



**Universidad Nacional de Misiones. Facultad de Ciencias Exactas,
Químicas y Naturales. Secretaría de Investigación y Postgrado.
Especialización en Bioquímica Clínica**

Especializanda
Bioq. María Mercedes Formichela

Pacientes diabéticos con expresión alterada del gen PTEN, su asociación con la susceptibilidad al desarrollo de neoplasias

**Trabajo final de Especialización presentada para obtener el
título de “Especialista en Bioquímica Clínica Área
Endocrinología”**

“Este documento es resultado del financiamiento otorgado por el Estado Nacional, por lo tanto
queda sujeto al cumplimiento de la Ley N° 26.899”.

Director
Dr. Cristian Alberto Ferri

Posadas, Misiones 2019



Esta obra está licenciado bajo Licencia Creative Commons (CC) Atribución-NoComercial-CompartirIgual 4.0 Internacional. <https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>



UNIVERSIDAD NACIONAL DE MISIONES (UNaM)

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS, QUÍMICAS Y NATURALES
(FCEQyN)

Pacientes Diabéticos con expresión alterada del gen PTEN, su asociación con la susceptibilidad al desarrollo de neoplasias

Tesis presentada para obtener título de Especialista en Bioquímica Clínica Área Endocrinología

Autor: Bqca. María Mercedes Formichela

Director: Dr. Cristian Alberto Ferri



*Posadas, Misiones- Argentina
Año 2019*



Agradecimientos:

Dedicatoria:

“Para los hombres de coraje se han hecho las empresas” *(Gral San Martin)*

El presente trabajo está dedicado a mi familia, a mis padres Nino y Marta, por haber sido mi apoyo a lo largo de toda mi carrera universitaria de grado y post grado y a lo largo de mi vida, aportando con amor a mi formación tanto profesional y como ser humano infundiéndome valentía para cada proyecto que emprendo.

Agradecimientos:

“Y todo lo que hagan, sea de palabra o de hecho, háganlo todo en el nombre del Señor Jesús, dando gracias a Dios Padre por medio de Él” *(Col 3:17)*.

Gracias Señor por darme fortaleza cuando mi ánimo caía.... Gracias Madre por abrazarme y reconfortarme en el cansancio.

A todas las personas que han apoyado y han hecho que el trabajo se realice en especial Marcela, Valeria y Betania.

A mis compañeros de trabajo que han facilitado que pueda asistir a las clases de la especialidad y a mi empleador quien apoyó mi formación profesional.

A la Directora del InBioMis, Dra. Fonseca por permitirme realizar parte de este proyecto en las instalaciones del Instituto.

Al Lic. Alan Ayala Schimpf por su incalculable trabajo y dedicación en la realización de este proyecto.

A director de tesis Cristian Ferri, por su paciencia invaluable y haberme guiado no solo en la elaboración de este trabajo sino también por su amistad y fraternidad de tantos años. Gracias amigo por cruzarte en mi vida!

Contenido

RESUMEN:	4
INTRODUCCIÓN	5
1.1 DIABETES Y SU RELACION CON EL CANCER	5
1.2 DIABETES MELITUS: GENERALIDADES.....	7
1.3 DEFINICIONES	8
1.4 LA DIABETES MELLITUS TIPO 2.....	9
1.5 MECANISMO DE ACCIÓN DE INSULINA, BASES MOLECULARES	14
1.6 RESISTENCIA A LA INSULINA E HISTORIA NATURAL DE LA DIABETES MELLITUS TIPO 2	17
2. CÁNCER:.....	18
2.1 SUPRESORES TUMORALES	19
2.2 BIOLOGÍA DE LAS REGIONES CPG Y METILACIÓN DEL ADN	20
2.3 METILACIÓN EN GENES SUPRESORES DE TUMORES.....	23
2.4 PTEN: EL GEN SUPRESOR DE TUMORES. CORRELACIÓN CON PATOLOGÍAS HUMANAS	24
2.4.1 PTEN Y METABOLISMO	25
2.4.2 ESTRUCTURA DE PTEN	28
2.4.3 RUTA DE SEÑALIZACIÓN PI3K/AKT Y ACTIVIDAD FOSFATASA DE PTEN	29
2.4.5 FUNCIONES FISIOLÓGICAS DE PTEN.....	31
3. LÍPIDOS Y LIPOPROTEÍNAS PLASMÁTICAS.....	33
3. 1 METABOLISMO DE LAS LIPOPROTEINAS	34
4. METAS DE CONTROL METABOLICO EN EL PACIENTE DIABETICO	35
HIPÓTESIS	37
OBJETIVOS	38
MATERIALES Y MÉTODOS	39
RESULTADOS.....	49
1. Distribución de la población en estudio según la edad y sexo	49
2. Expresión de <i>PTEN</i> :	49
3. <i>Estado de metilación del promotor de PTEN</i> :.....	50
3. Grado de control metabólico glucémico a través del dosaje de hba1c en pacientes cáncer.	52
4. Nivel de expresión del gen <i>PTEN</i> y control lipídico	52
DISCUSIÓN	53
CONCLUSIONES	59
BIBLIOGRAFÍA	60

RESUMEN:

La Diabetes Mellitus y el cáncer son enfermedades frecuentes de enorme impacto sanitario en todo el mundo. Los datos epidemiológicos sugieren que hay una asociación entre la incidencia de ambos. Las personas diagnosticadas con Diabetes tienen mayor riesgo de padecer algún tipo de cáncer. Las estimaciones realizadas por la Federación Internacional de Diabetes (FID), en el año 2017 establecen que la Diabetes afectaba a más de 425 millones de personas, una tercera parte de las cuales son personas mayores de 65 años. El cáncer se define como un conjunto de más de 200 enfermedades relacionadas en las que algunas de las células del cuerpo empiezan a dividirse sin detenerse y se diseminan a los tejidos circundantes se produce por diferentes mecanismos entre ellos la pérdida de función de un supresor tumoral puede llevar a las células a un estado de división descontrolada.

PTEN es un gen supresor de tumores que con mayor frecuencia se encuentra mutado en diferentes tipos de cáncer. Las posibles causas de su subexpresión incluyen mutaciones, episilenciamiento genético a través de la hipermetilación del promotor y una pérdida de la heterocigosidad en el locus de *PTEN*. A su vez, este gen está implicado en mecanismos de resistencia a la insulina asociado a Diabetes Mellitus tipo 2 y obesidad. La proteína PTEN controla el metabolismo de nutrientes en el organismo y el crecimiento celular, por lo cual variaciones en su expresión proteica está íntimamente relacionado al metabolismo como también al riesgo de desarrollar cáncer. Se necesitan estudios prospectivos de poblaciones para responder si existe asociación entre estas condiciones y el desarrollo de cáncer en individuos con y sin Diabetes. Se planteó la hipótesis de que la subexpresión del gen *PTEN* está asociada a la presencia de neoplasias en pacientes diabéticos; para lo cual, se estableció y evaluó el nivel de expresión de *PTEN*, así como también el perfil de metilación del promotor de este gen en pacientes diabéticos con y sin neoplasias. Los niveles de expresión de *PTEN* se obtuvieron mediante obtención y amplificación de cDNA obtenido a partir de las muestras respectivas y su posterior cuantificación por PCR en Tiempo Real. Para llevar a cabo la metilación del ADN se trató a las muestras con Bisulfito de Sodio y como método para la detección del estado metilado del promotor de *PTEN* se implementó una Nested PCR metilación-específica (MSP) seguida de una posterior ronda de amplificación con *primers* específicos para la región metilada. Se observó una mayor frecuencia de metilación del promotor de *PTEN* en los pacientes diabéticos oncológicos y los niveles de expresión génica obtenidos revelaron una marcada subexpresión de *PTEN* en los pacientes diabéticos con diferentes neoplasias respecto a los que presentaban solo Diabetes, mientras que no se tuvieron diferencias significativas en comparación a los individuos sanos.

En tanto que al evaluar el control metabólico de los pacientes tomados para el estudio se evidenció que los controles fueron malos en metas esperadas establecidas por la Asociación Americana de Diabetes y Guías para el tratamiento de las dislipemias en el adulto (ATPIII). Además, se comprobó un pobre requerimiento de pruebas en este grupo de pacientes acechados por las complicaciones micro y macrovasculares de la diabetes mellitus.

INTRODUCCIÓN

1.1 DIABETES Y SU RELACION CON EL CANCER

La Diabetes Mellitus (DM) y el cáncer (Ca) son enfermedades frecuentes de enorme impacto sanitario en todo el mundo. Los datos epidemiológicos sugieren que hay una asociación entre la incidencia de ambos. Las personas diagnosticadas con DM tienen mayor riesgo de padecer algún tipo de cáncer.

La DM tipo 2 (DM2) se caracteriza principalmente por *resistencia a la insulina, hiperinsulinemia e hiperglucemia*. Actualmente, es un serio y creciente problema de salud mundialmente debido a sus *complicaciones agudas y crónicas*. La incidencia de la DM continúa en aumento: en el año 2000 había al menos 171 millones de diabéticos, y se estima que aumentará hasta los 366 millones en el 2030 (Cannata 2010). Diversos estudios epidemiológicos han mostrado que pacientes con DM2 presentan un aumento en el riesgo y mortalidad para diferentes tipos de cáncer, particularmente el Cáncer Colon Rectal ha mostrado un riesgo relativo (RR) de 1.36 (1.23-1.50) y de 1.29 (1.16-1.43) con intervalo de confianza (IC) al 95% respectivamente (Sun 2009). Ambas entidades *comparten factores de riesgo*, como ser: *obesidad, sedentarismo y dieta alta en grasas saturadas*; por tanto, si la DM se asocia con incremento en la incidencia de Ca, esto tendrá consecuencias sumamente importantes. Se han descritos trabajos desde 1932 se señalaban mayor frecuencia de cáncer en pacientes diabéticos (Wilsson 1932), en 1959 Joslin advertía acerca de esta asociación, y pese a que cada vez existe más evidencia en favor de esta relación, los posibles mecanismos fisiopatológicos y los factores de riesgo implicados aún no se conocen bien los posibles vínculos biológicos entre ambas enfermedades

Hasta el momento los estudios observacionales realizados demuestran que los pacientes con DM no sólo tienen mayor predisposición a padecer algunos tipos de Ca que la población en general, sino que la *mortalidad por cáncer es mayor*, algunos autores, incluso, proponen que es prudente considerar al Ca como una nueva complicación (potencial) de la DM (Buysschaert 2013).

Uno de los estudios de cohorte más grandes que estudiaron la relación entre DM y Cáncer es el realizado por Coughlin (2004), en el que luego de un seguimiento de 16 años, se observó que la mortalidad por ciertos tipos de cáncer es mayor en la población de diabéticos que en los no diabéticos (Duarte 2016). Se ha reportado una fuerte asociación entre DM2 y riesgo de contraer determinados tipos de cáncer, principalmente: hígado, páncreas, endometrio, recto, colon, mama, vejiga, pero un reducido riesgo a contraer cáncer de próstata (Smith 2010). Tanto el Ca como DM2 son condiciones *relacionadas con la edad y ligeramente más frecuentes en*

varones. Existen importantes diferencias entre regiones geográficas, grupos socioeconómicos y étnicos que comparten un ambiente común. La medida en que estas diferencias son causadas por genes, exposiciones ambientales, estilo de vida, distribución de factores de riesgo o el acceso médico, son cuestiones que actualmente generan grandes controversias (Smith 2010).

En un metanálisis publicado en 2010 (Pears) se argumenta que la evidencia hallada es suficiente para concluir que la DM en pacientes con cáncer de mama incrementa el índice de mortalidad en todos los grupos etarios, incluso en cualquier etapa clínica del cáncer. Sin embargo, esta asociación está muy lejos de dar luz etiopatogénica de esta relación, porque se observó que las pacientes con DM y cáncer tienden a recibir esquemas de tratamiento menos agresivos que sus contrapartes no diabéticas; asimismo, existen más comorbilidades en las pacientes diabéticas y, finalmente, las diabéticas, por su estado de inmunosupresión, tienen más complicaciones durante el tratamiento del cáncer.

Evidencias epidemiológicas y genéticas, vinculan la DM2, la obesidad y el cáncer aumentando el interés en la idea de que algunas terapias contra la DM pueden aumentar el riesgo de la susceptibilidad de desarrollar cáncer, mientras que otras ofrecerían protección. Dicha vinculación se respalda en el descubrimiento de varios loci de susceptibilidad para la DM2 y su inesperada proximidad a genes implicados en la regulación del ciclo celular (Pal 2012).

Algunas neoplasias como la de páncreas, colon y mama se han asociado a niveles elevados de insulina endógena circulante en personas sin Diabetes, lo que explica cómo la DM2 la obesidad y otras condiciones asociadas a la Insulino Resistencia (IR) serían factores de riesgo para el cáncer. Una interacción *potencialmente importante entre la Diabetes y la carcinogénesis es la similitud en la vía de señalización de la insulina*. El descubrimiento de variantes genéticas comunes que influyen tanto en el riesgo de contraer cáncer como DM2 en direcciones opuestas, sugiere que ambas patologías pueden ser el resultado de alteraciones en la misma vía. La insulina es un potente promotor del crecimiento celular y se la ha implicado en el desarrollo de algunos tipos de cáncer (Giovannucci 2010; Smith 2010). La insulina constituye un factor de crecimiento para muchos tumores del tipo epitelial y el hiperinsulinismo produce un incremento secundario en la disponibilidad del IGF-1 (factor de crecimiento insulina-like-1), a través de la disminución de su proteína transportadora (IGFBP-1), lo cual caracteriza a los estados de IR tales como la DM2; a su vez el IGF-1 tiene efectos mitogénicos y antiapoptóticos más potentes que la propia insulina, lo cual sugiere que los cambios en el eje insulina-IGF-1 pudieran estar a favor de la supervivencia y progresión de focos malignos en los estadios iniciales (Gárciga-Cardoso 2012).

Teniendo en cuenta que la captación de glucosa en las células cancerosas no posee relación con la unión de la insulina, la activación del receptor de insulina, probablemente beneficia a la célula neoplásica, mediante la promoción de la supervivencia celular y la división. Múltiples

eventos de señalización resultan de la activación del eje Factor de Crecimiento Insulínico (IGF) contribuyendo al crecimiento de las células cancerígenas. Los efectos del crecimiento del eje IGF-insulina se pueden extender a las células normales del músculo liso, estableciendo así una vía común para la aterosclerosis acelerada y el desarrollo del cáncer en Diabetes (Smith 2010).

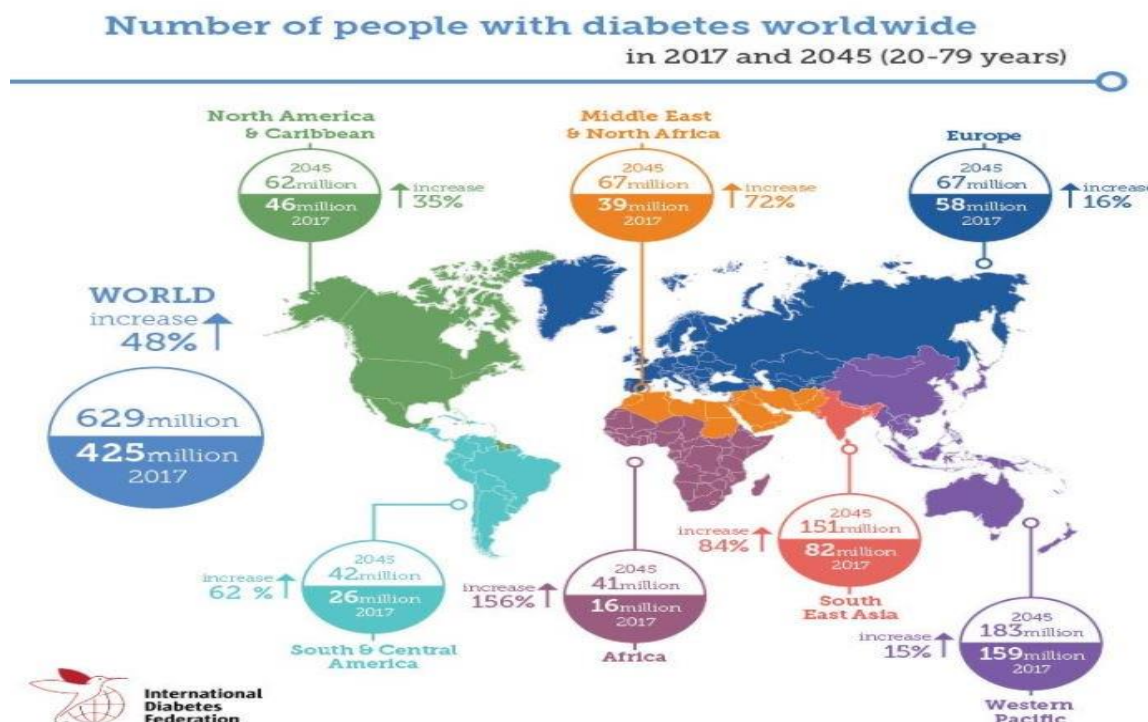
Las células tumorales, deben vencer múltiples bloqueos antes de convertirse en un verdadero tejido maligno. Algunos procesos descritos son: autonomía en las vías de crecimiento, insensibilidad a los factores inhibitorios del crecimiento, evasión a la muerte celular programada (apoptosis), potencial de replicación ilimitado, angiogénesis mantenida y la pérdida de las barreras para la invasión tisular. Una vez establecido el tejido tumoral, se incrementa el transporte de glucosa al interior de las células de manera independiente al mediado por la unión de la insulina a su receptor la cual parece tener un rol más importante en la supervivencia de la neoplasia y la mitogénesis, que en el transporte de glucosa (Gárciga-Cardoso 2012).

La inflamación es otra vía de enlace entre la DM y el Ca; las células adiposas liberan una variedad de citoquinas, que incluyen IL-6, la proteína quimioatrayente de monocitos, el plasminógeno inhibidor del activador-1, la adiponectina, leptina y TNF- α , todos los cuales intervienen en el crecimiento celular y la supervivencia. Los resultados experimentales demuestran que la IL-6 puede inducir cambios epigenéticos y transformación de células de mama en un fenotipo más invasivo (Smith 2010).

1.2 DIABETES MELITUS: GENERALIDADES

La DM es una patología descrita hace poco más de 3500 años en los papiros de Ebers, unos 2500 años a.C.; los griegos la definieron y dieron nombre por primera vez como DIABEINEM, que significa “pasar a través de” (*Demetrius De Apamaia Siglo II A.C.*) La DM es una de las enfermedades crónicas no transmisibles (ECNT) más comunes en casi todos los países y el aumento de su prevalencia acompaña a los cambios globales en el estilo de vida, como vida sedentaria y aumento de la obesidad. Las estimaciones realizadas por la Federación Internacional de Diabetes (FID), en el año 2017 establecen que la DM afectaba a más de 425 millones de personas, una tercera parte de las cuales son personas mayores de 65 años. Según los cálculos, el número de niños y adolescentes con Diabetes tipo 1 menores de 20 años ha aumentado superando el millón. La FID estima que el número de personas con Diabetes puede aumentar a 693 millones para 2045, aunque, por el lado positivo, la incidencia ha comenzado a caer en algunos países de ingresos altos. Al mismo tiempo, otros 352 millones de personas con alteración de la tolerancia a la glucosa corren un alto riesgo de desarrollar Diabetes.

Figura N°1: Número de personas con Diabetes Mellitus en el año 2017 y perspectiva para el año 2045 dado por la Federación



Internacional de Diabetes.

Tomado de American Diabetes Association- Standards of Medical Care in Diabetes.

Diabetes Care Volume 42, Supplement 1, January 2019.

1.3 DEFINICIONES

La DM comprende un grupo de enfermedades metabólicas que se caracterizan por hiperglucemia resultante de defectos en la secreción de insulina, de la acción de la insulina o de ambos. La hiperglucemia crónica en esta patología se relaciona con daño a largo plazo, disfunción y fallo de diferentes órganos especialmente retina, riñones, nervios, corazón y vasos sanguíneos. La insulina es una hormona secretada por las células beta del páncreas y que permite que la glucosa sea incorporada a las células del organismo, es decir su efecto es hipoglucemiante, antilipolítico y anabólico proteico, tiene una vida media plasmática de 5-6 minutos y es degradada por enzimas presentes en el hígado, riñón, y plasma. La base de las anomalías del metabolismo de los hidratos de carbono, las grasas y las proteínas en la DM es la acción deficiente de la insulina sobre los tejidos diana, debido a su secreción inadecuada y/o la disminución de la respuesta de los tejidos a la insulina en uno o más puntos en la compleja vía de la acción hormonal. El deterioro de la secreción de insulina y los defectos de la acción insulínica suelen coexistir en el mismo paciente, y no está establecido cuál de las anomalías es la causa principal de la hiperglucemia, si es que actúan por sí solas.

La acción de e hormona sobre los tejidos denominados insulino sensibles se da a través de la unión a su receptor específico de membrana, ejerciendo sobre la misma activación de

mecanismos de transporte, regulación de vías metabólicas y en el núcleo transcripción génica en los denominados tejidos insulinosensibles. Después de ser activado por la insulina, el receptor recluta y fosforila principalmente dos proteínas adaptadoras: Sustrato Receptor de Insulina (IRS) y Shc. Estas proteínas organizan complejos moleculares que desencadenan diferentes cascadas de señalización intracelular. Entre las vías mediadas por IRS se encuentran la de PI3K/Akt, la cual tiene un papel crucial en la activación y la regulación de diversos eventos metabólicos, que incluyen el transporte de glucosa y la síntesis de glucógeno, proteínas y lípidos. En el caso de la proteína Shc, esta se asocia a la activación de la vía de las quinasas activadas por mitógeno, MAPK, que regula funciones proliferativas y de crecimiento (Olivares-Reyes 2017).

1.4 LA DIABETES MELLITUS TIPO 2

La es grupo de enfermedades metabólicas crónicas, cuya prevalencia se ha incrementado drásticamente durante los últimos veinte años. La incidencia anual se calcula en 1,2-4,1 casos/1.000 personas; se caracteriza por hiperglucemia crónica, resultado de la alteración en los mecanismos de secreción y sensibilidad a la insulina. Tejidos como el músculo, el hígado, el tejido adiposo y la célula beta pancreática contribuyen de manera importante a la resistencia a la insulina característica de la DM2 (ALAD 2016). Factores tanto genéticos como ambientales subyacen a la etiología de la DM2. Dentro de las situaciones ambientales prevalecen el consumo excesivo de calorías y el sedentarismo, que llevan a la obesidad, aceleran en gran medida el inicio de la enfermedad (Sarmiento, Tusie 2008, Huerta 2016).

En la actualidad cada vez son más frecuentes los casos de DM2 diagnosticados en jóvenes, adolescentes y niños; la DM2 supone el 80-90% de todos los casos de DM, convirtiéndose en un problema socio sanitario y económico de primera magnitud (Conget 2002).

La etiopatogenia de la DM2 es multifactorial, interviniendo factores genéticos y ambientales. Desde el punto de vista fisiopatológico presenta tres alteraciones más o menos constantes: IR a nivel periférico, secreción alterada de insulina en respuesta al estímulo de la glucosa y producción aumentada de glucosa endógena por el hígado. En las formas poligénicas de la enfermedad, que son las más frecuentes, estos factores genéticos, ambientales y fisiopatológicos interactúan entre sí, aunque no es bien conocido de qué manera lo hacen. La alteración en la adaptación de las células β a la situación de resistencia a la insulina en pacientes con predisposición genética para padecer DM2 precipitaría la enfermedad (Sarmiento 2008).

En condiciones fisiopatológicas, en el periodo post absorptivo, la mayoría de la glucosa absorbida es utilizada por un mecanismo insulino dependiente: 50% cerebro y otros órganos 25%; el 25 % restante es utilizado por caminos insulino dependientes, especialmente el musculo. La captación basal de glucosa, cuyo promedio es de 2 mg/kg/min, se equilibra con la

producción de glucosa por el hígado (Gluconeogénesis). Después de la ingestión de glucosa se interrumpe el equilibrio entre la captación periférica y la producción de glucosa y el mantenimiento del homeostasis *normal* se produce por tres mecanismos coordinadamente: frente al aumento de glucosa se incrementa la secreción de insulina y esta hiperinsulinemia, junto con la hiperglucemia, estimulan la captación periférica de la glucosa, especialmente en tejido adiposo y en musculo e inhiben la salida de glucosa del hígado. Cuando se produce alguna alteración en la célula β y en la captación de glucosa en los tejidos blancos, aparece la intolerancia a la glucosa o DM. Por lo tanto, según Frunzo y col. Para que se desarrolle DM2 es necesario que exista IR periférica y una disminución de la función de las células β que deben presentarse sucesivamente (Ruiz 2010).

Si bien el origen y la etiología de la DM pueden ser muy diversos, conllevan inexorablemente la existencia de alteraciones en la secreción de insulina, en la sensibilidad a la acción de la hormona o bien en ambas, en algún momento de su historia natural (Chiasson 2007).

