

00377  
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

**PARTICIPACIÓN DE DIFERENTES VÍAS DE TRANSDUCCIÓN EN LOS EFECTOS MEDIADOS POR EL FACTOR DE CRECIMIENTO DE HEPATOCITOS (HGF), EN CÉLULAS DE HEPATOCARCINOMA Hep-G2.**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)**

**PRESENTA:**

**Biol. María Esther Bandala Sánchez**

**Director de tesis: Dr. Jorge Meléndez Zajgla**

**MÉXICO, D.F.**

**2000.**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Agradezco a los miembros de mi comité de examen por sus consejos, asesorías y apoyo para que este trabajo pudiera ser realizado.

Dra. Ivonne Castro.  
Dra. Marta Menjívar Iraheta.  
Dra. Vilma Maldonado Lagunas  
Dr. Jorge Meléndez Zajgla  
Dr. Luis Felipe Jiménez.  
Dr. Rogelio Alonso Morales.

**A MIS PADRES:**

Por ser mis mejores amigos y mi más grande apoyo.

**A MI HERMANO:**

Por estar siempre conmigo en los momentos difíciles.

**A JORGE Y VILMA:**

Por su paciencia y apoyo en todo momento.

**A MIS AMIGOS:**

Eda, Berenice, Paulina, Verónica, Gina, Nora, Isela, Magali, Angeles, Floria por su amistad incondicional.

## ABREVIATURAS.

**Bret-** Bromuro de etidio.

**CAK-** Cinasa activadora de CDK.

**CDK-** Cinasas dependientes de ciclina

**CKIs-** Inhibidores de CDK.

**c-met-** Receptor del factor de crecimiento de hepatocitos.

**DMEM-** Dulbecco's modified Eagle's medium.

**DOTAP-** N-[1-(2,3-Diolcoyloxy) prropyl]-N,N,N-trimethylammonium methylsulfate.

**DTT-** Dithiothreitol.

**EDTA-** Ethylenediaminetetraacetic acid.

**EGTA-** (Ethylene glycol-bis[ $\beta$ -aminoethyl ether]-N,N,N'N'-tetraacetic acid).

**EGF-** Factor de crecimiento epidérmico.

**ERKs-** Cinasas reguladas por señales extracelulares.

**G418-** Geneticina.

**Hep-G2-** Línea celular de hepatocarcinoma.

**HEPES-** (N-[2- Hydroxyethyl] piperazine\_N'-[2-ethanesulfonic acid).

**HGF-** Factor de crecimiento de hepatocitos.

**HGFA-** Activador de HGF.

**HLH-** Helix-loop-helix.

**IKK-** Cinasa de I $\kappa$ -B.

**JAK-** Cinasa Janus.

**JNK** – c-Jun N-terminal cinasa.

**KCl-** Cloruro de potasio.

**KGF-** Factor de crecimiento de keratinocitos.

**LZ-** Zipper de leucina.

**MAPK-** Proteínas cinasas activadas por mitógenos.

**MgCl<sub>2</sub>**- Cloruro de Magnesio.

**NaCl-** Cloruro de sodio.

**NF- $\kappa$ B-** Factor nuclear kappa-B.

**NIK**- Cinasa inductora de NF- $\kappa$ B.  
**NLS**- Señal de localización nuclear.  
**PBS**- Phosphate buffered saline.  
**PI-3**- Fosfatidilinositol 3 cinasa.  
**PMSF**- Fenilmetil –sulfonil fluoride.  
**RHD**- Dominio de homología Rel.  
**SDS**- Dodecil sulfato de sodio.  
**SFB**- Suero fetal de bovino.  
**SH2**- Dominio de homología SRC 2.  
**STAT**- Transductor de señales y activador de la transcripción.  
**TBE**- Tris borato.  
**TBS**- Tris buffered saline.  
**TBST**- TBS-Tween.  
**TNF $\alpha$** - Factor de necrosis tumoral  $\alpha$   
**TRIS**- (Tris [Hydroxymethyl] amino-methane).

# INDICE.

<b>Abreviaturas.</b>	4
<b>Resumen.</b>	6
<b>Introducción:</b>	7
Factor de crecimiento de hepatocitos.	7
Receptor del factor de crecimiento de hepatocitos (c-met).	8
Transducción de señales por el receptor de HGF.	9
Las vías de proteínas cinasas activadas por mitógenos.	12
NF- $\kappa$ B.	14
Myc.	16
Myc en transformación y tumorigénesis.	17
Myc y apoptosis.	17
Ciclo celular.	19
Ciclinas y cinasas dependientes de ciclinas (CDK).	19
Regulación de ciclina-CDK por fosforilaciones y defosforilaciones.	20
Regulación de CDK por inhibidores.	21
Regulación de las ciclinas por proteólisis.	21
Alteración en la regulación del complejo ciclina-CDK en células de cáncer.	22
<b>Justificación.</b>	23
<b>Antecedentes:</b>	24
El factor de crecimiento de hepatocitos y las vías de MAP cinasas.	24
El factor de crecimiento de hepatocitos y apoptosis.	24
El factor de transcripción NF- $\kappa$ B y proliferación.	24
<b>Hipótesis.</b>	26
<b>Objetivo general</b>	27
<b>Objetivos particulares.</b>	27
<b>Metas.</b>	28
<b>Material y Métodos:</b>	29

Cultivo celular.	29
Curvas de proliferación.	29
Transfección.	29
Selección de clonas.	30
Dispersión.	31
Ensayo de cinasa.	31
Extracción de proteínas: (Extracto nuclear y citosólico).	32
Extracción de proteínas totales.	33
Ensayo de Western Blot.	33
Ensayo de movilidad electroforética (EMSA).	34
Determinación de la IC50 (Concentración inhibitoria media).	34
Ensayo de protección de apoptosis.	35
Tinción con Bromuro de etidio.	36
Análisis estadístico.	36
<b>Resultados.</b>	37
<b>Discusión.</b>	49
<b>Conclusiones.</b>	53
<b>Bibliografía.</b>	54



## RESUMEN.

El factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), es un factor pleiotrópico capaz de provocar complejas respuestas biológicas tales como mitogénesis, motogénesis y morfogénesis en una gran variedad de células epiteliales y endoteliales. Algunas de estas respuestas pueden ser mediadas por activación de vías de transducción inducidas por estrés, como las vías de MAP cinasas, ( ERKs, JNK/SAPK y p38) y la vía de NF- $\kappa$ B.

El objetivo de este trabajo fue analizar la participación de éstas vías en los efectos provocados por el factor de crecimiento de hepatocitos.

El factor de crecimiento de hepatocitos indujo el crecimiento y dispersión de células de hepatocarcinoma Hep-G2, e incrementó la capacidad de unión de NF- $\kappa$ B, lo que se observó con ensayos de retardo. NF- $\kappa$ B fue el responsable de la inducción de la proliferación, dado a que ésta se bloqueó mediante la introducción de un dominante negativo del factor. Apoyando estos resultados, se demostró que los niveles de la proteína myc aumentaron a las 12 y 24 horas en células Hep-G2, a diferencia de las células transfectadas, al igual que los niveles de la proteína ciclina E a las 24 horas.

