



**ALTERACIONES EN LA EXHIBICION DE RECEPTOR DE INSULINA EN
LINFOCITOS TUMORALES HUMANOS IMPUESTAS POR LA DIABETES
METABOLIC CONDITIONS IN DIABETES ALTER THE EXHIBITION OF
INSULIN RECEPTOR IN HUMAN TUMORAL T CELLS.**

Niazi Dehbagher, N.

Facultad de CC de la Salud. URJC. Madrid. Correspondencia: n.niazi@alumnos.urjc.es

RESUMEN

Las poblaciones obesa y diabética presentan frecuencias aumentadas de ciertos cánceres, por lo que urge encontrar marcadores tumorales de detección temprana. El **objetivo** de este trabajo es testar si las condiciones metabólicas de la diabetes alteran los niveles del receptor de insulina (IR) o su exhibición en linfocitos T tumorales humanos (Jurkat) mediante citometría de flujo y Western-blot. Los **resultados** indican que la hiperglucemia duplica los niveles totales de la subunidad beta del IR, mientras que disminuye los de la subunidad alfa. Los ácidos grasos en altas concentraciones reducen los niveles de ambas subunidades en ambiente hiperglucémico pero no en normoglucemia. La exhibición del receptor disminuye con la hiperglucemia pero aumenta un 60% con los ácidos grasos en hiperglucemia. **Concluimos**, por tanto, que las condiciones metabólicas de la diabetes alteran la funcionalidad del IR en linfocitos tumorales. Esto podría explicar que la diabetes favorezca el crecimiento tumoral.

Palabras clave: diabetes, receptor de insulina, Jurkat, hiperglucemia, hiperlipidemia.

ABSTRACT

Obese and diabetic population present higher frequencies of certain types of cancer. This justifies the need for early-stage tumoral markers. The aim of this study was to test the effects of diabetic metabolic conditions on insulin receptor (IR) protein levels and exhibition in human tumoral T cells (Jurkat) by Western-blot and flow cytometry, respectively. Our results indicate that hyperglycemia doubles the total protein levels of the beta subunit of the receptor, while lowering the levels of the alpha subunit. High free fatty acids levels (FFA) reduces the levels of both subunits in hyperglycemia, but not in normoglycemia. Hyperglycemia lowers the exhibition of IR but high FFA concentrations in hyperglycemic conditions increases it by 60%. We conclude that diabetic metabolic conditions alter the functionality of the IR in Jurkat cells. This could link diabetes to tumoral proliferation.

Key words: diabetes, insulin receptor, Jurkat, hyperglycemia, hyperlipidemia.

INTRODUCCIÓN

La población obesa y la diabética presentan frecuencias aumentadas de cánceres específicos (Shikata, et al. 2013, Tsilidis, et al. 2015) representando una enorme carga social y económica dada su creciente prevalencia.

La diabetes, tipos 1 y 2 (T1D y T2D) comparten con el cáncer alteraciones hormonales, metabólicas e inmunológicas (Cohen and LeRoith 2012). Los aumentos prolongados en las concentraciones de glucosa circulante (hiperglucemia) y de ácidos grasos libres son las alteraciones metabólicas mejor conocidas. La hiperglucemia favorece el desarrollo tumoral actuando sobre la célula tumoral, disminuyendo la vigilancia inmunológica y aumentando la secreción de citoquinas pro-inflamatorias, revisado en (García-Jiménez et al. 2014).

El grupo donde se ha desarrollado este trabajo ha demostrado que la hiperglucemia potencia la señalización tumoral a través de la vía Wnt/ β Catenina, implicada en el 95% de los cánceres gastrointestinales y otros (Chocarro-Calvo et al. 2013). La vía Wnt/ β Catenina induce la expresión del receptor de insulina (IR) (Singh, R., et al. 2013). El IR (que tiene efectos metabólicos y proliferativos) es la diana terapéutica por excelencia en diabetes y cáncer.

