expresión o no del transportador y 2) las condiciones de quiescencia y sus efectos sobre este modelo, permitiendo integrar así elementos del microambiente tumoral al estudio de NIS y del cáncer, estrategia no explorada previamente en la literatura de acuerdo al conocimiento que se tiene.



## 1.7 Objetivos

### 1.7.1 General

Evaluar el efecto de los cambios en la proliferación celular sobre la expresión y localización del cotransportador Sodio/Yodo (NIS) en la línea celular HT29, establemente transfectada con dicha proteína (HT29-NIS).

### 1.7.2 Específicos

Establecer las condiciones de cultivo que imiten *in vitro* las condiciones de proliferación y quiescencia celular descritas en los tumores *in vivo*.

Evaluar los cambios en la expresión y localización celular del transportador NIS en células HT29-NIS cultivadas en condiciones de proliferación y quiescencia.

Evaluar el papel de la ruta PI3K/AKT, asociada a la proliferación celular, sobre la expresión y localización del transportador NIS en la línea celular HT29-NIS.



## **Capítulo 2. Establecimiento de las condiciones de proliferación y quiescencia en las células HT29-NIS**

Las células eucarióticas por lo general, requieren señales mitogénicas de crecimiento para que puedan salir de un estado quiescente a un estado proliferativo. Estas señales son transmitidas mediante receptores transmembranales que se unen a diferentes tipos de moléculas: factores de crecimiento, componentes de la matriz extracelular y moléculas señalizadoras de interacciones intercelulares (Hanahan & Weinberg, 2000). Las células cancerígenas, por su parte, presentan diferentes tipos de regulaciones y respuestas atípicas a este tipo de señales, las cuales no incluyen solamente estados de hiper-activación de la proliferación celular sino también estados de disminución de actividad metabólica y disminución de la proliferación (Aguirre-Ghiso, 2007).

Es por ello que con el fin de evaluar un estado quiescente en las células HT29-NIS se empleó la disminución de suero en el medio. Utilizando como variable este factor se realizaron diferentes ensayos que permitieron evaluar si las disminuciones de suero en el medio podrían catalogarse como un estado quiescente. Tomando en cuenta la necesidad de caracterizar de este estado alterado de proliferación se realizaron diferentes estrategias basadas en tres aspectos: crecimiento celular, morfología asociada a la capacidad de división y un marcador de proliferación. A continuación se presentan: la metodología utilizada para alcanzar los fines propuestos, los resultados obtenidos y las conclusiones a partir de esos resultados.

## **2.1 Metodología**

### **2.1.1 Cultivo celular**

Células HT29 (línea celular de adenocarcinoma de colon humano, ATCC, Manassas, VA, USA) y HT29-NIS (proveniente de la línea celular HT29 establemente transfectada con el co-transportador sodio/yodo NIS, línea celular donada por la unidad TIRO de la Université Sophie Antopolis de Nice) fueron mantenidas en medio DMEM (Gibco-Invitrogen, Eugene, OR, USA) suplementado con 10% de suero fetal bovino y 1% de solución de antibiótico-antimicótico (Gibco-Invitrogen, Eugene, OR, USA) a 37°C en una atmósfera humificada al 5% de CO<sub>2</sub>. El mantenimiento de ambas líneas celulares se realizó con condiciones de esterilidad. Los pases fueron realizados al obtener porcentajes de confluencia entre el 70% y 90% y se utilizó Tripsina 0,25%-EDTA para realizar estos procedimientos.

### **2.1.2 Condiciones de quiescencia**

Como se mencionó anteriormente, en este trabajo la condición utilizada para simular un estado quiescente es la deprivación de suero fetal bovino (SFB), con el objetivo de disminuir significativamente la cantidad de factores de crecimiento y de señales mitogénicas externas a las células. Para este fin, las células fueron sembradas y cultivadas en las condiciones de suplementación de suero descritas previamente es decir 10% durante 24 horas, para permitir su adhesión a la superficie. Luego, para simular las condiciones de quiescencia en ambas líneas celulares (HT29-WT y HT29-NIS) fue cambiado el medio de cultivo, realizando tres lavados suaves con PBS 1X pH 7.4 y luego la aplicación del “medio de quiescencia”. El medio de quiescencia esta constituido por medio DMEM suplementado con una concentración de 0.1% de SFB y 1% de solución de antibiótico-antimicótico (Gibco-Invitrogen, Eugene, OR, USA) a 37°C en una atmósfera humificada al 5% de CO<sub>2</sub>. Estas condiciones de cultivo se mantuvieron durante 4 días para luego realizar cada experimento propuesto. En algunos casos, con el fin de evaluar ampliamente la respuesta de las células a diferentes concentraciones de suero en el medio, se utilizaron concentraciones de 1%, 5% y 20% como se muestra en la descripción de cada experimento.

### **2.1.3 Observación de la morfología celular**

Para la observación de la morfología celular, células HT29-NIS fueron cultivadas en cajas de 24 pozos. Se permitió su adherencia durante 24 horas cultivándolas con medio suplementado con 10% de suero fetal bovino. Luego se realizó un cambio de medio, en este caso se implemento un gradiente de tratamientos en los que se utilizaron diferentes concentraciones de suero para la suplementación de los medios. Finalmente se utilizaron cuatro tratamientos: medio suplementado con 10% de suero, medio suplementado con 5% de suero, medio suplementado con 1% de suero y medio suplementado con 0.1% de suero. Además de evaluar el efecto de estos cuatro tratamientos se incluyó otra variable en el montaje, referente al porcentaje de confluencia determinando dos estados: alta confluencia y baja confluencia. Para obtener tales condiciones se realizaron variaciones en el número de células sembradas en la fase inicial del experimento, para el tratamiento de alta confluencia se sembraron 100.000 células/cm<sup>2</sup> y para la condición de baja confluencia se sembraron 60.000 células/cm<sup>2</sup>. Luego de cuatro días, se realizó la adquisición de las imágenes en el equipo Cytation3 Cell Imaging Multi-Mode Reader (Biotek), las imágenes se tomaron de manera manual, en campo claro y con un aumento de 20x. Para su visualización se utilizó el software ImageJ, sin realizar ninguna edición a las imágenes adquiridas.

### **2.1.4 Inmunocitoquímica**

Laminillas circulares fueron lavadas y colocadas en cada pozo de cajas de cultivo de 24 pozos, luego fueron tratadas con L-Polilisina durante 20 minutos. Tras el tratamiento las laminillas fueron lavadas 3 veces con abundante agua para luego dejarlas secar y finalmente irradiarlas con luz UV durante 4 horas para que fuera posible su utilización con células de cultivo. Células HT29-NIS fueron sembradas sobre estas laminillas y se dejaron en cultivo con medio DMEM suplementado al 10% durante 24 horas para permitir su adhesión. Luego se aplicaron los diferentes tratamientos (como se mencionó anteriormente gradiente de concentraciones de suero fetal bovino en el medio de cultivo: 10%, 5%, 1% y 0.1%) y 4 días después se llevó a cabo el protocolo de Inmunocitoquímica.

Los pozos se lavaron 3 veces con PBS 1X durante 5 minutos con leve agitación cada lavado aplicando el PBS por las paredes del pozo y no directamente sobre las células. Luego se llevó a cabo la fijación con paraformaldehido 4%, glutaraldehido 0,02% durante 20 minutos a temperatura ambiente y sin agitación. Se llevaron a cabo tres lavados de 5 minutos cada uno y las

trazas de fijador se inactivaron con 50mM de cloruro de amonio durante 15 minutos a temperatura ambiente y sin agitación, para luego llevar a cabo la permeabilización de las células con 0,1% Triton X-100, durante 5 minutos a temperatura ambiente. Cada uno de los pozos fue lavado 3 veces con PBS 1X durante 5 minutos cada lavado y luego las laminillas fueron incubadas con solución de bloqueo (PBS 1X-BSA 0,1%) durante 1 hora a temperatura ambiente y sin agitación. Luego las laminillas fueron incubadas con el anticuerpo primario anti-Ki67 durante toda la noche en una cámara húmeda a 4°C. Transcurrido este tiempo se realizaron 3 lavados de 5 minutos cada lavado para luego realizar la incubación con el anticuerpo secundario. Finalmente se adicionó una solución de 1 ug/ml del marcador de ADN Hoescht (Thermo Scientific) durante 15 minutos a temperatura ambiente, para luego realizar un lavado de 5 minutos y realizar el montaje de las laminillas en láminas con la solución de Fluoromount (Sigma, F4680) para conservar las marcaciones realizadas. Las imágenes fueron adquiridas en el equipo Cytation3 Cell Imaging Multi-Mode Reader (Biotek) y fueron analizadas y pseudocoloreadas con ayuda del software ImageJ.

### **2.1.5 Curvas de crecimiento**

Para la realización de las curvas de crecimiento celular, células de las líneas celulares HT29 y HT29-NIS fueron incubadas en cajas de cultivo de 24 pozos. Se utilizaron los dos tratamientos: el tratamiento de células proliferantes con medio suplementado con suero al 10% y el tratamiento de células quiescentes con medio suplementado con suero al 0.1%. Durante 24 horas se permitió su adhesión a la caja de cultivo con un medio suplementado con suero al 10%, para luego realizar el cambio de medio en cada caso al tratamiento indicado. El conteo celular se realizó todos los días durante 7 días, iniciando desde el día de cambio de medio, definiéndolo como Día 0. El conteo celular y cálculo de la viabilidad se llevó a cabo por medio de la técnica de exclusión con azul de tripán. Cada día, se realizó el conteo del número de células total y del número de células marcadas con azul (células definidas como muertas) y de esta forma se calculó el número aproximado de células por día y la viabilidad en cada caso. Finalmente, con el fin de determinar la *tasa de crecimiento celular* se tuvo en cuenta como referencia el número de células viables en el Día 0. Tomando como referencia este punto inicial se calculó, con respecto a este número inicial la relación con el número de células contadas cada día. De esta manera se obtuvo un valor de crecimiento desde el Día 1 hasta el día 6 tomando como referencia el número celular encontrado

en cultivo el Día 0. Los cálculos fueron realizados a partir de la ecuación que se presenta a continuación:

$$\text{Tasa de crecimiento} = \frac{\# \text{ de células viables Día } 1, 2, 3, 4, 5 \text{ o } 6}{\# \text{ de células viables Día } 0}$$

## 2.2 Resultados

### 2.2.1 Morfología celular bajo diferentes concentraciones de SFB en el medio

De acuerdo con la literatura, la disminución de suero en el medio de cultivo es una de las características del cultivo que puede inducir quiescencia (Pardee, 1974). Con la finalidad de evaluarlo, células HT29-WT y HT29-NIS fueron cultivadas diferentes condiciones de suplementación del medio con suero: 10%, 5%, 1% y 0.1%. Por lo general en la literatura la concentración utilizada es de 0,1%, sin embargo se seleccionaron estos valores con la finalidad de obtener una perspectiva de lo que sucede utilizando valores intermedio entre el rango de 10% y 0,1%. Para este fin las células fueron documentadas cuatro días después de estar bajo cuatro tratamientos de suplementación de suero en el medio diferentes en bajas y altas confluencias (ver sección de metodología).

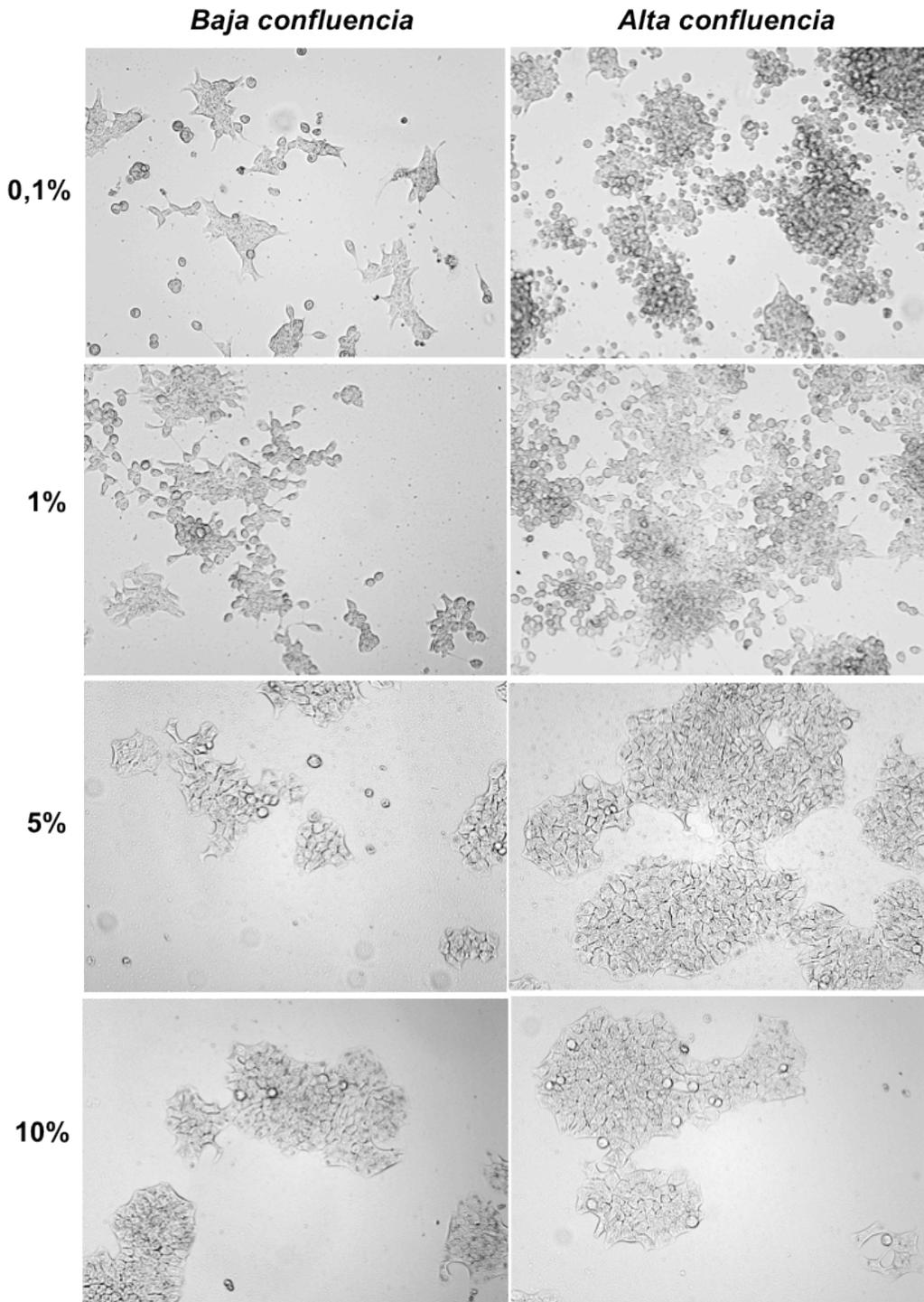
Como se observa en la Figura 2 las células sometidas a la concentración de 0,1% presentan una morfología circularizada y posiblemente con menor adherencia a la caja de cultivo. Este tipo de comportamientos han sido previamente descritos en células que no presentan una actividad metabólica muy activa ni que están en procesos activos de proliferación celular (Perillo, Marcus, & Baum, 1998) (Hynes, 1992), debido principalmente la estrecha relación entre las moléculas de adhesión y los procesos de proliferación celular. Este resultado es consistente con los resultados previos teniendo en cuenta que las condiciones de baja suplementación de suero fetal bovino en el medio de cultivo generan un estado quiescente en el que la división celular se ve disminuida y en el que aparentemente con relación a ese fenómeno también se generan alteraciones en la habilidad adherente y de la morfología de las células HT29-NIS.

