

Generación de vectores para la identificación de interacciones diferenciales de las isoformas de p85

Jesús Vallejo Díaz^{1,2*}, Ana C. Carrera²

1 Unidad de Bioquímica y Biología Molecular, Departamento de Biología de Sistemas, Facultad de Medicina, Universidad de Alcalá, 28871 Alcalá de Henares, Madrid, España. **2** Departamento de Inmunología y Oncología, Centro Nacional de Biotecnología/CSIC, Campus de Cantoblanco, Madrid E-28049, España.

Resumen

PIK3R2 codifica la subunidad reguladora p85 β de PI3K, un enzima que genera 3-polifosfoinosítidos en la membrana plasmática. La activación de PI3K dispara los mecanismos de supervivencia celular y migración. La sobreexpresión de p85 β se ha observado en diferentes tipos de cáncer como mama y colon, y esta expresión elevada de p85 β se correlaciona con un aumento de la señalización de PI3K y la progresión tumoral. La subunidad p85 α se expresa de forma mayoritaria en las células normales, pero recientemente se ha demostrado que en algunos tumores se reducen los niveles de expresión de p85 α y aumenta el de p85 β ("p85 β switch"). Este cambio en la expresión de p85 está correlacionado con la invasión y la progresión tumoral. En este trabajo trataremos de obtener herramientas de biología molecular que nos permitan determinar las interacciones diferenciales entre p85 α y p85 β con el objetivo de determinar la implicación de p85 β en la supervivencia, migración e invasión celular.

Palabras clave: PI3K; p85 β ; switch; pEBG(GST); pull down; tinción argéntica.

Cita: Vallejo J, Carrera A C (2013) Generación de vectores para la identificación de interacciones diferenciales de las isoformas de p85. *Dianas* 2(2): e20130907. ISSN 1886-8746 journal.dianas.20130907
URI <http://hdl.handle.net/10017/15181>

Editores: María José Carmena y Alberto Domingo, Departamento de Biología de Sistemas, Unidad de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de Alcalá, Alcalá de Henares, Madrid, España.

Recibido: 26 de junio de 2013

Copyright: © 2013 Vallejo y Carrera. Este es un artículo open-access distribuido bajo los términos de una licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 3.0 Unported. http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/deed.es_ES

*E-mail: jevadi85@gmail.com



Introducción

El enzima fosfatidil inositol trifosfato (PI3K) es uno de los componentes principales en la vía de señalización PI3K/Akt/mTOR, implicada en múltiples funciones celulares como proliferación celular, apoptosis, angiogénesis y biosíntesis proteica y ribosomal [1].

La desregulación de esta vía de señalización está directamente implicada con diferentes tipos de cáncer [1,2]. Se ha demostrado que en todos estos casos se produce una hiperactivación de la vía de señalización PI3K, bien sea por activación constitutiva de un receptor tirosina quinasa o por mutaciones en intermediarios o inhibidores de esta vía de señalización, como PTEN [3]

Existen varias isoformas de PI3K y se han constituido diferentes clases, agrupándolas según estructura, preferencia de sustrato, etc. Nuestros estudios se centran en los enzimas PI3K de clase Ia [4,5]. Desde el punto de vista estructural, PI3K de clase Ia está compuesto por una subunidad catalítica p110 y una subunidad reguladora p85, actuando como quinasa sobre lípidos de la membrana para generar distintos fosfoinosítidos (PIP2, PIP3) que activarán numerosos efectores implicados en el metabolismo celular.

Aún subsiste la discusión acerca de la posibilidad de que las subunidades de PI3K lleven adelante funciones como monómeros. En este sentido se conoce la correlación entre el aumento del número de copias del gen que codifica la subunidad catalítica p110 α y la aparición de cáncer de colon o de ovarios [6], y también se ha demostrado que la subunidad p110 β está relacionada con la respuesta celular tras la ruptura de la doble cadena de DNA [7]. Por otra parte, la subunidad reguladora p85 α se encuentra de manera ubicua en la célula, mientras que p85 β se encuentra en núcleo y citosol [8], lo que hace suponer posibles interacciones diferenciales.

Nosotros hemos generado una nueva herramienta que nos permitirá determinar las diferentes interacciones moleculares de p85 α y β , pudiendo así estudiar las diferentes funciones de cada subunidad.

Resultados

Diseño de la estrategia de clonación

Para comprobar interacciones diferenciales entre isoformas de p85, una aproximación útil son los ensayos de “pull-down”. Esta técnica de concentración, se basa en la captura selectiva de proteínas de interés, a las que se le ha fusionado el enzima glutatión S- transferasa (GST). El enzima fusionado reconocerá su sustrato (glutatión) que, unido a soportes inertes (agarosa, sepharosa, etc), nos permite arrastrar y purificar aquella proteína de interés, y sus posibles interacciones.

Inicialmente, las isoformas α y β se encuentran en vectores base diferentes pertenecientes a la colección propia del laboratorio. Por ello es necesario subclonarlos a un mismo plásmido, con objeto de reducir los diferentes condicionantes que pueden afectar a nuestros trabajos posteriores como por ejemplo, la eficacia de expresión y transfección del vector. Para que las construcciones sean útiles para los ensayos de “pull down”, utilizamos como nuevo vector base el plásmido pEBG (GST). Este plásmido presenta el promotor SV-40, y el gen que expresa la proteína GST justo antes del sitio de clonaje. De esta forma, tras la inserción de una secuencia codificante obtendremos una proteína de fusión compuesta por GST unida a la proteína generada (Figura 1).