Tomado en conjunto, planteamos la hipótesis de que en linfocitos circulantes de pacientes diabéticos se alteren los niveles o exhibición del IR sirviendo esto como marcador tumoral de detección precoz. Para testar esta hipótesis hemos medido las variaciones en los niveles de IR y su exhibición en células Jurkat (derivadas de una leucemia linfocítica aguda) tras su

estimulación por hiperglucemia sin y con niveles elevados de ácidos grasos (AG) según concentraciones plasmáticas de lípidos en pacientes diabéticos (Clare et al., 2002).

MATERIALES Y MÉTODOS

Reactivos: D-(+)-Glucosa, 45% en H₂O (G8769). Los AG se obtuvieron de Sigma-Aldrich.

Cultivo celular y tratamientos: los linfocitos tumorales Jurkat se han cultivado en medio RPMI-1640 (Lonza) suplementado con 10% de suero fetal bovino a 37°C, con una saturación de CO₂ del 5% y una humedad del 95%. Las células (a 5·10⁵ células/ml) se sembraron en medio sin glucosa durante 24 horas y se trataron con la mezcla de AG a 100 μM en 0, 5 (normoglucemia) y 25 mM (hiperglucemia) de glucosa durante 18 h (ambos tratamientos).

Citometría de flujo: las células tratadas fueron lavadas 2x con PBS frío; incubadas con anti-IRα (Millipore), que reconoce el extremo N-terminal de la región extracelular del receptor 30 min a 4°C; lavadas 2x con PBS e incubadas con 488 anti-mouse (Life Tech), 45 min a 4°C en oscuridad; lavadas 2x con PBS e incubadas 10 min con 7-Aminoactinomycin D, 7AAD (BD Pharmingen), un compuesto fluorescente que se intercala en el ADN. El marcaje indirecto del receptor de insulina es visible en el citómetro en FL1; la señal producida por células muertas fue excluida gracias al marcaje directo por 7AAD (visible en FL4). **Western Blot:** Los extractos totales preparados con RIPA se cuantificaron empleando reactivo de Bradford y midiendo la absorbancia a 595 nm en espectrofotómetro, extrapolando la concentración de proteínas a partir de una recta patrón de concentraciones conocidas de albúmina de suero bovino. Para el Western Blot se usaron geles de poliacrilamida (10%) y anticuerpos anti-IRα e IR-β (Santa Cruz) y GAPDH (Sigma) como control de carga. **Análisis estadístico:** Los resultados muestran la media de tres réplicas biológicas independientes ± error estándar, n≥3. El análisis estadístico se realizó por ANOVA comparando las condiciones de hiperglucemia frente a normoglucemia aplicando un post-test de Bonferroni.

RESULTADOS

1. Las condiciones metabólicas de la diabetes modifican los niveles totales de IR en linfocitos T tumorales humanos.

Los niveles de IR se analizaron en extractos proteicos totales de células Jurkat tratadas como se indica en el apartado de materiales y métodos mediante “Western Blot”. Se detectaron los niveles de las subunidades IRα e IRβ y del precursor que contiene ambas subunidades.

En ausencia de glucosa los niveles de IRα son más elevados, pero en concentraciones de hiperglucemia disminuye un 25% respecto a los valores de normoglucemia en estas células

(Figura 1A). El precursor disminuye su movilidad y sus niveles en un 50% al aumentar la glucosa (Fig. 1C) sugiriendo que la glucosa favorece su procesamiento. La mezcla de AG reduce ligeramente los niveles de IR α en normoglucemia pero no en hiperglucemia aunque los datos no son estadísticamente significativos (Fig 1A). La hiperglucemia aumenta los niveles de IR β maduro un 50%. No hay ningún efecto añadido de la mezcla de AG (Fig 1B). Por tanto la hiperglucemia reduce los niveles de la subunidad α y aumenta los niveles de la subunidad β y del precursor (Fig 1A-C).

2. Las condiciones metabólicas de la diabetes alteran la exhibición del IR en linfocitos T tumorales humanos.

La glucosa tiende a reducir la exhibición del IR aunque no se ha hallado significación estadística dado lo preliminar de los resultados. En contraste, los AG tienden a aumentar su exhibición cuando no hay normoglucemia (Figura 2).