El factor de crecimiento de hepatocitos tuvo efectos mitogénicos y dispersantes en células de hepatocarcinoma (Hep-G2). La vía de SAPK no estuvo involucrada en los efectos provocados por este factor en este modelo de estudio, y la vía de NF- $\kappa$ B participó en el proceso de proliferación al regular a algunas proteínas del ciclo celular (myc y ciclinas)

# INTRODUCCIÓN

## **Factor de crecimiento de hepatocitos (HGF).**

El factor de crecimiento de hepatocitos (HGF/SF), también conocido como hepatopoyetina A, factor dispersante, hepatotropina, y factor citotóxico de tumor, es sintetizado como un precursor inactivo compuesto de 728 aminoácidos, el cual es procesado proteolíticamente por la enzima urocinasa para dar lugar al heterodímero activo extracelularmente (Vargas 2000). La proteína madura de HGF esta compuesta de dos cadenas; una cadena pesada de 60 kDa ( $\alpha$ ) y una cadena ligera de 35 kDa ( $\beta$ ) (Zarnegar 1991).

La cadena  $\alpha$  consiste de 4 módulos denominados "kringles" (K1 (Cys-128-Cys-206), K2 Cys-211-Cys-288, K3 Cys-305-Cys-383, K4 Cys-391-Cys-469) y un dominio amino terminal (N) que comprende residuos Glu-30-Asn-121 (Dunsmore 1996, Chirgadze 1998). El primer kringles ha sido identificado como la región mínima necesaria para la unión al receptor. La cadena  $\beta$  es homóloga al dominio de serina proteasas, pero carece de actividad enzimática debido a la sustitución de dos aminoácidos en el sitio activo. Cuando se expresa la subunidad  $\beta$  por separado es incapaz de unirse al receptor y es biológicamente inactiva (Figura 1) (Longati 1996).

HGF es un factor pleiotrópico, capaz de provocar complejas respuestas biológicas. Es un potente mitógeno, estimula el crecimiento de células del parénquima hepático, células epiteliales y células no epiteliales incluyendo queratinocitos de piel, melanocitos y túbulos de riñón, así como también células endoteliales, también es un poderoso factor angiogénico "*in vivo*". Este factor tiene propiedades quimiotácticas y de dispersión de células epiteliales incrementando su motilidad e invasividad dentro de matrices extracelulares. HGF es uno de los principales mediadores de la regeneración del hígado. Asimismo HGF induce la expansión de células de carcinoma "*in vitro*" por lo que también recibe el nombre de factor dispersante (Longati 1996). Esta citocina es un factor morfogénico que puede activar y promover la transición fenotípica entre monocitos y macrófagos y

estimular el crecimiento y diferenciación de precursores hematopoyéticos eritroides. Protege de la muerte celular a algunos tipos celulares (Liu 1998), y tiene efectos citostáticos y citotóxicos en algunas células tumorales (Jhonson 1993). Debido a todas estas propiedades pleiotrópicas, se piensa que HGF juega un papel crítico en el desarrollo y en la renovación fisiológica de órganos epiteliales y de restringidas poblaciones celulares hematopoyéticas, así como también ha sido implicado en la patogénesis de varias enfermedades tales como hepatitis, cirrosis, tumorogénesis y metástasis (Longati 1996). En la tabla número 1 se resumen las características del factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) (Vargas 2000).

### **RECEPTOR DEL FACTOR DE CRECIMIENTO DE HEPATOCITOS (c-MET).**

El receptor para el factor de crecimiento de hepatocitos es una tirosina cinasa codificada por el proto-oncogen c-Met (p190<sup>met</sup>). La proteína p190<sup>met</sup> tiene características estructurales únicas; está compuesta por una cadena  $\alpha$  de 50 KDa unida por puentes disulfuro a una cadena  $\beta$  (145 kDa) formando un complejo de 190 KDa. La cadena  $\beta$  contiene el dominio tirosina cinasa así como también sitios para la fosforilación de tirosina y serina. El receptor para HGF/SF es sintetizado como un gran precursor (pr170), sufre una glicosilación co-traducciona y es procesado por proteólisis para formar las subunidades maduras (Figura 1) (Longati 1996).

El receptor de HGF está expresado en tejidos epiteliales adultos incluyendo; hígado, intestino, tiroides y riñón. El gen Met se ha encontrado sobre-expresado en metástasis de carcinoma gástrico humano y en un gran número de tumores humanos de origen epitelial. Cambios de la expresión del gen c-met ocurren durante la progresión de tumores colorectales, adenomas, y en metástasis de hígado. La sobre-expresión del oncogen c-met confiere un crecimiento selectivo a células neoplásicas durante la progresión del tumor (Longati 1996). En la tabla número 2 se resumen las características del receptor del factor de crecimiento de hepatocitos (c-met) (Vargas 2000).

## TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES POR EL RECEPTOR DE HGF (c-met).

La unión del ligando (HGF) a su receptor en membrana c-met es mediada principalmente por los dominios N, K1, K2, permitiendo la dimerización del receptor y la transfosforilación recíproca en múltiples sitios de cada monómero. Después el receptor de HGF, por medio de sus dos fosfotirosinas localizadas en el extremo carboxilo terminal, interactúa con múltiples efectores citoplasmáticos que contienen dominios SH2. El efecto pleiotrópico mencionado anteriormente puede ser debido al acoplamiento del receptor a diferentes transductores o a diferentes combinaciones del mismo grupo de transductores. Un número de variables, tales como diferencias en afinidad, variaciones en la concentración local de efectores, o en niveles de fosforilación del receptor pueden determinar cual transductor se une en un momento determinado (Birchmeier 1998).

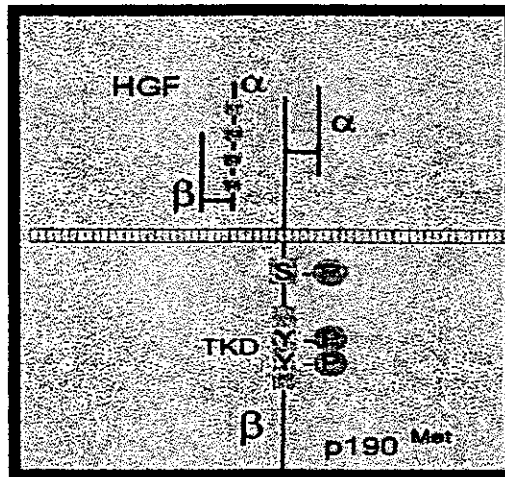


FIGURA 1; Estructura esquemática del factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) y su receptor (p190<sup>MET</sup>). HGF es un heterodímero  $\alpha\beta$  conteniendo 4 módulos "kringles" en la cadena  $\alpha$ . El receptor de HGF es un heterodímero de 190 KDa compuesto de una cadena  $\alpha$  extracelular, unida a la cadena  $\beta$  transmembranal por uniones disulfuro, incluyendo un dominio tirosina cinasa en el lado citoplasmático (TKD). El dominio yudamembranal contiene un residuo de serina (S) el cual es fosforilado como un mecanismo de control negativo de retroalimentación. Dos tirosinas (Y) en el dominio cinasa regulan la actividad catalítica sobre la autofosforilación.

**TABLA 1**

**CARACTERÍSTICAS BIOLÓGICAS DEL FACTOR DE CRECIMIENTO DE HEPATOCITOS (HGF).**

POLIPÉPTIDOS SINÓNIMOS:

- Factor citotóxico de tumor de fibroblastos (F-TCF)
- Factor de crecimiento de hepatocitos (HGF).
- Hepatopoyetina A.
- Hepatotropina.
- Factor dispersante (SF).