Teniendo en cuenta la íntima *relación* que guardan la *secreción de insulina y la sensibilidad a la acción de la hormona* en el complicado control del homeostasis de la glucosa, es prácticamente imposible discernir por separado la contribución de cada una de ellas a la etiopatogenia de la DM2.

La DM2 es una enfermedad hereditaria, cuya patogenia aceptada en la actualidad comienza en la periferia (hígado, tejido adiposo y musculo) por el mecanismo de la IR que es un fenómeno de origen genético (Ferranini 2003). Además, existiría otro mecanismo a nivel de la función de las células β que claudicaría cuando aparece la DM clínica (Cabezas Cerrato 2007)

Ambos fenómenos suelen coexistir y participan en una proporción diferente en la fisiopatología de la enfermedad, no sólo según la población estudiada, sino también según el período evolutivo de la misma (Conget 2002). Se diagnostica sobre la base de hiperglucemia prolongada; personas con DM2 están en riesgo elevado de una serie de graves complicaciones de salud, incluyendo enfermedades cardiovasculares, muerte prematura, ceguera, insuficiencia renal, amputaciones, fracturas, debilidad, depresión y deterioro cognitivo (Goff 2007). La población argentina incluye etnias de alto riesgo para el desarrollo de DM2, sumado a que la prevalencia de obesidad y sobrepeso se encuentra en constante aumento; actualmente se estima que la de la obesidad es del 20,8% y la del sobrepeso del 37,1% (Cairo, 2018). La DM2 es una de las comorbilidades asociadas al exceso de grasa corporal, durante las últimas décadas, la prevalencia de síndrome metabólico (SM) ha sido aumentada en todo el mundo y se ha convertido actualmente en un importante problema de salud a nivel mundial (Hashemi 2013, Eckel 2005). La asociación de factores metabólicos con riesgo de DM2 y enfermedad cardiovascular (ECV) era conocida desde ya en los años 80, pero el concepto de un "síndrome" comenzó cuando Gerald Reaven en 1988 propuso un marco conceptual fisiopatológico que relacionaba dichos factores a través de la IR, al que

llamó Síndrome X. Esta hipótesis planteaba que la IR era el mecanismo en común que conducía a las anormalidades metabólicas, presión arterial (PA) elevada, dislipemia (C-HDL bajo, triglicéridos elevados) y alteraciones en el metabolismo de la glucosa. Posteriormente cobró importancia junto a la IR la obesidad abdominal, y comenzaron a proponerse otros nombres para definirlo, como Cuarteto de la Muerte, Síndrome de IR, Síndrome Plurimetabólico, entre otros; consensuándose finalmente el término Síndrome Metabólico (SM) por la Organización Mundial de la Salud (OMS, 1998) para definir esta condición conjunta de factores de riesgo. Actualmente, otras anormalidades como estados crónicos pro-inflamatorios y pro-trombóticos, hígado graso no alcohólico y apnea del sueño están siendo asociadas a la entidad del síndrome, haciendo aún más compleja la tarea de la redefinición. La DM2 está íntimamente relacionada a la obesidad y ambas se caracterizan por un estado de resistencia a la insulina, generalmente definido como una reducción en la capacidad de la insulina para ejercer sus efectos metabólicos, es decir se trata de una afección crónica que se desencadena cuando el organismo pierde su capacidad de producir suficiente insulina o de utilizarla con eficacia. Habitualmente, la resistencia a la insulina, es precursora de la DM2 (Smith 2012). La alta prevalencia de la DM2 sus complicaciones específicas y la presencia de otras entidades que suelen acompañarla hacen de la enfermedad uno de los principales problemas socio sanitarios en la actualidad (Conget 2002). Un 50% de los individuos con DM2 tienen hipertensión arterial y un porcentaje similar presenta dislipidemia, siendo ambos factores de riesgo de enfermedad cardiovascular. Por otro lado, en el momento del diagnóstico, el 40% de los pacientes presenta algún tipo de macroangiopatía ya establecida. En el mismo contexto, un 35% presenta micro o macroalbuminuria y un 15% retinopatía, es decir, alguna de las formas en las que se manifiesta la enfermedad microvascular característica de la DM2 (UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group 1998) (Gagliardino 2019)

-FACTORES GENÉTICOS

Para la comprensión de los factores genéticos involucrados, se han utilizado distintas estrategias metodológicas para identificar los genes responsables:

- 1) Estudios de genes candidatos, de ligamiento genético, de asociación al genoma completo (GWAS);
- 2) Secuenciación del genoma o del exoma completo;
- 3) Estudios de expresión génica global.

En particular, los GWAS han sido exitosos identificando distintos genes y variantes genéticas de riesgo para desarrollo de DM2 y otros rasgos metabólicos relacionados. Esto ha permitido, dilucidar las bases bioquímicas y celulares mediante las cuales estos genes promueven el desarrollo de la DM2 (Consortium 2014). Aun habiéndose identificado casi un centenar de

variantes genéticas implicadas en la susceptibilidad a la DM2, todas ellas explican todavía una proporción muy pequeña de la herencia a la enfermedad (menos del 20%), sugiriendo que existen otros mecanismos, todavía poco entendidos, mediante los cuales el componente genético contribuye de manera sustantiva al riesgo a la patología. Estos comprenden la presencia de variantes genéticas menos frecuentes cuya contribución al riesgo pudiera ser más elevada, posibles interacciones gen-gen, así como interacciones gen-ambiente incluyendo distintos mecanismos epigenéticos que regulan la expresión de múltiples genes. La epigenómica abarca el estudio de *modificaciones temporales o permanentes la expresión génica* (Schones 2016). Las *modificaciones químicas sobre la molécula de ADN* como la metilación, acetilación o sobre las proteínas que la recubren, modifican la expresión de distintos genes y promueven la disfunción de distintos órganos y tejidos. En este sentido, el entendimiento de cómo los cambios del ambiente (p. ej. hábitos alimenticios, inactividad física) actúan sobre un fondo genético proclive al ahorro de energía (p. ej. genotipo ahorrador) tendrá un mayor impacto en la comprensión de las enfermedades. La importancia de la identificación del componente genético de riesgo a la DM2 radica en la eventual comprensión de las vías bioquímicas, metabólicas y celulares relacionadas a la disfunción de distintos órganos y tejidos, de tal manera que este conocimiento sustente el desarrollo y aplicación de nuevas medidas de prevención y tratamiento para esta enfermedad clínica y genéticamente heterogénea.

Sin embargo, ante todo lo expuesto, *todavía no se han identificado los genes principales implicados en esta enfermedad*, hay gran evidencia a favor de una fuerte predisposición genética, como la concordancia para padecerla en gemelos monocigotos (80-90%) y el aumento del riesgo en grupos familiares (2-4 veces más en familiares de primer grado) (Stumvoll 2005). El estudio genético resulta complicado por no seguir un patrón mendeliano definido. Se está rastreando toda la amplitud del genoma en busca de mutaciones o polimorfismos relacionados con la DM2. Cada genotipo no tiene una expresión fenotípica única y muchos genotipos pueden dar lugar a un fenotipo altamente similar. La identificación de genes asociados con el desarrollo de la DM es compleja y los defectos genéticos enmarcados en la DM2 y en la RI no están presentes en un gen, sino que existe un cierto polimorfismo y son muchos los genes que pueden estar involucrados: glucoquinasa36, GLUT-1, GLUT-4, hexoquinasa II, fosfofrutoquinasa, glucógeno-sintetasa, calpaína 1037 del receptor de insulina, RIPK1, BIRC2 y BIRC3, entre otros (Jamil 2017; Taylor 1992). Estos genes codifican proteínas implicadas en las señales post receptor y para enzimas clave del metabolismo (Zierath 2000).

FACTORES AMBIENTALES

-Edad: La prevalencia de la DM2 aumenta con la edad, entre 10-15% y 20 %, en los mayores de 65 y 80 años, respectivamente, y está en relación con la disminución progresiva de la sensibilidad a la insulina. A estas cifras contribuye el envejecimiento de la población mundial, pues las estadísticas reflejan que para mediados del siglo XXI el 16 % de la población mundial será anciana, lo que contrasta con el hecho de que en el año 1950 solamente el 5 % alcanzaba los 65 años. Datos epidemiológicos recientes señalan que la DM es la quinta enfermedad más frecuente en la senectud, tras la artrosis, la hipertensión arterial (HTA), las cataratas y las enfermedades cardiovasculares. (Rojas 2018). La sensibilidad hacia la insulina disminuye con la edad y esta disminución está ligada a un aumento de la grasa corporal (De Fronzo 2015).

-Obesidad: Se trata de la causa fundamental del incremento de la incidencia de DM2, aunque la genética humana se ha mantenido casi sin cambios en los últimos 50.000 años, en las últimas décadas se comenzó a vivir un aumento notable de la prevalencia de obesidad y diabetes, que han coincidido con un cambio drástico en el estilo de vida, con un incremento de la ingesta y un descenso de la actividad física. Es probable que se haya producido una falta de coincidencia entre los patrones evolutivos y el modo de vida de la sociedad actual, en nuestro entorno actual la comida es abundante y relativamente barata y la actividad física no siempre resulta necesaria, especialmente con los avances en el transporte y la tecnología (Picón 2010). La obesidad se asocia en mayor medida a DM2 y el riesgo de padecerla aumenta en relación con el grado de obesidad y con la distribución de la grasa (obesidad central) por su relación con la RI. En su patogenia se involucran una serie de factores como los ácidos grasos libres (AGL), la leptina (regula la ingesta alimentaria y la RI a nivel muscular), la adiponectina (reduce la RI a través de la oxidación de los AGL), la resistina (se opone a la acción de la insulina), etc.

-Hábitos alimentarios: En relación con hábitos dietéticos inadecuados como el consumo de alimentos ricos en carbohidratos, colesterol y grasas saturadas (Harding 2001).

-Actividad física: el efecto del ejercicio que es insulino-independiente. La insulina y el ejercicio coinciden en un mecanismo molecular para mejorar la entrada de glucosa a la célula: aumentan la traslocación del receptor de glucosa GLUT-4, que es el principal responsable del ingreso de glucosa a la célula muscular. Pero insulina y ejercicio lo hacen estimulando diferentes vías de señales. La contracción muscular implica un cambio en el estado energético muscular (incremento de AMP/ATP), aumento del calcio intracelular, incremento de las especies reactivas de oxígeno y de la actividad de la proteína quinasa C. Estos cambios activan diferentes vías de señalización que funcionan como cascadas activando la translocación del GLUT-4 a la membrana celular (SAD 2018). El ejercicio crónico genera adaptaciones metabólicas favorables para el tratamiento de la diabetes, específicamente al mejorar la función mitocondrial e incrementar la expresión de la proteína GLUT-4. Está

documentado que las personas con diabetes tienen mitocondrias más pequeñas, dañadas, defectuosas en su función y con una disminución del marcador de biogénesis mitocondrial. El ejercicio crónico de resistencia incrementa el contenido y actividad de las mitocondrias musculares y de los marcadores de actividad mitocondrial (como la actividad de la citrato sintetasa y la expresión de los complejos I, II y III). Estos hallazgos se correlacionan con una mayor disposición de glucosa estimulada por insulina, lo que sería un signo indirecto de incremento en la insulino-sensibilidad muscular mediada por el ejercicio. Puede mejorar la resistencia a la insulina a través de la regulación del transporte de la glucosa en el músculo al incrementar las concentraciones de GLUT-4. El ejercicio disminuye el riesgo a desarrollar DM2 mejora el metabolismo lipídico y ayuda a perder y mantener el peso. Además, la inactividad física favorece el desarrollo de obesidad íntimamente ligada a la DM2 (Salmeron 2001)

Siete grandes estudios han confirmado que la modificación del estilo de vida, en pacientes de alto riesgo para la DM, es eficaz para impedir o retrasar la evolución de estados pre diabéticos a DM2 y otros cuatro estudios ponen de manifiesto que diversos medicamentos (metformina, acarbosa, orlistad, ramipril y rosiglitazona) pueden frenar la evolución a DM e incluso reducir el riesgo a desarrollarla (Chiasson 2007; Yates 2007).

1.5 MECANISMO DE ACCIÓN DE INSULINA, BASES MOLECULARES

La insulina se une a su receptor (Rc) específico localizado en la membrana plasmática de sus células blanco, a través de la interacción con alguno de sus residuos: A1 glicina, A5-glicina, A19-tirosina y A21-asparagina. Estos Rc están constituidos por un complejo glicoproteico de peso molecular 400 kDa y comparten las propiedades generales de los receptores de hormonas polipeptídicas: localizados en membrana citoplasmática, alta especificidad y afinidad, número finito de sitios y en consecuencia saturables, interacción rápida y reversible con la hormona, relación directa e indirecta entre esta interacción y el efecto biológico del mismo (Ruiz 2010).

Cuando la insulina se une a su receptor, éste desencadena múltiples vías de señalización que median sus acciones biológicas, en las cuales la fosforilación inicial del receptor en residuos de tirosina (Tyr) lleva a una serie de eventos de fosforilación/desfosforilación de quinasas de Tyr y serina/treonina (Ser/Thr). Estas quinasas son las responsables de transmitir la señal de la insulina para la regulación de eventos metabólicos al interior de la célula (Avruch 1998).

El receptor de insulina (IRc) es una glucoproteína que pertenece a la familia de receptores para factores de crecimiento con actividad intrínseca de Tyr quinasas (RTK's), los cuales al ser estimulados por su ligando se autofosforilan en residuos de Tyr (Ebina 1985). El IRc es un heterotetrámero compuesto por dos subunidades α (125-153k Da) y dos subunidades β (95 kDa) unidas por puentes disulfuro dispuestas en forma simétrica. Estas subunidades son

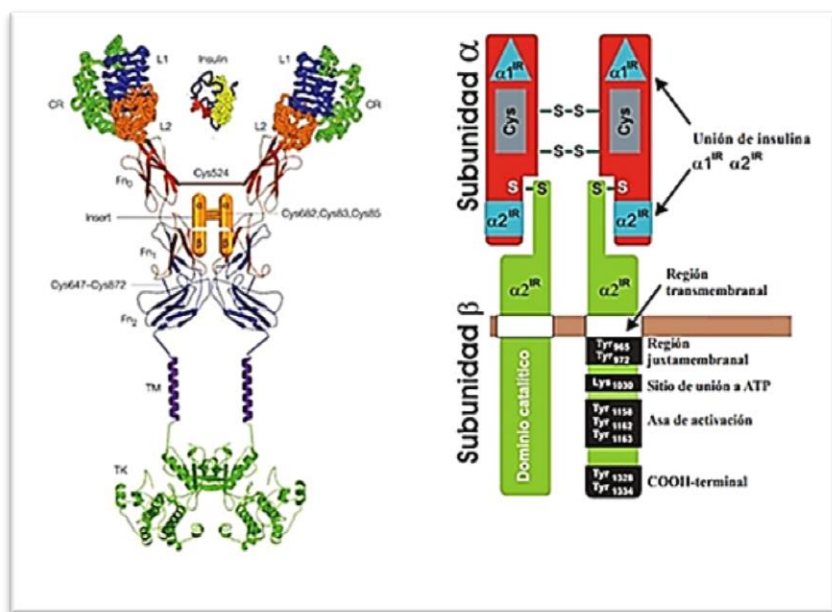
sintetizadas como un pro-receptor de cadena simple codificada por un gen situado en el cromosoma 19 (Ruiz 2011). Las subunidades α se encuentran localizadas en el exterior de la membrana plasmática y contienen sitios de unión a la insulina, mientras que las subunidades β tienen una porción extracelular, una transmembrana y una porción intracelular donde se localiza el dominio con actividad de Tyr quinasa (*Figura 2*). En la porción intracelular se han identificado tres regiones estructurales que incluyen:

1. Región yxtamembrana-intracelular, implicada en la transmisión de señal.
2. una región reguladora conocida como “Asa de activación”
3. una región con sitios de fosforilación en el extremo carboxilo terminal con una importante función reguladora.

En condiciones ausentes de estímulo, las subunidades α ejercen un papel regulador sobre las subunidades β , inhibiendo la capacidad del receptor para autofosforilarse. Después de la unión de la insulina a su receptor, las subunidades α sufren cambios conformacionales que permiten que las subunidades β se activen y sean capaces de autofosforilarse en residuos de Tyr.

Simultáneamente se produce un desplazamiento lateral de los complejos hormonas-Rc que se agregan en determinados sectores de la membrana; esta agregación hace irreversible la unión hormona- Rc y es esencial para que se manifieste el efecto biológico de la insulina, si los Rc no se agregan su unión con la hormona es reversible, pudiendo ser esta última desplazada por simple competencia. El mecanismo de autofosforilación se da por procesos de cis y trans-autofosforilación mediante las cuales ciertos residuos son fosforilados por la actividad fosfotransferasa de la misma subunidad β (cis), mientras que otros son sustratos de la actividad de quinasa de la subunidad β opuesta (trans) (Ebina 1985).

Figura 2. Estructura y dominios funcionales del receptor de Insulina. Modificado de “Regulación Hormonal del Metabolismo de Glucosa; Dra Sobeida Sanchez Nieto.



Una vez que la insulina interacciona con su receptor y, éste es activado, se inicia la cascada de señalización que depende de un gran número de interacciones proteicas (*Figura 3*).

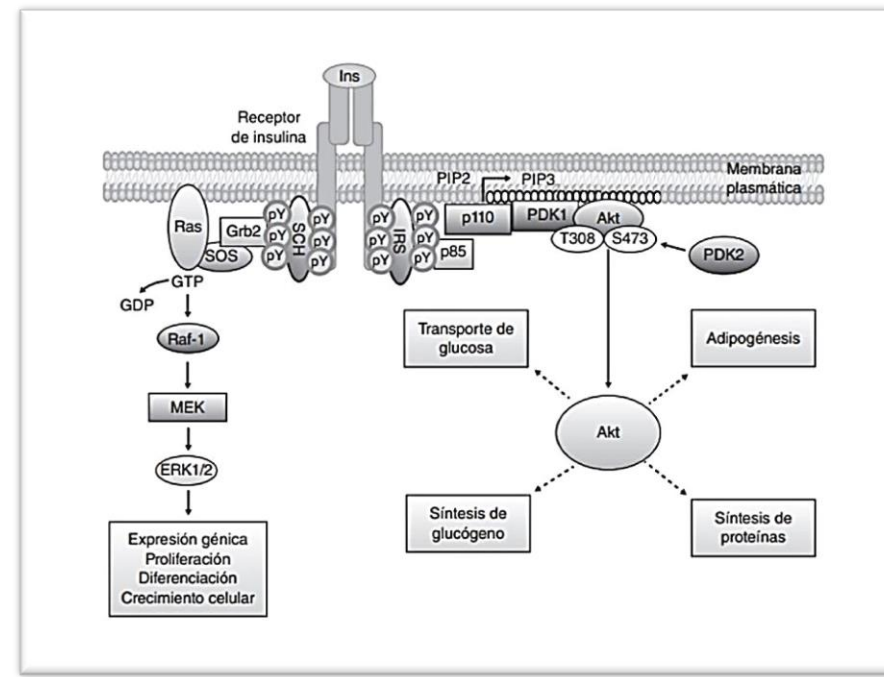
Dos vías principales de transducción son activadas por acción de la insulina:

la vía de la fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K) y la vía de las quinasas activadas por mitógenos (MAP quinasas). Ambas vías regulan la mayoría de las acciones de la insulina asociadas a la *regulación del metabolismo energético y de la expresión génica* (Youngren 2007; Saltiel 2001).

La vía de señalización de la *PI3K* es el *principal mecanismo por el que la insulina ejerce sus funciones en el metabolismo de la glucosa y de lípidos*. La transducción de señales se inicia cuando el IRc activo y autofosforilado, interacciona con el IRS y lo fosforila. Las proteínas del IRS contienen dominios que en conjunto permiten el acoplamiento al IRc activo. Adicionalmente, los IRS contienen sitios potenciales de fosforilación que al ser fosforilados por el IRc, se convierten en sitios de unión y activación de proteínas, muchas de las cuales funcionan *como proteínas adaptadoras*, como es el caso de *PI3K* (Reyes & Plancarte 2008). Las PI3Ks, son heterodímeros que constan de una *subunidad reguladora (p85)* y de una *subunidad catalítica (p110)*. Las *subunidades reguladoras son proteínas adaptadoras que contienen dos dominios SH2*, los cuales permiten su *unión a las proteínas IRS-1*. La interacción entre ambas proteínas provoca cambios alostéricos en la conformación de la subunidad reguladora dando por resultado la activación de la subunidad catalítica de PI3K. A consecuencia de ello, *p110* se localiza cerca de la membrana plasmática donde *tiene acceso a sus sustratos fosfatidilinositol 4-fosfato (PI4-P) y fosfatidilinositol4,5-bisfosfato (PI4, 5-P2)* los cuales son fosforilados en la posición 3 del inositol, generando los productos PI3,4-bisfosfato (PIP2) y PI3,4,5- trisfosfato (PIP3) respectivamente. El *PIP3* sirve como *sitio de unión para quinasas de Ser como PDK1 (quinasa dependiente de fosfoinositidos-1) y Akt o proteína*

quinasa B (PKB) (Engelman 2007) Ambas regulan varios de los efectos metabólicos de la insulina a través de la fosforilación de una lista creciente de sustratos como mTor, FOXO, GSK3 y caspasa 9, que propagan la respuesta de la insulina. (Figura 3).

Figura 3. Vía de señalización de la Insulina: Activación de la vía de la PI3K/Akt.



Tomado de Mecanismos Moleculares de la Resistencia a la Insulina: Una Actualización Citlaly Gutiérrez-Rodelo, Adriana Roura-Guiberna y Jesús Alberto Olivares-Reyes* Laboratorio de Transducción de Señales, Departamento de Bioquímica, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (IPN), Ciudad de México, México

1.6 RESISTENCIA A LA INSULINA E HISTORIA NATURAL DE LA DIABETES MELLITUS TIPO 2

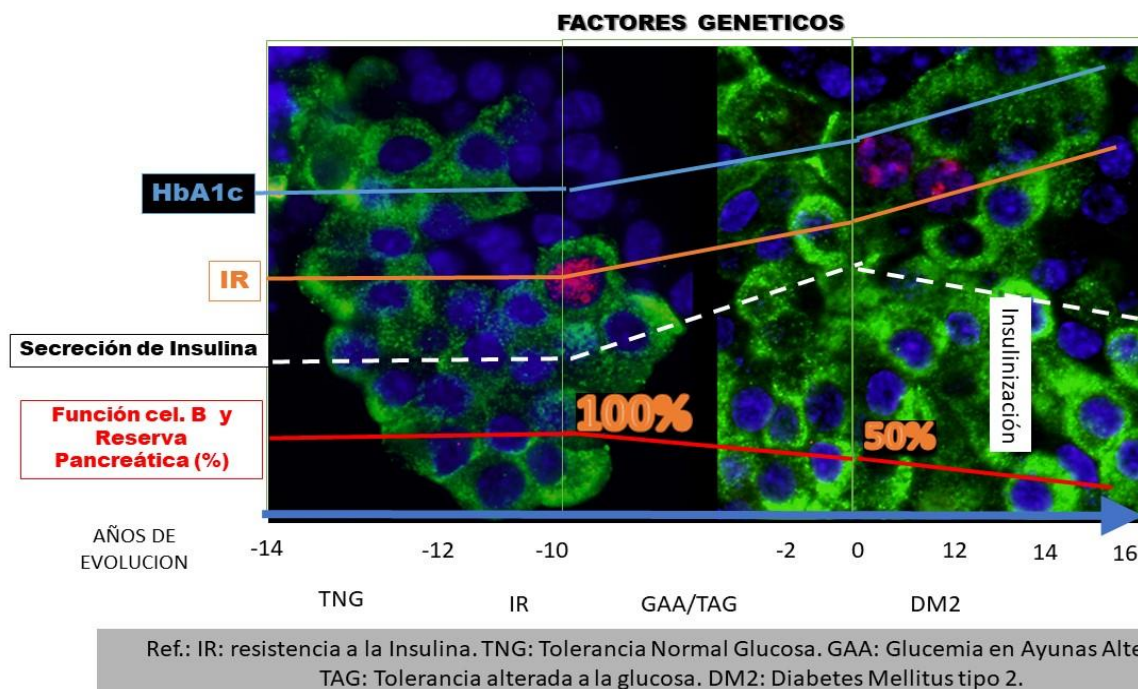
El estado generado por la incapacidad de las células blanco de responder a la insulina endógena y exógena para ejercer sus acciones biológicas en los tejidos diana a concentraciones que son eficaces en individuos no diabéticos, hemos definido como RI y se debe presumiblemente a defectos en su vía de señalización, siendo una de las principales características de manifestaciones patológicas asociadas con la DM2. Los niveles elevados de insulina en el organismo incrementan el riesgo cardiovascular y es un hecho constante en la DM2 pudiendo existir durante años antes del inicio de la enfermedad (Lillioja 1988). De manera general, la IR se manifiesta por una disminución en el transporte de glucosa inducido por la insulina en adipocitos y músculo esquelético, un aumento de la producción de glucosa hepática y alteraciones en el metabolismo de lípidos en tejido adiposo y hepático (Le Roith 2003). A nivel molecular, es la consecuencia directa de una *deficiente señalización* causada por *mutaciones o modificaciones post-traduccionales del receptor de insulina* o de *moléculas efectoras río abajo* del mismo que desempeñan funciones importantes en la vía de señalización (Paz 2002). Entre las alteraciones más comunes se encuentran la *disminución en*

el número de receptores y de su actividad de un aumento en el estado de fosforilación en residuos de Ser/Thr de proteínas clave como el receptor y su sustrato; la disminución de la actividad de las quinasas PI3K y Akt y defectos en la expresión y función del transportador GLUT4 (Sesti 2006).