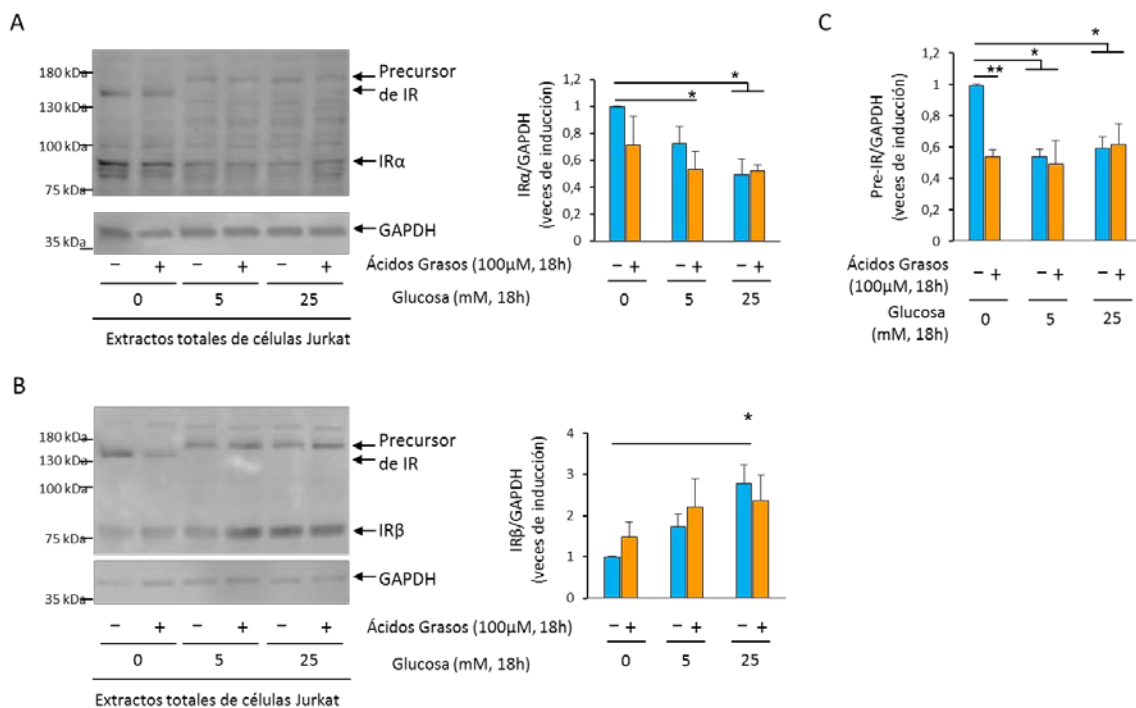


Figura 1. Cambios inducidos en los niveles de IR por las condiciones metabólicas de la diabetes. Western Blots representativos y análisis estadístico de las 3 réplicas biológicas. Los resultados representan la media \pm error estándar. WCE: Extractos proteicos totales. IR: Receptor de Insulina. GAPDH: Gliceraldehído fosfato deshidrogenasa. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

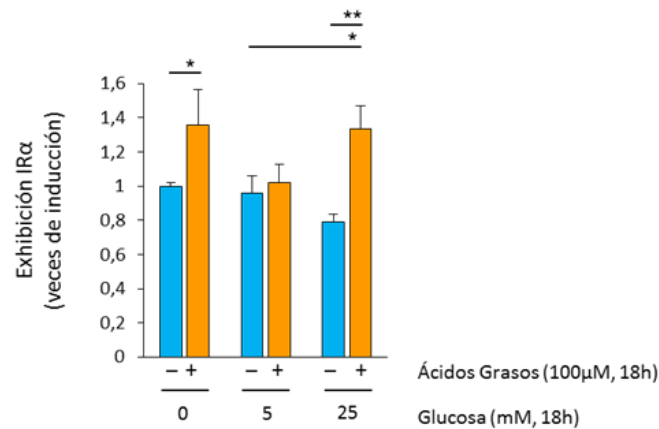


Fig 2. La exhibición del IR tiende a disminuir de forma dosis-dependiente con glucosa y a aumentar con ácidos grasos cuando no hay normoglucemia. Análisis de los resultados de 3 réplicas biológicas valoradas mediante citometría de flujo en células sin permeabilizar para evaluar la exhibición del IR en células Jurkat. Se valoró la intensidad media de fluorescencia (IMF) para cada condición. Los resultados representan las veces de inducción respecto a células crecidas en 0mM de glucosa y se expresan como la media de las tres réplicas±error estándar.