POLIPÉPTIDOS RELACIONADOS:

- Apolipoproteína (a).
- Factor de coagulación de la sangre XIIa.
- Proteína estimulante de macrófagos (MSP).
- Plasminógeno.

EFFECTOS BIOLÓGICOS.

- Mitógeno
- Morfógeno
- Motógeno
- Inductor de tubulogénesis.
- promotor de invasividad.

LOCALIZACIÓN DEL GEN DE HGF.

- Cromosoma humano 7, bandas 7q11.2-q21

CARACTERÍSTICAS POLIPEPTÍDICAS:

- Precursor monomérico inactivo (pro-HGF).
- Forma heterodimérica (cadenas  $\alpha/\beta$ ) después de la división proteolítica (728aa).
- Varias isoformas (splicing alternativo, truncadas).
- Cuatro dominios Kringles.
- Un dominio serina proteasa inactivo.
- Cuatro sitios potenciales de glicosilación.
- Sitios de unión a heparina y glicosaminoglicanos.

### EXPRESIÓN DE HGF.

- Durante el desarrollo de órganos (riñón, hígado, trofoblasto).
  - En el adulto tejido de origen mesodérmico (fibroblastos, células mononucleares de sangre, plaquetas).
- (Vargas y cols. 2000)

**TABLA 2**

### **CARACTERÍSTICAS BIOLÓGICAS DE C-MET.**

#### CARACTERÍSTICAS POLIPEPTÍDICAS DE C-MET.

- Producto del proto-oncogen c-met.
- polipéptidos sinónimos no conocidos.
- Precursor de 190 KD.
- Proteína madura N-glicosilada.
- Dos subunidades unidas por puentes disulfuro.
  - Cadena  $\alpha$ , 50KD, localización extracelular.
  - Cadena  $\beta$ 145 KD, localización extracelular, transmembranal e intracelular.
  - Un dominio tirosina cinasa ininterrumpido en la cadena beta.

#### POLIPÉPTIDOS RELACIONADOS:

- Receptor tirosina cinasa Ron (ligando MSP).
- Receptor tirosina cinasa Sea.

#### LOCALIZACIÓN DEL GEN DE C-MET.

- Cromosoma humano 7, bandas 7q21-q23.

#### FUNCIÓN BIOLÓGICA.

- Receptor único para HGF.

#### EXPRESIÓN DE C-MET.

- Casi todo el epitelio (riñón, hígado, estómago, intestino delgado, cerebro, mama).
- Células endoteliales.
- Expresión incrementada en varios carcinomas.

**(Vargas y cols. 2000)**

## **LAS VÍAS DE PROTEÍNAS CINASAS ACTIVADAS POR MITÓGENOS (MAPKs, ERKs, JNK/SAPK).**

En una célula la transmisión de señales extracelulares a sus blancos intracelulares es mediada por una red de proteínas que interactúan para gobernar un gran número de procesos celulares (Madhani 1998). Una de estas es la estimulación secuencial de varias proteínas cinasas citoplasmáticas, conocidas en conjunto como la cascada de señalización de proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK), las cuales consisten de tres proteínas cinasas actuando en serie: 1) una cinasa MEK (MEKK), 2) una cinasa de la cinasa de MAP de especificidad dual (MAPKK o MEK) y 3) una MAP cinasa (MAPK). Se han identificado varias vías de MAP cinasas en levaduras, y al menos tres existen en mamíferos. Las MAP cinasas de mamíferos incluyen las cinasas reguladas por señales extracelulares (ERK 1/2) también conocidas como p44 y p42, las cinasas amino-terminales c-JUN (JNKs) también referidas como SAPK o proteínas cinasas activadas por estrés, y la cinasa CSBP/RK/Mpk2 también conocida como p38. Estas MAP cinasas son activadas por una fosforilación dual sobre motivos Thr-X-Tyr. La activación de MAP cinasas es dada por miembros de la familia MEK, que se encuentran río arriba. Así, MEK1 y MEK2 activan ERK1/2, MEK3 y MEK6 activan p38, mientras (JNKK) es capaz de activar JNK así como también p38 (Figura 2) (Frost 1994).

Los papeles fisiológicos de la familia de las MAP cinasas han sido objeto de múltiples estudios. Entre ellos, ERK1/2 son activados en respuesta a estímulos extracelulares tales como factores de crecimiento y hormonas para inducir la proliferación celular. Por ejemplo, en muchos tipos celulares, la señal mitogénica es transmitida del citoplasma al núcleo por translocación nuclear de las isoformas p42/p44 expresadas ubicuamente, y activan un amplio rango de factores de transcripción tales como Elk-1. En contraste JNKs y p38 son usualmente insensibles a señales de crecimiento mientras su activación es dada por citocinas inflamatorias y estrés ambiental. p38 participa en la fosforilación de proteínas de choque térmico Hsp27, en la expresión de citocinas y en el programa de muerte celular. Figura 2. (Douziech 1999).

Las JNKs se identificaron por su habilidad para fosforilar los sitios amino-terminales de las proteínas c-Jun y ATF2 (las cuales participan en la activación y formación del complejo AP-1), Las JNKs están involucradas en respuestas celulares de estrés, citocinas proinflamatorias, estimulación mitogénica y estímulos apoptóticos. El grupo de JNKs consiste de tres miembros (JNK1, JNK2, y JNK3), cada uno con múltiples isoformas generadas a través de "splicing" alternativo. Las JNKs son activadas a través de fosforilación por cinasas específicas de las cinasas de MAP (JNKK1- también conocidas como SEK1 o MKK4 y JNKK2 también conocidas como SEK2 o MKK7). La activación de varias JNKs, JNKKs por cinasas de las cinasas de la cinasas de MAP, tales como MEKK1, MEKK2, MEKK3, ASK1, TAK1 y MLK, pueden activar JNK en respuesta a múltiples estímulos y regular diferentes sustratos (Figura 2) (Sabapathy 1999).

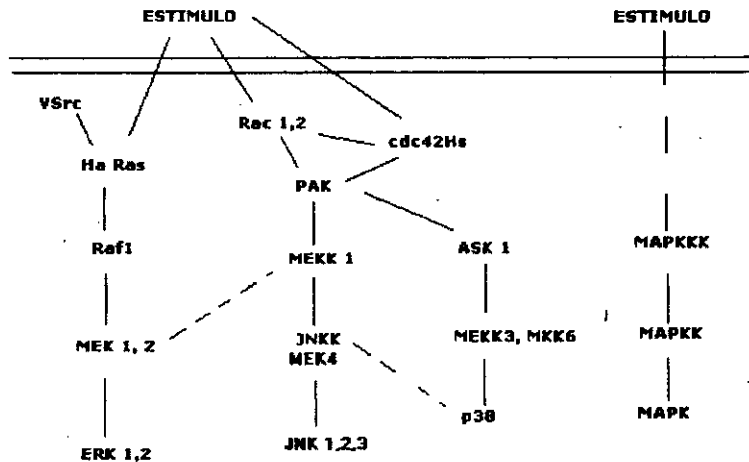


FIGURA 2; Activación de distintas vías de transducción. Las vías de MAP cinasas (ERKs 1 / 2, JNK/SAPK, p38).