Partimos de las secuencias de p85 α y p85 β de GeneBank (hp85 β : HGNC:8980; mp85 α : MGI:97583) y mediante estudios bioinformáticos obtuvimos las posibles dianas de enzimas de restricción en dichas secuencias. Dado que necesitamos que el marco de lectura se mantenga, también evaluamos las dianas de restricción presentes el vector pEBG(GST), de modo que seleccionamos aquella que nos permitía conseguir nuestro propósito. El esquema de la figura 2 muestra esta estrategia para los casos de p85 α y β .

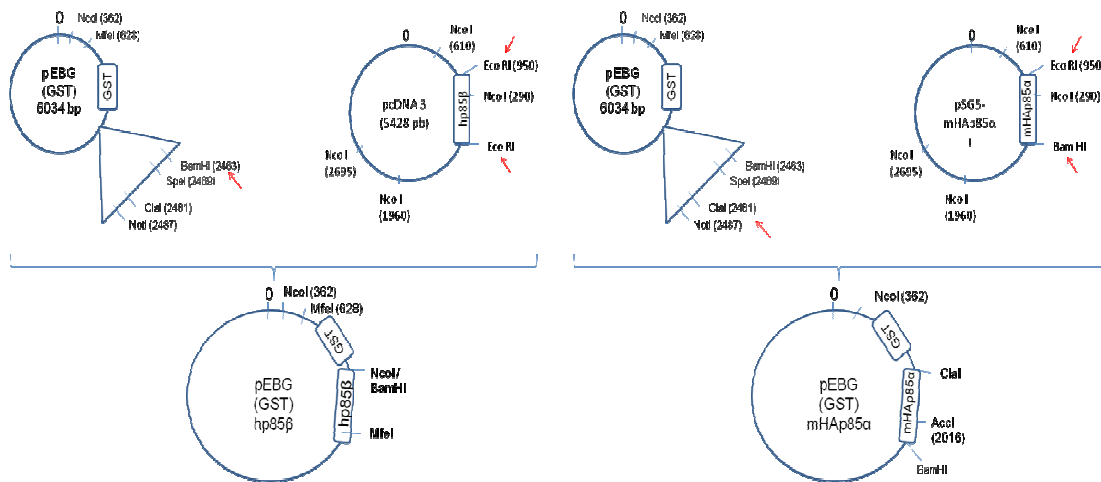


Figura 1.- Esquema de los vectores de partida y la construcción final del vector pEBG(GST)-hp85 β y pEBG(GST)-mHAp85 α .

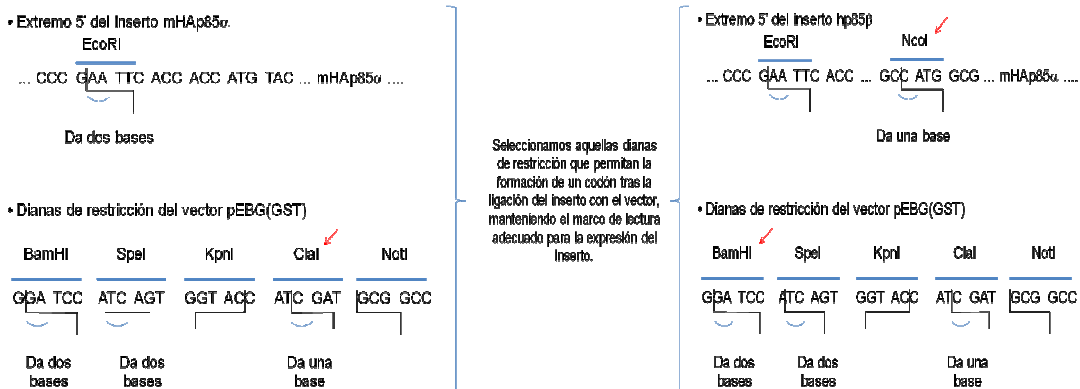


Figura 2.- Proceso de selección de la diana de restricción en el vector pEBG para la inserción del fragmento mHAp85 α .

Escisión de fragmentos, ligación y comprobación del sentido del inserto

El primer paso en la generación del nuevo vector consistió en la digestión del vector original con el enzima EcoRI. Dicha enzima debería linealizar el plásmido y escindir el fragmento hp85 β de interés (Figura 3A). Como podemos ver en la figura 3A, obtenemos una banda de ~2,5 Kb, que corresponde a

dicho fragmento, y una banda de 5,4 Kb que corresponde al resto de la secuencia plasmídica. Tras realizar una electroforesis en gel de agarosa de bajo punto de fusión, el fragmento hp85β fue purificado y posteriormente digerido con el enzima NcoI, proceso en el cual se acortó hasta ~2,2Kb. En este momento, se procedió a la modificación de los extremos cohesivos en romos, por medio del tratamiento con el enzima Klenow, que presenta una actividad 3' – 5', completando los extremos simplexos con desoxinucleótidos [9].