### 2.2.2 Índice Ki-67 de las células HT29-NIS

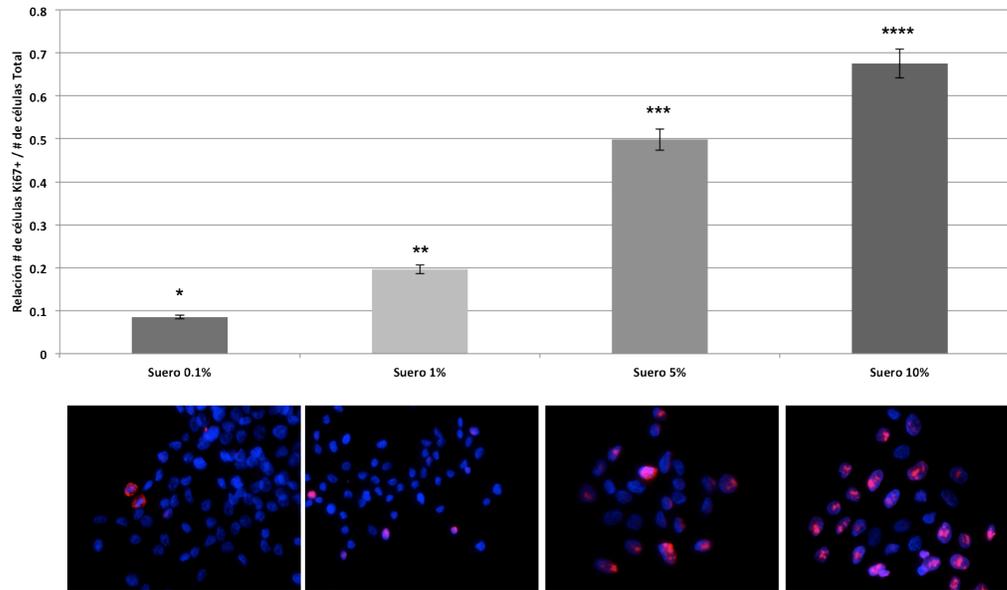
Las variaciones de porcentaje de suero fetal bovino en el medio de cultivo alteran la morfología de las células según lo establecido previamente, pero con el fin de establecer si estas variaciones están asociadas con procesos moleculares asociados a la proliferación se utilizó el marcador Ki67. Seguir los procesos de división celular no es sencillo, por lo que molecularmente se han desarrollado diversas estrategias que permitan hacerlo. Ki67 es una de ellas y desde hace más de 20 años es ampliamente utilizada como marcador de células que se encuentran en el proceso de proliferación (Lalor, Mapp, Hall, & Revell, 1987) (Ohta & Ichimura, 2000). Este marcador está presente durante todas las fases activas del ciclo celular (G1, S, G2 y mitosis) pero no se observa cuando las células presentan un estado Go por esto constituye una buena herramienta para el marcaje del proceso de proliferación. A pesar de su amplia utilización como marcador y caracterización a nivel molecular su significado funcional permanece desconocido. Sin embargo, los estudios que se adelantan para solventar este vacío en el conocimiento sugieren que Ki67 es un requerimiento absoluto para la progresión del ciclo celular (Scholzen & Gerdes, 2000) (Gerdes, Lemke, Baisch, Wacker, Schwab, & Stein, 1984) .

Como se muestra en la Figura 3 una inmunocitoquímica fue llevada a cabo en las células HT29-NIS con el fin de aplicar un método semi-cuantitativo para determinar el estado proliferativo de las células bajo cada uno de los tratamientos: el índice Ki67. Tal índice representa la relación entre el número total de células y las células marcadas positivamente para esta proteína y es utilizado en tumores de diferentes orígenes para realizar pronóstico y indicaciones de riesgo de proliferación excesiva (Katzenberger, et al., 2006). Con el fin de realizar un conteo del número de células totales y el número de células positivas para Ki67 se llevó a cabo la adquisición de 20 imágenes de diferentes campos de cada pozo de cultivo con cada uno de los tratamientos. Los campos no fueron seleccionados por el experimentador sino que se tomaron las fotos en campos aleatoriamente sobre la superficie de la laminilla. Tales imágenes se visualizaron en el software ImageJ y mediante la utilización de la herramienta de conteo se logró cuantificar de manera manual el número de células totales y el número de células Ki67-positivas.

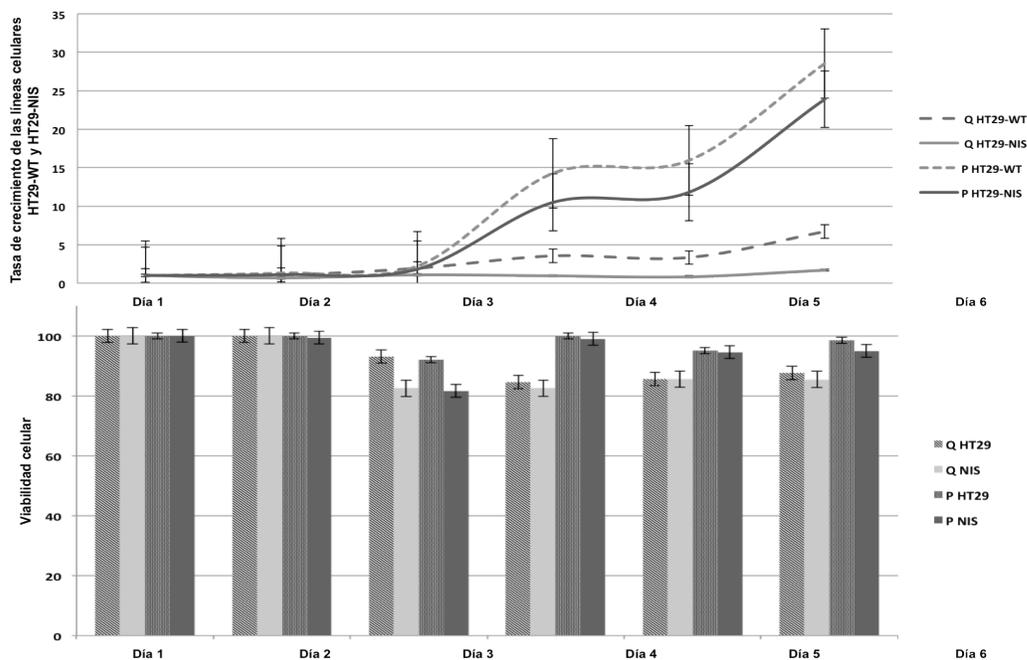
Se observa en la Figura 3 cómo las células HT29-NIS presentan un incremento en el índice de Ki67 a medida que los tratamientos (diferentes concentraciones de suero en el medio de cultivo)



**Figura 2. Evaluación morfológica de las células HT29-NIS bajo diferentes concentraciones de SFB en el medio de cultivo.** Imágenes representativas de microscopía de las células HT29-NIS cultivadas bajo diferentes concentraciones de SFB en el medio de cultivo: 0.1%, 1%, 5%, 10% durante 4 días. Se utilizaron además dos tratamientos adicionales: baja y alta confluencia como se indica en la imagen. Las imágenes fueron adquiridas con el equipo Cytation3. El software ImageJ fue utilizado para su visualización. Las imágenes adquiridas son representativas de un triplicado en cajas de cultivo de 24 pozos.



**Figura 3 Inmunocitoquímica y conteo del marcador de proliferación Ki67.** Imágenes representativas de la marcación de las células HT29-NIS con Ki67 bajo diferentes concentraciones de SFB en el medio de cultivo: 0,1%, 1%, 5% y 10%. Para la obtención del índice Ki67, se realizó el conteo de los núcleos marcados con Hoescht y luego el conteo de los núcleos marcados positivamente para el marcador. La relación entre el número de núcleos marcados positivamente con respecto al número de núcleos total es el valor representado en la gráfica. Los valores analizados corresponden al conteo en 10 fotos en cada uno de los tratamientos. El experimento fue realizado por duplicado y las diferencias estadísticas encontradas fueron determinadas mediante la prueba F de Snedecor.



**Figura 4 Tasa de crecimiento y Viabilidad de las células HT29-WT y HT29-NIS bajo condiciones de proliferación (P) o quiescencia (Q).** Las células fueron cultivadas en cajas de 24 pozos e incubadas con los tratamientos enunciados en cada caso. Los detalles del experimento se encuentran descritos en la sección de metodología. El experimento se realizó por triplicado y los resultados observados son el promedio de tres replicas experimentales.

aumentaban en el medio de cultivo. Esta información sugiere que los cambios observados previamente están asociados con modificaciones a nivel molecular del ciclo celular.

### **2.2.3 Seguimiento del crecimiento y viabilidad**

Con la final de evaluar el efecto de los tratamientos sobre el crecimiento celular, se evaluaron las tasas de crecimiento de las líneas celulares HT29-WT y HT29-NIS bajo los tratamientos de 0.1% y 10%. Como se observa en la Figura 4 cuando el cultivo es sometido a concentraciones de 0,1%, la tasa de crecimiento de las células es baja y mantenida durante los primeros cinco días de cultivo periodo en el cual no se ha presentado ningún cambio de medio, tal fenómeno se observa en ambas líneas celulares sin distinción entre las HT29-WT y HT29-NIS. En contraste con esto, cuando el cultivo es sometido a un medio suplementado con 10% de suero ambas líneas celulares HT29-WT y HT29-NIS crecen poco a poco hasta el tercer día, pero de este punto en adelante se observan tasas de crecimiento significativo hasta el Día 6 (fin del experimento).

De manera interesante, se realizó un cambio de medio en el Día 5, en todas las unidades experimentales se colocó un medio suplementado con suero al 10%. En este caso, tanto las células previamente sometidas a bajas concentraciones de suero en el medio (0.1%) como las sometidas a altas concentraciones de suero en el medio (10%) presentan aumentos en sus tasas de crecimiento sin importar si son HT29-WT y HT29-NIS, sugiriendo así la presencia de un estado quiescente en el cual se observa la recuperación de la capacidad proliferativa en las células que previamente no la presentaban. Con respecto a las diferencias entre las células HT29-WT y HT29-NIS, no se observan diferencias estadísticamente significativas entre ellas, lo que sugiere que a pesar de que es posible que haya una menor tasa de crecimiento de la línea celular HT29-NIS, estas células también son capaces de entrar en estados quiescentes presentando los mismos patrones de crecimiento que las células HT29-WT.

Con respecto a la viabilidad celular, luego de tres días de tratamiento se presenta una disminución en esta variable, pero esta disminución no es progresiva y se mantiene elevada (porcentajes superiores a 80%) a lo largo de la duración del experimento para ambas líneas celulares, por lo que la estabilidad e integridad del cultivo no fue comprometida significativamente (Figura 2 panel inferior).

## 2.3 Conclusiones

De acuerdo con los resultados obtenidos se observan efectos de los cambios en la concentración de suero en el medio en diferentes niveles: alteraciones del crecimiento poblacional, alteraciones a nivel morfológico posiblemente asociados con la adhesión y alteraciones a nivel de marcadores de la progresión del ciclo celular. Estas alteraciones, al ser producto de la disminución de la concentración de suero en el medio pueden ser definidas como alteraciones asociadas con el estado quiescente (Q) y son coherentes con las descripciones presentadas en la literatura.

La quiescencia en la línea celular HT29-NIS, a partir de estos experimentos, está definida como una condición en la cual: 1) la tasa de crecimiento de la población es muy baja pero puede recuperarse al retomar la presencia de factores de crecimiento y factores mitogénicos en el medio de cultivo, 2) la morfología celular se ve afectada drásticamente tanto en condiciones de baja como de alta confluencia adquiriendo una forma circularizada asociada a pérdida de la adherencia y a la capacidad de distribución de componentes intracelulares en la preparación para la división celular y, 3) un bajo índice de Ki67 asociado con bajos niveles de progresión a la división.

El gradiente de concentraciones utilizado también fue informativo ya que permitió evidenciar desde qué puntos de disminución de suplementación de suero en el medio se observan los fenotipos descritos, de manera esperada al disminuir al 1% la concentración de suero en el medio de cultivo ya se observan las características propias del estado quiescente (tratamiento con medio de cultivo suplementado con 0.1% de suero). Mientras que se observó que con la concentración de 5% de suero en el medio, todavía no se hacen evidentes los cambios fenotípicos esperados en una población quiescente.

En las siguientes fases experimentales es posible determinar los efectos del estado quiescente sobre el transportador NIS, en varios aspectos: expresión de proteína, patrón electroforético y localización celular.

## **Capítulo 3. Evaluación de la expresión y localización del cotransportador NIS en condiciones alteradas de proliferación**

Partiendo del establecimiento de las condiciones de quiescencia (Q) y proliferación (P) para las línea celular HT29-NIS, se aplicaron dichas condiciones para explorar su efecto sobre la expresión del cotransportador NIS. Para ello se utilizaron ensayos de inmunodetección de la proteína, particularmente western blot e inmunocitoquímica evaluando así la expresión, patrón electroforético y localización de NIS bajo estos tratamientos. A partir de estos ensayos se buscó indagar cómo los cambios en la proliferación debidos a la concentración de suero en el medio afectan o no a este transportador, utilizando un gradiente de diferentes concentraciones con la finalidad de establecer el punto determinante en los cambios observados.

Como se mencionó anteriormente la importancia de evaluar los efectos de la quiescencia sobre NIS radican en la importancia de conocer su comportamiento en este modelo con miras a la aplicación de una terapia combinada con la terapia génica. Teniendo en cuenta el antecedente en el cual condiciones variables del microambiente tumoral, posiblemente asociados con variaciones en la proliferación, alteran la expresión del transportador en tumores inducidos con nuestro modelo de estudio (células HT29-NIS). Lo anterior, buscando la manera en la que varios de los factores característicos del cáncer no puedan afectar de manera negativa la efectividad de esta estrategia.

### 3.1 Metodología

Como controles negativos en la fase inicial de los experimentos de inmunodetección de la proteína NIS se utilizaron las líneas celulares HT29-WT y MCF-7 a las cuales se les realizó el mismo procedimiento de extracción de proteína. Las células MCF-7 son un modelo celular ampliamente utilizado en estudio de NIS, debido a la presencia de NIS en tejidos mamarios *in vivo*. Además, las implicaciones funcionales del transporte de yodo mediado por NIS en estos tejidos son relevantes para procesos asociados a la gestación como los periodos de lactancia (Welch & Mankoff, 2000) (Upadhyay, et al., 2003). Por otra parte, este modelo celular ha sido ampliamente estudiado y en parte mucha de la información referente a la regulación de NIS ha sido estudiada en este y otros modelos celulares mamarios. Por ello, es un modelo apropiado para tomar como referencia en el estudio de este transportador (Kogai, Schultz, Johnson, Huang, & Brent, 2000) (Ohashi, Kogai, Kagechika, & Brent, 2009).