## NF- $\kappa$ B

El factor de transcripción eucarionte NF- $\kappa$ B se identificó por Sean y Baltimore aproximadamente hace 10 años (J. May 1997). Se ha demostrado que NF- $\kappa$ B existe en muchos tipos celulares y que existen en el DNA sitios de unión específica a NF- $\kappa$ B denominados  $\kappa$ B, los cuales tienen la secuencia consenso 5'-GGGRNNYYCC- 3' (donde R es purina e Y es pirimidina) (L. Pahl 1999). NF- $\kappa$ B se encuentra en el citoplasma de la mayoría de los tipos celulares como homo o heterodímeros de una familia de proteínas relacionadas estructuralmente, llamada proteínas Rel o Rel/NF- $\kappa$ B, cada una de las subunidades identificadas contiene una región amino-terminal de 300 aminoácidos conservada llamada dominio de homología Rel (RHD), dentro del cual hay dominios de dimerización y de unión a DNA y la señal de localización nuclear (NLS) (J. May 1997).

En mamíferos la familia Rel está compuesta de RelA/p65, c-Rel, RelB, p50 (NF- $\kappa$ B1), y p52 (NF- $\kappa$ B2). Estas subunidades son capaces de homo o heterodimerizar. La forma más ampliamente estudiada de NF- $\kappa$ B es un heterodímero de las subunidades p50 y p65 (L. Pahl 1999).

NF- $\kappa$ B es activado por un amplio rango de señales, muchas de las cuales están relacionadas con estrés celular. La regulación de NF- $\kappa$ B se basa en su localización en la célula; cuando está activa, reside en el núcleo, y cuando está inactiva, en el citoplasma. Esta localización de NF- $\kappa$ B es modulada por una familia de proteínas inhibitorias llamadas I $\kappa$ Bs (J. Van Antwerp 1998).

Los miembros de la familia I $\kappa$ B incluyen I $\kappa$ B $\alpha$ , I $\kappa$ B $\beta$ , p105/I $\kappa$ B $\gamma$  (precursor de p50), p100 (precursor de p52), e I $\kappa$ B $\epsilon$ . Cada uno de estos miembros tienen en común una serie de motivos estructurales conocidos como secuencias ankirina, los cuales interactúan con el dominio de unión a DNA y la señal de localización nuclear de NF- $\kappa$ B. De esta manera mantienen al factor de transcripción como un complejo inactivo. Diversos estímulos activan un complejo cinasa I $\kappa$ B (IKK), fosforilando a I $\kappa$ B en las serinas 32 y 36 (o serinas 19 y 23 de I $\kappa$ B $\beta$ ). Esta fosforilación dirige a I $\kappa$ B para ubiquitinación y degradación a través del complejo 26S del proteosoma,

resultando en la liberación y translocación nuclear de NF- $\kappa$ B (Figura 3) (Guttridge 1999). La I $\kappa$ B que controla la activación inmediata de NF- $\kappa$ B es I $\kappa$ B $\alpha$ , y es la mejor caracterizada de todas las I $\kappa$ Bs (J. Van Antwerp 1998).

Aunque NF- $\kappa$ B está involucrado en la activación de la transcripción de genes que participan en respuestas inmunológicas estudios recientes indican que también puede intervenir en promover el crecimiento celular, y tiene la habilidad de proteger a las células contra drogas quimioterapéuticas o apoptosis mediada por TNF (factor de necrosis tumoral) (Kaltschmidt 1999).

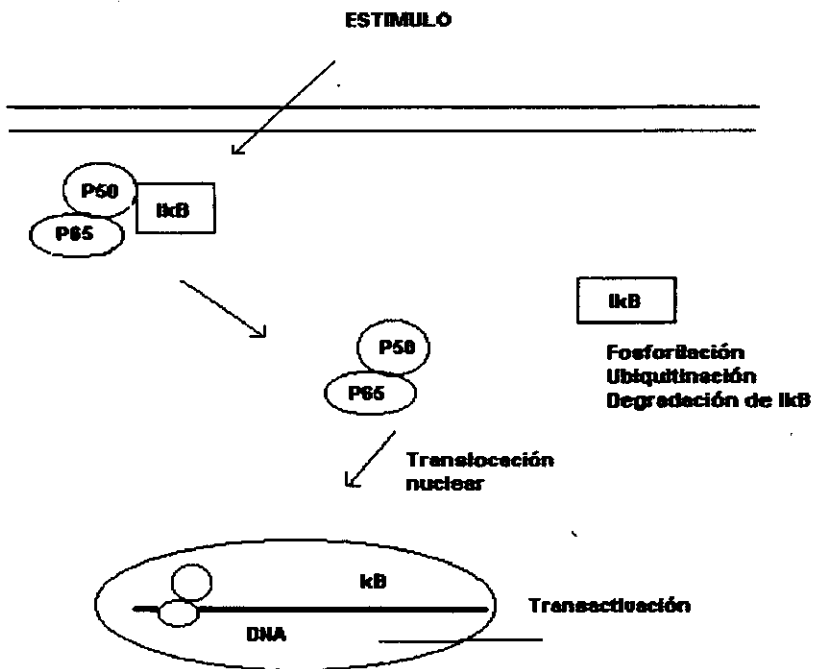


FIGURA 3; Activación de la vía de NF- $\kappa$ B. Diferentes estímulos provocan una cascada de transducción de señales que resulta en la fosforilación inducible de I $\kappa$ B en dos residuos de serina ubicados dentro de su dominio regulatorio amino terminal. Libre NF- $\kappa$ B (p50/p65) entra al núcleo y activa la expresión de genes.

# MYC

El oncogen *myc* se descubrió originalmente como una secuencia dentro del virus transformante MC29, el cual se aisló de un mielocitoma de pollo. Este virus también induce carcinoma de hígado, riñón, sarcomas y mesoteliomas (Thompson 1998). Además de *c-myc*, hay otros dos miembros de la familia altamente relacionados *l-myc* y *n-myc*. Las proteínas de la familia *myc* están compuestas de varios motivos asociados a factores de transcripción. Una región básica, la cual a menudo media la capacidad de unión a DNA es localizada junto a un dominio helix-loop-helix y a un dominio de zipper de leucina, motivos que están frecuentemente involucrados en la interacción proteína-proteína (figura 4) (Amati 1993).

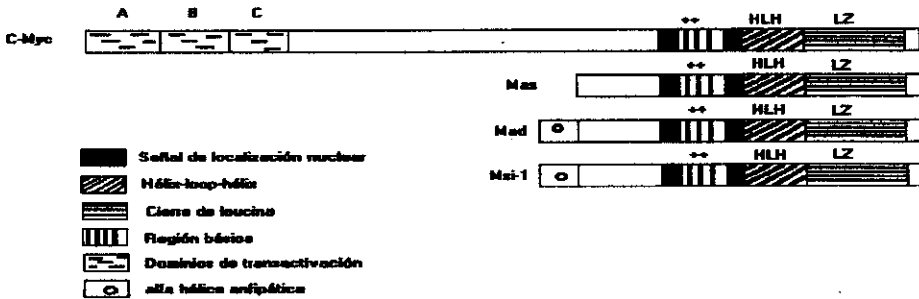


FIGURA 4: Estructura del gen *myc*. *Myc*, *Max*, *Mad* y *Mxi-1*, todas contienen dominios HLH y LZ, los cuales sirven para la dimerización y unión al ADN. *Max* puede dimerizar con *Myc*, *Mad* o *Mxi-1*.