Por su parte, el vector receptor pEBG(GST) presenta una diana única en su sitio de clonación para la enzima BamHI. Tras digestión, se observa la correcta linealización del vector (Figura 3C). Posteriormente se trató el vector linealizado con el enzima Klenow formándose los extremos romos, y por último fueron tratados con fosfatasa alcalina, la cual desfosforila los extremos 5' (Figura 3D).

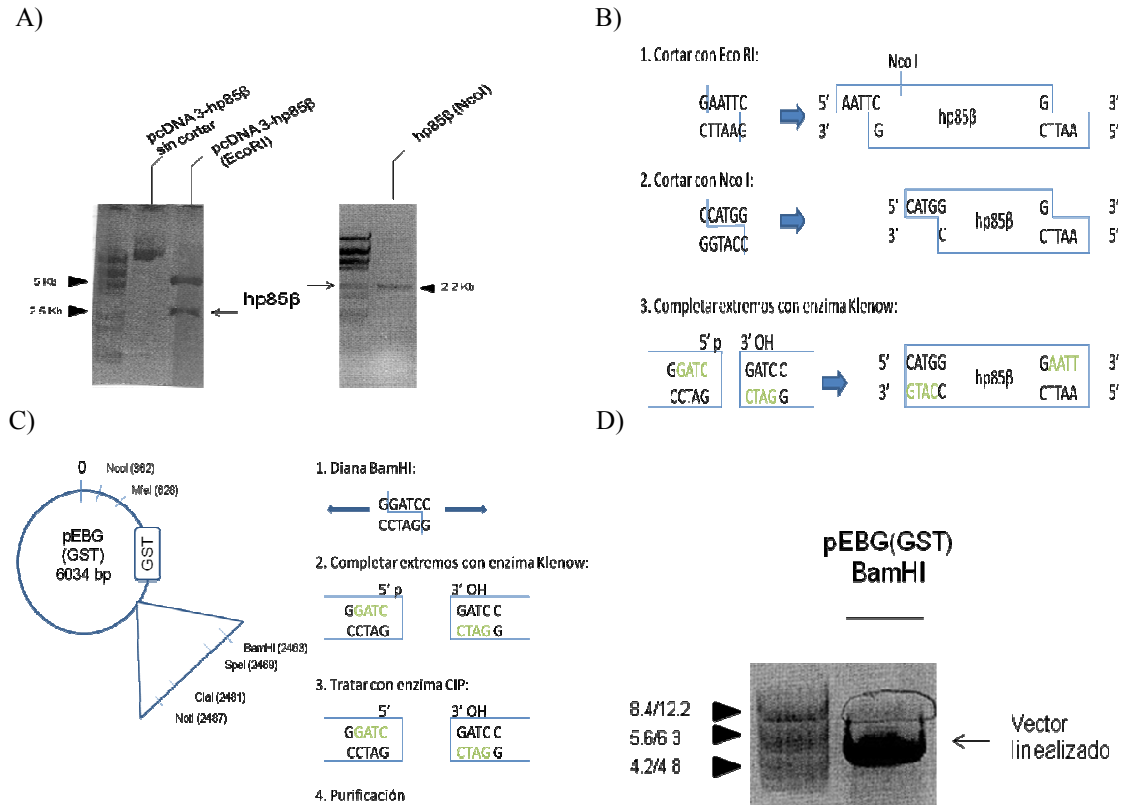


Figura 3.- A) Electroforesis en gel de agarosa para identificar y aislar el fragmento hp85β. B) Proceso de escisión del fragmento hp85β. C) Proceso de linealización del vector pEBG(GST). D) Electroforesis en gel de agarosa para identificar el vector linealizado.

En el caso de la generación del nuevo vector para el inserto, el vector pEBG(GST) se trató en iguales condiciones, excepto la enzima de restricción utilizada para su linealización, que fue ClaI. En el caso del fragmento mHAp85α, fue escindido con las enzimas de restricción EcoRI y BamHI, cuyas dianas flanquean al inserto en su vector originario (Figura 4).

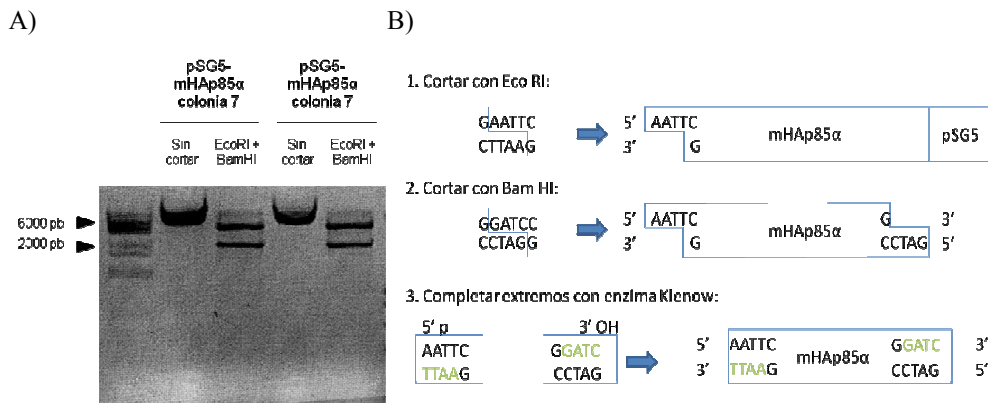


Figura 4.- A) Electroforesis en gel de agarosa para identificar y aislar el fragmento mHAp85α. B) Proceso de escisión del fragmento mHAp85α.