La IR, en una primera fase, estaría compensada por un aumento de la secreción pancreática de insulina (hiperinsulinemia compensadora), que estimulando la utilización periférica de glucosa y disminuyendo la producción de glucosa hepática, mantendría la euglucemia; sin embargo, a lo largo del tiempo este mecanismo fracasa. La función de las células β se deteriora progresivamente, mientras que la sensibilidad a la insulina permanece estable, apareciendo de manera gradual diferentes estados de hiperglucemia a pesar del hiperinsulinismo compensador (DeFronzo 1997).

La progresión desde la tolerancia normal a la glucosa (TNG) hasta la Diabetes franca, pasando previamente por los estados de GAA y TG, es el resultado del deterioro gradual de la función de la célula β (Weyer 1999) (Figura 4). Las causas de esto aún no son bien conocidas; se piensa que en el desequilibrio entre apoptosis y regeneración de la célula β , pueden intervenir factores genéticos y ambientales.

Figura 4: Mecanismos patogénicos de la Diabetes Mellitus Tipo 2



Modificado de DeFronzo, R. A. (1997). Pathogenesis of type 2 diabetes: metabolic and molecular implications for identifying diabetes genes.

2. CÁNCER:

El cáncer es una enfermedad compleja tanto en su desarrollo como en la forma en que se manifiesta de un individuo a otro; se caracteriza por la presencia de alteraciones en los

mecanismos genéticos y/o epigenéticos que regulan la división celular, llevando a la proliferación celular descontrolada (alteraciones en supresores tumorales, genes de reparación, reguladores del ciclo celular, adhesión, diferenciación celular y apoptosis, entre otros). De esta manera, las funciones fisiológicas de los tejidos afectados se perturban, dando lugar a múltiples manifestaciones clínicas, en dependencia del órgano comprometido, el tamaño del tumor y de la propagación de las células cancerígenas en el organismo (Boyle 2008)

Según el Instituto Nacional del Cáncer (NCI) de EEUU y la Asociación Española Contra el Cáncer (AECC), el cáncer se define como un conjunto de más de 200 enfermedades relacionadas en las que algunas de las células del cuerpo empiezan a dividirse sin detenerse y se diseminan a los tejidos circundantes. El inicio puede darse en cualquier lugar del organismo, cuando el proceso natural y ordenado de crecimiento, división y muerte de células se descontrola, de modo que las células que acumulan daños en el ADN, en vez de morir, sobreviven y forman células nuevas. Cuando se acumulan estas divisiones, las células pueden formar masas llamadas tumores. Normalmente se necesita más de un gen mutado para el desarrollo del cáncer (Knudson 2011). Además, una vez se fijan las alteraciones que dan inicio a la oncogénesis, a medida que las células se dividen y se forma el tumor, se siguen acumulando daños en el ADN y se producen cambios en los oncogenes y los supresores de tumores que favorecen al desarrollo del cáncer.

2.1 SUPRESORES TUMORALES

Para la generación de células cancerígenas, es necesario que los genes que regulan procesos como el crecimiento, división y diferenciación celular estén desregulados o alterados (Elizazu Perez 2019). Los genes involucrados se clasifican en dos categorías: los oncogenes, que son los genes que fomentan el crecimiento y la proliferación celular, y los genes supresores de tumores, que constituyen un grupo de proteínas capaces de controlar la división celular, promover apoptosis y suprimir la metástasis. Dicha transformación, generalmente, requiere que se produzcan alteraciones genéticas en protooncogenes y/o supresores tumorales. La pérdida de función de un supresor tumoral puede llevar a las células a un estado de división descontrolada y conducir al cáncer. Es por ello, que se realizan numerosos estudios para poder comprender los mecanismos funcionales y la regulación de dichos supresores tumorales.

Existen cuatro grandes mecanismos de supresión tumoral: inhibición de la división celular, inducción de apoptosis, reparación de daño al ADN, e inhibición de la metástasis (Sun and Yang 2010). La inhibición de la división celular es el principal mecanismo de la mayoría de los supresores tumorales, entre los que se incluye, por ejemplo, la proteína Rb (Retinoblastoma) que inhibe la transcripción de genes específicos necesarios para la mitosis, la proteína APC

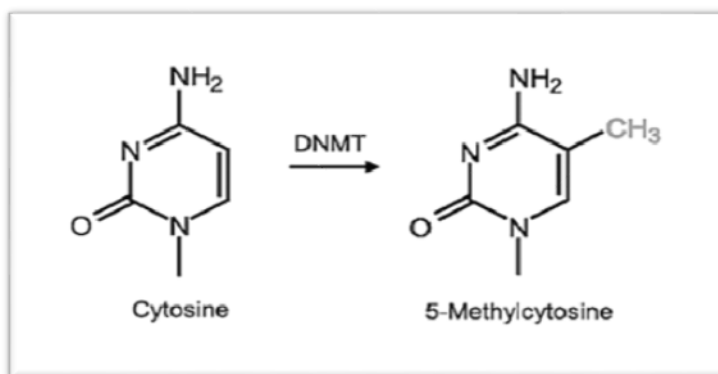
(Adenomatous Poliposis Coli), que inhibe la mitosis estabilizando los microtúbulos y la fosfatasa PTEN (Phosphatase and tensin homologue), que inhibe la transición G0-G1 del ciclo celular (Green et al 2005). La inducción de apoptosis o muerte celular programada es otro mecanismo de supresión tumoral. En este grupo se incluyen, entre otros, APC que promueve apoptosis a través de la caspasa 8 (Steigerwald 2005) y PTEN, que favorece la apoptosis bloqueando la activación de Akt (Simpson & Parsons 2001).

2.2 BIOLOGÍA DE LAS REGIONES CPG Y METILACIÓN DEL ADN

Cuando un estímulo extracelular llega a la célula, en condiciones fisiológicas, éste se une a su receptor de membrana produciendo la activación de distintas vías de transducción de señales intracelulares que finalmente conducen a la activación de factores de transcripción y la síntesis proteica derivada de la activación de un determinado gen. En este contexto la cromatina que estructuralmente está condensada en el núcleo de las células (forma inactiva), se “descompacta” ante la llegada de señales intracelulares permitiendo así que las ARN polimerasas inicien el proceso de transcripción y transducción proteica en respuesta a un determinado estímulo extracelular. De esta forma se activan o inhiben rutas de señalización implicadas en los procesos fisiológicos de proliferación, diferenciación, supervivencia, transformación y muerte celular necesarios para mantener la homeostasis tisular (Prendergast 2007). En esta cadena de eventos que ocurren en el interior de la célula, cobra gran relevancia determinados fenómenos epigenéticos que tienen un peso importante en la maquinaria de regulación de los procesos de transcripción génica. El término epigenética ha sido definido como: "los cambios heredables en la expresión génica que ocurren sin una alteración en la secuencia del ADN (Allegrucci, Laird 2015). Así, un mecanismo epigenético puede ser entendido como un sistema complejo para utilizar selectivamente la información genética, activando y desactivando diversos genes funcionales (Kondo 2008). Dentro de los procesos más estudiados en este campo, se encuentran las modificaciones covalentes que suceden en las histonas por procesos de acetilación/desacetilación de las mismas, así como las reacciones de metilación/desmetilación de las citosinas en el ADN.

Bioquímicamente, la metilación del ADN consiste en la unión covalente de un grupo metilo a los nucleótidos, mediada por metil-transferasas específicas del ADN (DNMTs) (Lister y Ecker 2009; Jones 2012; Barturen 2014) **Figura 4.**

Figura 4: Metilación del ADN. Fuente Chen & Riggs, *J Biol Chem* 2011; 286: 18347-53



En la Metilación existe una adición covalente de grupos metilos generalmente al carbono 5' de residuos de citosinas (C) del ADN situadas previa y contiguamente a bases de guanina (G) por medio de DNMTs, de las cuales, hasta la fecha se han descrito dos tipos: una inicial que se conoce como ADN Metiltransferasa de “novo” y un segundo tipo conocida como ADN Metiltransferasa de “mantenimiento”. Este fenómeno ocurre en regiones del gen ricas en dinucleótidos de citosina y guanina (CpG), que aparecen agrupados en formaciones de unas 1000-1500 pb conocidas como “islas CpG” y que se encuentran localizadas en regiones que son decisivas para la regulación de la transcripción génica, las mismas tienen lugar en las secuencias en la región promotora de los genes. En el 98 % del genoma, los CpG están presentes como promedio 1 vez por cada 80 dinucleótidos y existen regiones de 200 pares de bases (pb) con una frecuencia 5 veces mayor de dinucleótidos CpG, (Wen 2009, Rodríguez 2010).

Aproximadamente del 60 al 90 % de todas las secuencias CpG dispersas en el genoma están metiladas, mientras que las correspondientes a las islas CpG localizadas en la mayoría de los genes de mantenimiento celular, no lo están. En general, *las islas CpG se localizan entre la región central del promotor y en el sitio de inicio de la transcripción, observándose represión en la expresión del gen cuando se encuentran metiladas* (Costelo 2001).

Este fenómeno epigenético tiene un papel decisivo en la regulación de los procesos de transducción de señales actuando a dos niveles:

- a) Directamente sobre la *secuencia promotora del gen* que al ser metilada ocasiona el *silenciamiento de la transcripción proteica de dicho gen y por tanto anula su función*.
 - b) Indirectamente actuando sobre la transcripción génica al *favorecer que la cromatina se encuentre en su forma inactiva (cerrada/compacta) cuando la región promotora del gen se encuentra metilada; de esta manera se impide la unión de factores de transcripción al ADN*.
- Sin embargo, también juega un papel determinante en el desarrollo de procesos tumorales malignos cuando se produce de forma aberrante (Paulsen 2001).

Las enzimas DNMTs de “novo” (DNMT3A y DNMT3B) serían las encargadas de establecer el perfil de metilación del genoma en etapas tempranas del desarrollo mientras que las DNMTs de mantenimiento (DNMT1) se encargan posteriormente de propagar con rigurosa fidelidad este perfil de metilación CpG en cada una de las generaciones posteriores derivadas de la célula progenitora (Jaenisch & Bird, 2003). Un mal funcionamiento de las mismas favorece el silenciamiento génico y por lo tanto la falta de transcripción proteica de genes reguladores y así permitir la expresión de oncogenes que ponen en marcha la cascada de la carcinogénesis (Rhee, 2002).

Así cuando la ADN-Metiltransferasa durante la replicación del ADN metila el carbono 5' de las citosinas de la cadena recién sintetizada, la conversión de citosina en 5-metilcitosina de los islotes CpG de la región promotora, puede causar cambios en la conformación estructural de la cromatina que impidan su descompactación, bloqueando la entrada de los factores de transcripción y con ello provocando el silenciamiento y no expresión de un determinado gen (Ehrich, 2005; HoISM, 2006).

En la célula normal, aproximadamente el 70% de los casos estas secuencias CpG se encuentran de forma fisiológica en estado no metilado es decir funcionando, con expresión proteica derivada de la transcripción de dicho gen. Sin embargo, en las células tumorales estas regiones CpG se encuentran en la mayoría de los genes relacionados con actividades supresoras de tumores y de control del crecimiento celular normal en estado metilado es decir, silenciado, determinando con ello que genes que en condiciones fisiológicas se expresan actuando como genes supresores de tumores, a causa de la metilación de su promotor dejen de estarlo permitiendo la expresión de oncogenes que ponen en marcha la cascada de la carcinogénesis; aunque aún no son bien conocidas las circunstancias por las que esto sucede (Stirzaker 2004; Takai 2002).

Varios trabajos han determinado que la acetilación de las histonas actúa como mecanismo de protección frente a la metilación de la región promotora del gen que ha de expresarse manteniendo su estado no metilado. Esto ocurre debido a que al metilarse la región promotora de un determinado gen, existen enzimas metiladoras de histonas que pueden reconocer citosinas metiladas y metilar las histonas próximas. Del mismo modo, enzimas que metilan el ADN pueden reconocer histonas metiladas y así seguir con la metilación a nivel de ADN. El resultado final derivado de todo ello es que se produzca un cambio en el perfil de metilación del gen que da lugar al silenciamiento del gen metilado y por lo tanto la ausencia de expresión derivada de su transcripción (Mutskov 2002; Dworkin 2009). Por ejemplo, en el caso de la impronta, la metilación de ADN como patrón hereditario, puede determinar cuál de los alelos (el proveniente de la madre o el del padre) se expresa, o si finalmente lo hacen ambos (Bartolomei 1997, Abdolmaleky 2004. La expresión de un solo alelo supondría una menor actividad de la proteína relacionada, mientras que la expresión de ambos, una actividad

aumentada, lo que lleva a manifestaciones fenotípicas diferentes que podrían ser patológicas. Estas variaciones en la impronta podrían explicar las características fenotípicas que desaparecen y reaparecen al cabo de varias generaciones, también aclararía las diferencias registradas en algunas enfermedades como la DM 2, que se manifiesta en diferentes edades en los miembros de una misma familia; e igualmente explicaría enfermedades en gemelos idénticos, como la esquizofrenia, que puede afectar a solo uno de ellos (Nicholls 1998, Chen 2002).

Este hecho, ha revelado una importante relación entre cambios epigenéticos con patrones anormales de metilación y enfermedades como el cáncer. Esta relación entre metilación aberrante y cáncer se ha hecho evidente al encontrarse hace pocos años que la ausencia de metilación conducía a la activación de oncogenes mientras que la metilación anulaba la acción protectora de los genes supresores de tumores (Esteller 2008; Teodoridis 2008). Por lo tanto, el mantenimiento del perfil de metilación de los dinucleótidos CpG en el genoma es crucial para la homeostasis celular adecuada, de forma que cuando este equilibrio se altera, ocasiona patrones de metilación aberrantes que producen silenciamiento de genes que deberían expresarse como son los genes tumor supresores y en cambio permite la expresión de genes que deberían estar silenciados como los oncogenes pudiendo resultar de todo ello la aparición de un proceso tumoral (Piotrowski 2006).

2.3 METILACIÓN EN GENES SUPRESORES DE TUMORES

Uno de los mecanismos implicados en el proceso de carcinogénesis es la pérdida de función de genes supresores de tumores, que en condiciones fisiológicas actúan como un regulador negativo de la proliferación celular o regulador positivo de la diferenciación celular en respuesta al daño producido en el ADN. Así suprime la división celular cuando no existe necesidad de reparar un daño en el ADN. La inactivación de estos genes supresores de tumores por tanto contribuye al proceso de carcinogénesis por conferir ciertas ventajas al crecimiento celular indefinido estimulando la activación de la división celular desorganizada carente de retrocontrol negativo. Esta anulación de la actividad de estos genes en parte, está relacionada con el proceso de metilación de citosinas de las islas CpG situados en la región promotora de dichos genes supresores de tumores, produciendo un silenciamiento de su expresión por anulación en la transcripción del ADN, favoreciendo así una pérdida de control del ciclo celular al hacer que las células sean insensibles al control de señales antiproliferativas.

2.4 PTEN: EL GEN SUPRESOR DE TUMORES. CORRELACIÓN CON PATOLOGÍAS HUMANAS

El gen PTEN (Phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10) es uno de los genes supresores de tumores más frecuentemente mutados en cáncer humano descubierto independientemente por dos grupos de investigadores (1997 Li; Steck), se encuentra localizado en el cromosoma 10q 23.3, pertenece a la familia de genes Protein Tyrosine Phosphatase (PTP) y su función principal es desfosforilar el sustrato PIP3; fue la primera fosfatasa a caracterizarse como un supresor tumoral (Li 1998; Hashemi 2013). El gen supresor tumoral *PTEN* sufre pérdida de heterocigosidad en muchos cánceres humanos, captando un alto interés como objetivo potencial para la prevención y tratamiento del cáncer (Smith, 2012). Se han encontrado mutaciones y deleciones del gen *PTEN* en un gran número de tumores humanos, entre los que se encuentran glioblastoma, cáncer de endometrio, cáncer de próstata y melanoma derivando en que la proteína PTEN se encuentre inactiva o ausente (Chow & Baker 2006; Simpson & Parsons 2001). Asimismo, se encuentran mutaciones del gen *PTEN* en la línea germinal del 60-85% de pacientes con enfermedades hereditarias con alta predisposición al cáncer, las cuales se han agrupado en una entidad denominada “PHTS” (*Síndrome tumoral hamartomatoso*), (Bonneau & Longy 2000; Eng 2003; Lopiccolo 2007), todos son enfermedades raras autosómicas dominantes, que presentan como característica común, el desarrollo de crecimientos hiperplásicos desorganizados y no malignos. Además, los pacientes que los padecen presentan un alto riesgo de desarrollar ciertos tumores, como cáncer de mama, tiroides, endometrio, tumores gastrointestinales y de cerebro. Algunos de estos pacientes presentan, asimismo, autismo y macrocefalia (Butler 2005; Buxbaum; Herman 2007).

Los *genes supresores de tumores* están sujetos a estrictos mecanismos de regulación que incluye marcas epigenéticas, modulación transcripcional y modificaciones post-transcripcionales y post-traduccionales que rigen los niveles de proteína, su actividad, localización, proteínas de unión y su función (Molina 2011); *PTEN* es blanco de frecuentes cambios genómicos y epigenéticos en cánceres humanos (Eng 2003) (*Tabla 1*). Además de las enfermedades humanas asociadas a la pérdida funcional de *PTEN*, los estudios con modelos animales también apoyan su papel como supresor tumoral.

Tabla 1. Tipos de cánceres relacionados con la pérdida funcional de PTEN. Modificado de (Pinzón 2009)

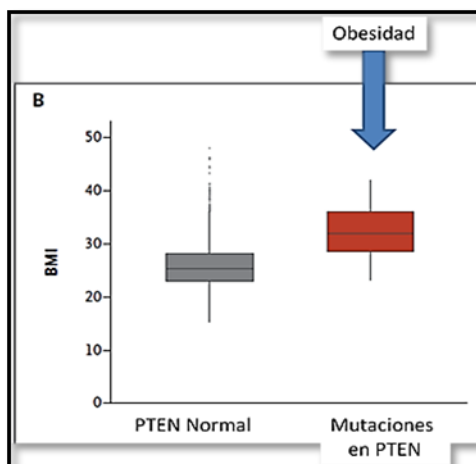
MOLÉCULA	ALTERACIÓN EN EL TUMOR	FRECUENCIA	TIPO DE CÁNCER
PTEN	Mutación somática	>50%	Glioma, melanoma, endometrio, endometrio de ovario, variable esporádica del cáncer de mama (2-30%)
	Subexpresión. Metilación. Pérdida de heterocigosidad	>50%	Mama, melanoma, próstata, inestabilidad de icrosatélites en cáncer colorrectal, endometrial y leucemia.
	Mutación germinal	80% de las enfermedades de Cowden	Mama, carcinoma endometrial y tiroideo.

La delección en homocigosis de *PTEN* en ratones conlleva la muerte en estado embrionario temprano (Stambolic 1998); los ratones heterocigotos son viables, pero susceptibles a distintos tipos de tumores y enfermedades autoinmunes (Di Cristofano 2000; Stambolic 2000). Además, ratones knock-out de *PTEN* condicionales para distintos tejidos demuestran una gran correlación entre la pérdida de la función génica y el desarrollo de tumores (Kishimoto 2003; Suzuki 2008).

2.4.1 PTEN Y METABOLISMO

PTEN a su vez, es en parte responsable de problemas de resistencia a la insulina asociado a DM2 y obesidad. La proteína PTEN controla el metabolismo de nutrientes en el organismo y el crecimiento celular, por lo cual variaciones en la expresión proteica está íntimamente relacionado al metabolismo como también al riesgo de contraer cáncer (Smith 2010, Smith 2012). La relación que se establece entre *PTEN* con la DMT2, radica en la vía de señalización de la PI3K (Stiles 2009). Por lo tanto, ambos están involucrados en las acciones de la insulina, cuya vía de señalización se encuentra disminuida en muchos pacientes con DM2 (Lazar & Saltiel 2006). *PTEN* ejerce su efecto supresor de tumores al menos en parte por la regulación de la fosfatidilinositol-3-quinasa (PI3K) en la cual convergen las vías de señalización intracelular de factores de crecimiento y de la insulina. Si los niveles de la enzima fosfatasa PTEN son adecuados, el organismo incrementa su sensibilidad a la insulina y no se observaría DM2, pero ante la presencia de mutaciones en el gen *PTEN*, la enzima no funciona correctamente generando acumulación excesiva de grasa, resistencia a la insulina y mayor riesgo de contraer cáncer (Pal 2012). Pruebas recientes (Figura 5) establecieron que pacientes con mutaciones en *PTEN* eran más obesos (IMC=32) que pacientes sin mutaciones (IMC=23), (P<0.001) (Pal 2012)

Figura 5. Variación en el IMC según estado mutacional de *PTEN* (Pal 2012)



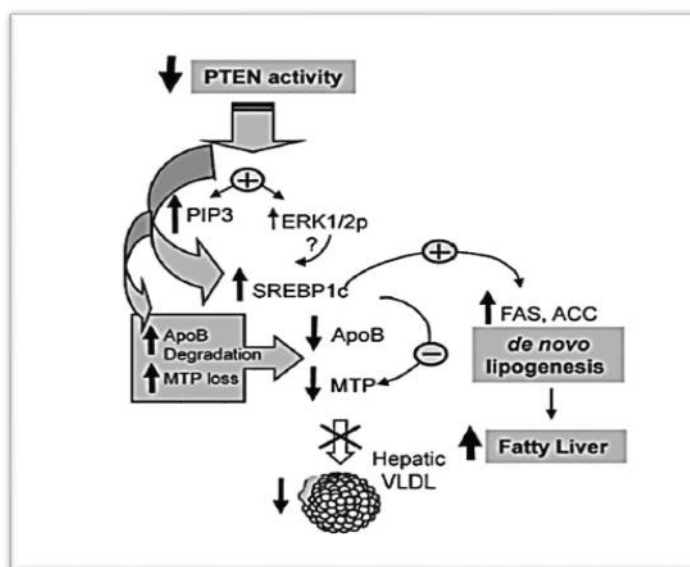
Se ha encontrado un polimorfismo en la región 5' no traducida del gen *PTEN*, asociado a DM2 en una población japonesa, que aumenta la expresión de *PTEN* y reduce la señalización por PI3K en respuesta a insulina (Ishihara 2003).

La biosíntesis de lípidos es esencial para mantener la homeostasis celular. Los lípidos que produce la célula (glicerol, ácidos grasos, fosfolípidos, colesterol y esfingolípidos) se utilizan como reserva o fuente para construir las membranas celulares, como precursores de otros compuestos celulares y como moléculas de señalización. Defectos en la síntesis o procesado de los lípidos contribuyen al desarrollo de muchas enfermedades incluyendo obesidad, RI, DM2, desarrollo de hígado graso, y cáncer. AKT regula el metabolismo de lípidos a través de la fosforilación e inhibición de GSK3, lo que produce la estabilización de SREBP y favorece la síntesis de lípidos (Sundqvist 2005). Recientemente, además del papel clave que juegan en el crecimiento celular y la síntesis de proteínas, se ha otorgado un papel muy importante a mTORC1 en el control de la síntesis de lípidos a través SREBP-1, PPAR- γ y Lipin1 (Laplante and Sabatini, 2009).