## **MYC EN TRANSFORMACIÓN Y TUMOROGÉNESIS.**

El gen *myc* ha sido muy estudiado debido a que está involucrado en un gran número de neoplasias, así como también por su aparente contribución en la regulación del crecimiento celular (Elend 1999). *myc* se expresa normalmente en células en proliferación. Además el incremento en la expresión de *myc* en tumores, probablemente no es relevante para carcinogénesis en estos tumores, pero puede simplemente reflejar el estado proliferativo (Marcu 1992).

Hay una fuerte evidencia para la participación de la familia de genes *myc* en un gran número de diferentes neoplasias humanas. En linfoma de Burkitt's translocaciones cromosomales provocan una expresión desregulada de *myc* por la unión de regiones regulatorias para genes de inmunoglobulina sobre el cromosoma 14, 2 o 22 al cromosoma 8 adyacente al gen *myc*. La sobre-expresión de *myc* debida a la translocación es también hallada en linfomas asociados a SIDA y en leucemias (Kato 1990). Recientemente mutaciones puntuales han identificado al gen *myc* en linfoma de Burkitt's. La amplificación del gen *myc* ha sido también identificado en leucemias promielocíticas, y leucemias granulocíticas (Amati 1993). La amplificación del gen *myc* está asociada con un pobre pronóstico en cáncer de mama, y la amplificación de *c-myc*, *l-myc*, o *n-myc* se ha encontrado en un pequeño porcentaje de cáncer de pulmón de células pequeñas. Las amplificaciones del gen *n-myc* ocurren frecuentemente en neuroblastomas y están asociadas con tumores más agresivos, y son también vistas en otras neoplasias del sistema nervioso central. Muchas amplificaciones del gen *myc* adicionales han sido identificadas en líneas celulares derivadas de tumores humanos pero no en tumores primarios (Amati 1993).

## **MYC Y APOPTOSIS.**

El factor de transcripción *c-myc* está involucrado en apoptosis por varias vías. (Bissonete 1992). Existen ejemplos de que la reducción en la expresión de *c-myc* induce apoptosis y el mantenimiento de su expresión previene la apoptosis. Esta

relación ocurre en una variedad de tipos celulares incluyendo líneas linfoides T y B. Algunas hipótesis plantean el hecho de que al disminuir la expresión de c-myc es una señal apoptótica donde el factor de transcripción es requerido para reprimir genes letales o para mantener la expresión de genes vitales (Evan 1992). En otros sistemas la expresión inapropiada de c-myc parece causar apoptosis. Esto es más obvio cuando a las células no se les permite crecer mientras hay simultáneamente una sobre-expresión de c-myc. La sobre-expresión "per se" del gen también es apoptótica. Las células también pueden ser sensibles a una variedad de agentes apoptóticos por expresión de c-myc. Dos hipótesis han tratado de explicar estos resultados, la primera idea sugiere que las células responden a una confusión de señales resultando en la expresión de c-myc y el fenómeno de apoptosis, la otra hipótesis es el resultado de un enmascaramiento de señales para avanzar a través del ciclo celular replicativo y en señales que provocan un paro en el ciclo. c-myc por sí mismo es responsable para provocar señales específicas;

1.- Avance en el ciclo celular

2.- Iniciar muerte apoptótica.

La evidencia que favorece la primera hipótesis de que simultáneamente permite el crecimiento y lo detiene en células cuyo ciclo normal ha interferido con c-myc mientras es expresado continuamente viene de varios lados; a) c-myc no es el único gen de crecimiento que se asocia con apoptosis. Muchos otros genes involucrados en las señales de crecimiento son asociados como causa de apoptosis, como la sobre-expresión de c-jun, c-fos, ciclina A, PU-1, p53, E2F, gen E2 del papilomavirus, el gen ras en varias combinaciones con otros agentes y el gen mos. Similar a c-myc, se ha reportado que la expresión de ras protege de apoptosis. Algunos de los genes mencionados arriba pueden unirse directamente al mecanismo de acción de c-myc (Fanidi 1992).

Varias vías interactuando y acciones ambivalentes de estos genes sugieren que entre los mecanismos que encienden la apoptosis están los que regulan el ciclo celular (Schuhmacher 1999).

## **CICLO CELULAR.**

Los factores de crecimiento estimulan el progreso de las células a través de la fase G1 del ciclo celular, la cual es seguida por la síntesis de DNA (fase S), G2 y mitosis (fase M). La progresión a través del ciclo celular es controlada por una familia de proteínas serina-treonina cinasas que están altamente conservadas evolutivamente y regulan el ciclo celular de todos los eucariontes. En particular las proteínas reguladoras del ciclo funcionan en dos principales puntos, controlando la progresión de las células de G1 a S y la transición de G2 a M (Murray 1993).

Debido a que los factores de crecimiento estimulan la proliferación de las células en G1, se puede esperar que al menos algunas respuestas inducidas por factores de crecimiento interactúen con algunos componentes de la maquinaria del ciclo celular que controla la progresión G1 a S. Se ha comprobado que componentes de esta maquinaria del ciclo celular son regulados por factores de crecimiento mitogénicos y factores extracelulares que inhiben la proliferación celular. Además anomalías en la regulación del ciclo celular pueden provocar directamente la proliferación celular anormal y desarrollo del tumor, como se indica por el hecho de que ambos oncogenes y genes supresores de tumor funcionan como reguladores de la progresión del ciclo celular (Murray 1993).

## **CICLINAS Y CINASAS DEPENDIENTES DE CICLINAS (CDK).**

Diferentes complejos ciclina-CDK dirigen a la célula a través de los principales puntos de control del ciclo celular (Cheng, 1999). En el ciclo celular de mamíferos se ha definido el papel de algunas CDKs más que de otras. Así, cdc2 es la cinasa mitótica primaria, CDK2 es requerida para la transición G1-S y fase S por sí misma, CDK4 y CDK6 están probablemente involucradas en el punto de restricción, y CDK7 parece tener papeles duales; como una cinasa activadora de CDK (CAK), y como parte del complejo factor de transcripción TFIIH. Principalmente la actividad proteína cinasa de todas las CDKs puede ser

controlada en las mismas vías; por síntesis de ciclinas, unión a ciclinas, destrucción de ciclinas, por fosforilación, y por unión de inhibidores. (Lewin 1990). CDKs deben unirse a las ciclinas para activarse, y casi todas las CDKs están presentes en constante exceso sobre las ciclinas a través del ciclo celular. Esto significa que la actividad CDK puede ser regulada al controlar la cantidad de ciclina.

Los cambios en la estructura de la CDK cuando se unen a ciclinas han sido recientemente determinados a través de la comparación por cristalografía de CDK2 monomérica con CDK2 en complejo con ciclina A. En resumen, las ciclinas cambian la conformación en la cual se une el ATP. Sin embargo para algunos complejos de ciclina-CDK esto solamente genera una actividad cinasa parcial. La actividad completa es conferida cuando un residuo de treonina conservado en el loop T es fosforilado. Este residuo es específicamente fosforilado por una cinasa activadora de CDK (CAK) (Lewin 1990).