#### 3.1.1 Extracción de Proteína

Luego de permitir la adhesión de las células durante 24 horas sembradas y cultivadas con medio suplementado al 10% con suero en cajas de cultivo, se realizó el tratamiento de las líneas celulares HT29-WT y HT29-NIS bajo las condiciones de proliferación y quiescencia, en algunos casos incluyendo tratamientos con diferentes valores de suplementación del medio con suero (20%, 5% y 1%). 24 horas previamente a la extracción proteínica se adicionó en algunos casos Insulina, en una concentración de 100uM al medio de cultivo. Luego de cuatro días de cultivo las células se lavaron 3 veces con PBS 1X, pH 7.4 suplementado con inhibidores de fosfatasa y proteasas, para luego realizar la remoción mecánica de las células y una centrifugación de 10000 rpm a 4°C durante 5 minutos. Luego de esto, las células fueron lisadas con buffer RIPA (Tris-Cl 1M pH 7.4, NaCl 5M, EDTA 0,5M, TritonX100 1%, SDS 0,1%) en presencia de inhibidores de fosfatasa y proteasas. Posteriormente los lisados fueron centrifugados a 14000 rpm a 4°C durante 15 minutos, para finalmente recolectar la fracción soluble del lisado y cuantificarla por el método del ácido Bicinoninico (Thermo Scientific).

#### 3.1.2 SDS-PAGE

Se cargaron entre 40 y 60 ug de extractos protéicos totales de cada uno de los tratamientos y se corrió una electroforesis vertical en geles de 8% acrilamida/bisacrilamida durante 2 horas a 100 V en un buffer de electroforesis. Los geles realizados tenían un espesor entre 1.0 y 1.5mm y en

algunos casos se realizaron pequeñas variaciones en su porcentaje de acrilamida/bisacrilamida (7% a 10%). Cada una de las muestras se cargó en el gel mezclada con la cantidad de buffer de carga necesaria en cada situación. En el caso de los geles realizados para probar la proteína NIS, se realizó una incubación en baño serológico a 40°C de las muestras previamente a su siembra en los pozos del gel.

### **3.1.3 Western blot**

Las proteínas separadas durante la electroforesis en gel fueron transferidas a unas membranas de Fluoruro de Polivinilideno (PVDF Amersham Hybond™ – P GE Healthcare), a un voltaje de 30 V durante toda la noche en un buffer de transferencia (10 mM tris, 34 mM glicina, 10% metanol). Luego de realizar la transferencia las membranas fueron incubadas dependiendo de la proteína de interés en solución de bloqueo: TBS-T 1X (TBS 1X; 20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl pH 7.5 y 0.05% Tween 20 v/v), 5% leche descremada (w/v), u otra: TBS-T 1X, 3% BSA (w/v) durante 2 horas con agitación suave y constante. Tras la realización del bloqueo las membranas fueron incubadas con el anticuerpo de interés según el caso: anti-NIS (Suero 240, Unidad TIRO, Université Sophie Antopolis Nice, France) en una dilución de 1:5000, anti-AKT (Santa Cruz Biotech) en una dilución de 1:1000, anti-pAKT (CellSignaling) en una dilución de 1:1500 o anti-Bactina (Santa Cruz Biotech) en una dilución de 1:2000, esta última utilizada como control de carga. Las incubaciones fueron realizadas durante la noche a 4°C con agitación constante en la mayoría de los casos menos en b-Actina donde la incubación tuvo una duración de 2 horas y se realizó a temperatura ambiente. Luego de la incubación las membranas se lavaron 3 veces con TBS-T 1X durante 7 a 10 minutos en agitación constante. Posteriormente se incubaron con el respectivo anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa de rábano (HRP) anti-rabbit o anti-mouse (Thermo Scientific, #31460) en una dilución de 1:5000, durante 1 hora y 30 minutos a temperatura ambiente y con agitación constante. Luego se realizaron de nuevo tres lavados con TBS-T 1X en periodos de 7 a 10 minutos en agitación constante y finalmente se realizó el revelado de las membranas con el kit ECL pico-West Detection (BioRad).

Para la interpretación de los resultados se adquirieron imágenes de las membranas en el equipo Thermo Scientific My ECL Imager TM. Las imágenes obtenidas se analizaron por densitometría con ayuda del programa ImageJ para determinar la densidad relativa a la actina de cada una de las proteínas detectadas.

### 3.1.1 Inmunocitoquímica

Se llevó a cabo un procedimiento general similar al descrito previamente. Las laminillas circulares sobre las cuales se realizaría el cultivo fueron lavadas y tratadas con L-Polilisina durante 20 minutos. Tras el tratamiento las laminillas fueron lavadas 3 veces con abundante agua dejándolas secar y finalmente irradiándolas con luz UV durante 4 horas para que fuera posible su utilización con células de cultivo. Células HT29-NIS y HT29-WT fueron sembradas sobre estas laminillas y se dejaron en cultivo con medio suplementado al 10% durante 24 horas para permitir su adhesión. Luego se aplicaron los diferentes tratamientos (gradiente de concentraciones de suero fetal bovino en el medio de cultivo) y 4 días después se llevó a cabo el protocolo de Inmunocitoquímica.

Se realizaron 3 lavados con PBS 1X durante 5 minutos, luego se llevó a cabo la fijación con paraformaldehído 4%, glutaraldehído 0,02% durante 20 minutos a temperatura ambiente y sin agitación. Se llevaron a cabo tres lavados de 5 minutos y las trazas de fijador se inactivaron con 50mM de cloruro de amonio durante 15 minutos a temperatura ambiente y sin agitación, para luego llevar a cabo la permeabilización de las células con 0,1% Triton X-100, durante 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, cada uno de los pozos fue lavado 3 veces con PBS 1X durante 5 minutos y luego las laminillas fueron bloqueadas con una solución de PBS 1X-BSA 0,1% durante 1 hora a temperatura ambiente y sin agitación. Luego las laminillas fueron incubadas con el anticuerpo primario anti-NIS (Suero 240, Unidad TIRO, Université Sophie Antopolis Nice, France) durante la noche en una cámara húmeda a 4°C. Transcurrido este tiempo se realizaron 3 lavados de 5 minutos para luego realizar la incubación con el anticuerpo secundario necesario en cada caso. Finalmente se adicionó una solución de 1 ug/ml del marcador de ADN Hoescht (Thermo Scientific) durante 15 minutos a temperatura ambiente, para luego realizar un lavado de 5 minutos y realizar el montaje de las laminillas en láminas con la solución de Fluoromount (Sigma, F4680) para conservar las marcaciones realizadas. Las imágenes fueron adquiridas en el equipo Cytation3 Cell Imaging Multi-Mode Reader (Biotek) y fueron analizadas y coloreadas con ayuda del software ImageJ.

## 3.2 Resultados

### 3.2.1 Efecto de la quiescencia sobre la expresión de NIS

Luego de someter el cultivo celular a las condiciones de quiescencia, es decir el tratamiento durante cuatro días con medio suplementado al 0.1% con suero, se evidenciaron cambios en el patrón de expresión de NIS. Por lo general, en la literatura que hace referencia a NIS, la proteína presenta un patrón electroforético particular. Esta particularidad hace referencia principalmente a la identificación de varias bandas, originadas principalmente por las modificaciones que hay en su procesamiento. En este caso el procesamiento de NIS es bastante complejo ya que sufre altos niveles de glicosilación, estos niveles son tan altos que las bandas correspondientes a la proteína glicosilada, que se observan por lo general como un barrido, se ubican en un peso molecular cercano a los 90kD, mientras que las bandas correspondientes a la proteína sin tal procesamiento presentan una banda cercana a los 50kD (Darrouzet, et al., 2016) (Paroder, Nicola, Ginter, & Carrasco, 2013).

Como se observa en la Figura 5, en la línea celular HT29-NIS, bajo el tratamiento con medio suplementado al 10% (condiciones de proliferación) NIS presenta una banda en barrido cercana a los 90kD cuantificada con un valor relativo a actina de 5.49, mientras que la banda cercana a los 50kD presenta una cuantificación de 0.83, mucho menor. Bajo condiciones de quiescencia (tratamiento con medio suplementado al 0.1% con suero) se observa la presencia de las dos bandas pero en este caso la expresión relativa de la banda de 90kD es menor 2.02 comparada con el otro tratamiento, mientras que la banda inferior aproximada a los 50kD aumentó significativamente 3.12. Por otra parte, extractos protéicos totales de células HT29-WT y MCF-7 (ver metodología) se utilizaron como controles negativos para el marcaje de NIS con este anticuerpo y en los carriles correspondientes a estas muestras no se observó la inmunodetección de NIS.

### **3.2.2 Efecto de un gradiente de suero y de la presencia de Insulina sobre la expresión de NIS.**

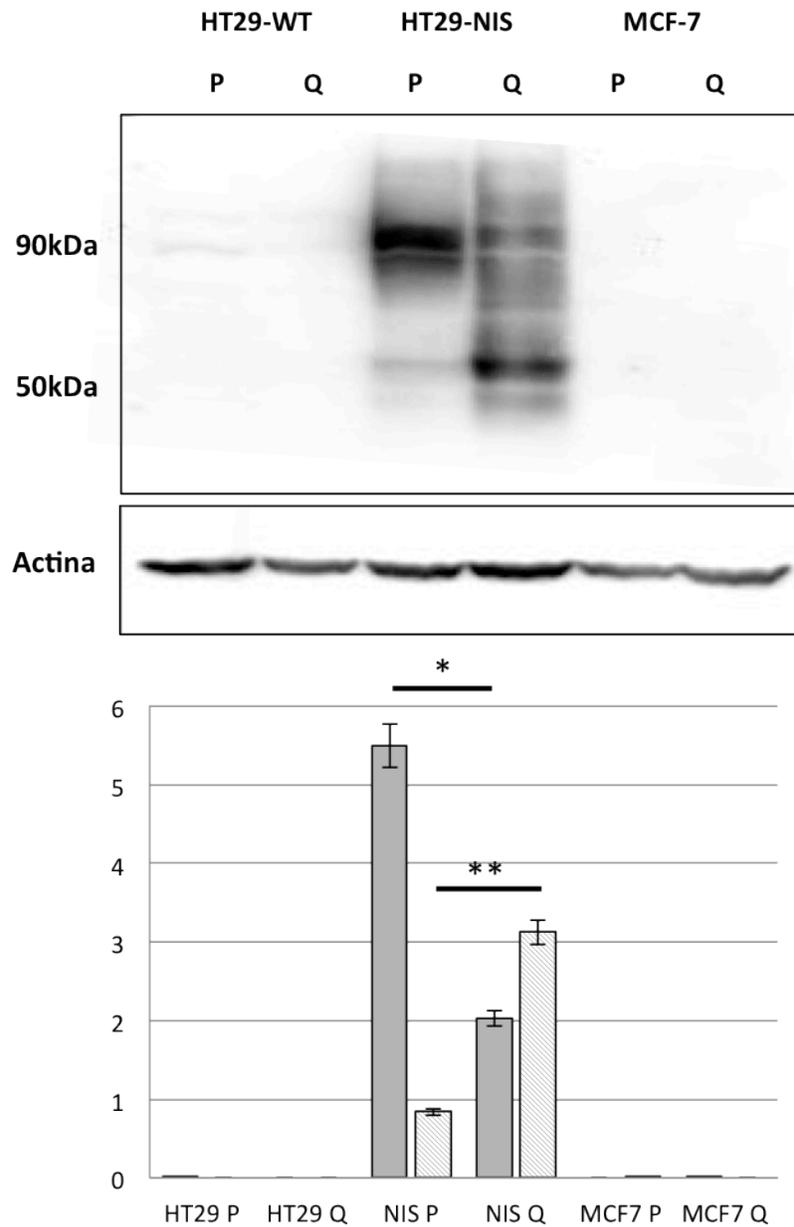
Con el fin de observar detalladamente el efecto de la concentración de suero en el medio de cultivo sobre la aparición de la banda cercana a los 50kD se llevó a cabo un gradiente de concentraciones, de manera similar al gradiente implementado previamente: 20%, 10%, 5% y 0,1% de suero en el medio de cultivo. Además de la inclusión del gradiente mencionado en estos experimentos se incluyó otra variable, la presencia o no de insulina en el medio de cultivo. La insulina presenta un efecto dosis-dependiente sobre la proliferación de las células HT29 (Bjork, Nilsson, Hultcrantz, & Johansson, 1993) y además activa la ruta de señalización PI3K (Chen, Huang, Quiao, & Katsifis, 2011) por lo que fue incluida como tratamiento.

Como se observa en la Figura 6, las células HT29-NIS mostraron el comportamiento de dos bandas (90kD y 50kD) cuando estaban sometidas a la concentración de 0,1% tanto en presencia como en ausencia de Insulina. En el tratamiento de 5% la expresión relativa de la banda de 90kD aumenta con respecto a la cuantificación de la banda en el tratamiento de 0,1% (0.008 y 0.012), mientras que se presenta una disminución en la expresión de la banda de 50kD. En el tratamiento de 10% de suplementación con suero en el medio, se observan ambas bandas, siendo la de 50kD de menor expresión relativa. En la concentración de 20% el comportamiento es muy similar al tratamiento con 10%, pero se observa que la banda de 50kD es casi imperceptible (como también lo muestra su expresión relativa: 0.004).

En los casos de los tratamientos de 5%, 10% y 20% la Insulina ejerce un efecto positivo con respecto a la expresión de la banda de 90kD representando en esos casos un aumento significativo de la expresión de la banda. En el caso del tratamiento de 0,1% no se observa tal efecto de incremento de la banda de 90kD y no se observan cambios significativos en la banda de 50kD.