El siguiente paso es ligar el fragmento de interés al nuevo vector. Este proceso puede ser fácilmente alterado por diversas variables, como temperatura, pH, secuencia de DNA los participantes, etc. Una ecuación empírica utilizada ampliamente, indica que relación correcta de molaridades entre inserto y

vector, puede favorecer de modo importante la ligación. Para calcular la cantidad de inserto necesaria utilizamos la siguiente ecuación.

$$\frac{\text{Vector (ng)} \times \text{Kb (inserto)}}{\text{Kb(vector)}} \times \frac{a}{b} = \text{ng de inserto}$$

Ecuación 1. Fórmula para calcular la cantidad de DNA de inserto necesario para la ligación (a= proporción del inserto; b= proporción del vector).

Finalmente, transformamos bacterias competentes y tras extracción de DNA plasmídico, comprobaremos el éxito de la ligación. En la figura 5 se observa un esquema mínimo del proceso realizado.

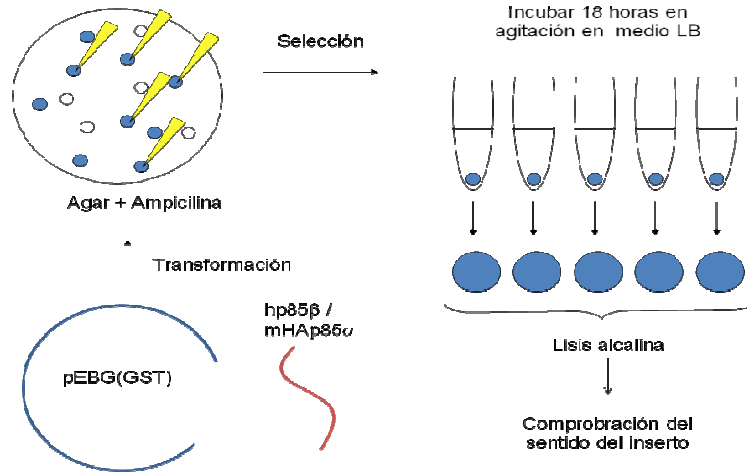
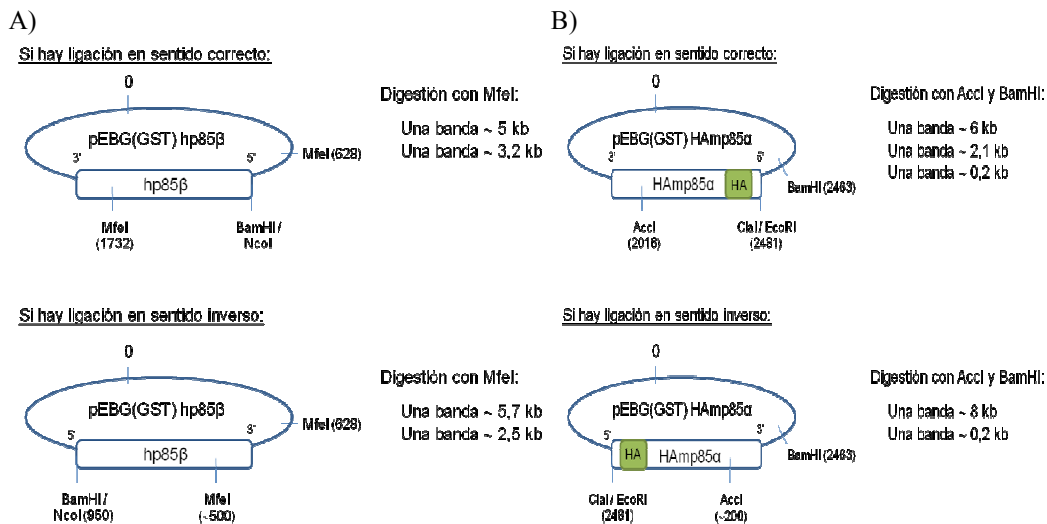


Figura 5.- Proceso de transformación bacteriana.

Un problema común es que el fragmento puede insertarse en un sentido incorrecto. Para comprobar el sentido, tuvimos en cuenta la presencia de una diana para MfeI en el inserto p85β y en el vector. Si el inserto se ubica en el sentido correcto, la digestión produciría dos bandas: una de 3,2 Kb y otra de 5 Kb. Sin embargo, si la inserción fuera incorrecta, el corte generaría también dos bandas, pero de diferentes tamaños a los anteriores: una de 2,5 Kb y otra de 5,7 Kb. En la figura 6A presentamos un esquema de la estrategia y los resultados que observamos en cuatro de las colonias seleccionadas (carriles B, D, F y G), en las que se presentan las dos bandas de peso correcto, indicativas del sentido adecuado del inserto, en tanto que en el resto de carriles se observan bandas no correspondientes, indicando sentido incorrecto del inserto.