### **REGULACIÓN DEL COMPLEJO CICLINA-CDK POR FOSFORILACIONES Y DEFOSFORILACIONES.**

Los complejos ciclina-CDK son regulados negativamente por fosforilación sobre residuos dentro de una región de unión a ATP. En mamíferos *cdc2* y CDK2 estos sitios son: tirosina 15, un sitio de fosforilación conservado a lo largo de la evolución en todos los homólogos de *cdc2*; y treonina 14, un sitio de fosforilación específico de células animales (King 1996). Hay datos que indican que la fosforilación en tirosina puede regular CDK4 después del daño a DNA, y ciclina E-CDK2 en la decisión para comenzar la fase S. En mamíferos existen tres miembros de una familia que actúan en diferentes estadios del ciclo celular CDC25A, B y C, hay datos que sugieren que CDC25A probablemente actúe en la transición de la fase G1-S para activar a la ciclina E-CDK2, y la actividad de CDC25A se incrementa después de la fosforilación por ciclina E-CDK2. Hay también datos que apoyan el papel de CDC25A como una fosfatasa crucial que activa ciclina B-*cdc2* en la transición de G2-M y la actividad de CDC25A es

aumentada por fosforilación por ciclina B-cdc2 ( Sherr 1993).

## **REGULACIÓN DE CDK POR INHIBIDORES.**

La forma más recientemente descrita de regular los complejos ciclina-CDK es por proteínas inhibitoras específicas. En células de mamíferos hay al menos dos clases de estos inhibidores. Una clase son las proteínas INK4, que se unen a la forma monomérica de CDK4, CDK6, los compañeros de las ciclinas tipo D. Las proteínas INK4 están compuestas de motivos repetidos de ankirina e incluyen p15, p16, p18 y p19 (Cheng 1999).

p16 ha sido implicado como un importante gen supresor de tumor. La otra clase de inhibidores incluyen p21, p27 y p57, los cuales tienen homología uno con otro en su extremo amino terminal y son capaces de unirse a una variedad de complejos ciclina-CDK. En esta situación más de una molécula de los inhibidores es requerida para inhibir la actividad de cinasa. Esto significa que los complejos ciclina-CDK pueden retener actividad de cinasa cuando se unen a una sola molécula inhibitora, así que los inhibidores pueden tener un papel adicional, como dirigir el complejo a otras moléculas (Lewin 1990).

## **REGULACIÓN DE LAS CICLINAS POR PROTEÓLISIS.**

Un aspecto importante de las ciclinas es su destrucción regulada en el ciclo celular, la cual consecuentemente inactiva a su CDK compañero y contribuye a la irreversibilidad de progreso de una fase del ciclo celular a la siguiente (King 1996). Estudios recientes han demostrado que el ciclo celular está basado sobre fases alternativas de proteólisis mediada por ubiquitina, envolviendo la destrucción de ciclinas e inhibidores de CDK. La proteólisis mediada por ubiquitina requiere una enzima conjugada con ubiquitina (UBC), a menudo acompañada con una ligasa de ubiquitina para transferir ubiquitina al sustrato. Una vez ubiquitinado, el sustrato es degradado por la subunidad 26S del proteosoma. En términos de su



destrucción hay dos clases de ciclinas; las que están constitutivamente inestables y se degradan a través del ciclo celular, por ejemplo ciclina D y E, y las que son degradadas solamente en un punto específico del ciclo celular, tales como ciclinas A y B (Cheng 1999).

Las ciclinas tipo E y D son proteínas de vida corta ( $t_{1/2}$  de 20 minutos), lo cual significa que sus niveles son determinados por el porcentaje de su transcripción. La inestabilidad de la ciclina tipo E y D es conferida por secuencias PEST ubicadas en la parte carboxilo terminal de la proteína.

Las ciclinas tipo A y B son estables en interfase pero son degradadas rápidamente una vez que la célula entra en mitosis. Esta propiedad es dependiente de una región conservada de 10 aminoácidos en el amino terminal, llamada la caja de destrucción. Las ciclinas son reconocidas por una ligasa de ubiquitina específica, pero usualmente solo cuando se unen a CDK (Ohtsubo 1993)

### **ALTERACIÓN EN LA REGULACIÓN DEL COMPLEJO CICLINA-CDK EN CÉLULAS DE CÁNCER.**

En células de cáncer los puntos de control y puntos de chequeo pueden ser alterados si un regulador positivo de CDK (ciclina) es sobre-expresado o un regulador negativo es removido. Ejemplos de ambas condiciones se encuentran en tumores (J. Sherr 1999). Algunos tumores sobre-expresan ciertas ciclinas, especialmente ciclinas tipo D, mientras que otros tumores pierden proteínas inhibitorias. La regulación del ciclo celular es esencial para características celulares como la diferenciación, senescencia y meiosis. Así algunos reguladores del ciclo tienen importantes papeles en la diferenciación, lo cual puede ser relevante para su participación en oncogénesis (Bellás 1999).

## **JUSTIFICACIÓN**

El factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) es un factor pleiotrópico del cual se conoce muy poco sobre las vías de transducción que utiliza para provocar sus efectos biológicos tales como dispersión, protección o inducción de apoptosis, morfogénesis, proliferación, angiogénesis etc, mediadas por su receptor en membrana (c-met).

Es importante conocer los mecanismos por los cuales HGF tiene un amplio espectro de actividades, debido a que nos permitirá comprender complejos procesos biológicos como; organogénesis, regeneración y carcinogénesis, y en el futuro se podría utilizar como una herramienta terapéutica o como un factor pronóstico en el tratamiento del cáncer.

## **ANTECEDENTES**

### **El factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) y las vías de MAP cinasas ;**

En 1998 Liang y cols. caracterizaron las vías de señalización de Ras/MAP cinasas y JAK-STAT en células epiteliales de córnea al ser expuestas al factor de crecimiento de hepatocitos y al factor de crecimiento de keratinocitos (KGF). En el mismo año Herrera R. reportó que la dispersión en células de carcinoma de colon HT29 era inducida por el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) e implicaba la activación de la vía de las MAP cinasas.

En 1999 Sipeki reportó que la fosfatidil inositol 3 cinasa (PI-3) contribuye a la activación de MAP cinasas (ERK1 y ERK2) y esto se asocia con la dispersión celular provocada por HGF, en células de hepatocarcinoma Hep-G2.

Potempa en 1999, con sus resultados indicó que la activación de MAP cinasa y PI-3 cinasa por RAS es requerida para desensamblar uniones y es esencial para la respuesta de motilidad provocada por HGF. Asimismo Zeigler en 1999 sugirió que la activación de ERK es suficiente para estimular la motilidad celular en keratinocitos estimulados con diferentes factores de crecimiento (HGF, EGF; KGF).

### **El factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) y apoptosis:**

En 1998 Liu y colaboradores reportaron que el factor de crecimiento de hepatocitos HGF protege a células epiteliales renales de la muerte celular apoptótica. En 1999 Mildner y cols, demostraron que HGF/SF es capaz de rescatar líneas celulares de keratinocitos del proceso apoptótico inducido por irradiación con luz UV, vía la fosfatidil inositol 3 cinasa, también Conner EA. en 1999, sugirió la posibilidad de que la apoptosis mediada por HGF es vía independiente de p53/bax activando JNK1.