### **3.2.3 Efecto de un gradiente de suero sobre la localización de NIS**

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en la sección anterior, es sorprendente cómo un estado de quiescencia inducido genera una posible alteración en la maduración del transportador NIS con respecto a su estado de glicosilación. Las glicosilaciones afectan una gran variedad de



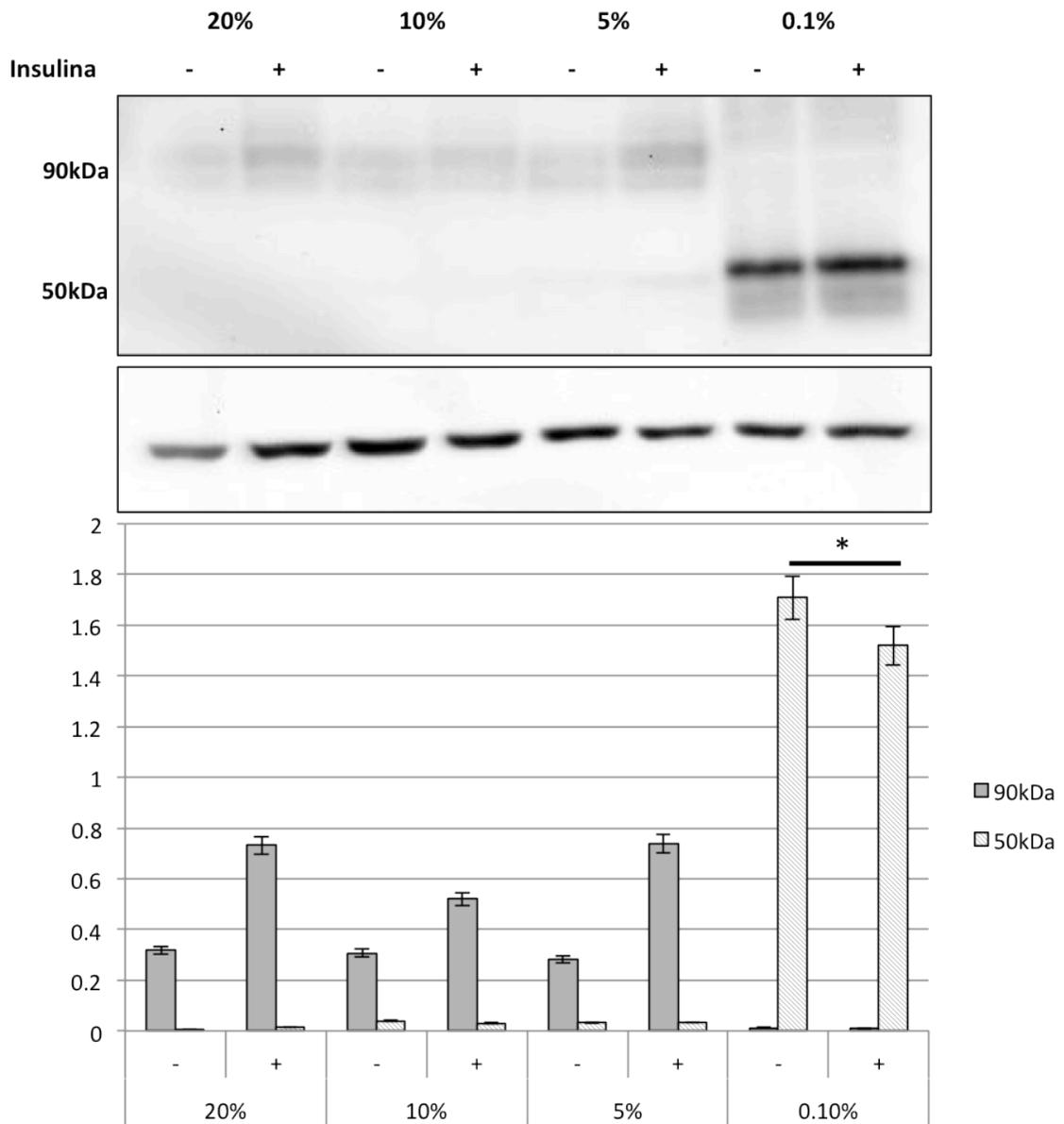
**Figura 5 Western Blot de NIS bajo las condiciones de proliferación (P) y quiescencia (Q).** Inmunodetección del transportador NIS en las líneas celulares HT29-WT, HT29-NIS y MCF-7. Se indican dos bandas de marcaje para NIS: 90kDa y 50kDa. La primera correspondiente a la proteína completamente procesada y glicosilada y la segunda correspondiente a la proteína procesada de manera incompleta y sin sus glicosilaciones completas. Se observa la gráfica de los promedios de los valores relativos de expresión de NIS con respecto a actina. La densitometría fue realizada en el software ImageJ y los resultados presentados son el resultado de tres replicas independientes.

procesos celulares, siendo uno de ellos el transporte de las proteínas hacia la membrana (Morreau, Galjart, Willemsen, Gillemans, Zhou, & d'Azzo, 1992) (Dorn, et al., 2009). En el contexto del desarrollo de terapia génica combinada con NIS, la funcionalidad de NIS es clave para la efectividad del tratamiento, pero a pesar de que la proteína pueda ser funcional si no es expuesta a nivel de la membrana celular no podrá desarrollar la función esperada y de igual manera la terapia fracasaría. Es por ello que se realizaron ensayos para evaluar el efecto de los diferentes tratamientos de suplementación del medio sobre los patrones de localización del transportador.

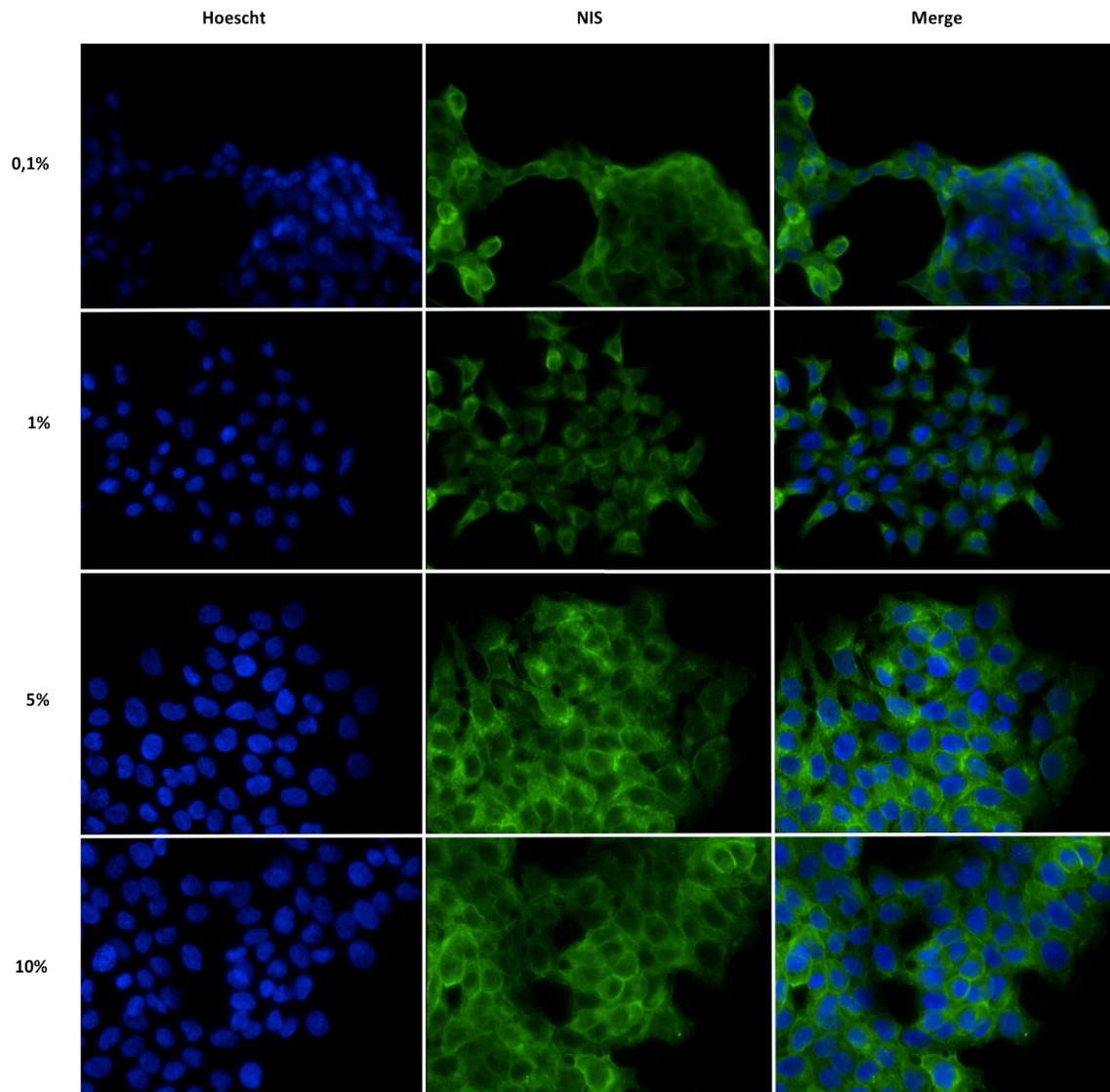
Como se observa en la Figura 7, el patrón de localización de NIS varía dependiendo de la concentración de suero en el medio de cultivo. Las células bajo el tratamiento con la concentración de 0,1% presentan una localización bastante dispersa posiblemente cercana al núcleo. Un fenómeno similar se presenta en el tratamiento con el 1%, en este caso se presentan lugares de densificación evidentes. Sin embargo, en la células tratadas con la concentración de 5% la localización de NIS se concentra en dos zonas particulares: 1) dentro del citoplasma, en localización perinuclear y 2) bien definida en localizaciones cercanas a la membrana celular, si no en ella. Finalmente en la células tratadas con la concentración de 10% el transportador presenta una localización a nivel membranal, localización esperada para que el transportador pueda llevar a cabo su función.

### **3.3 Conclusiones**

De acuerdo con los resultados observados, la expresión de NIS se ve altamente afectada por el estado quiescente. Las observaciones realizadas señalan que el efecto sobre el patrón electroforético de NIS es ampliamente marcado por el tratamiento de 0,1%, sugiriendo que es posible que este tratamiento genere un mal procesamiento de la proteína, por lo que al realizar la inmunodetección su forma totalmente glicosilada está ausente. Además, es de resaltar que la Insulina afecta positivamente la expresión de la proteína glicosilada, sugiriendo así que este otro tipo de aumento de la proliferación celular promovido por la Insulina también ejerce un efecto positivo sobre el procesamiento de NIS. Por otra parte, el aumento en la proliferación dado por la Insulina no es suficiente para contrarrestar el efecto de la disminución de la concentración de suero en el medio en el caso del 0,1%.



**Figura 6. Western blot de Nis bajo diferentes concentraciones de SFB en el medio y en presencia o ausencia de Insulina.** Inmunodetección de NIS en células HT29-NIS luego del tratamiento con diferentes concentraciones de SFB en el medio de cultivo: 0.1%, 5%, 10% y 20%. Se indican las densidades relativas de las dos bandas de NIS (90kDa y 50kDa) a actina. Los resultados presentados corresponden al promedio de tres experimentos independientes.



**Figura 7** Inmunocitoquímica de las células HT29-NIS bajo diferentes tratamientos con SFB en el medio de cultivo. Las células fueron sometidas a diferentes tratamientos de concentración de suero en el medio: 0.1%, 1%, 5% y 10%. Las imágenes presentadas son representativas del comportamiento de tres experimentos independientes. Las imágenes fueron adquiridas en el equipo Cytation3 y pseudocoloreadas en el software de análisis de imagen ImageJ. Los paneles indican la marcación utilizada en cada caso: Hoescht, Anticuerpo anti-NIS y la composición de ambas imágenes.

A nivel de localización intracelular de NIS, estos resultados sugieren que el transporte de la proteína puede estar siendo truncado en una zona perinuclear de manera dependiente de las concentraciones de suero con las que se suplementa el medio, por razones y mecanismos que no son claros. A pesar de lo anterior, tanto el patrón electroforético como la localización, no presentan información con respecto a la funcionalidad de la proteína, por lo cual no es claro si la proteína de menor peso molecular (50kD) o la proteína secuestrada a nivel perinuclear es funcional o no.

Por otra parte, estos tratamientos asociados a quiescencia, probablemente están regulados por diferentes rutas de señalización. Es por ello que teniendo en cuenta los efectos observados de la Insulina el siguiente paso es el análisis de una de las rutas de señalización asociadas a los cambios en los procesos proliferativos. Un ejemplo de este grupo de rutas de señalización es la ruta PI3K/AKT, que además de ser ampliamente asociada con la regulación de procesos proliferativos ha sido asociada con la regulación del cotransportador NIS y como se observó puede ser una de las rutas de señalización que es inducida por la Insulina y que genera variaciones en la expresión de NIS.



## **Capítulo 4. Evaluación del efecto de la ruta de señalización PI3K/AKT sobre la expresión y localización del cotransportador NIS**

La ruta de señalización PI3K/AKT ha sido ampliamente investigada por su papel en la transformación maligna, su importancia en diferentes tipos de señalizaciones a nivel celular varía desde prevención de apoptosis, crecimiento celular, supervivencia movilidad hasta proliferación hace que se le tome en cuenta como un target terapéutico (Vivanco & Sawyers, 2002) (Chang, et al., 2003) (Luo, Manning, & Cantley, 2003) (Osaki, Oshimura, & Ito, 2004). Además de tener una gran relevancia en el estudio del cáncer, esta ruta de señalización tiene efecto sobre dos de las variables de nuestro interés. Por una parte, como se mencionó anteriormente, en diferentes modelos celulares PI3K-AKT es una ruta de señalización involucrada en la regulación de NIS (Knostman, et al., 2004) (Kogai, Sajid-Crockett, Newmarch, Liu, & Brent, 2008) (Ohashi, Kogai, Kagechika, & Brent, 2009) y por otra parte es una ruta de señalización ampliamente asociada con la proliferación por lo cual representa un punto importante de estudio en este trabajo.

Teniendo en cuenta los resultados previamente obtenidos en los que el estado quiescente si tiene un efecto marcado sobre el patrón de expresión de NIS sugiriendo efectos en su proceso de maduración/glicosilaciones, se quiso evaluar los posibles efectos en la inhibición de la ruta de señalización PI3K/AKT sobre NIS con el objetivo de saber si los patrones observados con la privación de suero se mantienen o no y también observar si esta ruta de señalización que en otros modelos regula a NIS lo hace en este modelo celular HT29-NIS.

## **4.1 Metodología**

En esta sección experimental se realizaron procedimientos similares a los explicados previamente en detalle, a continuación se presenta una descripción general de las metodologías empleadas.

### **4.1.1 Extracción de Proteína**

Luego de permitir la adhesión de las células durante 24 horas sembradas y cultivadas con medio suplementado al 10% con suero en cajas de cultivo, se realizó el tratamiento de las líneas celulares HT29-WT y HT29-NIS bajo las condiciones enunciadas en cada caso. 24 horas previamente a la extracción proteínica se adicionó en algunos casos Insulina, en una concentración de 100uM al medio de cultivo. En otros casos 1 hora antes de la extracción se adicionó Wortmanina en diferentes concentraciones: 0nM, 100nM, 200nM y 400nM. Luego de cuatro días de cultivo para realizar la extracción, las células se lavaron 3 veces con PBS 1X, pH 7.4 suplementado con inhibidores de fosfatasa y proteasas, para luego realizar la remoción mecánica de las células y una centrifugación de 10000 rpm a 4°C durante 5 minutos. Luego de esto, las células fueron lisadas con buffer RIPA (Tris-Cl 1M pH 7.4, NaCl 5M, EDTA 0,5M, TritonX100 1%, SDS 0,1%) en presencia de inhibidores de fosfatasa y proteasas. Posteriormente los lisados fueron centrifugados a 14000 rpm a 4°C durante 15 minutos, para finalmente recolectar la fracción soluble del lisado y cuantificarla por el método del ácido Bicinoninico (Thermo Scientific).

### **4.1.2 SDS-PAGE**

Se cargaron entre 40 y 60 ug de extractos protéicos totales de cada uno de los tratamientos y se corrió una electroforesis vertical en geles de 8% acrilamida/bisacrilamida durante 2 horas a 100 V en un buffer de electroforesis. Los geles realizados tenían un espesor entre 1.0 y 1.5mm y en algunos casos se realizaron pequeñas variaciones en su porcentaje de acrilamida/bisacrilamida (7% a 10%). En el caso de los geles realizados para probar la proteína NIS, se realizó una incubación en baño serológico a 40°C de las muestras previamente a su siembra en los pozos del gel.