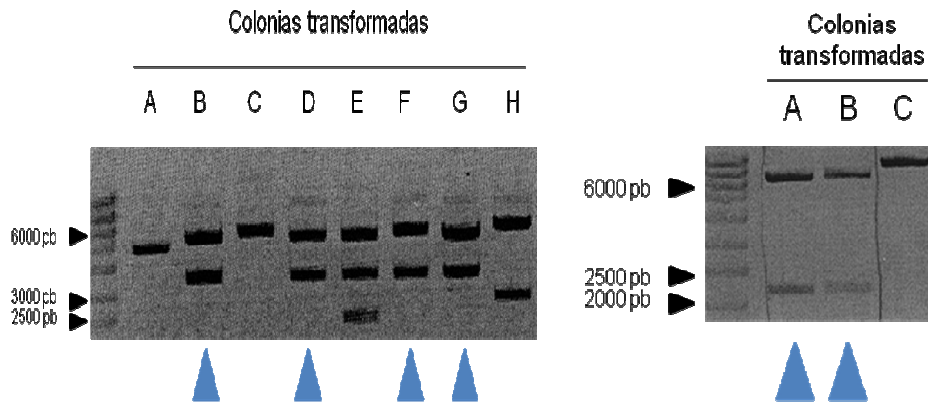


Figura 6.- (A) Esquema de la comprobación del sentido del fragmento p85β y electroforesis en agarosa tras ligación. B) Esquema de la comprobación del sentido de inserción del fragmento p85α electroforesis en gel de agarosa tras ligación.

En el caso del inserto de p85α (Figura 6B), si el sentido es correcto, la digestión con *AccI* y con *BamHI* generará una banda de 6 Kb, una de 2,1 Kb y una de 0,2 Kb. De las diferentes colonias analizadas, queda demostrada la inserción en el sentido correcto por la presencia de las bandas de 6 Kb y de ~2 Kb en dos colonias (carriles A y B). El último carril muestra un caso de un inserto en sentido incorrecto (carril C).

Antes de utilizar los vectores para el pull down, se comprobó la correcta expresión de los insertos mediante un ensayo de inmunodetección contra GST (Figura 7).

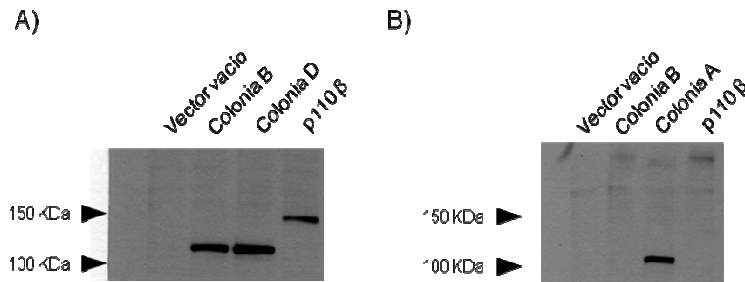


Figura 7.- Inmunodetección contra GST. A) hp85β. B) mHAp85α.

Tras dicha comprobación, utilizaremos los nuevos vectores generados para realizar transfecciones y ensayos de “pull down”.

Transfección, ensayo de pull down y tinción argéntica

Seleccionamos la línea celular 293T debido a su origen humano y facilidad para ser transfectada (Figura 8). Aunque la isoforma mHAp85α es originaria de ratón, su alta homología a la isoforma humana, mayor del 99%, la hace una herramienta adecuada a nuestros fines, la investigación de distintas interacciones en células humanas.

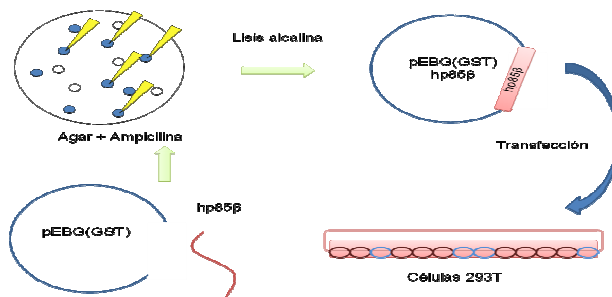


Figura 8.- Procedimiento de transfección

Tras 48 horas de la transfección, las células fueron lisadas y se realizó el ensayo de pull down con ambas construcciones, utilizando como control el vector pEBG(GST) vacío.

Como controles adicionales de la técnica hemos utilizado un extracto de proteína total, así como extractos del sobrenadante que queda tras el pull down. El primer carril (A) demostrará que nuestro sistema de inmunodetección funciona correctamente, en tanto que en los sobrenadantes (carriles B, C y D) observaremos tanto la eficacia de unión entre la proteína de fusión y su sustrato unido al soporte, así como todo exceso no unido. Este control será fundamental para demostrar que el pull down (carriles E, F y G) se ha llevado a cabo correctamente [10].

Tras la inmunodetección, existe una señal a 110 KDa aproximadamente, que corresponde a la proteína de fusión p85-GST en los carriles de los diferentes ensayos de pull down en tanto que el carril de control (plásmido vacío) no presenta dicha señal. En este carril de control observamos una señal en 25KDa, que se corresponde con la masa molecular de la Glutación-S-transferasa. Por su parte, en el carril de lisado total observamos señal en 25 KDa, lo que confirma la transfección y la correcta funcionalidad del WB ensayado.