En estudios sobre expresión de *PTEN* y metabolismo de lípidos, realizados en animales han logrado definir que la apolipoproteína hepática *Apo B100*, se encuentra regulada por la vía *PI3K*; sin embargo, el papel del *PTEN*, es aún una incógnita. En ratones knockout para *PTEN* hepático, los niveles de *ApoB100* y la proteína de transferencia microsómica de triglicéridos (MTP) están down-reguladas (73% y 36%, respectivamente) y se acompaña de un aumento y acumulación de triglicéridos (TG) y la expresión de genes lipogénicos, además de una reducción de la secreción de *Apo B*. La sobreexpresión del mutante negativo *PTENC/S124* (adenovirus que expresa mutante *PTENC/S* [Ad*PTENC/S*]) condujo a reducciones significativas tanto secreción de *ApoB100* y de MTP (76%y 34%, respectivamente) y el aumento del ARN mensajero (ARNm) para la proteína reguladora de esterol 1c (SREBP-1c), ácido graso sintasa (FAS) y acetil-CoA carboxilasa (ACC). La reducción de la secreción de

ApoB100 inducida por AdPTENC/S fue asociado con una mayor degradación de ApoB100 recién sintetizada, lo que sugiere una mayor degradación proteasomal. Estas investigaciones sugieren un vínculo entre la expresión de PTEN y la producción hepática de lipoproteínas que contienen Apo B100. Se postula que las alteraciones en *PTEN* no sólo puede influir en la señalización hepática de insulina y la lipogénesis hepática, sino también puede alterar la producción de Apo B-lipoproteína hepática y la estabilidad MTP. Sobre la pérdida de la actividad PTEN, se observa mayor disponibilidad de sustrato lipídico ante la reducción de la capacidad de producción de lipoproteínas hepáticas; lo cual puede conducir rápidamente a la hepatoesteatosis e hígado graso (Wei Qiu 2008)

Figura N 6: Mecanismos probables que vinculan la señalización PTEN y Homeostasis de lípidos hepáticos.



Tomado de "Phosphatase and tensin homolog (PTEN) regulates hepatic lipogenesis, microsomal triglyceride transfer protein, and the secretion of apolipoprotein B-containing lipoproteins" (Wei Qiu 2008)

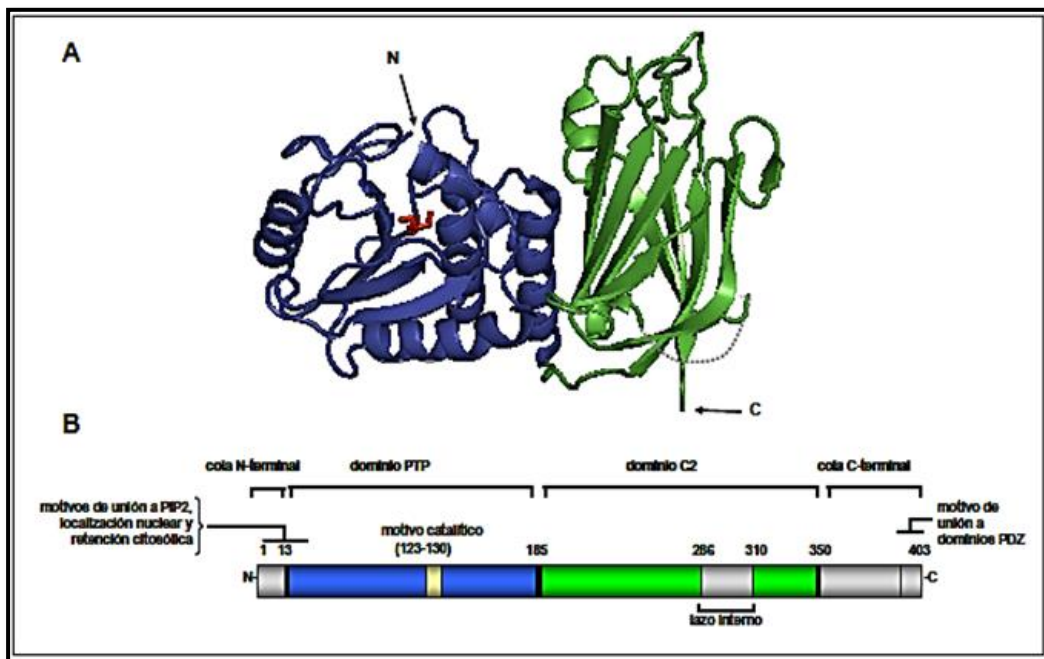
Además, existieron hallazgos de mutaciones de cambio de aminoácido de *PTEN* a lo largo de toda su estructura primaria, lo que sugiere que la mayoría de regiones son importantes para la función supresora tumoral de *PTEN* (Bonneau & Longy 2000; Eng 2003; Waite & Eng 2002). El centro activo de la proteína y en concreto, la Cys catalítica, constituyen un *hot spot* de mutaciones. La mutación en uno de los alelos de *PTEN* y la pérdida del otro es muy común como forma de inactivación de dicho gen en cánceres humanos, aunque también es frecuente en tumores la presencia de un alelo salvaje de *PTEN*, ya que el mismo parece ser haploinsuficiente (Kwabi-Addo 2001; Kwon 2008; Salmena 2008). Se han encontrado, además, otros mecanismos que pueden llevar a una pérdida de función de *PTEN*, tales como metilación o mutaciones en el promotor. La pérdida de la función en este gen no sólo está implicada en el desarrollo de cánceres y enfermedades relacionadas, sino que también se ha

asociado una disfunción de *PTEN* con otras patologías humanas (Pulido & van Huijsduijnen 2008).

2.4.2 ESTRUCTURA DE PTEN

La obtención de la estructura cristalina de PTEN (Lee 1999) permitió el estudio de sus dominios estructurales. La proteína humana tiene 403 aminoácidos y una masa molecular de 47 kDa. Consta de los siguientes dominios funcionales, que se muestran esquemáticamente en la siguiente imagen (*Figura 6*).

Figura 6: Estructura de la proteína PTEN.



- (A) Diagrama de la estructura de PTEN realizado con PyMOL. El dominio PTP se muestra en azul; y el dominio C2, en verde. Se señalan los extremos N- y C- terminales de la forma cristalizada de PTEN. (Los residuos 1-13 y 352-403 no están presentes en el cristal). La línea discontinua gris muestra el lazo del dominio C2 que tampoco fue cristalizado (residuos 286-309). Se muestra en rojo la Cys catalítica (Cys124).
- (B) Representación esquemática de los dominios y motivos funcionales de PTEN. Las zonas grises representan las regiones no estructuradas de la molécula, ausentes en el cristal (Modificado de Lee 1999).

- **Extremo amino-terminal** (residuos 1-13): La región N-terminal de PTEN está formada por aminoácidos básicos e hidrofóbicos que configuran un motivo de unión a PIP2 (residuos 6-15), importante para la unión a membranas (Lijima & Devreotes 2002; Vazquez & Devreotes 2006). Además, el PIP2 actúa como regulador alostérico que incrementa la actividad enzimática de PTEN (Campbell 2003). La activación de PTEN por PIP2 se puede explicar porque la unión de PIP2 al extremo N-terminal de PTEN provoca un cambio conformacional (incremento en el contenido de hélices α) (Redfern 2008). El extremo N-terminal también regula la localización nuclear de la proteína, ya que en él se ha identificado una NLS (señal de localización nuclear) funcional (Gil 2006).

- **Dominio PTP** (residuos 14-185): El dominio fosfatasa de PTEN pertenece a la superfamilia de las PTPs (*Protein Tyrosine Phosphatases*), aunque el centro activo de PTEN es más ancho y más profundo que el de las PTPs clásicas y es rico en residuos básicos. Todo ello le permite acomodar fosfoinosítidos, además de desfosforilar residuos de Tyr, Ser y Thr. En la región N-terminal de este dominio (residuos 19-25), PTEN posee una NES (señal de exportación nuclear) o señal de retención citoplásmica (Denning 2007).
- **Dominio C2** (residuos 186-351): El dominio C2 favorece la unión de la proteína a membranas por uniones electrostáticas, de forma independiente de Ca^{2+} (Lee 1999). En dicha unión participa también el dominio PTP (Das 2003). Además, el dominio C2 posiciona correctamente el sitio catalítico en relación a los sustratos lipídicos (McConnachie 2003). El dominio C2 y el dominio PTP se asocian entre sí a través de una superficie de contacto muy conservada entre especies. Los aminoácidos implicados en la interacción entre los dos dominios se encuentran mutados, frecuentemente, en cánceres humanos (Lee 1999), lo que indica que la integridad de esta superficie de contacto es importante para el mantenimiento de la actividad fosfatasa.
- **Extremo carboxilo-terminal** (residuos 351-403): Los últimos 50 residuos de la proteína forman una cola desestructurada, importante para la estabilidad de la proteína, en la que se encuentran los principales sitios de fosforilación y de corte por caspasa-3 de PTEN. Además, los tres últimos aminoácidos de la proteína (Thr-Lys-Val) configuran un motivo de unión a dominios PDZ de tipo I (Sheng and Sala, 2001). A través de este motivo, PTEN interacciona con dominios PDZ de diversas proteínas. La interacción de PTEN con proteínas PDZ puede contribuir a la regulación de su función, aunque se ha observado que el motivo de unión a dominios PDZ no es necesario para algunas funciones biológicas de PTEN, como la inhibición del crecimiento y la supresión tumoral (Leslie 2000; Tolkacheva & Chan 2000).

2.4.3 RUTA DE SEÑALIZACIÓN PI3K/AKT Y ACTIVIDAD FOSFATASA DE PTEN

La vía de señalización de la fosfatidilinositol-3-quinasa (PI3K) es crucial en numerosos aspectos celulares involucrados en el crecimiento y la supervivencia celular (*Figura 7*). La familia de PI3K constituye un gran grupo de proteínas kinasas de serina/treonina.

La vía de la PI3K es estimulada fisiológicamente como consecuencia de la activación de receptores de membrana tirosina quinasa, los cuales autofosforilan y fosforilan el sustrato del receptor de insulina (IRS); éste último, a la vez, fosforilará la subunidad p85 de la PI3K. La fosforilación de la subunidad p85 conduce a un cambio conformacional de dicha proteína que lleva a la unión de la subunidad catalítica (p110). La PI3K activa, fosforila el fosfatidilinositol 3,4 difosfato (PIP₂) convirtiéndolo en el segundo mensajero PIP₃, el cual, conduce a la

activación de la proteína Akt (Pinzón 2009). AKT es una familia de proteínas también llamadas proteína quinasa B, PKB (“*protein kinases B*”). Estas son enzimas de una familia de proteínas ser/thr kinasas. (Cantley 2002). La Akt tiene múltiples blancos, responsables de los efectos de la activación de la vía (Lewis 2002). Uno de estos efectos de Akt, que favorecen la supervivencia celular, es la inactivación del gen supresor de tumor p53; lo cual se da por la habilidad de Akt de fosforilar y activar directamente a MDM2, una proteína que regula negativamente a p53. MDM2 se encuentra usualmente en el citoplasma y tiene dominios NSL (señalización de localización nuclear) y de unión a p53. (Sherr 2000). Cuando MDM2 es activado por Akt, se transloca al núcleo para unirse a p53, impidiendo su actividad como factor de transcripción de genes proapoptóticos; posteriormente, se dirige nuevamente al citoplasma donde media los procesos de ubiquitinación y degradación proteosómica de p53, disminuyendo sus niveles (Pinzón 2009).

Cuando la vía PI3K/Akt se encuentra en un estado de activación permanente, el anterior mecanismo permite que una célula, aún en malas condiciones, resista a la apoptosis, sobreviva y prolifere, contribuyendo, de esta manera, a la inestabilidad cromosómica, característica de la vía supresora de la carcinogénesis (Brunet 1999).

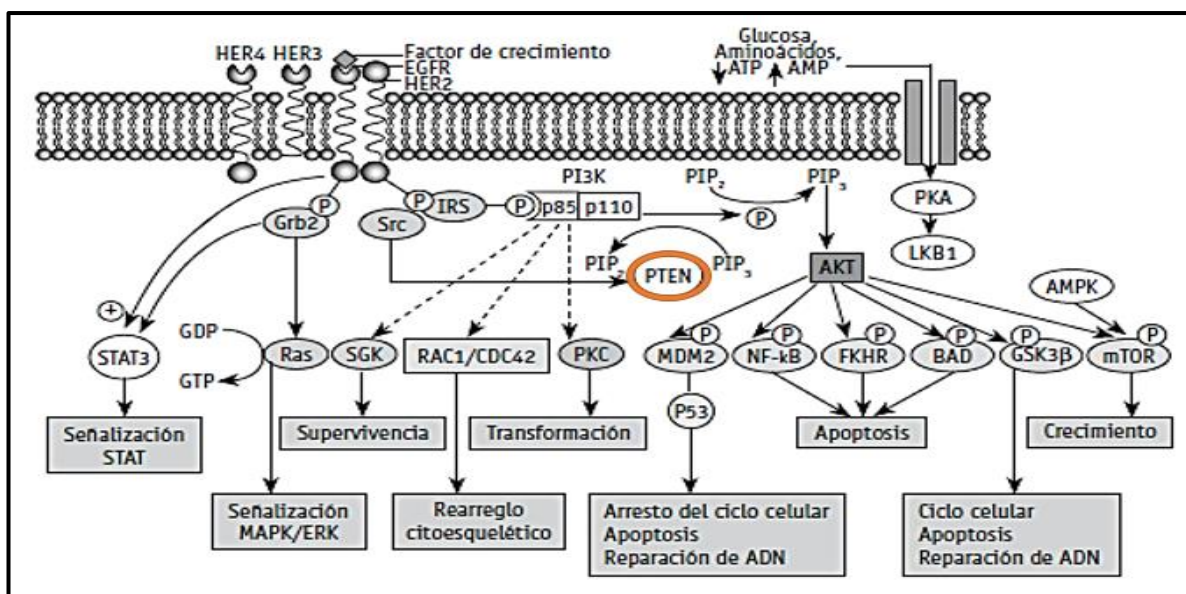


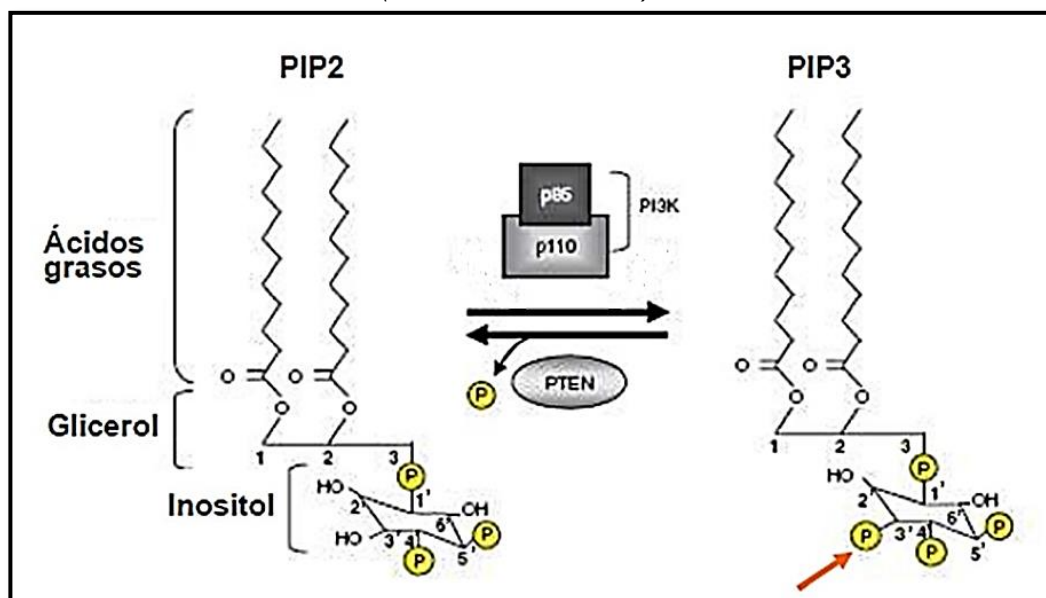
Figura 7. Esquema de la vía de señalización fosfatidil-inositol-3-quinasa (Pinzón 2009).

PTEN es una proteína que regula la señal de supervivencia celular, dependiente e independiente de la vía PI3K/Akt. Esta proteína supresora de tumores se expresa cuando existen señalizaciones de daño celular, bloqueando la supervivencia de la célula mediante p53. La actividad fosfatasa de PTEN le permite desfosforilar la PIP₃, inhibiendo el proceso de activación de Akt y el proceso de inactivación de p53 vía Akt-MDM2. PTEN también se une a p53, favoreciendo su estabilidad e impidiendo la actividad inhibitoria de MDM2 sobre la misma. Lo anterior representa que p53 se mantiene activa para inhibir la proliferación celular y

promover los procesos de reparación o apoptosis. De esta manera, se protege tanto la integridad genómica como cromosómica de una célula y un tejido en general (Chen 2005; Freeman 2003).

Estudios iniciales han puesto de manifiesto que PTEN es una fosfatasa con baja actividad in vitro hacia proteínas (Li & Sun 1998; Myers 1997), mostrándose activa frente a sustratos ácidos. Estas observaciones llevaron al descubrimiento del PIP3 como el principal sustrato fisiológico de PTEN (Maehama 1998). El fosfatidilinositol (PtdIns) es un tipo de fosfolípido que consiste en un ácido fosfatídico que tiene unido un anillo inositol. Los grupos OH libres en las posiciones 3, 4 y 5 del anillo inositol pueden ser fosforilados. Los derivados fosforilados del PtdIns se conocen como fosfoinosítidos (PI) y ejercen funciones esenciales como segundos mensajeros intracelulares. La caracterización de la actividad fosfatasa de lípidos de PTEN humano recombinante, demostró que ésta es específica para la posición 3' del anillo inositol del PIP3, la cual es fosforilada por las PI3K de clase I (*Figura 8*) (Courtney 2010). La actividad fosfatasa de lípidos de PTEN es esencial para su función supresora tumoral y mediante ella PTEN regula negativamente la concentración intracelular de PIP3, inhibiendo la vía de señalización de los oncogenes PI3K y Akt/PKB (Di Cristofano & Pandolfi 2000; Leslie & Downes 2002; Simpson & Parsons 2001).

Figura 8: Representación esquemática del fosfatidilinositol. La flecha naranja muestra la posición 3' del anillo inositol, fosforilada por las PI3Ks de clase I y desfosforilada por PTEN. Los átomos de C del anillo inositol se numeran con números prima, para distinguirlos de los átomos de C del glicerol. PIP3, fosfatidilinositol (3, 4, 5) trifosfato; PIP2, fosfatidilinositol (4,5) bifosfato. (*Modificada de Bunz 2008*).



2.4.5 FUNCIONES FISIOLÓGICAS DE PTEN

Más que una fosfatasa de lípidos PTEN desempeña importantes funciones en numerosos procesos fisiológicos de gran relevancia: ciclo celular, apoptosis, adhesión celular, migración, diferenciación, etc. (Maehama, 2001).

a) Funciones dependientes de la actividad fosfatasa

El principal sustrato fisiológico de PTEN es PIP3, lo cual sitúa a esta proteína en una importante vía de señalización intracelular. La concentración intracelular de PIP3 es muy baja en células quiescentes y aumenta notablemente tras la estimulación con factores de crecimiento, debido a la activación de las PI3K de clase I. La acumulación de PIP3 en la membrana permite el reclutamiento de proteínas con dominios PH (Pleckstrin-homology), que se unen a aquél. Entre ellas, uno de los efectores más importantes de la señalización por PI3K es la Akt, la cual, en líneas generales, facilita la proliferación y/o la supervivencia celular. Debido a la desfosforilación de PIP3, PTEN contrarresta los efectos producidos por Akt. En este sentido, la función de PTEN es mantener baja la concentración de PIP3, lo cual favorece la apoptosis, inhibe la supervivencia celular, detiene la progresión del ciclo celular e inhibe el crecimiento independiente de adherencia, entre otros efectos (Di Cristofano & Pandolfi 2000; Maehama 2001; Yamada & Araki 2001).

Este mecanismo, también posee un rol en la señal proveniente de la insulina, ya que el SRI participa activamente en la vía de la PI3K, siendo PTEN quien se encarga de modular las acciones metabólicas a nivel celular mediante la regulación río abajo en dicha vía de señalización. A su vez, un estudio reciente se ha demostrado que además de disminuir los niveles de PIP3, PTEN también puede desfosforilar a IRS, alterando de esta forma la señalización de la insulina a través de la vía PI3K/Akt mediante estos dos mecanismos. (Gutiérrez-Rodelo 2017).

b) Funciones independientes de la actividad fosfatasa

PTEN realiza funciones independientes de su actividad catalítica, importantes también para su función supresora tumoral (Blanco-Aparicio 2007) y que dependen, principalmente, de su interacción física con otras moléculas. Por ejemplo, mediante interacciones proteína-proteína, PTEN coopera con la actividad del supresor tumoral p53, inhibe la transformación celular mediada por la oncoproteína MSP58 y favorece el mantenimiento de la integridad cromosómica por CENP-C, un componente del cinetocoro. PTEN se une al promotor del gen Rad51, favoreciendo su transcripción y por tanto, la reparación de roturas de las dos cadenas de DNA. Estas funciones son ejercidas en el núcleo celular. En el citoplasma, PTEN inhibe la señalización a través del receptor de andrógenos mediante mecanismos dependientes de la interacción física entre ambas proteínas y dependientes e independientes de la vía PI3K/Akt (Lin 2004). PTEN también inhibe la invasión en células de glioma independientemente de su actividad catalítica (Maier 1999). Además, recientemente se ha descrito que PTEN, de manera tanto dependiente como independiente de su actividad fosfatasa de lípidos, puede poseer propiedades oncogénicas en líneas de glioblastoma con mutaciones de ganancia de función de p53 (Li 2008).

Aberraciones y alteraciones genéticas de la vía PI3K

Se ha demostrado que las anomalías en la vía de PI3K conducen a una respuesta proliferativa y antiapoptótica que participan en la transformación neoplásica y se relaciona con el desarrollo de múltiples tipos de cáncer (Dey 2008; Pal 2012). En sí, PI3K es un blanco frecuente de activación mutacional (Pinzón 2009). Recientemente, se han detectado frecuentes mutaciones no descritas en la vía de PI3K o en otras vías de kinasas, por ejemplo, en los tres genes que codifican los componentes de la vía PI3K/Akt (PDK1, AKT2 y kinasa activada por p21 (PAK4)) en cáncer colon-rectal. En modelos específicos, se demostró que las isoformas de Akt tienen actividad de transformación. Las isoformas de Akt se han visto implicadas en funciones específicas, relacionadas con cáncer (Akt2 en motilidad/invasión y Akt3 en la independencia hormonal) (Arboleda 2003). En ratones knockout, la eliminación de las diferentes isoformas conlleva a diversos defectos en el desarrollo y alteraciones en la sensibilidad a la insulina (Testa 2001). Akt2 se encuentra amplificado en tumores pancreáticos, de mama y de ovario, y la actividad de Akt3 se ha visto aumentada, a través de un mecanismo desconocido, en cánceres de próstata y de mama, no sensibles a hormonas. En muchos casos, los efectos oncogénicos de estas anomalías están mediados, al menos parcialmente, por la señalización de PI3K/Akt (Pinzón 2009).

3. LÍPIDOS Y LIPOPROTEÍNAS PLASMÁTICAS

Los principales lípidos del organismo son los triglicéridos (TG), el colesterol libre (CL), el colesterol esterificado (CE) y los fosfolípidos (FL). Los triglicéridos almacenados en el tejido adiposo constituyen la reserva energética más importante. El colesterol forma parte de las membranas celulares, es el precursor de las hormonas esteroideas y de los ácidos biliares. Debido a su naturaleza apolar los lípidos necesitan ser trasladados en la circulación sanguínea a través de Lipoproteínas (LP) quienes constituyen un medio de transporte y reservorio circulante para los lípidos. Una LP puede verse como una esfera que tiene un centro no polar formado de TG y colesterol esterificado (CE) y que está rodeada por una capa superficial única de moléculas de fosfolípido y colesterol no esterificado. Las apolipoproteínas, proteínas antipáticas, pueden hallarse en la superficie de la partícula o tener una parte en la superficie y otra parte sumergida dentro de la partícula. Las proteínas que se hallan exclusivamente en la superficie pueden transferirse entre las lipoproteínas durante el metabolismo de estas partículas (Carabajal 2014). Se han identificado cuatro grupos principales de lipoproteínas basados en su densidad: quilomicrones (QM), lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), lipoproteínas de baja densidad (LDL) y lipoproteínas de alta densidad (HDL). Las apoproteínas son las proteínas específicas que componen las LP y tienen diversos comportamientos:

-*Estructurales: para unir los lípidos en las lipoproteínas ej. apo-AI, apoAII, apo-B48 y apo-B100.*

-*Ligandos para unir las lipoproteínas a sus receptores: apo-AI, apo-B100 y apo-E.*

-*Inhibidores para las interacciones con el receptor de lipoproteínas: apo-CI y apo-CIII.*

-*Moduladores de la actividad enzimática en el metabolismo de las lipoproteínas: familias apo A-I, A-II, y apo C-I, C-II.*

-*Cofactores para el transporte de lípidos entre las lipoproteínas (apo-A IV).*

3. 1 METABOLISMO DE LAS LIPOPROTEINAS

Los lípidos ingeridos en la dieta son absorbidos a nivel intestinal y donde son ensamblados junto con diferentes apolipoproteínas en el retículo endoplásmico y en Golgi originando el QM. En este proceso participan múltiples proteínas y entre ellas se cuenta la Proteína Microsomal Transferidora de Triglicéridos (MTP), cuya función es transferir lípidos a la Apo B-48 en formación para originar un pre-QM que posteriormente adquirirá más lípidos antes de ser secretado (Hussain 2008). El QM es sintetizado durante los períodos postprandiales y es secretado hacia la linfa para alcanzar finalmente la circulación sanguínea., a cuyo nivel los QM nacientes adquieren Apo-E y Apo C-II a partir de HDL maduro. Apo-E sirve como ligando para la eliminación posterior del remanente del QM y Apo C-II es un activador de la enzima lipoprotein lipasa (LPL) (Vaziri 2009).