### **4.1.3 Western blot**

Luego de que los extractos proteicos se sometieran a la electroforesis en gel fueron transferidas a unas membranas de Fluoruro de Polivinilideno (PVDF Amersham Hybond™ – P GE Healthcare), a un voltaje de 30 V durante toda la noche en un buffer de transferencia (10 mM tris, 34 mM glicina, 10% metanol). Luego de realizar la transferencia las membranas fueron incubadas en la solución de bloqueo correspondiente en cada caso durante 2 horas con agitación suave y constante. Tras la realización del bloqueo las membranas fueron incubadas con el anticuerpo de interés según el caso. Las incubaciones fueron realizadas durante la noche a 4°C con agitación constante en la mayoría de los casos menos en b-Actina donde la incubación tuvo una duración de 2 horas y se realizó a temperatura ambiente.

Luego de la incubación las membranas se lavaron 3 veces con TBS-T 1X durante 7 a 10 minutos en agitación constante. Posteriormente se incubaron con el respectivo anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa de rábano (HRP) anti-rabbit o anti-mouse (Thermo Scientific, #31460). Luego se realizaron de nuevo tres lavados con TBS-T 1X en periodos de 7 a 10 minutos en agitación constante y finalmente se realizó el revelado de las membranas con el kit ECL pico-West Detection (BioRad). Para la interpretación de los resultados se adquirieron imágenes de las membranas en el equipo Thermo Scientific My ECL Imager TM. Las imágenes obtenidas se analizaron por densitometría con ayuda del programa ImageJ para determinar la densidad relativa a la actina de cada una de las proteínas detectadas.

### **4.1.4 Inhibición con Wortmanina**

Luego de permitir la adhesión de las células HT29-NIS a las cajas de cultivo celular durante 24 horas, las células fueron cultivadas durante 4 días para luego aplicar el estímulo con diferentes concentraciones de Wortmanina (BioRad): 0nM, 100nM, 200nM y 400nM. La Wortmanina es un inhibidor covalente inespecífico de las tres formas de PI3K (I, II y III) (Walker, et al., 2000). Éste inhibidor ha sido previamente utilizado en estudios que evalúan el efecto de la ruta de señalización PI3K/AKT sobre NIS y es ampliamente utilizado en el estudio de esta señalización (Serrano-Nascimento, Silve Texeira, Nicola, Tadeu, Masini-Repiso, & Nunes, 2014). La viabilidad de las líneas celulares fue evaluada previamente bajo los tratamientos mencionados y no se observaron diferencias significativas. 1 hora luego de la estimulación se llevó a cabo la extracción de proteína, y la detección de NIS, AKT1-2-3 y actina por medio de Western blot.

## 4.2 Resultados

### 4.2.1 Comportamiento de AKT1-2-3 en el tratamiento con insulina y diferentes concentraciones de suero en el medio

AKT, también conocida como PKB, es una serín-treonina kinasa efectora de la señalización generada por PI3K. La estructura canónica y la regulación de AKT son altamente conservadas en metazoos. En mamíferos se presentan tres isoformas codificadas por tres genes diferentes: Akt1, Akt2 y Akt3. Estas isoformas comparten un alto grado de identidad a nivel de sus secuencia de amino ácidos y presentan la misma especificidad para sus sustratos (Walker, Deak, Paterson, Hudson, Cohen, & Alessi, 1996) (Stambolic & Woodgett, 2006). A pesar de lo anterior, estas isoformas varían en su localización celular y en su expresión relativa en diferentes tejidos: Akt1 es la isoforma predominante en la mayoría de los tejidos, Akt2 es la isoforma predominante en los tejidos que responden a insulina y Akt3 es la isoforma predominante en el cerebro y los testículos. Para su activación completa Akt debe ser fosforilada en dos residuos: Thr-308 y Ser-473, para finalmente transmitir su señalización a los complejos mTOR (Bhaskar & Hay, 2007).

Como se observa en la Figura 8, se realizó un western blot con el fin de observar el comportamiento de Akt bajo los tratamientos previamente descritos. Se observan dos bandas, de acuerdo a la literatura la banda superior correspondiente a 62kDa hace referencia a Akt1, mientras que la banda inferior correspondiente a 56kDa corresponde a Akt2. Se observa una disminución paulatina en la disminución de las dos bandas de AKT. No se observa una influencia significativa de la insulina sobre la expresión relativa de ninguna de las bandas. En los tratamientos evaluados (20%, 10%, 5% y 0.1%) hay un patrón de disminución en la expresión relativa de Akt1 y Akt2 en función de la concentración de suero fetal bovino. Particularmente, en el tratamiento con la concentración de 0,1% se observa una disminución significativa de la expresión relativa de Akt con respecto al tratamiento con 10%, lo que sugiere que la quiescencia es un tratamiento que afecta la expresión de esta proteína.

#### **4.2.2 Comportamiento de AKT1-2-3 en el tratamiento con insulina y diferentes concentraciones de Wortmanina en el medio**

Con la finalidad de realizar la inhibición de la señalización PI3K/AKT, se utilizó en este esquema experimental Wortmanina que como se indicó anteriormente es un fuerte inhibidor de esta ruta (Sarbasov, Guertin, Ali, & Sabatin, 2005). Como se observa en la Figura 9, de manera interesante Akt1 presenta un patrón de aumento en su expresión a medida que la concentración de Wortmanina aumenta, fenómeno similar al observado en la expresión relativa de Akt2, este fenómeno ocurre por motivos que aún desconocemos. Por otra parte, se observa que el tratamiento con insulina genera un aumento significativo particularmente en la expresión de Akt2 con respecto a AK1 en todas las concentraciones de Wormanina evaluadas.

Los resultados observados sugieren que cuando se someten las células a baja estimulación con Wortmanina, la insulina todavía es capaz de generar un aumento en la expresión de Akt1 y Akt2, sin embargo, cuando la estimulación con Wortmanina es de mayores concentraciones, los niveles de expresión de estas mantienen el mismo patrón y no muestran diferencias significativas en los tratamientos con o sin insulina. Los comportamientos observados en la expresión relativa de Akt1 y Akt2, bajo tratamientos tanto con diferentes concentraciones de suero, como con diferentes concentraciones de Wortmanina muestran grandes variaciones. Es posible que estos comportamientos indiquen una diferencia en las señalizaciones involucradas en cada uno de los procesos evaluados, es decir, posiblemente la señalización afectada con un estado quiescente es diferente a la señalización PI3K/AKT la cual es la afectada por la inhibición con Wortmanina.

#### **4.2.3 Inhibición por medio de Wortmanina de la ruta de señalización PI3K/AKT**

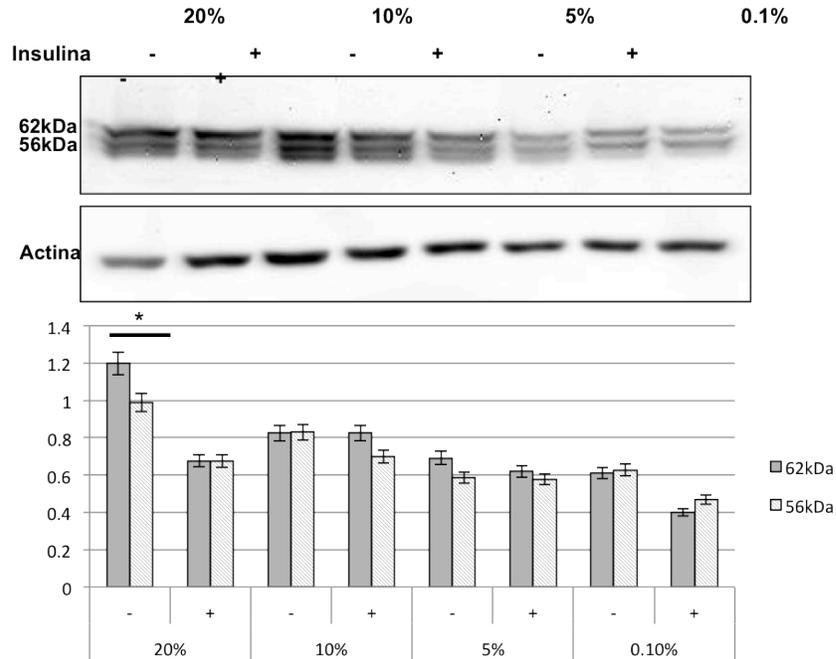
Teniendo en cuenta los resultados observados con respecto a la expresión relativa de Akt1,2y3 es difícil generar alguna conclusión con respecto a lo que sucede con la ruta de señalización luego de la aplicación de los diferentes tratamientos. Sin embargo, es importante notar que el efecto de la inhibición, más que en la expresión de las proteínas de la ruta de señalización, es sobre la activación y la transducción de la señal, que en este caso estaría dada por la fosforilación de AKT. Es por ello que se decide evaluar por medio de Western blot la expresión relativa de p-AKT (AKT fosforilado) bajo cada uno de los tratamientos propuestos.

A pesar de los grandes intentos para lograr la inmunodetección de p-AKT, los resultados no surtieron frutos a pesar de realizar diferentes modificaciones en el protocolo con el fin de lograr detectar la presencia de esta proteína fosforilada. Fue entonces que se tomó la decisión de realizar una evaluación de la inhibición de la ruta en las células control MCF-7, que como se mencionó anteriormente han sido utilizadas en el estudio de la regulación de NIS. Como se observa en la Figura 10 los niveles de expresión de AKT1 y Akt2 en las células MCF-7 son mayores a los niveles presentados en las células HT29-WT y HT29-NIS. Por otra parte, cuando los diferentes tipos celulares fueron sometidos a un tratamiento con Wortmanina de (100nM) la expresión relativa de p-AKT con respecto a AKT total disminuye significativamente en las células MCF-7 tratadas con el inhibidor, sugiriendo así una inhibición efectiva de la ruta de señalización, a pesar de que este fenómeno no pudo ser observado en nuestro modelo de estudio (células HT29-NIS).

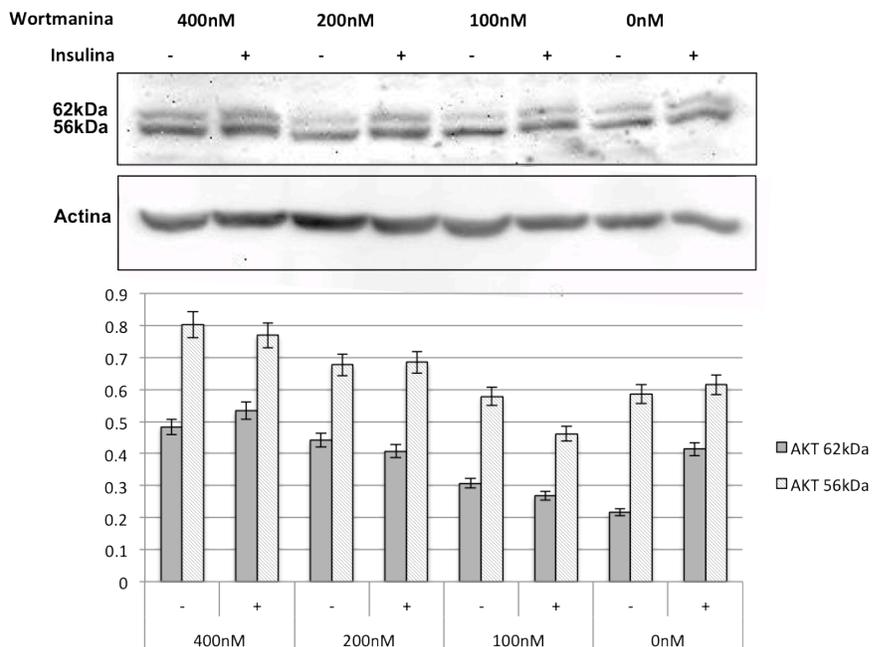
#### **4.2.4 Efecto de la inhibición de la ruta PI3K/AKT mediada por Wortmanina sobre la expresión de NIS**

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos con respecto a la inhibición de la ruta de señalización, se realizó el análisis del efecto de la inhibición de la ruta PI3K/AKT sobre la expresión y patrón de expresión de NIS. Como se observa en la Figura 11 la banda superior de NIS (90kDa), asociada con un procesamiento completo de la proteína específicamente a nivel de glicosilaciones no presenta variaciones significativas en ninguno de los tratamientos: ni con las diferentes concentraciones del inhibidor, ni con la presencia o no de insulina.

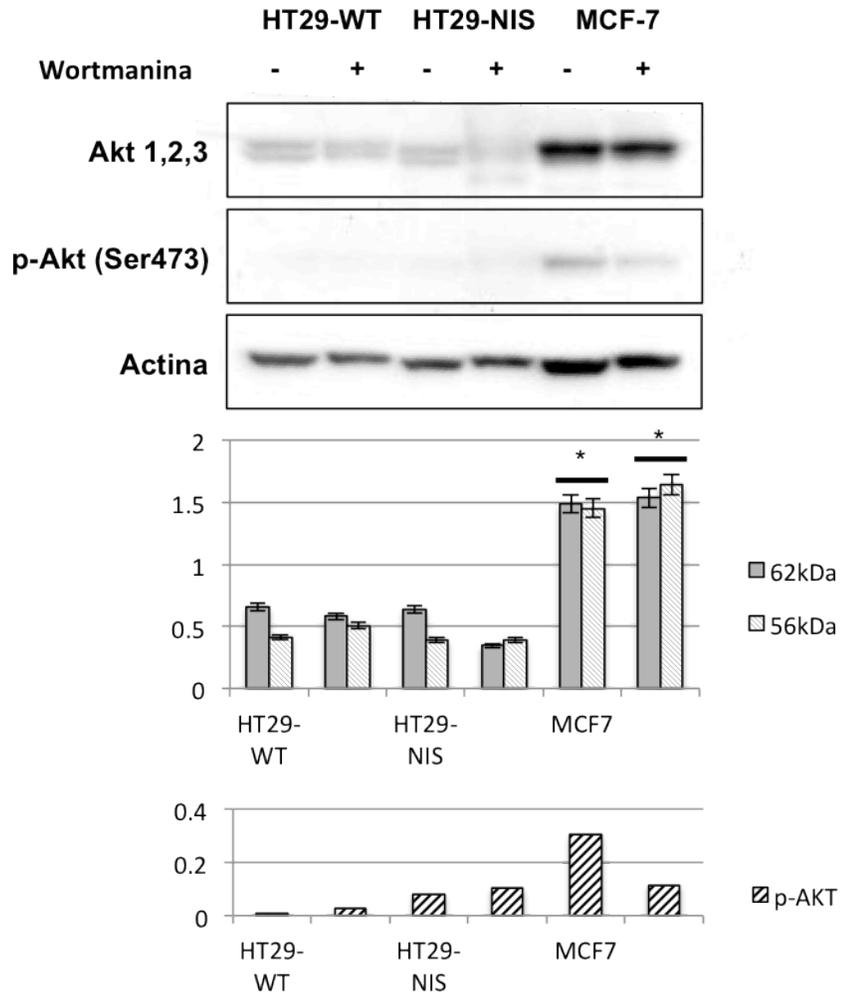
Por otra parte, la banda de menor peso (50kDa) presenta ligeras variaciones de expresión relativa pero estas variaciones no son significativas para ninguno de los tratamientos aplicados. De manera diferente a los resultados obtenidos con los diferentes tratamientos de suero en el medio donde la condición quiescente si presentaba un efecto notorio en el patrón electroforético de NIS, la inhibición de esta ruta de señalización (PI3K/AKT) no representa efectos significativos en NIS, por lo que es posible que en este modelo celular HT29-NIS no sea la señalización involucrada en la regulación del transportador.