Dado que nuestro interés será revelar interacciones diferenciales de isoformas de p85 mediante Maldi-toff, pondremos a punto la tinción argéntica, que permitirá una mayor sensibilidad en la detección de los resultados del pull down. Dicha tinción es del orden de mil veces más sensible que la inmunodetección, y de cien veces más sensible que la tinción con azul de Comassie,

Para la puesta a punto utilizamos cantidades decrecientes de BSA (Masa molecular ~60 KDa), desde 500ng hasta 0,5 ng. El límite de detección en nuestra experiencia, ha llegado hasta valores de 5 ng, suficientes para someter las proteínas arrastradas tras pull down a las técnicas de alta sensibilidad.

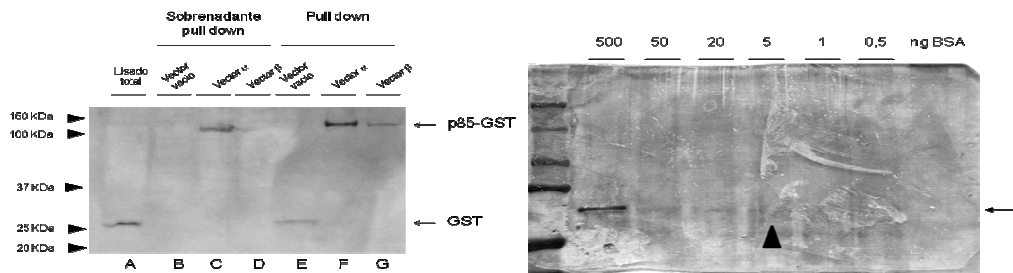


Figura 9.- A) Ensayo de pull down. B) Tinción argéntica.

Estos resultados nos permitirán disponer de los medios necesarios para llevar a cabo el experimento de interés, que consiste en precipitar las proteínas que se unen a p85-GST, eluirlos, resolverlos en SDS-PAGE, teñirlos mediante la tinción con plata e identificarlos por técnicas de proteómica, en concreto la ionización suave en espectrometría de masas (Maldi-toff).

Discusión

En este trabajo hemos obtenido una nueva herramienta para indagar en las interacciones diferenciales de las isoformas de p85, dado que aún subsiste la discusión de la existencia de actividades de p85 y p110 como monómeros, y para tratar de comprender cómo el aumento de expresión de p85 β supone una ventaja en la progresión tumoral. En este sentido, sabemos que p85 α y β presentan numerosos dominios de asociación de proteínas en el extremo N-terminal, región muy diferente entre ambas subunidades, lo que proporciona distintos anclajes a la membrana o interacciones proteicas. En estudios anteriores se ha visto que los niveles de p85 β [11] están correlacionados con la progresión tumoral y la capacidad invasiva, siendo objeto de estudio encontrar qué funciones diferenciales entre las isoformas de p85 son las responsables de ese cambio.

Además Recientemente se ha descrito el proceso llamado “p85 β switch”, en el cual se produce un aumento de la expresión de p85 β a la vez disminuyen los niveles de p85 α . Este cambio es importante, ya que desconocemos si los heterodímeros p85 β /p110 son capaces de activar efectores, y se ha observado que afecta a las funciones en las que interviene la vía PI3K/Akt.

gula distintos puntos del metabolismo de la glucosa y considerando que en los tumores se ve favorecida la glucólisis, y se observa un aumento de la supervivencia a pesar de los bajos niveles de oxígeno, tratar de descubrir las interacciones del heterodímero p85 β /p110 nos ayudaría a comprender mejor todas estas evidencias, pudiendo servir como base para futuros ensayos sobre la regulación de la vía PI3K/Akt. Eventualmente, el heterodímero p85 β /p110 puede no ser sensible al mecanismo de retro-regulación que posee la vía de señalización. Este mecanismo es responsable, además, de la activación constitutiva de la ruta por bloqueo farmacológico de PI3K [12].

Por todo lo anterior creemos que es de suma importancia determinar las interacciones diferenciales de p85 α y β y evaluarlas mediante estudios proteómicos y moleculares. A la conclusión de este trabajo, estaremos en disposición de un listado con las proteínas candidatas a estudio para tratar de entender su papel en la vía PI3K/Akt y cómo favorecen la acción transformante que se ha observado, ahondando en el mecanismo biológico de acción.

Materiales y métodos

Líneas celulares: La línea celular 293T HEK, proveniente de riñón humano, y la línea celular NIH-3T3, proveniente de fibroblastos de ratón, fueron adquiridas de la American Type Culture Collection (Manassas, VIR, USA).

Vectores: Los vectores pSG5-mHAp85 α y pcDNA 3-hp85 β , objeto de subclonación, pertenece a la colección propia del laboratorio. El vector receptor pEBG(GST) fue adquirido de Addgene (Cambridge, MA, USA) (Addgene número: 22227).