A nivel del endotelio de tejidos extrahepáticos, y especialmente de músculo y de tejido adiposo, los QM sufren una extensa lipólisis mediada por la (LPL) dando como resultado la pérdida de la mayoría de sus TG (cerca del 70 a 90%). Los ácidos grasos liberados son captados por las células musculares y los adipocitos.

Las VLDL son ensambladas en el hígado a nivel del retículo endoplásmico (RE) y el aparato de Golgi ensamblando los lípidos de origen endógenos, en su mayoría TG, con diferentes apolipoproteínas, especialmente la Apo B-100. La producción y secreción de VLDL depende de la disponibilidad de TG y de Apo B-100. Los TG hepáticos derivan de: ácidos grasos libres provenientes de la lipólisis a nivel de tejido adiposo, captación hepática de remanentes de VLDL y de QM y síntesis hepática de novo (lipogénesis). Ante cualquier condición que acreciente el flujo de ácidos grasos libres aumentará la producción de VLDL, tal y como ocurre en estados de obesidad visceral, de resistencia a la insulina y en la diabetes mellitus (Sundaram 2010). Apo B-100 es producida en el RE y en un contexto de poca disponibilidad de lípidos es degradada por diversas vías. La maduración de la partícula de VRDL requiere de numerosos factores proteicos que median la unión de lípidos con Apo B-100. Destaca especialmente MTP para transferir los lípidos a la partícula naciente de VLDL. En circulación esta partícula adquiere Apo-E y Apo C-II a partir de HDL maduro.

En los tejidos extrahepáticos, a nivel endotelial VLDL sufre hidrólisis de sus TG por la LPL y origina el remanente de VLDL (conocido como IDL). La IDL tiene dos destinos metabólicos:

ser tomada y catabolizada rápidamente por el hígado, en un proceso similar al del remanente de QM, o permanecer en circulación y dar origen a la LDL por acción de dos enzimas: HL, que la despoja de TG, y la Proteína Transferidora de ésteres de colesterol (CETP) que le permite captar CE a partir de HDL (4, 17). La LDL tiene dos destinos posibles: ser captada por el hígado (70%) o por tejidos extrahepáticos (30%). En ambos casos la LDL es endocitada por el LDLR que reconoce a la proteína Apo B-100.

4. METAS DE CONTROL METABOLICO EN EL PACIENTE DIABETICO

Para la evaluación del Control metabólico del paciente diabético la Asociación Americana de Diabetes (ADA) establece cada año metas de tratamiento, que son seguidas por otros organismos como la Asociación Latinoamericana de Diabetes (ALAD) y la Sociedad Argentina de Diabetes (SAD) quienes a comienzos del 2019 establecieron los rangos de variabilidad glucémica ideales de forma individualizada para cada paciente según las comorbilidades asociadas, así como también enumeran reglas generales como ser: las mediciones de glucosa pre prandial deberán mantenerse en un rango entre 80 a 130 mgr/ dl y los picos post prandiales ser menores a 180 mgr/dl, manteniendo idealmente un rango entre 140 y 160 mgr/dl. Se utiliza un criterio más o menos estricto dependiendo de las comorbilidades asociadas, por ejemplo, las metas más estrictas podrán buscarse en aquellos pacientes con pocas o nulas comorbilidades y metas menos estrictas en pacientes frágiles o con múltiples comorbilidades.

Tabla N 2: Metas de control para pacientes diabéticos según ALAD (2019)

Nivel	Adecuado
Glucemia en ayunas	80-130 mgr/dl
Glucemia 2 horas post prandial	140-160 mgr/dl
HBA1C	< 7%

Además, se establecen sugerencias en cuanto a la periodicidad de la evaluación de la HbA1C: trimestral en pacientes cuya terapia ha cambiado o que no están cumpliendo los objetivos de glucemia en ayunas o al menos dos veces al año en pacientes que si los cumplen. En cuanto a aquellos pacientes que presentan DM y Ca y se encuentran en cuidados paliativos la incidencia de hiperglucemia es superior a la de la población general. Y las causas que pueden producir hiperglucemia, además de la DM previa, serían el uso de corticoides y el déficit de insulina o la resistencia a su acción en pacientes con Ca de Páncreas. En fases avanzadas de la enfermedad el control estricto de la glucemia para prevenir complicaciones a largo plazo será innecesario. Por el contrario, en función de las situaciones en que se encuentre el paciente (caquexia, infecciones, tratamientos como los corticoides, etc.), las necesidades de

tratamiento de la DM variarán y habrá que actuar con rapidez para que no afecten a la calidad de vida. Por tanto, se debería intentar mantener al paciente asintomático y con bajo riesgo de descompensación aguda. Sin embargo, no se han encontrado metas específicas para los pacientes oncológicos en la bibliografía consultada y el especialista consultado.

En cuanto al el control metabólico lipídico, se establece que se deberá realizar al menos una vez al año el estudio de: colesterol total, colesterol LDL, colesterol HDL y Triglicéridos. Deberá tenerse en cuenta también del perfil renal: urea, Creatinina y evaluación de relación albumina/ creatinina. Asimismo, se consideró el control cardiometabólico adecuado teniendo en cuenta los objetivos recomendados por el ADA presión arterial < 140/90 mmHg, IMC entre 18.5 y 24.9 según Organización Mundial de Salud(OMS), además de triglicéridos < 150 mg/dl, colesterol total < 200 mg/dl, perímetro abdominal < 88 cm en mujeres y < 102 cm en varones según los criterios señalados por el National Cholesterol Education Program Panel Treatment III (ATPIII)

Tabla N 3: Criterios señalados por el National Cholesterol Education Program Panel Treatment III (ATPIII).

Valores esperados en Adultos (mgr/dl)		
Colesterol Total	< 200	Deseable
	200 a 239	Intermedio Alto
	>240	Alto
Colesterol LDL	<100	Optimo
	100 a 129	Intermedio Bajo
	130 a 159	Intermedio Alto
	160 a 189	Alto
	190	Muy Alto
Colesterol HDL	Varones < 40	Bajo
	Mujeres: < 50	Bajo
	>60	Alto
Triglicéridos	< 150	Deseable
	150 a 199	Levemente elevado
	200 a 499	Elevados
	>500	Muy elevado

HIPÓTESIS

La subexpresión del gen *PTEN* está asociada a la presencia de neoplasias en pacientes diabéticos.

OBJETIVOS

-GENERAL

- Determinar la asociación entre la susceptibilidad al desarrollo de neoplasias y la expresión alterada del gen *PTEN* en pacientes diabéticos en el contexto del tratamiento y control metabólico.

-ESPECÍFICOS

- Describir la distribución de la población en estudio según la edad y sexo.
- Establecer el nivel de expresión de *PTEN* en pacientes con DM2 con y sin neoplasia.
- Determinar el estado de metilación del promotor del gen supresor *PTEN* en pacientes diabéticos con y sin cáncer.
- Determinar el grado de control metabólico glucémico a través del dosaje de HbA1c en pacientes DM2 con y sin neoplasias.
- Determinar el Nivel de expresión de *PTEN* y control lipídico mediante la valoración de Colesterol Total y Triglicéridos en pacientes DM2 con y sin Cáncer

MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño experimental: Descriptivo transversal.

Selección de las poblaciones a analizar: fueron incluidos 70 pacientes con diabetes de ambos sexos, de estos 30 pacientes tenían cáncer; y 40 Diabetes únicamente, asistidos en un laboratorio Privado de la Ciudad de Posadas, provincia de Misiones. Para llevar a cabo la presente labor se contó el aval Comité de Ética del Hospital de Pediatría de Posadas Dr. Fernando Barreyro con firma de consentimiento informado y preservando el anonimato de los pacientes, en todo momento se resguardaron los datos personales de los pacientes implicados conforme a la Ley Nacional N° 26529 de Derechos del paciente en su relación con los profesionales e Instituciones de la Salud. Como grupo control fueron incluidos 50 individuos sanos de ambos sexos y edades que oscilaron entre los 20 – 80 años, sin patología conocida de cáncer, diabetes ni enfermedades autoinmunes.

Variables a analizar y descripción de los criterios en la población:

- Edad: en años,
- Sexo: femenino/ masculino;
- Concentración de Triglicéridos y Colesterol, ambos expresados en mgr/dl
- % de HBA1c.
- Tipo de neoplasia: transcripción según diagnóstico médico.

Tipos de muestra: A ambas poblaciones Casos y Controles, se le realizó una venopunción para la obtención de 5 ml de sangre entera, anti coagulada con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) y suero.

Obtención de muestras y procesamiento: Las muestras de sangre fueron colectadas por el personal del laboratorio, quienes procedieron a separar el suero con exudado mínimo de 30 minutos, posteriormente se sometieron a centrifugación a 3000 r.p.m. durante 10 minutos. Para el procesamiento de las mismas se utilizó el sistema integrado Autoanalizador ci8200 Architect (Abbott Diagnostic®). El sistema ci8200 consta de un analizador de química clínica c 8000 y un analizador de inmunoensayo i. Cada muestra fue evaluada para determinar la presencia de interferentes endógenos: hemólisis, ictericia, lipemia (HIL), utilizando.

Principios biológicos del procedimiento para dosaje de:

-Colesterol Total (mgr/dl): Metodología: enzimática.

El reactivo utilizado se basa en la fórmula de Allain y col. y en la modificación de Roeschlau con perfeccionamientos posteriores para estabilizar el reactivo en la solución. Los ésteres de colesterol se hidrolizan enzimáticamente por el colesterol esterasa en colesterol y en ácidos

grasos libres. El colesterol libre, incluyendo el original que ya estaba presente, se oxida por la colesterol oxidasa a colest-4-en-3-ona y peróxido de hidrógeno. El peróxido de hidrógeno se combina con el ácido hidroxibenzoico (HBA) y la 4-aminoantipirina para formar un cromóforo (colorante de quinoneimina), el cual se mide a 500 nm.

-Triglicéridos (mgr/dl): Metodología: glicerol fosfato oxidasa

La lipasa hidroliza enzimáticamente los triglicéridos contenidos en la muestra del paciente para liberar ácidos grasos y glicerol. El trifosfato de adenosina (ATP) fosforila el glicerol con glicerol cinasa (GK) para producir glicerol-3-fosfato y difosfato de adenosina (ADP). La glicerol fosfato oxidasa (GPO) oxida el glicerol-3-fosfato a dihidroxiacetona fosfato (DAP) produciendo peróxido de hidrógeno (H₂O₂). En una reacción coloreada catalizada por peroxidasa, el H₂O₂ reacciona con 4-aminoantipirina (4-AAP) y 4-clorofenol (4-CP) para formar un compuesto coloreado rojo. La absorbancia de este compuesto coloreado es proporcional a la concentración de triglicéridos presente en la muestra. Este método de análisis se basa en la secuencia de reacción descrita por Fossati y col. (1982) y McGowan y col (1983) En este reactivo se utiliza 4-clorofenol en lugar de 2-hidroxi-3,5-diclorobencenosulfonato, que es el utilizado en los estudios de Fossati y McGowan.

-LDL colesterol (mgr/dl):

El ensayo es un método homogéneo de medición directa de las concentraciones de LDL en suero, con el que no es necesario someter las muestras a pasos de pretratamiento fuera del sistema o de centrifugación. El método es un sistema de dos reactivos y está basado en las propiedades de un detergente único. Este detergente, solubiliza exclusivamente las partículas no-LDL. Las enzimas colesterol esterasa y colesterol oxidasa consumen el colesterol liberado en una reacción incolora. El segundo detergente, solubiliza las partículas de LDL restantes y un acoplador cromogénico permite la formación de color. La reacción enzimática con la LDL en presencia del acoplador conduce a la formación de color que es proporcional a la cantidad de colesterol LDL presente en la muestra. Metodología: por medición; detergente selectivo líquido.

-Colesterol HDL (mgr/dl): Metodología: detergente acelerador específico

El ensayo Ultra HDL es un método homogéneo para la medición directa de las concentraciones del colesterol de las HDL en suero o plasma, con el que no es necesario someter las muestras a pasos de pretratamiento fuera del sistema o de centrifugación. El método utiliza un sistema de dos reactivos y está basado en las propiedades de un detergente único. Ese método se basa en la aceleración de la reacción de colesterol oxidasa (CO) con colesterol sin esterificar no perteneciente a las HDL y colesterol de las HDL disuelto de forma

selectiva con un detergente específico. En el primer reactivo, el colesterol sin esterificar no perteneciente a las HDL se somete a una reacción enzimática y el peróxido generado se consume por una reacción de la peroxidasa con N, N-bis (4-sulfobutil)-m-toluidina-disodio (DSBmT) dando un producto incoloro. El segundo reactivo consiste en un detergente (capaz de solubilizar el colesterol de las HDL), colesterol esterasa (CE) y un copulante cromógeno que desarrolla color para la determinación cuantitativa del colesterol de las HDL.

- Hemoglobina A1c (HbA1c): Metodología: enzimática

La determinación consiste en dos mediciones separadas: la HbA1c y la hemoglobina total (THb). Las dos concentraciones se utilizan para determinar el porcentaje de HbA1c (unidades del NGSP) o la fracción de hemoglobina en mmol/mol (unidades de la IFCC). Las concentraciones individuales de HbA1c y de THb obtenidas por el ensayo Hemoglobin A1c se utilizan para calcular el porcentaje de hemoglobina A1c o la fracción de HbA1c. La muestra de sangre anticoagulada se lisa automáticamente en el sistema para la aplicación en sangre completa o puede lisarse manualmente usando el diluyente Hemoglobin A1c para la aplicación en hemolizado. Se trata de método enzimático que específicamente mide los dipéptidos fructosil N-terminal de la cadena β del HbA1c. Durante el proceso de pretratamiento, los eritrocitos se lisan y la hemoglobina se transforma a metahemoglobina al reaccionar con el nitrito de sodio. Al añadir el reactivo 1 a la muestra, el dipéptido glucosilado N-terminal (fructosil valina) de la cadena β de hemoglobina se rompe por acción de la proteasa. La hemoglobina se transforma en azida de metahemoglobina estable por acción de la azida sódica, y la concentración de la hemoglobina se determina por medición de la absorbancia. La adición del reactivo 2 comienza una reacción de manera que la fructosil péptido oxidasa (FPOX) puede reaccionar con la fructosil valina. La concentración de HbA1c se mide determinando el peróxido de hidrógeno resultante. Hemoglobina total (THb): La hemoglobina se oxida a azida de metahemoglobina estable por acción del nitrito de sodio y de la azida sódica, y la concentración de la hemoglobina se determina por medición de la absorbancia muestra.

-Estudios de Biología Molecular: Obtención de Ácidos Nucleicos.

Para obtención de muestras de ARN y ADN, a partir de los leucocitos totales: las muestras de sangre entera fueron sometidos al protocolo de lisis de glóbulos rojos mediante tres lavados sucesivos con solución Buffer de lisis (Red cell lisis buffer - RCLB: Tris 1M, Cl₂Mg 1M, ClNa 5M) durante 10 minutos a temperatura ambiente y una posterior centrifugación a 3500 rpm durante 15 minutos, para obtener los leucocitos totales. El pellet de leucocitos obtenido fue resuspendido en 1ml de TRIAGENT® (Sigma-Aldrich®) para la posterior extracción del ARN y ADN.

Extracción de Ácidos Nucleicos

1-Extracción de ARN:

El ARN total se obtuvo siguiendo el protocolo de Chomczynski 1993, mediante la extracción con tiocianato de guanidinio- fenol-cloroformo. Al pellet se adicionó 200 µl de cloroformo y se realizó una agitación intensa, se dejó reposar por 5-10 minutos a temperatura ambiente hasta observar separación de fases. Luego se centrifugó a 13000 rpm durante 15 minutos a 4°C y se obtuvo, fase acuosa, interfase y pellet. Para obtener el RNA, se recuperó la fase acuosa, y se precipitó el ARN en un volumen de 500 µl de isopropanol frío por centrifugación a 13000 rpm durante 10 minutos a 4°C. El pellet de ARN se lavó con 1ml de etanol al 75% y posteriormente se centrifugó a 13000 rpm por 15 minutos a 4°C. Finalmente se removió el sobrenadante y el pellet de ARN fue resuspendido en un volumen adecuado de agua libre de RNAsas. Una vez finalizado este procedimiento se evaluó la concentración y calidad del material, mediante espectrofotometría.

2-Extracción de ADN

Para obtener el ADN, se trabajó con la interfase, para precipitar el mismo mediante la adición de 300 µl de Etanol al 96% por cada 1 ml de TRIAGENT® utilizado inicialmente, posteriormente se homogeneizó por inversión. A continuación, se incubaron las muestras a temperatura ambiente durante 2-3 minutos y el sedimento ADN por centrifugación a 2000 rpm durante 5 minutos a 4°C (La remoción cuidadosa de la fase acuosa residual es crítico para la calidad del ADN aislado).

El sobrenadante con cloroformo se descartó dejando solo el pellet de ADN el cual fue sometido a dos lavados continuos que consistieron en la adición de 1 ml de Citrato de Sodio, mezclando por inversión en intervalos de 10 minutos durante media hora. Luego de cada lavado se centrifugó a 2000 rpm durante 5 minutos a 4°C y posteriormente se descartó el sobrenadante.

El pellet de ADN obtenido se lavó con 1ml de Etanol al 75% y posteriormente se centrifugó a 2000 rpm durante 5 minutos a 4°C. Finalmente se removió el sobrenadante y el pellet obtenido fue resuspendido en 50 µl de NaOH 8 mM.

Técnicas Experimentales con ADN

- Metilación del promotor de PTEN: Tratamiento con bisulfito

Para evaluar el perfil de metilación alelo-específica en los sitios CpG del promotor de PTEN, las muestras fueron tratadas con bisulfito de Sodio, que convierte las citosinas (C) no metiladas a Timina (T), siendo los residuos C metilados resistentes al tratamiento.

El protocolo utilizado para la modificación del ADN con bisulfito fue el proporcionado por la Dra. Carmen Stanganelli del servicio de Genética Hematológica de la Academia Nacional de Medicina de Bs. As. el cual se detalla a continuación:

1. Diluir 1µg de ADN en 50µl de agua bidestilada estéril.
2. Agregar 5,5µl de NaOH 3M e incubar a 37°C por 20 minutos en baño de agua termostatzado para desnaturalizar el ADN.
3. Agregar 30µl de solución de Hidroquinona y 520µl de solución de Bisulfito de sodio.
4. Incubar a 55°C por 4,5 horas para producir la sulfonación y desaminación hidrolítica, efectuar durante ese tiempo dos incubaciones de 20 segundos a 95°C.
5. Remover los tubos para detener la reacción, agregar 1ml de resina (Wizard™ DNA Clean-up System, Promega A7280) y mezclar por inversión.
6. Pasar el ADN por la columna usando una bomba de vacío. Agregar 2ml de 2-propanol 80% para lavar la columna y aplicar vacío nuevamente.
7. Colocar la columna en un tubo de microcentrífuga y centrifugar por 2 minutos a 12.000rpm para remover el propanol residual.
8. Dejar las columnas a temperatura ambiente por 10 minutos para evaporar completamente el propanol. Transferir la columna a un nuevo tubo de microcentrífuga y eluir el ADN con 50µl de buffer Tris-CIH precalentado a 80°C, esperar 1 minuto y centrifugar a 12.000 rpm por 20 segundos. Descartar la columna.
9. Agregar 5,5µl de NaOH 3M, centrifugar brevemente e incubar a 37°C por 20 minutos para lograr la desulfonación alcalina.
10. Luego, agregar 35µl de NH₄OAc, 300µl de alcohol etílico absoluto (-20°C) y mezclar con vórtex. Precipitar el ADN por incubación a -20°C hasta el día siguiente. Centrifugar a 14.000rpm por 25 minutos a 4°C.
11. Eliminar el sobrenadante y lavar el ADN con 200µl de etanol 70% (-20°C). Centrifugar 1 minuto. Eliminar el sobrenadante y dejar secar el ADN por 1 minuto o hasta que esté bien seco.
12. Resuspender en 60µl de agua bidestilada precalentada a 37°C. Dejar a 65°C de 15 a 60 minutos. Resuspender y guardar a -20°C.
13. Amplificación de PCR para identificar metilación del promotor:

Como método para la detección del estado metilado del promotor de PTEN se implementó la Nested PCR metilación-específica (MSP) desarrollada por (Hashemi 2013). En la primera amplificación los primers de la Nested PCR, reconocen el templado tratado con bisulfito pero no discrimina entre alelos metilados y no metilados (529 pb) (Goel 2004).

En la segunda etapa, se utilizaron dos pares de primers; un par es específico para una secuencia no metilada y la otra es específica para la región metilada.; se obtendrán fragmentos de 173 pb y 155 pb respectivamente. Los primers a utilizados son los publicados por (Hashemi 2013) cuyas secuencias se detallan en la **Tabla 1**. En ambas etapas de

amplificación, el termociclador utilizado fue Bioer GenePro y la enzima empleada fue Taq ADN polimerasa 500U InBio Highway siguiendo las especificaciones detalladas en las **Tablas 2 y 3**.

Tabla 1. Secuencias de primers utilizados para detectar Metilación de Promotor de PTEN.

Nº Ciclado	Primers (secuencia 5'-3')	Tamaño del amplicón (pb)
1º	Fw: TTTGGGAGGGGGTTTGA Rv: CCATCCTCTTAATATCTCCT	529 pb
2º	Fw: GGTTTCGGAGGTCGTCGGC Rv: CAACCGAATAATACTACTACGACG	155 pb
	Fw: TGGGTTTTGGAGGTTGTTGGT Rv: ACTTAACTCTAAACCACAACCA	173 pb

Tabla 2. Proporciones de Master Mix empleada en ambas etapas de amplificación.

Reactivos	Volumen (µl)
Buffer 10X	4
Solución Enhancer 5X	1
Primer Fw (10µM)	2
Primer Rv (10µM)	2
Cl2Mg (25 mM)	1
H2O Rnase-free	9,37
dNTPs (10µM)	0,5
Enzima Taq Polimerasa (500 U)	0,13
ADN templado (50 ng)	5
Volumen Final	25

Tabla 3. Condiciones de ciclado general utilizado en ambas etapas de amplificación

Ciclado	Temperatura	Tiempo
Hold Inicial	95° C	5 min
Ciclo 2-30	97° C	45 seg
	58° C	30 seg
	72° C	1 min
Extensión Final	72° C	10 min

Electroforesis:

Los productos de PCR obtenidos tanto para evaluar el patrón de metilación del promotor de *PTEN*, fueron revelados en gel de agarosa al 2%; la electroforesis se realizó a 90 voltios por 30 minutos en todos los casos.

-Técnicas experimentales con ARN

- Evaluación de la calidad de extracción del ARN total

El ARN total se cuantificó con el espectrofotómetro para valorar la pureza de las muestras, a través de la medición de la absorbancia a las longitudes de onda de 260, 280 y 230nm y posteriores cálculos de razón entre las mismas:

RELACION DO	INTERPRETACIÓN
DO 260 / DO 230 < 1	significa que la muestra está contaminada con fenol
DO 260 / DO 280 < 1,9	indica que la muestra está contaminada con proteínas y, por lo tanto, en ambos casos la cuantificación no será exacta
DO 260 / DO 280 ≥ 1,9	la muestra es pura y puede calcularse la concentración de ARN teniendo en cuenta que 1 unidad de DO 260 = 40µg ARN/ml. La masa de ARN final a utilizar de cada muestra para la reacción de retrotranscripción fue de 1µg.

- Reacción de Retrotranscripción (RT-PCR)

-Obtención de cDNA

La obtención del ADNc, se realizó a partir de 1µg de ARN en un volumen final de 20µl. A cada 1µg de ARN se le agrego 25 pmol de random primers y se sometió a 65°C durante 5 minutos, luego se añadió a la mezcla de reacción: dNTPs, enzima transcriptasa reversa (M-MLV de Promega®) y buffer de reacción. La RT-PCR se llevó a cabo durante una hora a 37°C y 10 minutos a 70°C para inactivar la enzima. El protocolo descrito utilizado en la reacción se resume en las tablas que se encuentran a continuación (**Tablas 4 y 5**).

Tabla 4. Proporciones de la Master mix para la retrotranscripción.