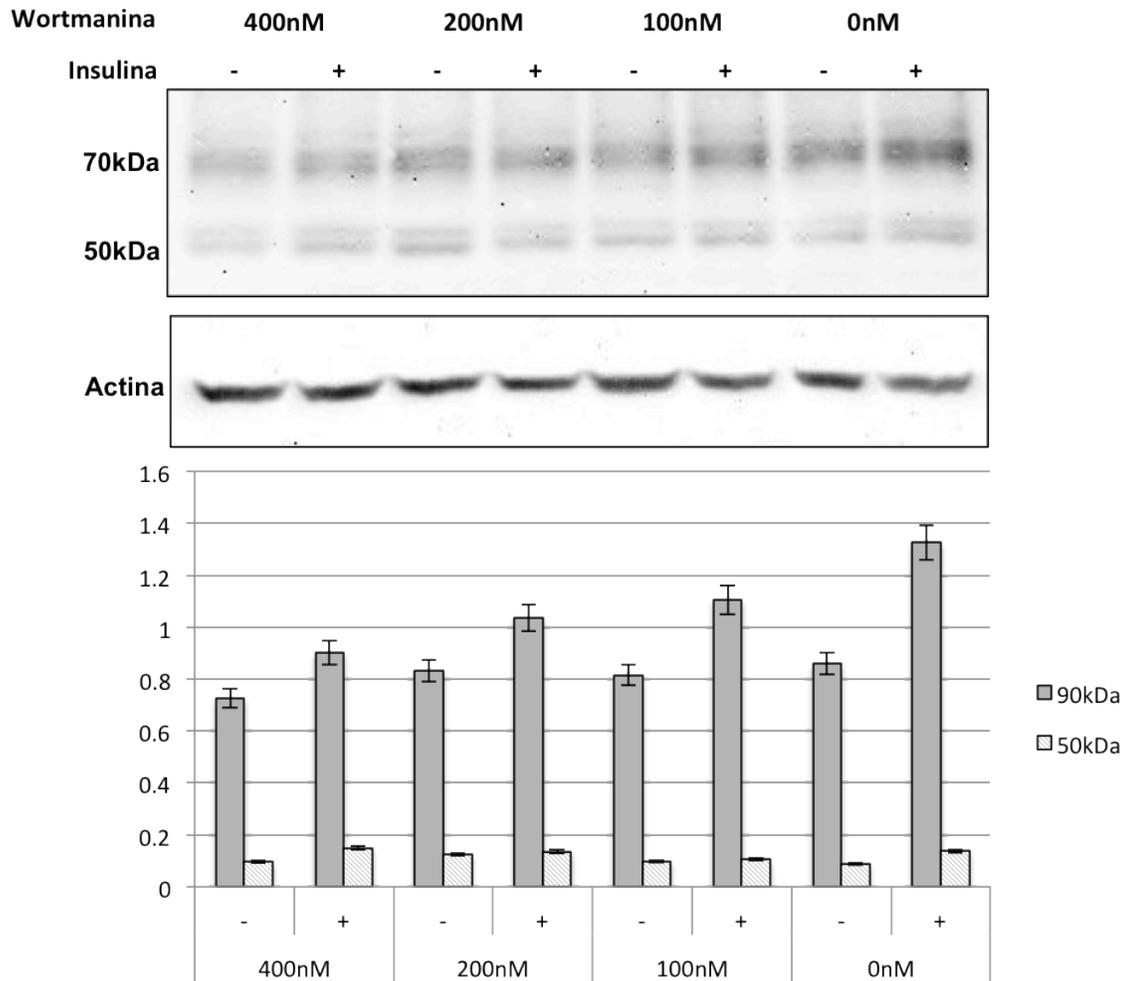
**Figura 8 Western blot de Akt1, 2, 3 en células HT29-NIS bajo diferentes tratamientos de SFB en el medio de cultivo.** Inmunodetección de Akt1, 2, 3 en células HT29-NIS luego del tratamiento con diferentes concentraciones de SFB en el medio de cultivo: 0.1%, 5%, 10% y 20%. Además se indica el tratamiento o no con insulina. La gráfica inferior muestra las densidades relativas de las dos bandas de Akt (62kDa y 56kDa) con actina. Los resultados presentados corresponden al promedio de tres experimentos independientes.



**Figura 9 Western blot de Akt1, 2, 3 en células Ht29-NIS bajo diferentes concentraciones de Wortmanina en el medio de cultivo.** Inmunodetección de Akt1, 2, 3 en células HT29-NIS luego del tratamiento con diferentes concentraciones de SFB en el medio de cultivo: 0.1%, 5%, 10% y 20%. Además se indica el tratamiento o no con insulina. La gráfica inferior muestra las densidades relativas de las dos bandas de Akt (62kDa y 56kDa) con actina. Los resultados presentados corresponden al promedio de tres experimentos independientes.



**Figura 10 Western blot de Akt1, 2, 3 y p-AKT en diferentes líneas celulares bajo el tratamiento con y sin Wortmanina (100nM).** Inmunodetección de Akt1, 2, 3 y p-AKT en células HT29-WT, HT29-NIS y MCF7 luego del tratamiento con Wortmanina en el medio de cultivo a una concentración de 100nM. La gráfica Superior muestra las densidades relativas de las dos bandas de Akt (62kDa y 56kDa) con actina. La gráfica a inferior corresponde a la expresión de p-AKT relativa a AKT. Los resultados presentados corresponden a un experimento.



**Figura 6 Western blot de Nis bajo diferentes concentraciones de Wortmanina en presencia o ausencia de Insulina (100uM)** Inmunodetección del transportador NIS en células HT29-NIS sometidas a diferentes tratamientos de Wortmanina: 0nM, 100nM, 200nM y 400nM. Se indica la expresión relativa de las dos bandas de NIS (50kDa y 90kDa). El proceso de densitometría fue realizado utilizando el software ImageJ. La imagen presentada es representativa de tres replicas experimentales independientes.

### 4.3 Conclusiones

Como se observó en los resultados obtenidos, los patrones de expresión de AKT son diferentes en los dos casos contrastados: tratamiento con diferentes concentraciones suero y tratamiento con diferentes concentraciones de Wortmanina. En el primero de los casos Akt1 presenta mayor expresión en los tratamientos de 20%, 10% y 5%, pero presenta una disminución en el tratamiento con la concentración de 0,1% lo cual sugiere algún efecto de la quiescencia sobre la expresión de esta proteína. Por otra parte, en el segundo caso (tratamiento con diferentes concentraciones de Wortmanina), Akt2 presenta mayores niveles de expresión relativa que Akt1, y más sorprendente resulta que a medida que aumenta la concentración de Wortmanina su

expresión parece aumentar. Estos resultados no son los esperados y en este momento no es posible su explicación, sin embargo, aporta información con respecto a la diferencia entre los procesos generados por la deprivación de suero en el medio de cultivo y por la inhibición de la ruta de señalización PI3K/AKT.

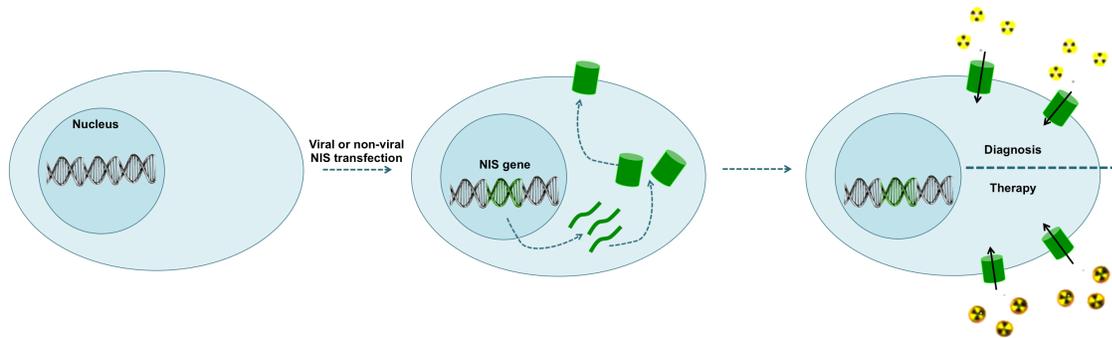
Por otra parte se observó que en los modelos HT29-WT y HT29-NIS la expresión de AKT es relativamente baja con respecto a otro modelo celular como lo son las células MCF-7. Es por ello que bajo las condiciones experimentales utilizadas no fue posible inmunodetectar p-AKT (Akt fosforilado) en estos dos modelos, probablemente debido de antemano a la baja expresión de Akt. Sin embargo, fue posible evidenciar la inhibición generada por la Wortmanina (100nM) en el modelo MCF-7 bajo las mismas condiciones, por lo que se obtuvo confirmación del efecto inhibidor de la Wortmanina.

Finalmente, con respecto al efecto de la inhibición de la ruta de señalización PI3K/AKT sobre la expresión de NIS, es posible afirmar que no es un factor determinante ni en la expresión ni en el procesamiento de la proteína, a que su inhibición no generó cambios significativos en estos aspectos. Sin embargo, es importante recalcar que la búsqueda de las redes de señalización involucradas en los problemas de procesamiento de NIS en condiciones quiescentes es un campo abierto de estudio y que su descubrimiento posiblemente contribuirá al desarrollo y mejor aplicación de tratamientos de terapia génica combinada con NIS.

## Capítulo 5. Discusión

El cáncer es un grupo de enfermedades que presenta una alta complejidad de diagnóstico y tratamiento. Diferentes estrategias han sido utilizadas para intentar eliminar células transformadas malignamente, una gran variedad de factores reconocidos en estas células se han intentado abordar (la habilidad de mantener señales de proliferación celular, habilidad de evadir supresores de crecimiento, evasión de la respuesta inmune, inmortalidad replicativa, movilidad aumentada, habilidad metastásica, potencial angiogénico, inestabilidad genómica y alteración del metabolismo celular son algunos ejemplos (Chang, et al., 2015)). Sin embargo, diferentes factores del microambiente tumoral como la heterogeneidad tumoral hacen que la aplicación de estas estrategias sea menos efectiva, por ejemplo, la variación de disponibilidad de oxígeno a lo largo de un tumor sólido o el estadio en el ciclo celular de diferentes subpoblaciones de células tumorales (Brown & Giaccia, 1998).

Una estrategia propuesta para evitar algunos de estos problemas es la terapia génica combinada con NIS. Esta estrategia consiste en introducir este transportador utilizando diferentes metodologías (virales y no virales) para lograr su expresión y su óptima funcionalidad como transportador de yodo. De esta manera estrategias como el diagnóstico y la terapia con radioisótopos, previamente utilizadas en la tiroides donde se expresa de manera endógena el transportador, podrían ser exitosas en otros tejidos que no lo expresan (ver Figura 12) (Penheiter, Russell, & Carlson, 2012). En este caso, con la colaboración de la unidad TIRO de la Université Nice tras la generación de la línea celular HT29-NIS para estudiar a fondo la posibilidad de realizar la estrategia descrita, se observó que algunos factores como la heterogeneidad tumoral asociada a la quiescencia podían estar afectando la ejecución efectiva de esta terapia, por lo que se decidió llevar a cabo una evaluación *in vitro* del efecto de este factor sobre las células HT29-NIS.



**Figura 7** Diagrama general de la estrategia empleado para generar células que expresan NIS y que pueden ser utilizadas como herramientas de diagnóstico y terapia. Con la finalidad de generar la expresión de NIS en células que no expresan esta proteína diferentes metodologías son empleadas para transfectar o transducir establemente el transportador. Luego de obtener estabilidad en su expresión, las células modificadas podrán expresar NIS, y explotando su funcionalidad como transportador de yodo y otros radioisótopos utilizados comúnmente en radioterapia metabólica, es posible realizar terapias dirigidas que erradiquen las células cancerígenas y se logre el mejor resultado para el paciente. Modificado de Theranostics 2012. 2(4) 392-402.

Existen por lo general dos métodos para establecer el arresto en el ciclo celular *in vitro*: la privación de factores de crecimiento y la inhibición por contacto. Por medio de estos factores se busca que las células permanezcan en un estado G<sub>0</sub> y no prosigan con la división celular (Gustincich & Schneider, 1993) (Medina, et al., 2008). En este estudio la privación de factores de crecimiento presentes en el medio de cultivo fue la estrategia utilizada. De acuerdo con los resultados observados, los efectos de esta disminución de factores de crecimiento se observan a diferentes niveles: alteraciones del crecimiento poblacional, alteraciones a nivel morfológico posiblemente asociados con la adhesión y alteraciones a nivel de marcadores de la progresión del ciclo celular.

La quiescencia en la línea celular HT29-NIS, a partir de estos experimentos, pudo ser definida como una condición en la cual la morfología celular se ve afectada, las células pierden adherencia y se observan con morfología circularizada, presentan un bajo índice Ki67 y su tasa de crecimiento es baja comparada con condiciones estándar de cultivo pero es posible recuperar la actividad proliferativa luego de ser sometidas a la estimulación con los factores de crecimiento presentes en el medio de cultivo. Estas observaciones son correspondientes con otros estudios en los que se ha utilizado la privación de suero como inductor de quiescencia *in vitro* (Sutterlüty, et al., 1999) (Yesushaimi, Woods, Ravdin, Hayes, & Gelmon, 2010).

En la siguiente parte de este trabajo, se evidenció un efecto dramático de la concentración de 0,1% de SFB sobre el patrón de expresión de NIS. El observar dos bandas de NIS está ampliamente asociado con la presencia de la proteína sin glicosilar. En la literatura no hay estudios previos que evalúen el efecto de la deprivación de suero o la quiescencia sobre NIS, por lo que este patrón solo es equiparable con estudios en donde se caracteriza a la proteína (Levy, de la Vieja, Ginter, Riedel, Dai, & Carrasco, 1998) (Levy, de la Vieja, & Carrasco, 1998) (Dohán, et al., 2003). Por otra parte, cuando las células son tratadas con Insulina, se observa un ligero aumento en la expresión relativa del transportador, resultado que es controversial con alguna de la literatura pero que fortalece una visión en la que se observa una regulación específica modelo-dependiente (Kogai, et al., 2008) (Trapasso, et al., 1999).

Por otra parte, para que NIS realice su función efectivamente, debe lograr localizarse a nivel de la membrana celular, pero en caso de que esto no ocurra la captación de yodo del medio no va a ser posible a pesar de que la proteína pueda realizar el cotransporte (Pohlenz, Duprez, Weiss, Vassart, Refetoff, & Costagliola, 2000). En este estudio, a nivel de localización intracelular de NIS, se observa que el transporte de la proteína puede estar siendo truncado en una zona perinuclear de manera dependiente de las concentraciones de suero con las que se suplementa el medio, por razones y mecanismos que todavía no son claros, pero que podrían estar asociados al patrón electroforético observado previamente.