Cepa bacteriana competente: se utilizaron las cepas bacterianas XL-1 Blue y DH5 α de *Escherichia coli*, las cuales son competentes para choque térmico (Departamento de Inmunología y Oncología, Centro Nacional de Biotecnología, Madrid, España)

Clonaje: Las diferentes endonucleasas de restricción (AclI, BamHI, ClaI, EcoRI y NcoI), el enzima Klenow 3'→5', la fosfatasa alcalina CIP y la ligasa T4 DNA fueron adquiridas comercialmente (New England BioLabs, Ipswich, MA, USA).

Extracción plasmídica por lisis alcalina: fue realizada utilizando el kit QIAprep® Spin Kit (QIAGEN, Hilden, Alemania), según indicaciones del fabricante.

Transfección: El reactivo de transfección Lipofectamine™ fue adquirido comercialmente (Invitrogen, Paisley UK) y utilizado según indicaciones del fabricante.

Lisis celular y cuantificación proteica: Los reactivos necesarios para la preparación de tampones fueron de diversas casas comerciales y todos de calidad Biología Molecular (Sigma-Aldrich, Merck, Panreac) en tanto que para la cuantificación de proteína total se utilizó el kit Micro BCA™ Protein Assay (Thermo; Waltham MA, USA).

Ensayos de “pull down”, SDS-PAGE, tinción de geles e inmunodetección: Las bolillas de agarosa recubiertas de glutatión fueron adquiridas de GE Healthcare Life Sciences (Little Chalfont, UK), en tanto que los reactivos para electroforesis en geles de poliacrilamida y electrotransferencia fueron adquiridos a BIO-Rad (Hercules CA, USA). En los experimentos que así lo requirieron, las proteínas separadas por electroforesis fueron teñidas utilizando nitrato de plata (Silver-Staining Kit; GE Healthcare Life Sciences). Con respecto a la inmunodetección, se utilizaron anticuerpos anti Glutatión S-Transferasa (Cell Signaling, Danvers, MA, USA).

Cultivos celulares: La línea celular 293T HEK fue cultivada en medio DMEM (Lonza, Basel, Suiza), suplementado con suero fetal bovino (GBI Life Sciences Company, XXX), 1 mM de HEPES, L-glutamina (1 mM) y antibióticos (20 uds/mL penicilina y 20 uds/mL estreptomina, BioWhittaker, Walkersville, Maryland USA). La línea celular NIH-3T3 fue cultivada en medio DMEM, suplementado con suero bovino de ternera, 10 mM de HEPES, 2 mM de L-glutamina y antibióticos (20 uds/mL penicilina y 20 uds/mL estreptomina).

Construcción del vector pEBG(GST)-hp85 β : Cincuenta microgramos de DNA del plásmido pcDNA 3-hp85 β , conteniendo el fragmento de p85 β de interés, fueron digeridos utilizando 60 unidades de EcoRI durante 4 horas a 37°C. Tras electroforesis en gel de agarosa, el fragmento escindido fue purificado, solubilizado y digerido con 10 unidades de NcoI durante 4 horas a 37°C. Posteriormente, 10 unidades de enzima Klenow fueron puestas en contacto con el producto de la digestión anterior, durante 15 minutos a 25°C, para asegurar la generación de nuevos extremos romos. La inactivación del enzima Klenow fue alcanzada mediante calentamiento a 75°C durante 20 minutos. Tras la electroforesis en geles de agarosa, el fragmento escindido fue purificado bajo iluminación ultravioleta.

Por su parte, 10 μ g del vector receptor pEBG(GST) fue linealizado por tratamiento con 45 unidades de BamHI, durante 4 horas a 37°C. El producto de esta digestión fue tratado con 10 unidades de Klenow, durante 15 minutos a 25°C, y su inactivación fue alcanzada añadiendo 0,5 M EDTA y posterior calentamiento a 75°C durante 20 minutos. La desfosforilación de los extremos se realizó mediante tratamiento con 4 unidades de fosfatasa alcalina, durante 10 minutos a 37 °C. La fosfatasa alcalina fue inactivada por calentamiento a 75°C durante 2 minutos. Finalmente, la purificación del vector linealizado se realizó bajo iluminación ultravioleta tras electroforesis en gel de agarosa.

Construcción del vector pEBG(GST)-mHAp85 α : Diez microgramos de DNA del plásmido pSG5-mHAp85 α , conteniendo el fragmento de p85 α de interés, fueron digeridos utilizando 40 unidades de EcoRI y BamHI durante 4 horas a 37°C. Tras electroforesis en gel de agarosa, el fragmento escindido fue purificado, solubilizado. Posteriormente, 10 unidades de enzima Klenow fueron puestas en contacto con el producto de la digestión anterior, durante 15 minutos a 25°C, para asegurar la generación de nuevos extremos romos. La inactivación del enzima Klenow fue alcanzada mediante calentamiento a 75°C durante 20 minutos. Tras la electroforesis en geles de agarosa, el fragmento escindido fue purificado bajo iluminación ultravioleta.