Reactivos	Volumen (µl)
Random primers (0,4 µg/µl)	1
H2O RNase-free	5
ARN (0,2 µg/µl)	5
Desnaturalización inicial 5 min a 65°C	
Buffer 10X	4
dNTPs (10mM)	1,5
M-MLV RT (200 U/µl)	1
H2O RNase-free	2,5
Volumen final	20

Ref. Enzima transcriptasa reversa (M-MLV, Promega®); dNTPs (Promega®), Random primers (Invitrogen®).

Tabla 5. Condiciones de Ciclado para la obtención del ADNc. Retrotranscripción.

Ciclado	Temperatura	Tiempo
Retrotranscripción	37°C	1 h
Inactivación de la transcriptasa inversa	70°C	In

- **Cuantificación mediante PCR en Tiempo Real**

Amplificación de los transcriptos de PTEN a partir de cDNA

La cuantificación relativa de los transcriptos de PTEN se realizó por PCR en Tiempo Real utilizando un intercalante de ADN doble cadena (Eva Green, a la longitud de onda de 530nm). Como gen control se utilizó β -actina. El termociclador en el que se llevaron a cabo las reacciones fue BIOER -Line Gene K Real Time, modelo FDQ-48A (A4). El cDNA se amplificó por PCR en Tiempo Real siguiendo las indicaciones detalladas a continuación (Tablas 6 y 7).

Tabla 6. Proporciones de Master Mix para PCR-Real Time

Reactivos	Volumen (μ l)
Mezcla Real (2X)	10
Primer Fw (10 μ l)	0,25
Primer Rv (10 μ l)	0,25
H2O	7,5
cDNA template	2
Volumen final	20

Tabla 7. Condiciones del Ciclado en PCR- Real Time

Ciclado	Temperatura	Tiempo
Hold inicial	95°C	3 min
	50° C	1 min
Ciclo x40	95° C	15 seg
	60° C	1 min 20 seg
Melting	95°C	c/ 20 seg hasta 70° C

- **Expresión génica relativa:**

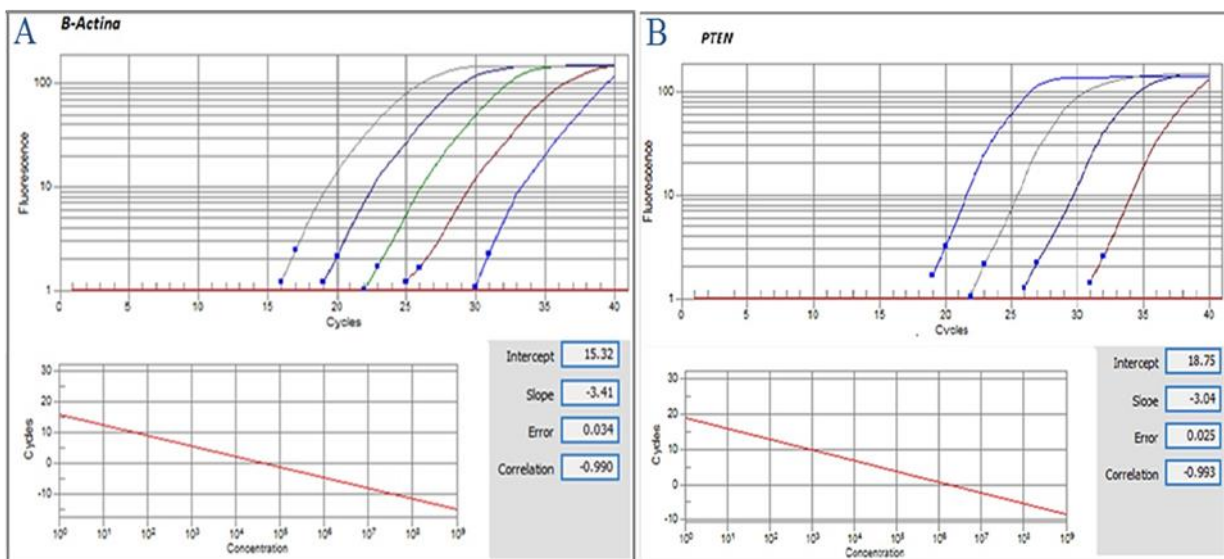
Los valores de ciclo umbral o Ct (ciclo threshold) obtenidos mediante PCR en Tiempo Real se analizaron de acuerdo a la población correspondiente a individuos sanos, pacientes diabéticos y pacientes diabéticos oncológicos. A partir de los valores de Ct del gen PTEN, se calculó su expresión relativa al housekeeping Beta-Actina (Ct de β -actina) haciendo uso del cálculo del Δ Ct (mediante la fórmula $2^{-\Delta Ct}$) y se expresaron los valores como porcentaje. La especificidad de los productos de amplificación obtenidos se evaluó mediante el programa de Melting incluido en el software del equipo. Este programa construye una gráfica de forma

automática a partir de los datos de fluorescencia y a temperatura decreciente. El ensayo de disociación o melting (realizado al final de la reacción de amplificación) se observa como un gráfico de pico único correspondiente a la temperatura de melting (T_m) esperado para cada amplicón.

Curvas de Calibración

En la **Figura N 1** se representa la curva de calibración correspondiente a cada gen en estudio de la PCR en tiempo real, a través de la misma se obtendrán las diferentes concentraciones.

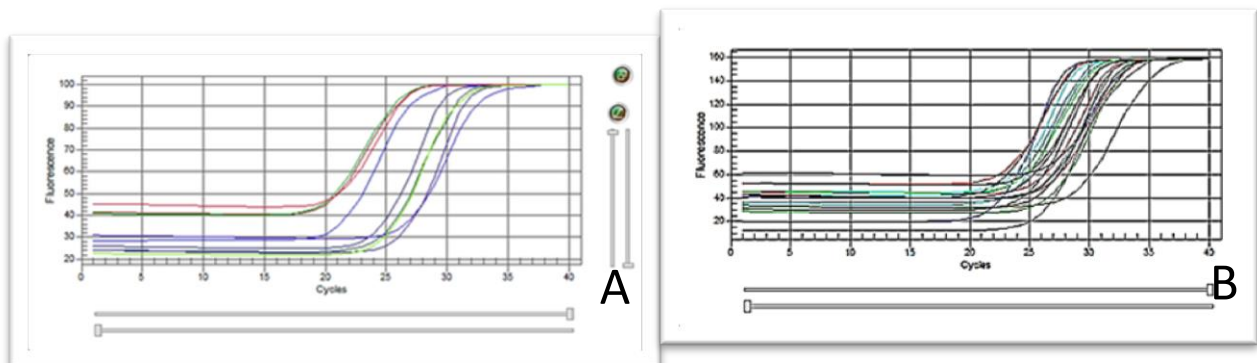
Figura N 1: Curvas de calibración de B-Actina y PTEN. En la imagen superior de A (β -Actina) y B (PTEN) se representa la amplificación de los genes por PCR en Tiempo Real de las diferentes concentraciones utilizadas, determinándose los ciclos umbrales (C_t) de cada una de ellas. En la imagen inferior se observan las pendientes obtenidas a partir de los valores C_t vs. el logaritmo de la concentración en la determinación de las curvas de calibración para cada gen.



- Amplificación y evaluación de especificidad de los productos

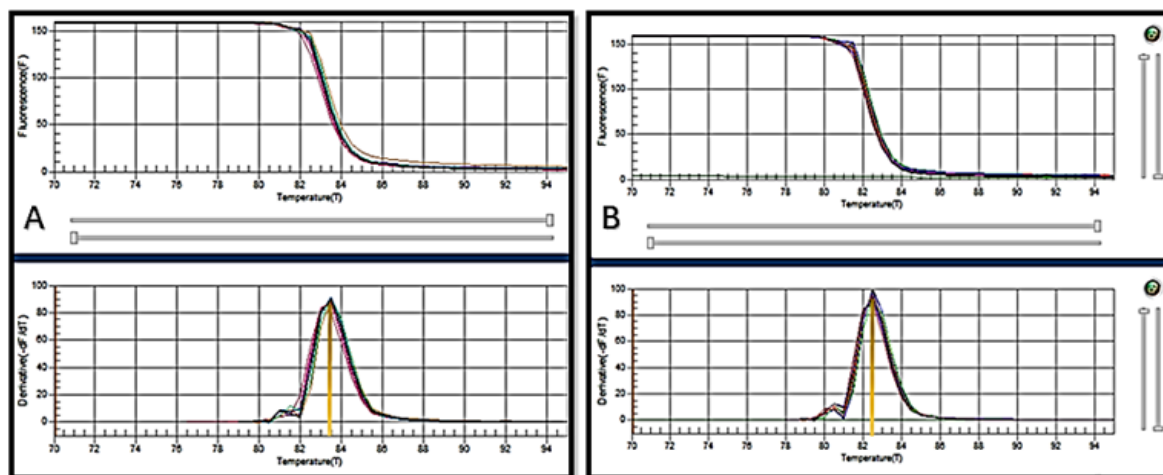
En la **Figura 2**, se observa un ejemplo de las curvas de amplificación para cada gen a partir de muestras de individuos sanos.

Figura 2. Ejemplo de cómo se muestran algunas curvas de amplificación para los genes β -actina y PTEN a partir de muestras de individuos sanos: (A) β -actina y (B) PTEN.



En la **Figura 3** se muestra que como a través del software del equipo, se obtienen las curvas de melting a partir de los valores de fluorescencia vs. temperatura durante el ensayo de disociación de los productos amplificados

Figura N°3: Curvas de melting de los amplímeros β -Actina (83,9°C) y PTEN (82,5°C). En el gráfico se observan los picos únicos correspondientes a la temperatura de melting de los productos específicos esperados para cada amplicón.



Se procedió a corroborar la especificidad de los productos amplificados mediante el análisis de las curvas de melting, donde verifico picos únicos correspondientes a los productos esperados, mientras que no se observaron otros picos a temperaturas bajas descartando la presencia de dímeros de primers y/o amplificación de productos inespecíficos que pudieran alterar la lectura de los Ct de las muestras. Se procedió entonces a registrar los valores Ct para el análisis de expresión relativa.

Análisis estadístico de los datos

Para la recolección de datos se diseñó una planilla en el programa MicrosoftExcel®, que incluyó la siguiente información: edad, sexo, tipo de neoplasia, concentración de triglicéridos, colesterol total, colesterol HDL y colesterol LDL, todos expresados en mgr/dl y valor de porcentaje de HbA1c. Con el objetivo de comprobar si PTEN sigue una distribución Normal se realizó la prueba de Kolmogorov-Smirnov, obteniéndose un valor de $p=0,821$, con lo cual se demuestra la normalidad de los datos con un nivel de significancia del 95%. Para el análisis estadístico de los niveles de expresión de PTEN obtenidos, se llevó a cabo un ANOVA de un factor con un nivel de significación $\alpha=0,05$. Para aquellas variables que no siguieron una distribución normal (Triglicéridos) de los datos, se utilizaron pruebas estadísticas como la de Kruskal-Wallis, la W de Mann-Whitney y la Mediana de Mood para comparar medianas con un nivel de significación de $\alpha=0,05$. El análisis de los datos se llevó a cabo mediante los paquetes estadísticos STATGRAPHICS® CenturionXVI y GRAPHPAD PRISM5®-v.6.01.

RESULTADOS

1. Distribución de la población en estudio según la edad y sexo

Este estudio se llevó a cabo con muestras de 120 individuos, constituida por 50 individuos sanos y los 70 diabéticos, de los cuales 40 eran diabéticos y 30 diabéticos diagnosticados con neoplasias como: cáncer de testículo, mama, colon, pulmón, próstata, riñón y páncreas; presentados en **Tabla 1**.

Tabla 1: Distribución de la población estudiada en función del género y edad.

Población		Total Analizado	Mujeres	Hombres	Mediana de edad (rango)
Individuos Sanos		50	27	23	32??? (18-76)
Diabéticos	Sin Ca	40	21	19	64 (18-86)
	Con Ca	30	13	17	58 (22-83)

Ref: Ca: cáncer

2. Expresión de *PTEN*:

A través de un análisis de la varianza (ANOVA) se evaluó en primer lugar, si las medias de niveles de expresión indicados en % entre las distintas poblaciones analizadas eran similares (**Tabla 2**), para un nivel de significación $\alpha=0,05$.

Tabla 2: Resultados del ANOVA de un factor obtenido a partir del software GraphPad Prism® versión 7.02 para los valores de expresión de *PTEN*. SS: suma de cuadrados; DF: grados de libertad; MS: media cuadrática.

ANOVA Table	SS	DF	MS	F	P value
<i>Treatment (between columns)</i>	2852	2	1426	16,73	0,0413
<i>Residual (within columns)</i>	4603	54	85,24		
<i>Total</i>	7455	56			

El resultado del análisis arrojó un valor $F= 16,73$ ($p=0,0413$). Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula de igualdad de medias, donde se observa que existen diferencias estadísticamente significativas entre los niveles de expresión de ***PTEN*** en las distintas poblaciones evaluadas.

Tabla 3: Se expresan los valores obtenidos para cada una de las poblaciones en estudio correspondiente a la Media, Desvió y Error Estándar.

	HD	DBT	DBO
χ	8,57	23,16	7,74
Σ	7,60	12,13	7,08
EE	0,92	2,78	1,67

Ref: HD: healthy donor/ Individuos Sanos, DBT: pacientes Diabéticos, DBO: pacientes Diabéticos Oncológicos

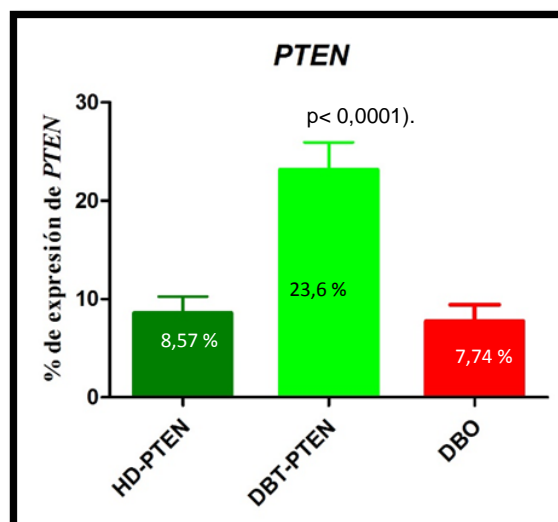
Se estableció un valor de corte (cut off) con el fin de definir los casos con niveles incrementados de expresión de PTEN respecto del grupo control calculado de la siguiente manera:

$$\text{Media (Individuos Sanos)} + 2DS = 8,57 + (2 \times 3,818) = 16,2 \text{ (Ferri, 2014).}$$

Sin embargo, al diferenciar la población analizada entre pacientes, se identificó que el 78,94% de los pacientes DBT analizados (15/19) presentaban valores de expresión de *PTEN* superior al cut off, mientras que solo el 2,4 % de los DBO superaron dicho valor.

Una vez comprobada la desigualdad de medias entre los grupos, se procedió a realizar el test de Student (t-test) para evaluar la expresión de PTEN comparando la misma entre pacientes DBT, DBO respecto a la HD. Se observaron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo DBT-PTEN con respecto a los grupos HD-PTEN y DBO ($p < 0,0001$) (**Figura 1**).

Figura 1. Medias de niveles de expresión de *PTEN* expresados en porcentaje (HD: 8,57%; DBT: 23,16%; DBO: 7,74%) con sus respectivos errores estándar.



Ref: HD-PTEN: población sana. DBT-PTEN: pacientes con Diabetes. DBO: pacientes diabéticos oncológicos

3. Estado de metilación del promotor de *PTEN*:

Para evaluar el perfil de metilación del Promotor de *PTEN* se procedió a optimizar la amplificación por PCR convencional y se logró visualizar los productos mediante electroforesis en gel de Agarosa al 2%. Si bien el número de casos analizados por metilación es pequeño (**Tabla 4**), se observó una mayor frecuencia de metilación del promotor de *PTEN* en los pacientes DBO, que en DBT e HD ($P < 0,05$). Estos resultados deberán ser confirmados posteriormente en un estudio que aumente el número de muestras analizadas.

Tabla 4: Número de casos analizados por metilación de las poblaciones en estudio con sus respectivos resultados respecto al estado de metilación del Promotor del gen *PTEN*.

Población	Casos Analizados	Promotor de <i>PTEN</i>		
		<i>MET</i>	<i>MET/UNM</i>	<i>UNM</i>
HD	15	0	11	4
DBT	15	0	15	0
DBO	12	9	3	0

Ref: *MET*: metilado *MET/UNM*: metilado y no metilado, *UNM*: no metilado.

En la **Figura 4**, se observa la electroforesis de los productos de PCR pertenecientes a HD y DBT. El amplicón de 155 pb se corresponde al ADN metilado, mientras que el de 173 pb, al ADN NO-Metilado. En la **Figura 5** se observan los resultados del estado de metilación del promotor de *PTEN* en la cohorte de pacientes DBO, observándose los productos de 155 pb correspondiente al ADN metilado.

Figura 5: Electroforesis en gel de Agarosa de pacientes diabéticos e individuos sanos. M, marcador de peso molecular de dos mil pb. m: metilado (banda inferior de 155pb) u: no metilado (banda superior de 173 pb)

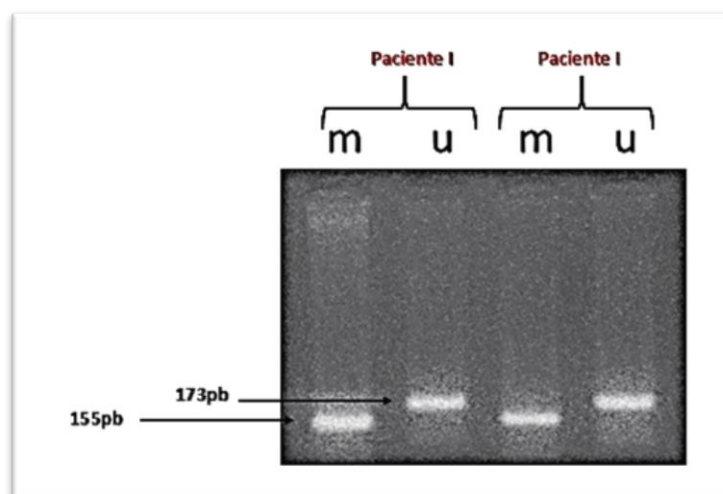
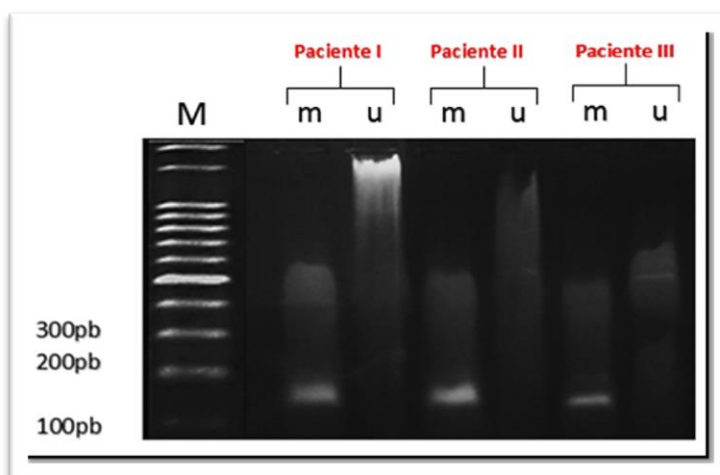


Figura 5: Electroforesis en gel de Agarosa de pacientes diabéticos oncológicos. M, marcador de peso molecular de 2 mil pb. m: metilado (155pb) u: no metilado (173 pb).



3. Grado de control metabólico glucémico a través del dosaje de hba1c en pacientes cáncer.

Para cumplir el objetivo se registraron los valores de HbA1c en la población de pacientes diabéticos. Se encontró que solo el 66% de los mismos tuvieron al menos un de registro control en un periodo de 1 año.

En la **Figura 6 y 7** se plantean los valores obtenidos para la población DBT y DBO con respecto a la meta establecida por la ADA de 7% para HbA1c.

Figura 6: Porcentaje de HbA1c en pacientes Diabéticos Oncológicos.

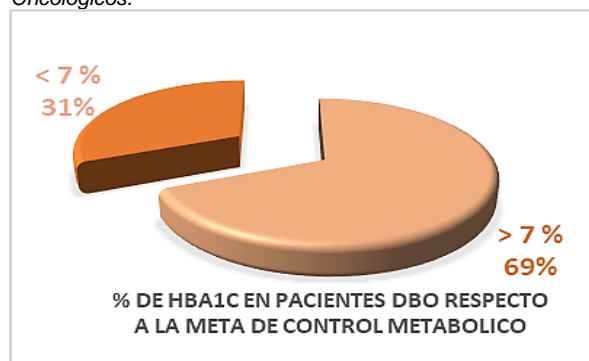
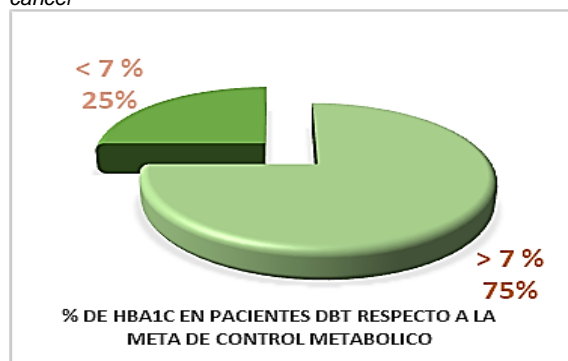


Figura 7: Porcentaje de HbA1c en pacientes Diabéticos sin cáncer

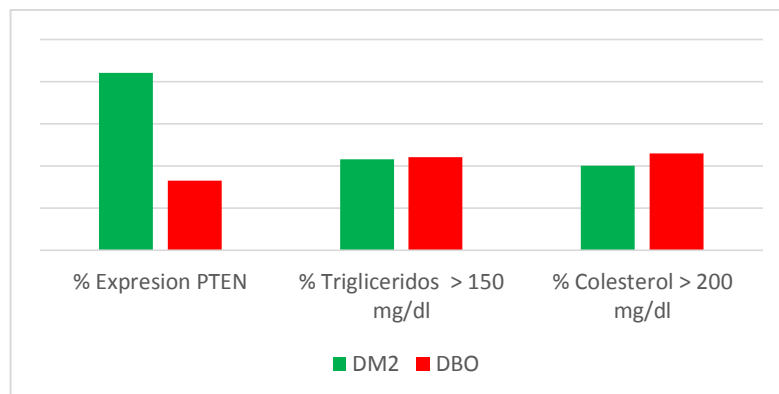


En ambas poblaciones analizadas es notable el alto porcentaje de mal control glucémico.

4. Nivel de expresión del gen *PTEN* y control lipídico

Del análisis de la expresión de *PTEN* y los valores de lípidos hallados en la población en estudio se observó que no se existen variaciones significativas en cuanto a la sobreexpresión y los niveles deseables establecidos por el ATP III: colesterol total <200 mg/dl y de Triglicéridos < 150 mgr/dl ($p>0,5$). **Figura 8.**

Figura 8: Porcentaje de sobreexpresión de *PTEN* y el porcentaje de pacientes que presentaron niveles de colesterol total < 200 mg/dl, triglicéridos < 150 mg/dl



En la **Tabla N 5** se exponen los porcentajes hallados para Colesterol y Triglicéridos según metas ATP III.

			DBT (%)	DBO (%)
Colesterol total (mg/dl)	<i>Deseable</i>	<200	30	58
	<i>Intermedio Alto</i>	200-239	30	37
	<i>Alto</i>	>240 más	40	5
Triglicéridos (mgr/dl)	<i>Deseable</i>	<150	57	56
	<i>Levemente Elevado</i>	150-200	28	25
	<i>Elevado y Muy Elevado</i>	>200 y más	15	19

DISCUSIÓN

La participación del gen *PTEN* en el desarrollo de neoplasias, ha sido ampliamente estudiado, aunque los estudios acerca de su función como regulador negativo en la recepción de la insulina a nivel celular y su implicancia en el desarrollo de cáncer en individuos diagnosticados con DM2, es escasa.

La señalización a través de la ruta de la fosfatidilinositol-3-quinasa (PI3K) es crucial para las respuestas metabólicas a la insulina y se han reportado defectos en la señalización de PI3K en DM2. *PTEN* es una proteína fosfatasa que puede regular negativamente la vía de PI3K desfosforilando fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP3), sin embargo, aún no está claro si su rol es fisiológicamente relevante en la señalización de la insulina (Butler, M; 2002). Es una fosfatasa de especificidad dual implicada no solo en la transducción de señales de la insulina sino también en la supresión tumoral. Debido a que muchos de los efectos metabólicos de la insulina implicados en el desarrollo de DM2 están mediados a través de la activación de PI3K y el subsiguiente aumento de las concentraciones intracelulares de PIP3, la inhibición de un regulador negativo de esta vía podría “mejorar” la señalización de la insulina. Aunque las funciones de *PTEN* como supresor tumoral ya han sido ampliamente demostradas, su papel fisiológico en el metabolismo de la glucosa es en gran parte desconocido.