En la búsqueda por la identificación de factores que influyen la regulación de NIS bajo tratamientos como la quiescencia, probablemente son diferentes rutas de señalización. Es por ello que teniendo en cuenta los efectos observados de la Insulina el siguiente paso fue el análisis de una de las rutas de señalización asociadas a los cambios en los procesos proliferativos: PI3K/AKT, por medio de la utilización de un inhibidor ampliamente utilizado en la literatura, la Wortmanina. En los resultados obtenidos se presentan comportamientos interesantes de AKT total (Akt 1, 2, 3) dado que se observan efectos particulares sobre cada una de las bandas observadas (62kDa:Akt1 y 56kDa:Akt2) observaciones para las cuales no se tiene explicación en el momento. Una conjetura al respecto, por ejemplo, puede ser que la disminución de suero en el medio pueda generar alteraciones específicas en la síntesis de proteínas (Dorello, Peschiaroli, Guardavaccaro, & Colburn, 2006), por lo que se generó una disminución en la expresión relativa de Akt. También es posible que sistemas reguladores como lo son los microRNAs se vean

afectados por estos estímulos (Vasudevan, Tong, & Steitz, 2007) generando respuestas variables, campo de estudio que no se incluyó en este trabajo.

La activación de la ruta de señalización debería ser el criterio de evaluación de la efectividad de la inhibición con wortmanina, por lo que se realizó la evaluación de la expresión relativa de p-Akt en el modelo HT29-NIS. Sin embargo, a nivel técnico la detección de esta proteína fosforilada se dificultó posiblemente debido a la baja expresión de la proteína total en este modelo. Esto último se hizo evidente a la hora de comparar la expresión relativa de AKT total en los modelos HT29-WT, HT29-NIS y MCF7. Fue por ello y por condiciones que aún desconocemos que la expresión relativa de AKT fosforilado solo se logró evaluar en una ocasión, en la cual se hizo evidente su caída, al comparar el tratamiento sin y con Wortmanina (Figura 10).

Finalmente, con respecto al efecto del tratamiento con Wortmanina sobre la expresión de NIS se observaron resultados contradictorios a los observados en la literatura, particularmente diferentes a los previamente contrastantes reportes encontrados en los que la ruta de señalización en algunos modelos fomentaba un incremento o una disminución significativa en la expresión del transportador (Kogai, Sajid-Crockett, Newmarch, Liu, & Brent, 2008) (Serrano-Nascimento, Silve Texeira, Nicola, Tadeu, Masini-Repiso, & Nunes, 2014). En este caso, los resultados observados sugieren que a pesar de que hay una leve tendencia a la disminución a mayor concentración del inhibidor, no se presentan variaciones significativas entre los tratamientos sin y con el inhibidor. Estos resultados pueden deberse a que en la literatura revisada, los modelos celulares no habían sido sometidos a una transducción de la proteína NIS, sino que la expresaban endógenamente, en este trabajo las células fueron modificadas genéticamente, por lo que puede que la regulación observada por parte de la ruta PI3K/AKT sea efectiva bajo condiciones endógenas, mas no en condiciones en las que la proteína se expresa debido a la modificación realizada.

Previamente, no se tenían registros con respecto al efecto de los cambios de proliferación sobre algún aspecto del transportador NIS (en la literatura revisada). Es por eso que los resultados obtenidos son pioneros en este campo y permiten asociar aspectos importantes de esta proteína. El estado de glicosilación de NIS, por ejemplo, el cual tiene repercusiones a nivel de procesamiento, localización e incluso funcionalidad. En este caso observar posibles variaciones en

este aspecto es de vital importancia ya que esos factores mencionados anteriormente posiblemente estén siendo afectados por un factor como la disponibilidad de nutrientes en el medio de cultivo.

Los tratamientos aplicados en este trabajo, presentan una pequeña gama de variaciones posibles, y representan sólo uno de los Hallmarks del cáncer propuestos. Es importante entonces reconocer la existencia de posibilidades diferentes de regulación del transportador posiblemente sistemas de regulación, así como las limitaciones de la aplicabilidad de este tipo de terapias y la necesidad de caracterizarlas e incluso combinarlas con las terapias existentes. Por último, lograr engranar las limitaciones de estos sistemas con las facilidades que presentan otras estrategias terapéuticas es el ideal en la búsqueda de mejorar el tratamiento de los pacientes.



## Capítulo 6. Perspectivas

Este trabajo fue un primer paso en la exploración de los mecanismos involucrados en la regulación del cotransportador NIS en un modelo *in vitro*. Se logró establecer un tratamiento de disminución de la concentración de suero fetal bovino en el medio de cultivo como un estado quiescente. Se lograron observar los efectos del estado quiescente sobre el patrón de expresión y localización del transportador NIS, obteniendo resultados interesantes posiblemente asociados con el procesamiento y la glicosilación de esta proteína. Y además, se logró establecer que la ruta de señalización PI3K/AKT en este modelo HT29-NIS no es una señalización que regule la expresión del transportador, ni que afecte directamente su procesamiento. Teniendo en cuenta estos aportes y su relevancia en el tema es claro que son muchos los puntos por explorar y como es usual en la ciencia son más las preguntas que surgieron que las respuestas obtenidas.

Con respecto a los efectos del estado quiescente sobre el transportador NIS existen varias perspectivas o posibles caminos por explorar. Por ejemplo, lograr determinar específicamente a que tipo de modificaciones postraduccionales hace referencia el patrón electroforético observado, ¿qué otro tipo de modificaciones además de la glicosilación pueden haberse alterado? ¿Qué implicaciones funcionales tienen estas alteraciones? A nivel de localización subcelular, bajo el tratamiento de quiescencia ¿en que lugar se localiza NIS? ¿En qué compartimento celular esta fallando su tráfico hacia la membrana celular? Estando atrapado en compartimentos intracelulares, ¿sigue siendo funcional como transportador sodio/yodo?

Con respecto a las diferentes señalizaciones involucradas en el estado quiescente propuesto la mayor perspectiva es lograr determinar cuales señalizaciones están involucradas en este estado y cómo logran afectar la maduración del transportador y su tráfico intracelular. ¿Cómo se conectan entre ellas y cuales son las redes de regulación de NIS en modelos en los que ha sido transfectado

establemente? ¿Cómo lograr un aumento en la expresión del transportador sin generar herramientas para la proliferación de las células transformadas malignamente?

Y finalmente, con respecto a la aplicabilidad y efectividad de herramientas de terapia génica combinada con NIS, quedan por explorar los mecanismos de regulación de NIS *in vivo*, así como las estrategias por aplicar para evitar escapes a las terapias aplicadas. Buscar las mejores combinaciones con otras terapias (por ejemplo radiación de fuente externa) para maximizar los resultados en pacientes, y lograr utilizar este tipo de herramientas para desarrollar diagnósticos y tratamientos oportunos y completos para obtener el mejor resultado para los pacientes.

## Referencias

Aguirre-Ghiso, J. (2007). Models, mechanisms and clinical evidence for cancer dormancy. *Nature Reviews Cancer* , 7, 834-846.

Ajani, J. A., Izzo, J. G., & Lee, J.-S. (2009). Chemotherapy and Radiotherapy Resistance: Complexity, Reality, and Promise. *Journal of Clinical Oncology* , 27 (1), 162-163.

Allen, K., Jiang, P., Zheng, Y., Liao, G., Sun, H., Wong, J., et al. (2013). Cancer Genome Scanning in Plasma: Detection of Tumor-Associated Copy Number Aberrations, Single-Nucleotide Variants, and Tumoral Heterogeneity by Massively Parallel Sequencing. *Clinical Chemistry* , 59 (1).

Almendo, V., Marusyk, A., & Polyak, K. (2013). Cellular Heterogeneity and Molecular Evolution in Cancer. *Annual Review of Pathology And Mechanisms of Disease* , 8, 277 - 302.

Arturi, f., Ferreti, E., Presta, I., Mattei, T., Scipioni, A., Scarpelli, D., et al. (2005). Regulation of Iodide Uptake and Sodium/iodide Symporter Expression in the MCF-/ Human Breast Cancer Cell Line. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* , 90 (4), 2321 - 2326.

Balkwill, F., Capasso, M., & Hagemann, T. (2012). The tumor microenvironment at a glance. *Journal of Cell Science* .

Bhaskar, P., & Hay, N. (2007). The two TORCs and Akt. *Developmental Cell* , 12 (4), 487-502.

Bizhanova, A., & Kopp, P. (2009). The sodium- iodide symporter NIS and Pendrin in iodide Homeostasis of the thyroid. *Endocrinology* , 150 (3), 1084-1090.

Bjork, J., Nilsson, J., Hultcrantz, R., & Johansson, C. (1993). Growth-Regulatory Effects of Sensory Neuropeptides, Epidermal Growth Factor, Insulin, and Somatostatin on the Non-

Transformed Intestinal Epithelial Cell Line IEC-6 and the Colon Cancer Cell Line HT 29. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* , 28 (10), 879-884.

Brown, M., & Giaccia, A. (1998). The unique physiology of solid tumors: Opportunities (and Problems) for Cancer Therapy. *Cancer Research* , 58 (7).

Brown, T., & Fee, E. (2006). Rudolf Carl Virchow: medical scientist, social reformer, role model. *American Journal of Public Health* , 96, 2104 - 2106.

Cengic, N., Baker, C., Schütz, M., Göke, B., Morris, J., & Christine, S. (2005). A novel Therapeutic Strategy for Medullary Thyroid Cancer Based on Radioiodine Therapy following Tissue Specific Sodium Iodide Symporter Gene Expression. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* , 90 (8), 4457 - 4464.

Chang, C.-H., Qui, J., O'Sullivan, D., Buck, M., Noguchi, T., Curtis, J., et al. (2015). Metabolic Competition in the Tumor Microenvironment Is a Driver of Cancer Progression. *Cell* , 162 (6), 1229-1241.

Chang, F., Lee, J., Navolanic, P., Steelman, L., Shelton, J., Blalock, W., et al. (2003). Involvement of PI3K/AKT pathway in cell cycle progression, apoptosis, and neoplastic transformation; a target for cancer chemotherapy. *Leukemia* , 17, 590-603.

Chen, J., Huang, X.-F., Quiao, L., & Katsifis, A. (2011). Insulin-induced drug resistance to oxaliplatin in colon cancer cell line HT29. *Journal of Gastrointestinal Oncology* , 2 (1), 27-33.

Cho, J., Leveille, R., Kao, R., Rousset, B., Parlow, A., Burak, J. W., et al. (2000). Hormonal regulation of radioiodide uptake activity and Na<sup>+</sup>/I<sup>-</sup> symporter expression in mouse mammary glands. *Journal of clinical endocrinology* , 2936-2943.

Coller, H., Sang, L., & Roberts, J. (7 de March de 2006). A new description of cellular quiescence. *PLOS Biology* .

Darrouzet, E., Graslin, F., Marcellin, D., Tcheremisinova, I., Marchetti, C., Salleron, L., et al. (2016). A systematic evaluation of sorting motifs in the sodium-iodide symporter (NIS). *Biochemical Journal* , 473 (7), 919-928.

Day, G., Levy, O., & Carrasco, N. (1996). Cloning and characterization of the thyroid iodide transporter. *Nature* , 379, 458 - 460.

De la Vieja, A., Dohan, O., Levy, O., & Carrasco, N. (2000). Molecular analysis of the Sodium/Iodide Symporter: Impact on Thyroid and Extrathyroid Pathophysiology. *Physiological Reviews* , 80 (3), 1083 - 1105.

Dohán, O., de la Vieja, A., Paroder, V., Riedel, C., Artani, M., Reed, M., et al. (2003). The sodium/iodide symporter (NIS): Characterization, regulation, and medical significance. *Endocrine Reviews* , 24 (1), 48-77.

Dorello, V., Peschiarolli, A., Guardavaccaro, D., & Colburn, N. (2006). S6K1 and BTRCP-mediated degradation of PDCD4 promotes protein translation and cell growth. *Science* , 314 (5798), 467-471.

Dorn, M., Jaehme, M., Weiwad, M., Markwardt, F., Rudolph, R., Brandsch, M., et al. (2009). The role of N glycosylation in transport function and surface targeting of the human solute carrier PAT1. *FEBS Letters* , 583 (10), 1631-1636.

Eskandari, S., Loo, D., Day, G., Levy, O., Wright, E., & Carrasco, N. (1997). Thyroid Na/I symporter. Mechanism, stoichiometry, and specificity. *J Biol Chem* , 272 (43), 27230-27238.

Everett, L. A., & Green, E. D. (1998). A family of Mammalian anion transporters and Their involvement in Human Genetic diseases. *Hum Mol Genet* , 8 (10), 1883-1891.

Filetti, S., Bidart, J., Arturi, F., Caillou, B., Russo, D., & Schlumberger, M. (1999). Sodium/iodide symporter: a key transport system in thyroid cancer cell metabolism. *Eur J Endocrinol* , 141, 443-457.

Findler, I., & Kripke, M. (1977). Metastasis results from preexisting variant cells within malignant tumor. *Science* , 197, 893 - 895.

García, B., & Santisteban, P. (2002). PI3K Is involved in the IGF-I Inhibition of TSH Induced Sodium/Iodide Symporter Gene Expression. *Molecular Endocrinology* , 16 (2), 342 - 352.

Gerdes, J., Lemke, H., Baisch, H., Wacker, H., Schwab, U., & Stein, H. (1984). Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody, Ki67. *The journal of Immunology* , 133 (4), 1710-1715.

Guernot, D., Guérin, E., Aguilon-Romain, S., Pencreach, E., Shneider, A., Neuville, A., et al. (2006). Primary tumour genetic alterations and intra tumoral heterogeneity are maintained in xenografts of human colon cancers showing chromosome instability. *The Journal of Pathology* , 208 (5), 643-652.

Gustincich, S., & Schneider, C. (1993). Serum deprivation response gene is induced by serum starvation but not by contact inhibition. *Cell growth & Differentiation* , 4, 753-760.

Hakansson, L., & Tropé, C. (1974). On the presence within tumors of clones that differ in sensitivity to cytostatic drugs. *Acta Pathol Microbiol Scand Suppl Section A* , 35-40.

Hanahan, D., & Weinberg, R. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, *144*, 646 - 674.

Hanahan, D., & Weinberg, R. (2000). The Hallmarks of Cancer. *Cell*, *100* (1), 57-70.

Harmer, C. (1996). Radiotherapy in the management of thyroid cancer. *Ann Acad Med Singapore*, *25* (3), 413-419.

Heppner, G., & Miller, B. (1983). Tumor heterogeneity: biological implications and therapeutic consequences. *Cancer Metastasis Review*, *2*, 5 - 23.

Hynes, R. (1992). Integrins: versatility, modulation and signaling in cell adhesion. *Cell*, *69* (1), 11-25.

Jhng, S. (2000). Regulation of Sodium/Iodide Symporter. *Reviews in Endocrine & Metabolic Disorders*, *1*, 205 - 215.