Por su parte, 10 μ g del vector receptor pEBG(GST) fue linealizado por tratamiento con 45 unidades de ClaI, durante 4 horas a 37°C. El producto de esta digestión fue tratado con 10 unidades de Klenow, durante 15 minutos a 25°C, y su inactivación fue alcanzada añadiendo 0,5 mM EDTA y posterior calentamiento a 75°C durante 20 minutos. La desfosforilación de los extremos se realizó mediante tratamiento con 4 unidades de fosfatasa alcalina, durante 10 minutos a 37 °C. La fosfatasa alcalina fue

inactivada por calentamiento a 75°C durante 2 minutos. Finalmente, la purificación del vector linealizado se realizó bajo iluminación ultravioleta tras electroforesis en gel de agarosa.

Ligación y transformación de bacterias competentes: Para la ligación se utilizó una unidad de ligasa T4 DNA, durante 18 horas a temperatura ambiente. Posteriormente, la cepa bacteriana competente fue transformada por choque térmico (20 minutos a 4°C y después 50 segundos a 42°C) con 1 µg del producto de ligación. Tras 18 horas de incubación en placas de agar con agente de selección (150 µg ampicilina/ml medio LB), se cultivaron 24 colonias seleccionadas al azar y se extrajo DNA plasmídico.

Se comprobó la ligación y orientación de sentido del inserto de cada clonación, mediante digestión con MfeI (2 unidades, durante 4 horas, a 37°C), en el caso de pEBG(GST)-hp85β, y mediante digestión con AccI y BamHI (2 unidades de cada enzima, durante 4 horas a 37°C) en el caso de pEBG(GST)-mHAp85α. Tras las digestiones, se resolvió por electroforesis en gel de agarosa.

Transfección, ensayos de “pull-down” y tinción argéntica: Se sembraron 4 x 10⁵ células NIH/3T3 y tras 24 horas de incubación se transfectaron 4 µg de DNA plasmídico, utilizando Lipofectamina según indicaciones del fabricante. Tras 48 horas de incubación las células fueron lisadas (10 mM Tris/HCl pH 7,4, 10 mM NaCl, NP-40 0,5% e inhibidores), rotadas durante 20 minutos a 4°C y centrifugadas a 13.000 g a 4°C durante 15 minutos. Posteriormente, se cuantificó la concentración de proteínas y se realizaron ensayos de *pull-down*, anteriormente descritos [7]. Brevemente, 1 mg de lisado total fue puesto en contacto con 20 µl de bolillas de agarosa recubiertas con glutatión y rotadas durante dos horas a 4°C. Tras los lavados (10 mM Tris HCl pH 7,4, 150 mM NaCl, 1 mM PMSF e inhibidores), se adicionó tampón Laemmli 2x al precipitado y se resolvió mediante SDS-PAGE e inmunodetección.

En algunos casos, se realizó la tinción de los geles de poliacrilamida con nitrato de plata [12]. Los geles fueron fijados (etanol 40%, ácido acético glacial 10%) durante 18 horas a temperatura ambiente y posteriormente tratados con solución sensibilizadora (Etanol 30%, tiosulfato sódico 5% p/v, acetato sódico 7% p/v). Tras 35 minutos de incubación con nitrato de plata (2,5% p/v) se procedió al revelado (Solución reveladora: Carbonato sódico 2,5% p/v, formaldehído 37% p/v), y finalmente se detuvo la reacción con una solución de EDTA disódico 3,5% p/v.

Bibliografía

1. Cariacedo A. y Pandolfi PP. 2008. The PTEN-PI3K pathway: of feedbacks and crosstalks. *Oncogene*. 27:5527-5541.
2. Fresno Vara, et al. 2004. PI3K/Akt signalling pathway and cancer. *Cancer Treatment Reviews*. 30(2):193-204.
3. Chandralapaty S, et al. 2011. AKT inhibition relieves feedback suppression of receptor tyrosine kinase expression and activity. *Cancer cell*. 19(1):58-71.
4. Zachary C, et al. 2013. The Importance of the PI3K/AKT/MTOR Pathway in the Progression of Ovarian Cancer. *Int. J. Mol. Sci*. 14:8213-8227.
5. Vanhaesebroeck B, et al. 2010. The emerging mechanisms of isoform-specific PI3K signaling. *Mol. Cell Biol*. 11:329-341.
6. Philp AJ, et al. 2001. The PI3K p85alpha gene is an oncogene in human ovarian and colon tumors. *Cancer Res*. 61:7426-7429.
7. Kumar A, et al. 2010. Nuclear phosphoinositide 3-kinase beta controls double-strand break DNA repair. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA*. 107(16):7491-6.
8. Ueki K, et al. 2002. Molecular balance between the regulatory and catalytic subunits of PI3K regulates cell signaling and survival. *Mol Cell Biol*. 22:967-977.
9. Bebenek K, et al. 1990. The fidelity of DNA synthesis catalyzed by derivatives of Escherichia coli DNA polymerase I. *J Biol Chem*. 265(23):13878-13887.
10. Cortés I, et al. 2011. p85beta phosphoinositide 3-kinase subunit regulates tumor progresión. *PNAS*. 28(109):11318-11323.
11. Khan KH, et al. 2013. Targeting the PI3K-AKT-mTOR signaling network in cancer. *Chinese Anti-Cancer Association. Chinese J. Cancer*. 32(5):253-65.
12. Zhao L, et al. 2012. A rapid and simplified method for protein silver staining in polyacrylamide gels. *Electrophoresis*. 33(14):2143-4