### **El factor de transcripción NF- $\kappa$ B y proliferación:**

En 1999, varios investigadores reportaron que NF- $\kappa$ B además de estar

involucrado en la regulación de numerosos genes que participan en procesos como inflamación, apoptosis (inducción o inhibición), transformación y desarrollo tumoral, también está involucrado con el proceso de proliferación al regular algunas proteínas involucradas en el ciclo celular, principalmente ciclina D1. Otros investigadores mencionan que existe una vía de supervivencia dependiente de NF- $\kappa$ B/c-myc (Guttridge 1999).

## **HIPÓTESIS**

El factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), activa la vía de MAP cinasa, SAPK/JNK y/o NF- $\kappa$ B en las células de hepatocarcinoma Hep-G2, y esta activación esta asociada con algunos de los efectos provocados por HGF.

## **OBJETIVO GENERAL**

Analizar la participación de diferentes vías de transducción en los efectos mediados por el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), en células de hepatocarcinoma Hep-G2.

## **OBJETIVOS PARTICULARES.**

1.-Determinar el efecto del factor de crecimiento de hepatocitos en la línea celular de hepatocarcinoma Hep-G2, en diversas respuestas celulares como: proliferación, dispersión y apoptosis.

2.-Determinar la participación de las vías de MAP cinasas (ERKs y SAPK/JNK) y la vía de NF- $\kappa$ B en los efectos provocados por el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), en células de hepatocarcinoma Hep-G2, de dos maneras;

a) Medir la actividad de proteínas implicadas en cada vía, en células Hep-G2 expuestas a HGF.

b) Asociar la activación de las vías con HGF y las respuestas celulares inducidas por esta citocina.

## METAS.

Para llevar al cabo el objetivo particular número 1, se realizaron:

Curvas de proliferación para observar el efecto del HGF sobre la línea celular de hepatocarcinoma Hep-G2.

Ensayos de dispersión para corroborar el efecto motogénico de este factor.

Ensayos de protección de apoptosis, para observar el papel de este factor como protector de la muerte celular.

Para llevar al cabo el objetivo particular número 2, se realizaron:

Ensayos de cinasa para ver la actividad de la vía SAPK/JNK.

Ensayos de retardo para observar la actividad de unión del factor de transcripción NF- $\kappa$ B.

Transfecciones para obtener tres líneas celulares y poder corroborar los efectos de HGF utilizando dominantes negativos para las dos vías (SAPK y NF- $\kappa$ B).

Curvas de proliferación para las tres líneas celulares y observar las diferencias con respecto a las células sin transfectar.

Ensayos de dispersión para observar el efecto de este factor en líneas transfectadas con un dominante negativo.

Ensayos de protección de apoptosis, para observar el efecto de este factor en proteger de la muerte celular en líneas con un dominante negativo.

Ensayos de retardo para la vía de NF- $\kappa$ B en células transfectadas con un dominante negativo.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

**CULTIVO CELULAR:** Las células Hep-G2 se sembraron en botellas de cultivo de 25 cm<sup>2</sup> con DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium), conteniendo 10% de suero fetal bovino, se mantuvieron en una incubadora a 37 ° C con CO<sub>2</sub> al 5 %. El medio DMEM y el suero fetal bovino fueron obtenidos de GIBCO.

**CURVAS DE PROLIFERACIÓN:** Las células Hep-G2-WT, se sembraron en cajas de cultivo de 24 y 96 pozos (10,000 y 3000 células respectivamente) con 500 y 200 µl de medio, se mantuvieron tres días con medio sin suero y después se expusieron a diferentes concentraciones de HGF (0, 1, 5, 10, 25, 50, 100 ng/ml) durante 24 horas, las células se fijaron en etanol al 70 % frío y se midió la viabilidad con el método de cristal violeta (0.1%) a una absorbancia en el lector de ELISA ( Labsystems MultiskanMS) de 570 nm ( Denizot 1986, Hartman 1991). Se realizaron tres ensayos. Para realizar las curvas de proliferación de células Hep-G2-S32/36 y células Hep-G2-SEK-AL se utilizaron cajas de cultivo de 96 pozos (3000 células por pozo) con 200 µl de medio, se mantuvieron sin suero durante tres días, y después se les aplicó HGF (50ng/ml) durante 24 horas, se fijaron en etanol al 70 % frío y se midió la viabilidad con el método de cristal violeta a una absorbancia de 570 nm en el lector de ELISA. Se realizaron tres ensayos por triplicado cada uno

**TRANSFECCIÓN:** Células Hep-G2 (500, 000 células) se sembraron en cajas de cultivo de 6 pozos con 6 ml de medio DMEM y suero fetal de bovino al 10 %, se utilizó el método de lipofección para realizar la transfección con los vectores linearizados pRcCMV o pRcCMV-IxB (Britta 1995), pcDNA3 o pcDNA3-SEK-AL, (Zanke 1996) para esto, el DNA se diluyó a una concentración de 1µg/ml en HEPES en un tubo estéril, al mismo tiempo en otro tubo estéril se mezcló DOTAP y HEPES. El DNA se transfirió al tubo de reacción y se mezcló con DOTAP y



HEPES, esta mezcla se dejó 15 minutos a temperatura ambiente, después se agregó a medio de cultivo, se removió el medio de cultivo de las células que tenían 24 horas de crecimiento y se les agregó el medio con la mezcla, después de 24 horas de la transfección se les cambió el medio, y se empezaron a seleccionar durante tres semanas con concentraciones crecientes de geneticina G418, hasta llegar a una concentración de 800  $\mu\text{g/ml}$ .

De este ensayo de transfección se obtuvieron tres líneas celulares:

Hep-G2-WT: Transfectada únicamente con los vectores pcDNA3 y pRcCMV.

Hep-G2-S32/36: Transfectada con el vector pRcCMV - $\text{I}\kappa\text{B}$  que lleva el dominante negativo para la vía de NF- $\kappa\text{B}$ .

Hep-G2-SEK-AL: Transfectada con el vector pcDNA3-SEK-AL, que lleva el dominante negativo para la vía de SAPK/JNK.

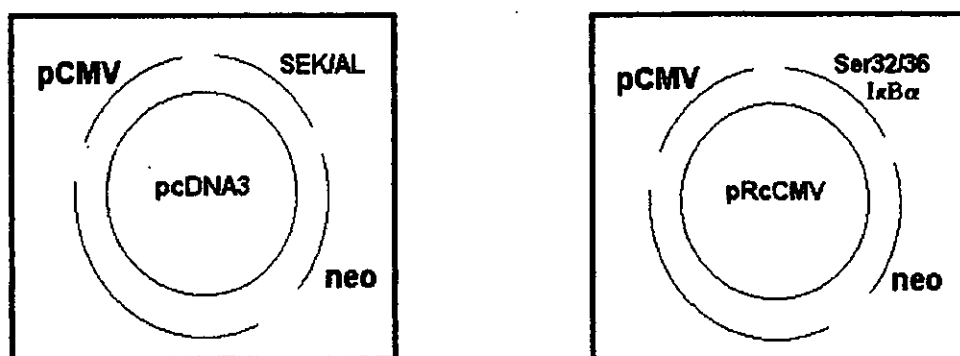


Figura 1. Plásmidos utilizados para la transfección de dominantes negativos para las vías de SAPK/JNK y NF- $\kappa\text{B}$ . Vector pcDNA3 (vía de SAPK) con el promotor de citomegalovirus y la resistencia a neomicina. Vector pRcCMV (vía de NF- $\kappa\text{B}$ ) con el promotor de citomegalovirus y la resistencia a neomicina.