DISCUSIÓN

Las condiciones metabólicas de la diabetes modifican los niveles totales de IR y su exhibición en membrana en linfocitos T tumorales humanos. En concreto hemos detectado aumentos en los niveles de IR β y del precursor de IR, impuestos por la hiperglucemia comparada con la normoglucemia. Este aumento contrasta con la disminución de IR α . Esto se podría explicar teniendo en cuenta que el IR α se encuentra expuesto en la región extracelular del receptor. Por tanto sería susceptible de perderse durante la elaboración de los extractos proteicos totales. Sin embargo, la disminución en los niveles de IR α detectado en western-blot concuerda con la disminución en la exhibición del receptor detectada en citometría, en condiciones similares, indicando que se trata de una verdadera disminución que puede afectar a su funcionalidad y no de un artefacto técnico. Otros autores (Oleszczak et al. 2012) han evaluado los cambios impuestos por la hiperglucemia en linfocitos circulantes de individuos sanos sin detectar cambios significativos. Nuestros resultados son por tanto prometedores puesto que indicarían que los cambios detectados son específicos de células tumorales. No tenemos conocimiento de que se haya estudiado esto en linfocitos de individuos diabéticos.

CONCLUSIONES

Las condiciones metabólicas de la diabetes alteran la funcionalidad del receptor de insulina en linfocitos tumorales. Esto podría explicar, dada su importancia controlando el metabolismo y la apoptosis, que el ambiente metabólico de la diabetes favorezca el crecimiento tumoral.

BIBLIOGRAFIA

- Clore, J. N., J. Allred, D. White, J. Li and J. Stillman. 2002. The role of plasma fatty acid composition in endogenous glucose production in patients with type 2 diabetes mellitus. *Metabolism* 51(11): 1471-1477. doi: <http://dx.doi.org/10.1053/meta.2002.35202>.
- Cohen, D. H. and D. LeRoith. 2012. Obesity, type 2 diabetes, and cancer: the insulin and IGF connection. *Endocr Relat Cancer* 19(5): F27-45. doi: 10.1530/ERC-11-0374.
- Chocarro-Calvo, A., J. M. Garcia-Martinez, S. Ardila-Gonzalez, A. De la Vieja and C. Garcia-Jimenez. 2013. Glucose-induced beta-catenin acetylation enhances Wnt signaling in cancer. *Mol Cell* 49(3): 474-486. doi: 10.1016/j.molcel.2012.11.022.
- Garcia-Jimenez, C., J. M. Garcia-Martinez, A. Chocarro-Calvo and A. De la Vieja. 2014. A new link between diabetes and cancer: enhanced WNT/beta-catenin signaling by high glucose. *J Mol Endocrinol* 52(1): R51-66. doi: 10.1530/JME-13-0152.
- Shikata, K., T. Ninomiya and Y. Kiyohara. 2013. Diabetes mellitus and cancer risk: review of the epidemiological evidence. *Cancer Sci* 104(1): 9-14. doi: 10.1111/cas.12043.
- Singh, R., Renata B. De Aguiar, S. Naik, S. Mani, K. Ostadsharif, D. Wencker, M. Sotoudeh, R. Malekzadeh, Robert S. Sherwin and A. Mani. 2013. LRP6 Enhances Glucose Metabolism by Promoting TCF7L2-Dependent Insulin Receptor Expression and IGF Receptor Stabilization in Humans. *Cell Metabolism* 17(2): 197-209. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cmet.2013.01.009>.
- Tsilidis, K. K., J. C. Kasimis, D. S. Lopez, E. E. Ntzani and J. P. Ioannidis. 2015. Type 2 diabetes and cancer: umbrella review of meta-analyses of observational studies. *BMJ* 350: g7607. doi: 10.1136/bmj.g7607.