Nuestro trabajo de investigación tuvo por finalidad determinar en pacientes diabéticos la asociación con la susceptibilidad al desarrollo de cáncer; se evaluó además los niveles de expresión génica en pacientes que podrían presentar alterada la vía PI3K debido a la propia DM2 y se comparó respecto a la expresión en pacientes diabéticos oncológicos considerando la función de *PTEN* como supresor tumoral.

EXPRESIÓN RELATIVA DEL GEN *PTEN*

El rol de *PTEN* como supresor tumoral y sus niveles de expresión se encuentran regulados por numerosos y complejos mecanismos (Hashemi 2013). Teniendo en cuenta que el principal sustrato fisiológico de *PTEN* es PIP3 y que tiene como función primordial mantener

equilibrada su concentración mediante la desfosforilación de este metabolito, contrarrestando los posibles efectos que el aumento de PIP3 podría provocar, como la desregulación de la señalización de AKT. La proteína Akt, es un gran regulador en la funcionalidad celular, entre otras funciones, actúa como antiapoptótico al activar a NF- κ B; es decir que una actividad incrementada de AKT conduce a disminución de la apoptosis y la supervivencia celular (Di Cristofano & Pandolfi 2000; Maehama 2001, Kantarjian 2006). Como ha sido reportado, (Bosch-Barrera 2009) en numerosos tipos de neoplasias los pacientes presentan una menor expresión de *PTEN* respecto a la población sin neoplasia. Estas investigaciones se basan en que el desarrollo de cáncer es la consecuencia final de la desregulación del ciclo celular e inhibición de la Apoptosis (Hassan 2014).

PTEN modula las acciones metabólicas en la célula mediante la regulación aguas abajo de la vía PI3K, donde además de disminuir los niveles de PIP3, también puede desfosforilar al IRS, alterando la señalización de la insulina a través de la vía PI3K/AKT mediante estos dos mecanismos (Gutiérrez-Rodelo 2017). Un aumento en la expresión de *PTEN* y por ende en su actividad, deberían provocar el mismo impacto en la señalización de insulina como una disminución en la actividad de la vía PI3K (Dupont 2002). La progresión celular está aumentada y descontrolada en el cáncer; la insulina se relaciona principalmente con la vía de señalización de Akt2.

En nuestro trabajo la expresión de *PTEN* presentó marcada variación en la población de pacientes diabéticos con respecto de los individuos sanos. Fue posible identificar mediante la determinación de un valor de *cut off*, calculado a partir de la expresión en individuos sanos, que el 79% de la población diabética tendría sobreexpresado *PTEN*. Si bien, no se han publicado aún estudios en humanos referentes a la expresión de este gen y su asociación a Diabetes, ha sido demostrado que los altos niveles de expresión de *PTEN* contribuyen a la degradación de proteínas musculares fenómeno que es característico en la Diabetes (Hu 2007). La Diabetes es una enfermedad metabólica asociada con la atrofia muscular progresiva, lo cual contribuye a la morbilidad bajo esta condición, principalmente cuando no es bien controlada. El mecanismo que conduciría a atrofia muscular se relaciona con la reducción de la síntesis de proteínas; la proteólisis del músculo en condiciones catabólicas está ligada a la resistencia a la insulina y específicamente a los defectos en el sustrato del receptor de insulina asociado a la vía PI3K/AKT, siendo una de las principales influencias de la insulina disminuir la degradación de proteínas en el músculo.

Evidencias experimentales demostraron no solo que los niveles de *PTEN* varían con los modelos de defectos en la señalización de la insulina, sino que la supresión de la expresión de *PTEN* produce una marcada mejora en las concentraciones de glucosa en sangre y en la sensibilidad a la insulina en ratones diabéticos. De hecho, Nakashima et al. han demostrado

que la sobreexpresión de *PTEN* inhibe la captación de glucosa y la translocación de GLUT4 (principal proteína transportadora de glucosa regulada por la insulina) (Nakashima 2000).

En contraste con la Diabetes tipo 1, en la DBMT2, el ARNm de *PTEN* y la proteína en el músculo aumentan. Esto es relevante porque un aumento de *PTEN* en la Diabetes crónica proporciona un estímulo positivo adicional en la degradación de la proteína del músculo. (Vílchez Rienda 2016). *PTEN* participa en el control del metabolismo de las proteínas musculares presentando un comportamiento fluctuante en condiciones catabólicas; varios estudios demuestran la gran variabilidad en la expresión de *PTEN*. La resistencia a la insulina inducida por una dieta rica en grasas, aumenta la actividad de *PTEN* (Lo 2004), por otra parte, la eliminación específica de *PTEN* en el musculo esquelético mejora la homeostasis de la glucosa en ratones (Wijesekara 2005) y durante el desarrollo, es mayor la cantidad de células con menor actividad de *PTEN* (Nguyen 2006).

La sobreexpresión de *PTEN* en pacientes diabéticos observada en este trabajo concuerda con la evidencia experimental previa que sugiere que *PTEN* se encuentra regulado transcripcionalmente en la deficiencia/resistencia a la insulina crónica establecida en DM2. El mecanismo mediante el cual se produce el aumento de la expresión de *PTEN* en Diabetes, implicaría un aumento en el ARNm de *PTEN*. Wang et al. publicaron que la incubación de células endoteliales con ácidos grasos libres aumenta la actividad y expresión de *PTEN*. En este caso, la sobreexpresión fue relacionada con la estimulación de la proteína quinasa activada por mitógenos p38. Los hallazgos en células musculares en cultivo confirmaron no solo que el ácido palmítico aumenta la activación de p38 y la expresión de *PTEN*, sino que también la inhibición de p38 suprime el aumento inducido por ácido palmítico tanto en el ARNm de *PTEN* como en la expresión de la proteína. Estos resultados sugieren que la transcripción y expresión de *PTEN* se encuentran relacionadas con la activación de p38 lo cual explicaría en parte la elevada expresión de *PTEN* en la población de pacientes diabéticos (Hu 2001; Wang 2006).

A diferencia de lo que se esperaba en los pacientes oncológicos, los niveles de expresión de *PTEN*, no mostraron diferencias estadísticamente significativas con respecto a la población sana. El rol de *PTEN* en el desarrollo de diversos tumores humanos es motivo de varios estudios de susceptibilidad al desarrollo de un determinado tipo de cáncer, estando claro desde hace tiempo, su rol como supresor tumoral mediante pruebas experimentales como las llevadas a cabo por Di Cristofano y Stambolic en el 2000, quienes establecieron que ratones heterocigotos de *PTEN* eran viables en su desarrollo, pero susceptibles a padecer distintos tipos de tumores y enfermedades autoinmunes. Además, ratones knock-out de *PTEN* condicionales para distintos tejidos demostraron una gran correlación entre la pérdida de la función génica y el desarrollo de tumores (Kishimoto 2003; Suzuki 2008). Debido a la gran sobreexpresión de *PTEN* observada en pacientes diabéticos y considerando que el

diagnóstico de la neoplasia en nuestro grupo de estudio (DBO) fue posterior a la condición de diabéticos, es necesario comparar estas dos poblaciones entre sí. Si bien, no se observó diferencias estadísticas significativas al comparar los niveles de *PTEN* en los pacientes diabéticos oncológicos y la población sana, el nivel de expresión en los pacientes diabéticos oncológicos fue marcadamente menor ($p > 0,0001$) que en los diabéticos sin neoplasias. Lo cual podría hacernos inferir que durante la DM2 ante la necesidad de mantener la homeostasis celular los valores de *PTEN* estén sobreexpresados y frente a esta situación, variaciones en los niveles de expresión podrían llevar a la desregulación del “equilibrio” alcanzado en las vías de señalización y favorecer el desarrollo de neoplasias. Para demostrarlo, es necesario estudios prospectivos en pacientes diabéticos que desarrollen en el tiempo alguna neoplasia y se registre una disminución de la expresión de *PTEN* ante esta situación.

METILACIÓN DEL PROMOTOR DE *PTEN*

El proceso de carcinogénesis comprende una serie de alteraciones genéticas y epigenéticas que son acumuladas en las células y que terminan por permitir su crecimiento no regulado. Posiblemente el cáncer es uno de los procesos patológicos en el que más se ha estudiado la metilación del ADN. Existen numerosos datos que indican que las células tumorales, invariablemente, presentan diversas alteraciones en el ADN. De hecho, los cambios en el patrón de metilación pueden ser tan importantes como las mutaciones génicas o el cambio del número de copias de un gen. Los cambios en el patrón de metilación del ADN han sido un hallazgo constante en las células cancerosas (Zhu 2005, Marrero Rodríguez 2010). La naturaleza principalmente descriptiva de estos estudios y el hecho de que se han observado hipo e hipermetilación en varios *loci* ha dificultado evaluar si estos cambios están causalmente involucrados en el proceso de transformación o si reflejan la fisiología alterada de las células cancerosas que se dividen rápidamente. Además de las mutaciones de *PTEN*, el epi silenciamiento genético del mismo a través de la hipermetilación de su promotor, ha sido sugerido como potencial mecanismo que contribuye con la baja regulación de la vía PI3K por parte de *PTEN*, a la vez que se asocia positivamente con un mayor riesgo para varios tipos de cáncer.

Esta relación entre metilación aberrante y cáncer se ha hecho evidente dado que la ausencia de metilación conduce a la activación de oncogenes mientras que, la metilación anula la acción protectora de los genes supresores de tumores (Esteller 2008, Muñoz 2003).

El presente trabajo tuvo como objetivo evaluar el perfil de metilación del promotor de *PTEN* en las distintas poblaciones analizadas, estableciendo su asociación con la baja expresión de *PTEN* en pacientes diabéticos oncológicos. La inactivación de genes supresores de tumores contribuye al proceso de carcinogénesis por conferir ciertas ventajas al crecimiento celular indefinido, lo cual concuerda con nuestros resultados parciales obtenidos, que como no fue

posible estudiar al total de la población y no fue posible realizar un análisis estadístico. La hipermetilación del promotor de *PTEN* fue más frecuente en la cohorte de pacientes diabéticos oncológicos que en los individuos sanos y pacientes con Diabetes. Estos resultados podrán ser corroborados cuando sea posible analizar el total de la población participante de este estudio, lo cual podría ubicar a *PTEN* como un gen clave en el desarrollo tumoral mediante el silenciamiento debido a la hipermetilación de su promotor. Conocer el estado de metilación del promotor de *PTEN* podría ser un factor pronóstico clave en el desarrollo de cáncer en pacientes diabéticos. Además, dada la sobreexpresión de *PTEN* en pacientes diabéticos, el control farmacológico de *PTEN* podría representar un enfoque terapéutico favorable en el tratamiento de la DM2.

En cuanto al cumplimiento de las metas del 7% establecidas por el ADA y sabiendo que el control intensivo disminuye la incidencia de complicaciones microvasculares hemos visto que tanto que para DBT (31%) como DBO (25%), fueron bajos porcentajes de cumplimientos siendo similares a los expuestos por Huamán en el 2015 (31,8%), algo inferiores a los publicados por Coon (47%), Domínguez (50%) y Díaz (45,1%), siendo no menos llamativo el porcentaje bajo porcentaje de controles a lo largo de 1 año, siendo que al menos se solicita que el dosaje de HbA1c sean de 2 a 3 veces al año. En cuanto a metas diferenciales establecidas entre DBT y DBO no se han encontrado trabajos que las acuerden.

ESTADO METABÓLICO DE LA POBLACIÓN Y SU RELACIÓN A LA EXPRESIÓN DE *PTEN*

En cuanto al control metabólico lipídico no se encontraron valores estadísticamente significativos entre el nivel de sobreexpresión de *PTEN* y las concentraciones deseables por ATP III de 200 y 150 mgr/dl para colesterol total y triglicéridos respectivamente. Se han hallado en este sentido solamente trabajos experimentales en animales que expliquen el rol de *PTEN* en la lipogénesis.

Con respecto a las categorías establecidos por ATP III, hemos notado que en nuestro trabajo es menor, para el rango deseable de colesterol, al informado por López Carmona (2004), aunque similar al intermedio alto (24%,2) y muy superior al alto (24,4%); en tanto que, para triglicéridos, los rangos deseable y levemente aumentado fueron menores a los informados por estos investigadores (51,3 5 y 18, 3% respectivamente) y los valores elevados y muy elevados fueron menores a los informados (26%). No se encontró hasta el momento bibliografía que discrimine para poblaciones diabéticas con o sin cáncer, los valores de control de lípidos. En cuanto a los resultados obtenidos, para las lipoproteínas hemos notado que se cumplen para los pacientes DBT únicamente los valores de colesterol total, y para los DBO los de Colesterol Total y Col HDL. Los controles del metabolismo de los hidrocarburos tanto DBT como DBO fueron funestos en consonancia con los expuestos por trabajos consultados,

donde cabria la pregunta ¿realmente el paciente DBT está informado de las complicaciones micro y macrovasculares a las que lleva un mal control de su tratamiento?

Limitaciones del proyecto:

Como limitaciones del proyecto se remarca la dificultad para logra la paridad de rango etario entre los casos y controles; debido a que a mayor edad existe menor número de individuos cumplan con la condición de control. Además, encontrar pacientes que cumplan con la condición de Diabetes y Cáncer fue un inconveniente durante todo el desarrollo del trabajo.

CONCLUSIONES

A través de los resultados obtenidos podemos realizar las siguientes conclusiones:

- Los niveles de expresión de *PTEN* son notablemente mayores en pacientes diabéticos que en la población control de individuos sanos.
- Los valores de expresión *PTEN* son marcadamente menores en la población de pacientes diabéticos oncológicos que en los diabéticos sin neoplasias.
- El promotor de *PTEN* se halló hipermetilado con mayor frecuencia en los pacientes diabéticos oncológicos.
- El grado de control metabólico glucémicos determinado a través de la HbA1c presentó un mal control de metas en más del 69% de la población diabética y diabética oncológica
- Los valores de lípidos hallados en la población en estudio no mostraron diferencias significativas en cuanto a la expresión de *PTEN*.

Perspectivas:

- ✓ Trabajar en forma conjunta con los médicos para asegurar que se cumplan con los tiempos y número de controles propuestos para estas patologías a fin de asegurar una buena calidad de vida y arribar a conclusiones concretas en futuras investigaciones.

BIBLIOGRAFÍA

- Cannata D, Fierz Y, Vijayakumar A, LeRoith D. Type 2 Diabetes and cancer: What Is the Connection? *Mt Sinai J Med.* 2010;77(2):197-213. Action to Control Cardiovascular Risk in Diabetes Study Group. (2008). Effects of intensive glucose lowering in type 2 Diabetes. *The New England journal of medicine*, 358(24), 2545.
- Wilson EB, Maher HC. Cancer and tuberculosis with some comments on cancer and other diseases. *Am J Cancer* 1932;16:227-250.
- Buyschaert M, Sadikot S. Diabetes and cancer: a 2013 synopsis. *Diabetes Metab Syndr Clin Res Rev* 2013;7:247-250.
- Bosch-Barrera, J., Hernández, A., & Abella, L. E. (2009, December). La vía de la insulina y el factor de crecimiento similar a la insulina, una nueva diana terapéutica en oncología. In *Anales del Sistema Sanitario de Navarra* (Vol. 32, No. 3, pp. 413-421). Gobierno de Navarra. Departamento de Salud.
- Chen, Z., Trotman, L. C., Shaffer, D., Lin, H. K., Dotan, Z. A., Niki, M. & Cordon-Cardo, C. (2005). Crucial role of p53-dependent cellular senescence in suppression of Pten-deficient tumorigenesis. *Nature*, 436(7051), 725-730.
- Gagliardino, J. J. (2019). Guías de diagnóstico y tratamiento de diabetes y factores de riesgo cardiovascular: posible aporte del laboratorio para optimizar su implementación en la práctica diaria. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, 53(1), 11-13
- Lewis C. Cantley* 2002. The Phosphoinositide 3-Kinase Pathway
- Bartolomei MS, Tilghman SM. Genomic imprinting in mammals. *Annu Rev Genet.* 1997;31:493-525.
- 14. Abdolmaleky HM, Smith CL, Faraone SV, Shafa R, Stone W, Glatt SJ, et al.
- Methyloomics in psychiatry: modulation of gene-environment interactions may be through DNA methylation. *Am J Med Genet.* 2004;127B:51-9.
- Cairo, G., Romero González, SA., Itria, G., Waitman, J. Diabetes tipo 1 e insulinoresistencia: tasa estimada de disposición de la glucosa y su correlación con complicaciones crónicas. *Revista de la Sociedad Argentina de Diabetes* Vol. 51 N° 2 Junio de 2017: 38-46 ISSN 0325-5247.
- Kiviniemi, A. M., Lepojärvi, E. S., Tulppo, M. P., Piira, O. P., Kenttä, T. V., Perkiömäki, J. S., ... & Huikuri, H. V. (2019). Prediabetes and Risk for Cardiac Death Among Patients With Coronary Artery Disease: The ARTEMIS Study. *Diabetes care*, 42(7), 1319-1325
- Schones DE, Leung A, Natarajan R. Chromatin Modifications Associated with Diabetes and Obesity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2015;35:1557-61.
- Depay, N., Crosswell, H. E., De, P., Parsons, R., Peng, Q., Su, J. D., & Durden, D. L. (2008). The protein phosphatase activity of PTEN regulates SRC family kinases and controls glioma migration. *Cancer research*, 68(6), 1862-1871.

- Freeman, D. J., Li, A. G., Wei, G., Li, H. H., Kertesz, N., Lesche, R... & Liu, X. (2003). PTEN tumor suppressor regulates p53 protein levels and activity through phosphatase-dependent and-independent mechanisms. *Cancer cell*, 3(2), 117-130.
- Gárciga-Cardoso, F., & Licea-Puig, M. (2012). Relación entre la Diabetes Mellitus y el cáncer. *Revista Peruana de Epidemiología*, 16(2), 69-75.
- Chen Y, Sharma RP, Costa RH, Costa E, Grayson DR. On the epigenetic regulation of the human reelin promoter. *Nucleic Acids Res.* 2002;30:2930-9.
- Nicholls RD, Saito S, Horsthemke B. Imprinting in Prader-Willi and Angelman syndromes. *Trends Genet.* 1998;14:194-200.
- American Diabetes Association. (2019). 2. Classification and diagnosis of diabetes: standards of medical care in diabetes—2019. *Diabetes Care*, 42(Supplement 1), S13-S28.
- Sacks, D. B., Bruns, D. E., Goldstein, D. E., Maclaren, N. K., McDonald, J. M., & Parrott, M. (2002). Guidelines and recommendations for laboratory analysis in the diagnosis and management of diabetes mellitus. *Clinical chemistry*, 48(3), 436-472.
- Tusié Luna, M. T. (2008). El componente genético de la diabetes tipo 2. *Mensaje bioquímico*, 32, 59-65.
- Martín, C. G., & Muratore, C. (2018). XXVII JORNADAS DEL COMITÉ DE GRADUADOS: "ACTIVIDAD FÍSICA Y DIABETES". *Revista de la Sociedad Argentina de Diabetes (SAD)*, 52(3 Supl.), 2.
- Giovannucci, E., Harlan, D. M., The Phosphoinositide 3-Kinase Pathway
- Lewis C. Cantley* 2002Archer, M. C., Bergenstal, R. M., Gapstur, S. M., Habel, L. A & Yee, D. (2010). Diabetes and cancer: a consensus report. *CA: a cancer journal for clinicians*, 60(4), 207-221.
- Goel, A., Arnold, C. N., Niedzwiecki, D., Carethers, J. M., Dowell, J. M., Wasserman, L. & Boland, C. R. (2004). Frequent inactivation of PTEN by promoter hypermethylation in microsatellite instability-high sporadic colorectal cancers. *Cancer research*, 64(9), 3014-3021.
- Goff, D. C., Gerstein, H. C., Ginsberg, H. N., Cushman, W. C., Margolis, K. L., Byington, R. P & ACCORD Study Group. (2007). Prevention of cardiovascular disease in persons with type 2 Diabetes mellitus: current knowledge and rationale for the Action to Control Cardiovascular Risk in Diabetes (ACCORD) trial. *The American journal of cardiology*, 99(12), S4-S20.
- Hashemi, M., Rezaei, H., Eskandari-Nasab, E., Kaykhaei, M. A., & Taheri, M. (2013). Association of promoter methylation and 32-bp deletion of the PTEN gene with susceptibility to metabolic syndrome. *Molecular medicine reports*, 7(1), 342-346.
- Hassan, M., Watari, H., AbuAlmaaty, A., Ohba, Y., & Sakuragi, N. (2014). Apoptosis and molecular targeting therapy in cancer. *BioMed research international*, 2014.
- Jamil, K., Jayaraman, A., Ahmad, J., Joshi, S., & Yerra, S. K. (2017). TNF-alpha- 308G/A and-238G/A polymorphisms and its protein network associated with type 2 Diabetes mellitus. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 24(6), 1195-1203.

- Rojas-Martínez, R., Basto-Abreu, A., Aguilar-Salinas, C. A., Zárate-Rojas, E., Villalpando, S., & Barrientos-Gutiérrez, T. (2018). Prevalencia de diabetes por diagnóstico médico previo en México. *salud pública de méxico*, 60, 224-232.
- DeFronzo RA, Ferrannini E, Zimmet P, Alberti G. *International Textbook of Diabetes Mellitus*. Vol. 1 (4th edition). 2015 doi:10.1002/9781118387658.
- Picón, M., & Tinahones, F. (2010). Factores genéticos frente a factores ambientales en el desarrollo de la diabetes tipo 2. *Avances en Diabetología*. España, 28, 268-269.
- Kantarjian HM., et al. (2006). "New Insights into the Pathophysiology of Chronic Myeloid Leukemia and Imatinib Resistance". *Annals of Internal Medicine* 145:913-923.
- Lin, P. C., Lin, J. K., Lin, H. H., Lan, Y. T., Lin, C. C., Yang, S. H., ... & Chang, S. C. (2015). A comprehensive analysis of phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10 (PTEN) loss in colorectal cancer. *World journal of surgical oncology*, 13(1), 1.
- Mayo, L. D., & Donner, D. B. (2002). The PTEN, Mdm2, p53 tumor suppressor–oncprotein network. *Trends in biochemical sciences*, 27(9), 462-467.
- Wen W Ma, Adjei Alex A. Novel Agents on the Horizon for Cancer. *Therapy Cancer J Clin*. 2009;59:111-37.
- Pal, A., Barber, T. M., Van de Bunt, M., Rudge, S. A., Zhang, Q., Lachlan, K. L., ... & Walker, L. (2012). PTEN mutations as a cause of constitutive insulin sensitivity and obesity. *New England Journal of Medicine*, 367(11), 1002-1011.
- Pinzón, C. E., Serrano, M. L., & Sanabria, M. C. (2009). Role of phosphatidylinositol 3-kinase pathway (PI3K/Akt) in humans. *Revista Ciencias de la Salud*, 7(2), 47-66.
- Smith, U. (2012). PTEN—linking metabolism, cell growth, and cancer. *New England Journal of Medicine*, 367(11), 1061-1063.
- Smith, U., & Gale, E. A. (2010). Cancer and Diabetes: are we ready for prime time? *Diabetologia*, 53(8), 1541-1544.
- Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ. The metabolic syndrome. *Lancet*. 2005
- Zimmet P, Alberti KG, Shaw J. Global and societal implications of the Diabetes epidemic. *Nature*. 2001;414:782-7.
- Zimmet P, Alberti G, Shaw JE. Mainstreaming the metabolic syndrome: a definitive definition. Editorial. *Med J Aust*. 2005;183: 175-6.
- American Diabetes Association. (2014). Diagnosis and classification of Diabetes mellitus. *Diabetes care*, 37(Supplement 1), S81-S90.
- Peairs KS, Barone BB, Snyder CF, Yeh HC, et al. Diabetes mellitus and breast cancer outcomes: a systematic review and meta-analysis. *J Clin Oncol* 2011;29:40-46.
- Lillioja, S., Mott, D. M., Howard, B. V., Bennett, P. H., Yki-Järvinen, H., Freymond, D., ... & Bogardus, C. (1988). Impaired glucose tolerance as a disorder of insulin action. *New England Journal of Medicine*, 318(19), 1217-1225.