Junttila, M., & de Sauvage, F. (2013). Influence of tumour micro-environment heterogeneity on therapeutic response. *Nature*, *501*, 346-354.

Kaminsky, S., Levy, O., Salvador, C., Dai, G., & Carrasco, N. (1994). Na/I symport activity is present in membrane vesicles from thyrotropin-deprived non-I-transporting cultured thyroid cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, *91*, 3789 - 3793.

Katzenberger, T., Petzoldt, C., Höller, S., Mäder, U., Kalla, J., Adam, P., et al. (2006). The Ki67 proliferation index is a quantitative indicator of clinical risk in mantle cell lymphoma. *Blood*, *107*, 3407.

Kelkar, M., Senthilkumar, K., Jadhav, S., Gupta, S., Ahn, B.-C., & De, A. (2016). Enhancement of human sodium iodide symporter gene therapy for breast cancer by HDAC inhibitor mediated transcriptional modulation. *Scientific reports*, *19341*.

Klutz, K., Willhauck, M., Wunderlich, N., Zach, C., Anton, M., Senekowitsch-Schmidtke, R., et al. (2011). Sodium Iodide Symporter (NIS) -Mediated Radionuclide (I, Re) Therapy of Liver Cancer After Transcriptionally Targeted Intratumoral in Vivo NIS Gene Delivery. *Human Gene Therapy*, *22*, 1403 - 1412.

Knoop, K., Kolokythas, M., Klutz, K., Willhauck, M., Wunderlich, N., Draganovici, D., et al. (2011). Image guided, Tumor Stroma-Targeted I Therapy of Hepatocellular Cancer After Systemic Mesenchymal Stem Cell-mediated NIS gene delivery. *Molecular Therapy*, *19* (9), 1704 - 1713.

Knostman, K., Cho, J.-Y., Ryu, K.-Y., Lin, X., McCubrey, J., Hla, T., et al. (2004). Signaling through 3', 5' -Cyclic Adenosine Monophosphate and Phosphoinositide -3 Kinase Induces

Sodium/Iodide Symporter Expression in Breast Cancer. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* , 89 (10), 5196 - 5203.

Kogai, T., Endo, T., Saito, T., Miyazaki, A., Kawaguchi, A., & Onaya, T. (1997). Regulation by thyroid-stimulating hormone of sodium/iodide symporter gene expression and protein levels in FRTL-5 cells. *Endocrinology* , 138, 2227 - 2232.

Kogai, T., Kanamoto, Y., Che, L., Taki, K., Moatamed, F., Schultz, J., et al. (January de 2004). Systemic retinoic acid treatment induces Sodium iodide symporter expression and radioiodide uptake in mouse breast cancer models. *Endocrinology* .

Kogai, T., Ohashi, E., Jacobs, M., Crockett, S., Fisher, M., Kanamoto, Y., et al. (2008). Retinoic Acid Stimulation of the sodium/iodide symporter in MCF7 breast cancer cells is mediated by the insulin like growth factor I/Phosphatidylinositol 3-kinase and p38 mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *J Clin Endocrinol Metab* , 93 (5), 1884-1892.

Kogai, T., Sajid-Crockett, S., Newmarch, L., Liu, Y., & Brent, G. (2008). Phosphoinositide 3 - Kinase inhibition induces sodium/iodide expression in rat thyroid cells. *Journal of Endocrinology* , 199, 243 - 252.

Kogai, T., Schultz, J., Johnson, L., Huang, M., & Brent, G. (2000). Retinoic Acid induces sodium/iodide symporter gene expression and radioiodide uptake in the MCF7 breast cancer cell line. *PNAS* , 87 (15), 8519-8524.

Lalor, P., Mapp, P., Hall, P., & Revell, P. (1987). Proliferative activity of cells in the synovium as demonstrated by a monoclonal antibody, Ki67. *Rheumatology International* , 7 (5), 183-186.

Laporte, D., Lebaudy, A., Sahin, A., Pinson, B., Ceschin, J., Daignan-Fornier, B., et al. (2011). Metabolic status rather than cell cycle signals control quiescence entry and exit. *The Journal of Cell Biology* , 216 (4).

Levy, O., Day, G., Riedel, C., Ginter, C., Paul, E., Lebowitz, A., et al. (1997). Characterization of the thyroid Na/I symporter with an anti- COOH terminus antibody. *Proceedings of the National Academy of Science* , 94, 5568-5573.

Levy, O., de la Vieja, A., & Carrasco, N. (1998). The Na/I symporter (NIS): recent Advances. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* , 30 (2), 195-206.

Levy, O., de la Vieja, A., Ginter, C., Riedel, C., Dai, G., & Carrasco, N. (1998). N-linked Glycosylation of the Thyroid Na/I symporter (NIS) . *The Journal of Biological Chemistry* , 273, 22657-22663.

Lindencrona, U., Nilsson, M., & Forssell-Aronsson, E. (2001). Similarities and differences between free <sup>211</sup>At and <sup>125</sup>I transport in porcine thyroid epithelial cells cultured in bicameral chambers. *Nuclear Medicine and Biology*, 28 (1), 41-50.

Luo, J., Manning, B., & Cantley, L. (2003). Targeting the PI3K/Akt pathway in human cancer: Rationale and promise. *Cancer Cell*, 4 (4), 257-262.

Makino, S. (1955). Further evidence favoring the concept of the stem cell in ascites tumors of Rats. *Annals New York Academy of Sciences*, 818-830.

Maxon, H., & HS, S. (1999). Radioiodine-131 in the diagnosis and treatment of metastatic well differentiated thyroid cancer. *Endocrinology and metabolism clinics of North America*, 19 (3), 685-718.

Medina, R., Zaidi, S., Liu, C.-G., Stein, J., vanWijnen, A., Croce, C., et al. (January de 2008). MicroRNAs 221 and 222 bypass quiescence and compromise cell survival. *Cell, Tumor and Stem Cell Biology*.

Mohanty, A., Datta, A., & Venkatraj, V. (2014). A Model for Cancer Tissue Heterogeneity. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, 61 (3), 966 - 974.

Morreau, H., Galjart, N., Willemsen, R., Gillemans, N., Zhou, X., & d'Azzo, A. (1992). Human Lysosomal protective protein. Glycosylation, intracellular transport, and association with beta-galactosidase in the endoplasmic reticulum. *The Journal of Biological Chemistry*, 267, 17949-17956.

Navin, N., Kendell, J., Troge, J., Andrews, P., & Rodgers, L. (2011). Tumour evolution inferred by single cell sequencing. *Nature*, 90-94.

Ohashi, E., Kogai, T., Kagechika, H., & Brent, G. (2009). Activation of the PI3 Kinase Pathway by retinoic Acid Mediates Sodium/Iodide Symporter Induction and Iodide Transport in MCF7 breast Cancer Cells. *Endocrinology*, 69 (8).

Ohta, Y., & Ichimura, K. (November de 2000). Proliferation markers, proliferating cell nuclear antigen, Ki67, 5-bromo-2-deoxyuridine, and cyclin D1 in mouse olfactory epithelium. *Annals of Otolaryngology, Rhinology & Laryngology*.

Osaki, M., Oshimura, M., & Ito, H. (2004). PI3K-Akt pathway: Its functions and alterations in human cancer. *Apoptosis*, 9 (6), 667-676.

Pardee, A. (1974). A restriction point for control of normal animal cell proliferation. *PNAS*, 71 (4), 1286-1290.

Paroder, V., Nicola, J., Ginter, C., & Carrasco, N. (2013). The iodide transport defect causing mutation R124H: a amino group at position 124 is critical for maturation and trafficking of the Na/I symporter. *Journal of Cell Science* , 126, 3305-3313.

Penheiter, A., Russell, S., & Carlson, S. (2012). The sodium iodide Symporter (NIS) as an imaging reporter for gene, viral, and cell-based therapies. *Current Gene Therapy* , 12 (1), 33-47.

Perillo, N., Marcus, M., & Baum, L. (1998). Galectins: versatile modulators of cell adhesion, cell proliferation, and cell death. *Journal of Molecular Medicine* , 76 (6), 402-412.

Pohlenz, J., Duprez, L., Weiss, R., Vassart, G., Refetoff, S., & Costagliola, S. (2000). Failure of Membrane Targeting Causes the Functional Defect of Two Mutant sodium Iodide Symporters. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* , 85 (7), 2366-2369.

Powis, G., Bonjouklian, R., Berggren, M., Gallegos, A., Abraham, R., Ashendel, C., et al. (1994). Wortmannin, a potent and selective inhibitor of Phosphatidylinositol-3-kinase. *Cancer Research* , 54 (9).

Prehn, R. (1970). Analysis of antigenic heterogeneity within individual 3-methylcholanthrene-induced mouse sarcomas. *Journal of National Cancer Institute* , 1039-1045.

Richman, S., Chambers, P., Seymour, M., Daly, c., Grant, S., Hemmings, G., et al. (2011). Intra-tumoral heterogeneity of KRAS and BRAF mutation status in Patients with advanced colorectal cancer (aCRC) and Cost-effectiveness of multiple sample testing. *Analytical Cellular Pathology* , 34 (1-2), 61-66.

Riedel, C., Dohán, O., De la Vieja, A., Ginter, C., & Carrasco, N. (2001). Journey of the iodide transporter NIS: from its molecular identification to its clinical role in cancer. *TRENDS in Biochemical Sciences* , 26 (8).

Sarbassov, D., Guertin, D., Ali, S., & Sabatin, D. (2005). Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the Rictor-mTOR Complex. *Science* , 307 (5712), 1098-1101.

Schmutzler, C., Winzer, R., Meissner-Weigl, J., & Kohtle, J. (1997). Retinoic acid increases sodium/iodide symporter mRNA levels in human thyroid cancer cell lines and suppresses expression of functional symporter in nontransformed cells. *Biochemistry and Biophysical Research Communications* , 240, 832 - 838.

Scholz, I., Cengic, N., Göke, B., Morris, J., & Spitzweg, C. (2004). Dexamethasone Enhances the Cytotoxic Effect of Radioiodine Therapy in Prostate Cancer Cells Expressing the

Sodium Iodide Symporter. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* , 89 (3), 1108 - 1116.

Scholzen, T., & Gerdes, J. (2000). The Ki67 protein: From the known and the unknown. *Journal of Cellular Physiology* , 182 (3), 311-322.

Serrano-Nascimento, C., Silve Texeira, S., Nicola, J. P., Tadeu, R., Masini-Repiso, A., & Nunes, M. T. (2014). The acute inhibitory effect of Iodide Excess on sodium/Iodide Symporter Expression and Activity Involves the PI3K/AKT Signaling Pathway. *Endocrinology* , 155 (3), 1145-1156.

Simpson, J. (1975). Radiotherapy in thyroid cancer. *Cancer Medical Association Journal* , 113 (2), 115-118.

Smanik, P., Liu, Q., Furmiger, T., Ryu, K., Xing, S., & Mazzaferri, E. (1996). Cloning of the human sodium iodide symporter. *Biochemical and Biophysical Research Communications* , 226, 339 - 345.

Spitzweg, C., & Morris, J. (2012). Genetics and phenomics of hypothyroidism and goiter due to NIS mutations. *Molecular and Cellular Endocrinology* , 322 (1-2), 56-63.

Spitzweg, C., & Morris, J. (2002). The sodium iodide symporter: its pathophysiological and therapeutic implications. *Clinical Endocrinology* , 57, 559 - 574.

Spitzweg, C., Scholz, I., Bergert, E., Tindall, D., Young, C., Göke, B., et al. (2003). Retinoic Acid-Induced Stimulation of Sodium Iodide Symporter Expression and Cytotoxicity of Radioiodine in Prostate Cancer Cells. *Endocrinology* , 144 (8), 3423 - 3432.

Stambolic, V., & Woodgett, J. (2006). Functional distinctions of protein kinase B/Akt isoforms defined by their influence on cell migration. *Trends in Cell Biology* , 16, 461-466.

Sutterlüty, H., Chatelain, E., Marti, A., Wirbelauer, C., Senften, M., Müller, U., et al. (1999). p45SKP2 promotes p27Kip1 degradation and induces S phase in quiescent cells. *Nature Cell Biology* , 1 (207).

Tlsty, T., & Coussens, L. (2006). Tumor stroma and regulation of cancer development. *Annual Reviews of Pathology and Mechanisms of Disease* , 1, 119 - 150.

Trapasso, F., Iuliano, R., Chiefari, E., Arturi, F., Stella, A., Filetti, S., et al. (1999). Iodide symporter gene expression in normal and transformed rat thyroid cells. *Eur J Endocrinol* , 140, 447-451.

- Upadhyay, G., Singh, R., Agarwal, G., Mishra, S., Pal, L., Pradhan, P., et al. (2003). Functional expression of sodium iodide symporter (NIS) in human breast cancer tissue. *Breast Cancer Research and Treatment* , 77 (2), 157-165.
- Urnauer, S., Morys, S., Levacic, A. K., Müller, A., Schug, C., Schmohl, K., et al. (2016). Sequence-defined cMET/HGFR-targeted Polymers as Gene Delivery Vehicles for the Theranostic Sodium Iodide Symporter (NIS) Gene. *Molecular Therapy* , 24 (8), 1395-1404.
- Van Herle, A., Agatep, M., Padua, D., Totanes, T., Canlapan, D., Van Herle, H., et al. (1990). Effects of 13-cis-retinoic acid on growth and differentiation of human follicular thyroid carcinoma cells. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* , 71, 755 - 763.
- Van Sande, J., Massart, C., Beauwens, R., Schoutens, A., Costagliola, S., Dumont, J., et al. (2003). Anion selectivity by the sodium iodide symporter. *Endocrinology* , 144 (1), 247-252.
- Vasudevan, S., Tong, Y., & Steitz, J. (2007). Switching from repression to activation: MicroRNAs can up-regulate translation. *Science* , 318 (5858), 1931-1934.
- Vijlder, J. (2003). Primary congenital hypothyroidism: defects in iodine pathways. *Eur J Endocrinol* , 149, 247-256.
- Vivanco, I., & Sawyers, C. (2002). The phosphatidylinositol 3-Kinase-AKT pathway in human cancer. *Nature Cancer Reviews* , 2, 489-501.
- Walker, E., Pacold, M., Perisic, O., Stephens, L., Hawkins, P., Wymann, M., et al. (2000). Structural determinants of Phosphoinositide 3-Kinase inhibition by Wortmannin, LY294002, Quercetin, Myricetin, and Staurosporine. *Molecular cell* , 6 (4), 909-919.
- Walker, K., Deak, M., Paterson, A., Hudson, K., Cohen, P., & Alessi, D. (1996). Activation of protein kinase B beta and gamma isoforms by insulin in vivo and by 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 in vitro: comparison with protein kinase B alpha. *Biochem J* , 331, 299-308.
- Welsh, P., & Mankoff, D. (2000). Cancer: Taking up iodide in breast tissue. *Nature* , 406, 688-689.
- Yesushaimi, R., Woods, R., Ravdin, P., Hayes, M., & Gelmon, K. (2010). Ki67 in breast cancer: prognostic and predictiv potential. *The Lancet Oncology* , 11 (2), 174-183.