- Stern, M. P., Williams, K., González-Villalpando, C., Hunt, K. J., & Haffner, S. M. (2004). Does the metabolic syndrome improve identification of individuals at risk of type 2 Diabetes and/or cardiovascular disease?. *Diabetes care*, 27(11), 2676-2681.
- Artola Menéndez, S., González Sarmiento, E., & Sánchez-Ledesma, M. (2006). Fisiopatología y patogenia del síndrome metabólico. Documento de consenso sobre el síndrome metabólico de la Sociedad Española de Medicina Interna y de la Sociedad Española de Medicina de Familia y Comunitaria. *Med Clin Monogr (Barc)*, 7, 13-22.
- Stumvoll, M., Goldstein, B. J., & van Haeften, T. W. (2005). Type 2 Diabetes: principles of pathogenesis and therapy. *The Lancet*, 365(9467), 1333-1346.
- Costello JF, Plass C. Methylation matters. *J Med Genet*. 2001;38:285-303.
- Taylor, S. I., Cama, A., Accili, D., Barbetti, F., Quon, M. J., Sierra, M. D. L. L., ... & Moncada, V. Y. (1992). Mutations in the insulin receptor gene. *Endocrine Reviews*, 13(3), 566-595.
- Zierath, J. R., Krook, A., & Wallberg-Henriksson, H. (2000). Insulin action and insulin resistance in human skeletal muscle. *Diabetologia*, 43(7), 821-835.
- Chiasson, J. L. (2007). Prevention of Type 2 Diabetes: fact or fiction?. *Expert opinion on pharmacotherapy*, 8(18), 3147-3158.
- Yates, T., Khunti, K., Bull, F., Gorely, T., & Davies, M. J. (2007). The role of physical activity in the management of impaired glucose tolerance: a systematic review. *Diabetologia*, 50(6), 1116-1126.
- UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. (1998). Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 Diabetes (UKPDS 33). *The lancet*, 352(9131), 837-853.
- Maghnie M: Diabetes insipidus. *Horm Res* 2003; 59 (Suppl 1): 42-54
- Saborio P, Tipton GA, Chan JC: Diabetes insipidus. *Pediatr Rev* 2000; 21 (4): 122-9.
- American Diabetes Association. (2003). Report of the expert committee on the diagnosis and classification of Diabetes mellitus. *Diabetes care*, 26(suppl 1), s5-s20.
- Salmeron, J., Hu, F. B., Manson, J. E., Stampfer, M. J., Colditz, G. A., Rimm, E. B., & Willett, W. C. (2001). Dietary fat intake and risk of type 2 Diabetes in women. *The American journal of clinical nutrition*, 73(6), 1019-1026.
- DeFronzo, R. A. (1997). Pathogenesis of type 2 diabetes: metabolic and molecular implications for identifying diabetes genes. *Diabetes reviews*, 5, 177-266.
- Duarte, M. J., Romero, F. S., Espinosa, L. R. F., & Sánchez, R. G. (2016). diabetes y cáncer ¿ es real la asociación?. *Med Int Méx*, 32(3), 318-329.
- Coughlin SS, Calle EE, Teras LR, Petrelli J, Thun MJ. Diabetes mellitus as a predictor of cancer mortality in a large cohort f US adults. *Am J Epidemiol* 2004;159:1160-1167
- Barturen, G. (2014). Regiones Genómicas implicadas en la metilación diferencial del ADN. Universidad de Granada
- Li, D. M., & Sun, H. (1998). PTEN/MMAC1/TEP1 suppresses the tumorigenicity and induces G1 cell cycle arrest in human glioblastoma cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(26), 15406-15411.

- Ortega Molina, A. (2011). Nuevas funciones del supresor de tumores PTEN en metabolismo y envejecimiento.
- Chow, L. M., & Baker, S. J. (2006). PTEN function in normal and neoplastic growth. *Cancer letters*, 241(2), 184-196.
- Simpson, L., & Parsons, R. (2001). PTEN: life as a tumor suppressor. *Experimental cell research*, 264(1), 29-41.
- Bonneau, D., & Longy, M. (2000). Mutations of the human PTEN gene. *Human mutation*, 16(2), 109-122.
- Eng, C. (2003). PTEN: one gene, many syndroSM. *Human mutation*, 22(3), 183-198.
- LoPiccolo, J., Ballas, M. S., & Dennis, P. A. (2007). PTEN hamartomatous tumor syndroSM (PHTS): rare syndroSM with great relevance to common cancers and targeted drug development. *Critical reviews in oncology/hematology*, 63(3), 203-214.
- Stambolic, V., Suzuki, A., De La Pompa, J. L., Brothers, G. M., Mirtsos, C., Sasaki, T., ... & Mak, T. W. (1998). Negative regulation of PKB/Akt-dependent cell survival by the tumor suppressor PTEN. *Cell*, 95(1), 29-39.
- Di Cristofano, A., & Pandolfi, P. P. (2000). The multiple roles of PTEN in tumor suppression. *Cell*, 100(4), 387-390.
- Kishimoto, H., Hamada, K., Saunders, M., Backman, S., Sasaki, T., Nakano, T., ... & Suzuki, A. (2003). Physiological functions of Pten in mouse tissues. *Cell structure and function*, 28(1), 11-21.
- Suzuki, A., Nakano, T., Mak, TW, y Sasaki, T. (2008). Retrato de PTEN: mensajes de ratones mutantes. *Cancer science* ,
- Lee, J. O., Yang, H., Georgescu, M. M., Di Cristofano, A., Maehama, T., Shi, Y., ... & Pavletich, N. P. (1999). Crystal structure of the PTEN tumor suppressor: implications for its phosphoinositide phosphatase activity and membrane association. *Cell*, 99(3), 323-334.
- Iijima, M., & Devreotes, P. (2002). Tumor suppressor PTEN mediates sensing of chemoattractant gradients. *Cell*, 109(5), 599-610.
- Vazquez, F., & Devreotes, P. (2006). Regulation of PTEN function as a PIP3 gatekeeper through membrane interaction. *Cell Cycle*, 5(14), 1523-1527.
- Campbell, R. B., Liu, F., & Ross, A. H. (2003). Allosteric activation of PTEN phosphatase by phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate. *Journal of Biological Chemistry*, 278(36), 33617-33620.
- Redfern, R. E., Redfern, D., Furgason, M. L., Munson, M., Ross, A. H., & Gericke, A. (2008). PTEN phosphatase selectively binds phosphoinositides and undergoes structural changes. *Biochemistry*, 47(7), 2162-2171.
- Gil, A., Andrés-Pons, A., Fernández, E., Valiente, M., Torres, J., Cervera, J., & Pulido, R. (2006). Nuclear localization of PTEN by a Ran-dependent mechanism enhances apoptosis: Involvement of an N-terminal nuclear localization domain and multiple nuclear exclusion motifs. *Molecular biology of the cell*, 17(9), 4002-4013.
- Denning, G., Jean-Joseph, B., Prince, C., Durden, D. L., & Vogt, P. K. (2007). A short N-terminal sequence of PTEN controls cytoplasmic localization and is required for suppression of cell growth. *Oncogene*, 26(27), 3930.

- Das, S., Dixon, J. E., & Cho, W. (2003). Membrane-binding and activation mechanism of PTEN. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(13), 7491-7496.
- McConnachie, G., Ian, P. A. S. S., Walker, S. M., & Downes, C. P. (2003). Interfacial kinetic analysis of the tumour suppressor phosphatase, PTEN: evidence for activation by anionic phospholipids. *Biochemical Journal*, 371(3), 947-955.
- Sheng, M., & Sala, C. (2001). PDZ domains and the organization of supramolecular complexes. *Annual review of neuroscience*, 24(1), 1-29.
- Tolkacheva, T., & Chan, A. M. (2000). Inhibition of H-Ras transformation by the PTEN/MMAC1/TEP1 tumor suppressor gene. *Oncogene*, 19(5), 680.
- Leslie, N. R., Alex, G. R. A. Y., Ian, P. A. S. S., ORCHISTON, E. A., & DOWNES, C. P. (2000). Analysis of the cellular functions of PTEN using catalytic domain and C-terminal mutations: differential effects of C-terminal deletion on signalling pathways downstream of phosphoinositide 3-kinase. *Biochemical Journal*, 346(3), 827-833.
- Cantley, L. C. (2002). The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science*, 296(5573), 1655-1657.
- Sherr, C. J., & Weber, J. D. (2000). The ARF/p53 pathway. *Current opinion in genetics & development*, 10(1), 94-99.
- Brunet, A., Bonni, A., Zigmond, M. J., Lin, M. Z., Juo, P., Hu, L. S., ... & Greenberg, M. E. (1999). Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *cell*, 96(6), 857-868.
- Chen, Z., Trotman, L. C., Shaffer, D., Lin, H. K., Dotan, Z. A., Niki, M., ... & Cordon-Cardo, C. (2005). Crucial role of p53-dependent cellular senescence in suppression of Pten-deficient tumorigenesis. *Nature*, 436(7051), 725.
- Freeman, D. J., Li, A. G., Wei, G., Li, H. H., Kertesz, N., Lesche, R., ... & Liu, X. (2003). PTEN tumor suppressor regulates p53 protein levels and activity through phosphatase-dependent and-independent mechanisms. *Cancer cell*, 3(2), 117-130.
- Myers, M. P., & Tonks, N. K. (1997). PTEN: sometiSM taking it off can be better than putting it on. *The American Journal of Human Genetics*, 61(6), 1234-1238.
- Maehama, T., Taylor, G. S., & Dixon, J. E. (2001). PTEN and myotubularin: novel phosphoinositide phosphatases. *Annual review of biochemistry*, 70(1), 247-279.
- Courtney, K. D., Corcoran, R. B., & Engelman, J. A. (2010). The PI3K pathway as drug target in human cancer. *Journal of clinical oncology*, 28(6), 1075-1083.
- Di Cristofano, A., & Pandolfi, P. P. (2000). The multiple roles of PTEN in tumor suppression. *Cell*, 100(4), 387-390.
- Leslie, N. R., & Downes, C. P. (2002). PTEN: The down side of PI 3-kinase signalling. *Cellular signalling*, 14(4), 285-295.
- Simpson, L., & Parsons, R. (2001). PTEN: life as a tumor suppressor. *Experimental cell research*, 264(1), 29-41.
- Dey, N., Crosswell, H. E., De, P., Parsons, R., Peng, Q., Su, J. D., & Durden, D. L. (2008). The protein phosphatase activity of PTEN regulates SRC family kinases and controls glioma migration. *Cancer research*, 68(6), 1862-1871.

- Eng, C. (2003). PTEN: one gene, many syndroSM. *Human mutation*, 22(3), 183-198.
- Arboleda, M. J., Lyons, J. F., Kabbinavar, F. F., Bray, M. R., Snow, B. E., Ayala, R., ... & Slamon, D. J. (2003). Overexpression of AKT2/protein kinase B β leads to up-regulation of β 1 integrins, increased invasion, and metastasis of human breast and ovarian cancer cells. *Cancer research*, 63(1), 196-206.
- Testa, J. R., & Bellacosa, A. (2001). AKT plays a central role in tumorigenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(20), 10983-10985.
- Yamada, K. M., & Araki, M. (2001). Tumor suppressor PTEN: modulator of cell signaling, growth, migration and apoptosis. *Journal of cell science*, 114(13), 2375-2382.
- Blanco-Aparicio, C., Renner, O., Leal, J. F., & Carnero, A. (2007). PTEN, more than the AKT pathway. *Carcinogenesis*, 28(7), 1379-1386.
- Lin, H. K., Hu, Y. C., Lee, D. K., & Chang, C. (2004). Regulation of androgen receptor signaling by PTEN (phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10) tumor suppressor through distinct mechanisms in prostate cancer cells. *Molecular endocrinology*, 18(10), 2409-2423.
- Maier, D., Jones, G., Li, X., Schönthal, A. H., Gratzl, O., Van Meir, E. G., & Merlo, A. (1999). The PTEN lipid phosphatase domain is not required to inhibit invasion of glioma cells. *Cancer research*, 59(21), 5479-5482.
- Li, Y., Guessous, F., Kwon, S., Kumar, M., Ibadapo, O., Fuller, L., ... & Laterra, J. (2008). PTEN has tumor-promoting properties in the setting of gain-of-function p53 mutations. *Cancer research*, 68(6), 1723-1731.
- LoPiccolo, J., Ballas, M. S., & Dennis, P. A. (2007). PTEN hamartomatous tumor syndroSM (PHTS): rare syndroSM with great relevance to common cancers and targeted drug development. *Critical reviews in oncology/hematology*, 63(3), 203-214.
- Saltiel, A. R., & Kahn, C. R. (2001). Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature*, 414(6865), 799-806.
- Avruch, J. (1998). Insulin signal transduction through protein kinase cascades. *Molecular and cellular biochemistry*, 182(1-2), 31-48.
- Ebina, Y., Ellis, L., Jarnagin, K., Edery, M., Graf, L., Clauser, E., ... & Roth, R. A. (1985). The human insulin receptor cDNA: the structural basis for hormone-activated transmembrane signalling. *Cell*, 40(4), 747-758.
- Youngren, J. F. (2007). Regulation of insulin receptor function. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 64(7), 873-891.
- Engelman, J. A., Luo, J., & Cantley, L. C. (2006). The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. *Nature reviews. Genetics*, 7(8), 606.
- Reyes, J. A. O., & Plancarte, A. A. (2008). Bases moleculares de las acciones de la insulina. *Revista de Educación Bioquímica*, 27(1), 9-18.
- Le Roith, D., Quon, M. J., & Zick, Y. E. H. I. E. L. (2003). Molecular and cellular aspects of insulin resistance: implications for Diabetes. *Signal transduction and human disease*, 90, 171.

- Paz, K. E. R. E. N., & Zick, Y. E. H. I. E. L. (2002). Ser/Thr phosphorylation of insulin receptor signaling molecules and insulin resistance. *Insulin Signaling: From cultured cells to animal models*. Editor: Gruenberg G, Zick Y. Taylor & Francis, New York, 259-280.
- Sesti, G. (2006). Pathophysiology of insulin resistance. *Best practice & research Clinical endocrinology & metabolism*, 20(4), 665-679.
- Weyer, C., Bogardus, C., Mott, D. M., & Pratley, R. E. (1999). The natural history of insulin secretory dysfunction and insulin resistance in the pathogenesis of type 2 Diabetes mellitus. *Journal of Clinical Investigation*, 104(6), 787.
- Shi, Y., Wang, J., Chandarlapaty, S., Cross, J., Thompson, C., Rosen, N., & Jiang, X. (2014). PTEN is a protein tyrosine phosphatase for IRS1. *Nature structural & molecular biology*, 21(6), 522-527.
- Gutiérrez-Rodelo, C., Roura-Guiberna, A., & Olivares-Reyes, J. A. (2017). Mecanismos Moleculares de la Resistencia a la Insulina: Una Actualización. *Gaceta Médica de México*, 153(2), 214-228.
- Sun, J., Zhou, W., Ma, D., & Yang, Y. (2010). Endothelial cells promote neural stem cell proliferation and differentiation associated with VEGF activated Notch and Pten signaling. *Developmental Dynamics*, 239(9), 2345-2353.
- Green, R. A., Wollman, R., & Kaplan, K. B. (2005). APC and EB1 function together in mitosis to regulate spindle dynamics and chromosome alignment. *Molecular biology of the cell*, 16(10), 4609-4622.
- Steigerwald, K., Behbehani, G. K., Combs, K. A., Barton, M. C., & Groden, J. (2005). The APC Tumor Suppressor Promotes Transcription-Independent Apoptosis *In vitro* 11NIH CA 63517 (J. Groden) and CA 53683 (MC Barton) and Albert J. Ryan Foundation (K. Steigerwald). *Molecular cancer research*, 3(2), 78-89.
- Prendergast, J. G., Campbell, H., Gilbert, N., Dunlop, M. G., Bickmore, W. A., & Semple, C. A. (2007). Chromatin structure and evolution in the human genome. *BMC evolutionary biology*, 7(1), 72.
- Paulsen, M., & Ferguson-Smith, A. C. (2001). DNA methylation in genomic imprinting, development, and disease. *The Journal of pathology*, 195(1), 97-110.
- Boyle P, Levin B, Editores. *World Cancer Report 2008*. Lyon, Francia: International Agency for Research on Cancer; 2008:
- Jaenisch, R., & Bird, A. (2003). Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nature genetics*, 33(3s), 245.
- Rhee, I., Bachman, K. E., Park, B. H., Jair, K. W., Yen, R. W. C., Schuebel, K. E., ... & Baylin, S. B. (2002). DNMT1 and DNMT3b cooperate to silence genes in human cancer cells. *Nature*, 416(6880), 552-556.
- Ehrich, M., Nelson, M. R., Stanssens, P., Zabeau, M., Liloglou, T., Xinarianos, G., ... & van den Boom, D. (2005). Quantitative high-throughput analysis of DNA methylation patterns by base-specific cleavage and mass spectrometry. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(44), 15785-15790.

- HoISM, R., & Soloway, P. D. (2006). Regulation of imprinted DNA methylation. *Cytogenetic and genome research*, 113(1-4), 122-129.
- Stirzaker, C., Song, J. Z., Davidson, B., & Clark, S. J. (2004). Transcriptional gene silencing promotes DNA hypermethylation through a sequential change in chromatin modifications in cancer cells. *Cancer research*, 64(11), 3871-3877.
- Takai, D., & Jones, P. A. (2002). Comprehensive analysis of CpG islands in human chromosom 21 and 22. *Proceedings of the national academy of sciences*, 99(6), 3740-3745.
- Mutskov, V. J., Farrell, C. M., Wade, P. A., Wolffe, A. P., & Felsenfeld, G. (2002). The barrier function of an insulator couples high histone acetylation levels with specific protection of promoter DNA from methylation. *Genes & development*, 16(12), 1540-1554.
- Dworkin, A. M., Huang, T. H. M., & Toland, A. E. (2009, June). Epigenetic alterations in the breast: Implications for breast cancer detection, prognosis and treatment. In *Seminars in cancer biology* (Vol. 19, No. 3, pp. 165-171). Academic Press.
- Esteller, M. (2008). Epigenetics in cancer. *n Engl j Med*, 2008(358), 1148-1159.
- Teodoridis, J. M., Hardie, C., & Brown, R. (2008). CpG island methylator phenotype (CIMP) in cancer: causes and implications. *Cancer letters*, 268(2), 177-186.
- Piotrowski, A., Benetkiewicz, M., Menzel, U., de Ståhl, T. D., Mantripragada, K., Grigelionis, G., ... & Śrutek, E. (2006). Microarray-based survey of CpG islands identifies concurrent hyper-and hypomethylation patterns in tissues derived from patients with breast cancer. *Genes, Chromosom and Cancer*, 45(7), 656-667.
- Ding, J., Gao, Y., Liu, R., Xu, F., & Liu, H. (2011). Association of PTEN polymorphisms with susceptibility to hepatocellular carcinoma in a Han Chinese population. *DNA and cell biology*, 30(4), 229-234.
- Ferri C, et al. (2014) "Expression of LYN and PTEN genes in chronic myeloid leukemia and their importance in therapeutic strategy". *Blood Cells Mol Dis*. 52(2-3):121-5.
- Butler, M., McKay, R. A., Popoff, I. J., Gaarde, W. A., Witchell, D., Murray, S. F., ... & Monia, B. P. (2002). Specific inhibition of PTEN expression reverses hyperglycemia in diabetic mice. *Diabetes*, 51(4), 1028-1034.
- Guttmacher AE, Collins FS. Genomic medicine—a primer. *N Engl J Med*. 2002;347:1512-20
- Porta M. The genome sequence is a jazz score. *Int J Epidemiol*. 2003;32:29-31.
- Caporaso NE. Why have we failed to find the low penetrance genetic constituents of common cancers? *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2002;11:1544-9.
- Tabor HK, Risch NJ, Myers RM. Opinion: candidate-gene approaches for studying complex genetic traits: practical considerations. *Nat Rev Genet*. 2002;3:391-7
- Maehama T, Dixon JE: El supresor de tumores, PTEN / MMAC1, desfosforila el segundo mensajero lipídico, phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate. *J Biol Chem* 273 : 13375 - 13378, 1998
- Dupont J, Renou JP, Shani M, Hennighausen L, LeRoith D: La sobreexpresión de PTEN suprime la proliferación y diferenciación y mejora la apoptosis del epitelio mamario de ratón. *J Clin Invest* 110 : 815 - 825, 2002

- Nakashima N, Sharma PM, Imamura T, Bookstein R, Olefsky JM: The tumor suppressor PTEN negatively regulates insulin signaling in 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem* 275 :12889 – 12895.,2000
- Lo YT, Tsao CJ, Liu IM, Liou SS, Cheng JT: Increase of PTEN gene expression in insulin resistance. *Horm Metab Res* 36 :662 –666,2004
- Wijesekara N, Konrad D, Eweida M, Jefferies C, Liadis N, Giacca A, Crackower M, Suzuki A, Mak TW, Kahn CR, Klip A, Woo M: Muscle-specific Pten deletion protects against insulin resistance and Diabetes. *Mol Cell Biol* 25 :1135 –1145,2005
- Nguyen KT, Tajmir P, Lin CH, Liadis N, Zhu XD, Eweida M, Tolasa-Karaman G, Cai F, Wang R, Kitamura T, Belsham DD, Wheeler MB, Suzuki A, Mak TW, Woo M: Essential role of Pten in body size determination and pancreatic beta-cell homeostasis in vivo. *Mol Cell Biol* 26 :4511 – 4518,2006.
- Vílchez Rienda, J. D. (2016). Modulación de rutas de señalización, metabolismo proteico y diferenciación celular en músculo y cerebro.
- Wang XL, Zhang L, Youker K, Zhang MX, Wang J, LeMaire SA, Coselli JS, Shen YH: Free fatty acids inhibit insulin signaling–stimulated endothelial nitric oxide synthase activation through upregulating PTEN or inhibiting Akt kinase. *Diabetes* 55 :2301 –2310,2006
- Schones DE, Leung A, Natarajan R. Chromatin Modifications Associated with Diabetes and Obesity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2015;35:1557-61.
- Elizazu Pérez, J. (2019). Sobreexpresión de PTEN como terapia preventiva en cáncer.
- Allain CC, Poon LS, Chan CS, et al. Enzymatic determination of total serum cholesterol. *Clin Chem* 1974;20(4):470–5.
- Roeschlau P, Bernt E, Gruber WA. Enzymatic determination of total cholesterol in serum. *Z Klin Chem Klin Biochem* 1974;12:226.
- Fossati P, Prencipe L. Serum triglycerides determined colorimetrically with an enzyme that produces hydrogen peroxide. *Clin Chem* 1982;28:2077–80.
- McGowan MW, Artiss JD, Strandbergh DR, et al. A peroxidase-coupled method for the colorimetric determination of serum triglycerides. *Clin Chem* 1983;29:538–42.
- Sun J, Khalid S, Rozakis-Adcock M, Fantus IG, Jin T. P-21-activated protein kinase-1 functions as a linker between insulin and Wnt signaling pathways in the intestine. *Oncogene.* 2009;28(35):3132-44.
- Vigneri P, Frasca F, Sciacca L, Pandini G, Vigneri R. Diabetes and cancer. *Endocr Relat Cancer.* 2009;16(4):1103-23.
- Cannata D, Fierz Y, Vijayakumar A, LeRoith D. Type 2 Diabetes and cancer: What Is the Connection? *Mt Sinai J Med.* 2010;77(2):197-213.
- Godsland IF. Insulin resistance and hyperinsulinaemia in the development and progression of cancer. *Clin Sci.* 2009;118(5):315-32.
- Giouleme O, Diamantidis MD, Katsaros MG. Is diabetes a causal agent for colorectal cancer? Pathophysiological and molecular mechanisms. *World J Gastroenterol.* 2011;17(4):444-8.

- Qiu, W., Federico, L., Naples, M., Avramoglu, R. K., Meshkani, R., Zhang, J., ... & Kontos, C. D. (2008). Phosphatase and tensin homolog (PTEN) regulates hepatic lipogenesis, microsomal triglyceride transfer protein, and the secretion of apolipoprotein B-containing lipoproteins. *Hepatology*, 48(6), 1799-1809.
- Carvajal, Carlos. (2014). Lipoproteínas: metabolismo y lipoproteínas aterogénicas. *Medicina Legal de Costa Rica*, 31(2), 88-94. Retrieved November 23, 2019, from http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1409-00152014000200010&lng=en&tlng=es.
- Pan X. Hussain M. Gut triglyceride production. *Biochim Biophys Acta* 2012;1821(5):727-735. [Links]
- Hussain M. Rava P. Walsh M. Rana M. Iqbal J. Multiple functions of microsomal triglyceride transfer protein. *Nutrition & Metabolism* 2012: 9(14)1-16.
- Vaziri N. Causes of dysregulation of lipid metabolism in chronic renal failure. *Semin Dial.* 2009; 22(6):644-651.
- Sundaram M. Yao Z. Recent progress in understanding protein and lipid factors affecting hepatic VLDL assembly and secretion. *Nutrition & Metabolism* 2010: 7(35):1-17.
- Marrero Rodríguez, M. T. (2010). Metilación y expresión de genes en el cáncer diferenciado de tiroides. *Revista Cubana de Endocrinología*, 21(3), 340-350.
- e Zhu J. El patrón de metilación del ADN alterado y sus implicaciones en el cáncer de hígado. *Cell Res* 2005; 15: 272-80 M
- Muñoz, J., Inza, M. M., & Castresana, J. S. Análisis de metilación de los genes PTEN, MGMT, RASSF1A, p14/ARF y p16/INK4A en líneas celulares de tumores del sistema nervioso (2003)