**SELECCIÓN DE CLONAS:** Las células transfectadas con el dominante negativo de la vía de NF- $\kappa\text{B}$  (Hep-G2-S32/36) se subclonaron en placas de 96 pozos, y después de tres semanas se obtuvieron 13 clonas, de las cuales se extrajo proteína y se detectaron niveles de la proteína  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$  por Western Blot.

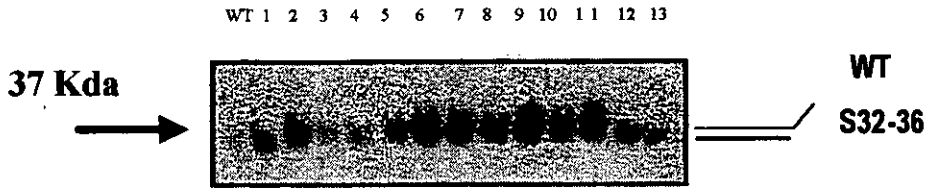


Figura 2.- Análisis de Western blot para la proteína IκB α. Extractos citosólicos de células Hep-G2-S32/36 tratadas con HGF durante 24 horas. Células Hep-G2-WT sin tratar, y 13 clonas obtenidas.

**DISPERSION:** Las células Hep-G2-WT y células Hep-G2-S32/36 se sembraron en cajas petri de cultivo con cubreobjetos, se dejaron tres días con medio DMEM sin suero, y se trataron con HGF (50ng/ml) durante 24 horas, después se fijaron con etanol al 70 % frío, se tiñeron con cristal violeta (0.1%) y se observaron al microscopio con aumentos de 10X y 40X, tanto las células tratadas con HGF como las células sin tratar con este factor.

**ENSAYO DE CINASA:** Se sembraron células Hep-G2-WT ( $1 \times 10^6$ ), en botellas de cultivo de 25 cm<sup>2</sup>, se mantuvieron con medio DMEM sin suero durante tres días y se trataron con HGF (50 ng/ml) a diferentes tiempos (0, 5, 15, 30, y 1 hora). Las células se lisaron con Buffer de lisis 1X ( 20 mM Tris (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1mM EDTA, 1mM EGTA, 1% Tritón X-100, 2.5mM de pirofosfato de sodio, 1mM de β-glicerolfosfato, 1mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 1μg/ml de leupeptina), más PMSF 1mM, y se incubaron durante 5 minutos, las células se rasparon con un gendarme y se pasaron a un tubo eppendorf, se mantuvieron en hielo se sonicaron 4 veces durante 5 segundos y se centrifugaron a 14,000 rpm durante 10 minutos a 4 °C, el sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo (el sobrenadante fue el lisado celular). De este lisado se tomaron 250 μl (aproximadamente 250 μg de proteína total ), a los cuales se agregó 2 μg (20 μl) de la proteína de fusión c-jun y se incubó toda la

noche a 4 °C, después se centrifugó por 30 segundos a 4 °C. El botón formado se lavó con Buffer de lisis 1X (2 veces), y dos veces más con Buffer de cinasa 1X (25 mM Tris (pH 7.5), 5 mM β-glicerolfosfato, 2 mM DTT, 0.1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 10 mM MgCl<sub>2</sub>) y se guardaron en hielo.

Para el ensayo de cinasa el botón se suspendió en 50 μl de Buffer de cinasa 1X suplementado con ATP 100 mM, y se incubó 30 minutos a 30°C, la reacción se terminó con 25 μl de Buffer de muestra 3X (187.5 mM Tris-HCl (pH 6.8 25 °C), 6 % SDS, 30 % de glicerol, 150 mM DTT, 0.3 % azul bromofenol). Las muestras se hirvieron por 5 minutos, centrifugaron por 2 minutos y corrieron en un gel de acrilamida al 6%, el cual se transfirió a una membrana de nitrocelulosa, esta membrana se lavó con TBS a temperatura ambiente, después se incubó con la Solución de Bloqueo durante 3 horas a temperatura ambiente, y se incubó con el anticuerpo primario (anticuerpo c-Jun fosfoespecifico) dilución 1:1000 toda la noche a 4° C, se lavó tres veces durante 5 minutos con TBS-Tween, y se incubó la membrana con el anticuerpo secundario anti-conejo conjugado con HRP (1:2000), y el anticuerpo anti-biotina conjugado con HRP (1:200) para detectar marcadores de proteína biotinilados en solución de bloqueo durante dos horas a temperatura ambiente, se lavó la membrana con TBS-Tween por 5 minutos, se le agregó líquido de quimioluminiscencia (Boehringer Mannheim) y se detectó la proteína fosforilada c-jun por autoradiografía (Derijard 1994, Gupta 1996).

#### **EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS: (EXTRACTO NUCLEAR Y CITOSÓLICO).**

Células Hep-G2-WT y células Hep-G2-S32/36 (1x10<sup>6</sup>), se incubaron con el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) a diferentes tiempos (0, 5, 15, 30, 1h, 12h, 24h 48h ), se recolectaron con un gendarme, la suspensión celular se colocó en tubos eppendorf, se centrifugó, y se lavó en PBS, se recentrifugó y eliminó el sobrenadante. Al botón se le agregó 100 μl de buffer A ( 10 mM HEPES (pH 7.5), 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 15 mM KCL, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM EGTA, 1 mM DTT, 0.5 mM PMSF, 2 μg/ml leupeptina y 2 μg/ml aprotinina), y se incubó 15 minutos en hielo, 5 μl de NP40 al 10 % se agregó a cada tubo y se centrifugó 5 minutos a 2000 rpm. El sobrenadante referido como la fracción citosólica fue removido y estabilizado

por la adición de 20  $\mu$ l de glicerol al 50 %. El botón nuclear fue resuspendido en 30  $\mu$ l de buffer C (25 mM HEPES (pH 7.5), 400 mM NaCl, 1 mM EDTA, 20 % de Glicerol, 1 mM DTT, NP40 al 0.1%, 0.5 mM PMSF, 2  $\mu$ g/ml leupeptina y 2 $\mu$ g/ml aprotinina), por vigoroso pipeteo, y se dejó 30 minutos a 4 °C. Los núcleos fueron removidos por centrifugación 5 minutos a 2000 rpm; este sobrenadante fue referido como el extracto nuclear.

**EXTRACTOS DE PROTEÍNAS TOTALES;** Para obtener extractos de proteínas totales las células Hep-G2-WT y Hep-G2-S32/36 se sembraron en cajas de cultivo de 25cm<sup>2</sup>, se dejaron tres días con medio sin suero, después se les dio tratamiento con HGF (50 ng/ml) a diferentes tiempos ( 0, 30, 1h, 3h, 12h, 24h 48h), se lisaron con buffer de RIPA (1% NP40, 0.5% deoxicolato de sodio, 0.1% SDS en PBS 1X) conteniendo inhibidores de proteasas y fosfatasa y se centrifugó para obtener el sobrenadante, en el cual se encontraban las proteínas totales.

**ENSAYO DE WESTERN BLOT;** Se utilizaron extractos totales y nucleares de las células Hep-G2-WT y Hep-G2-S32/36, para llevar al cabo electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS al 10 % y 12 % que se transfirieron a un papel de nitrocelulosa, en una cámara de transferencia semi-seca (BIO-RAD). Las membranas se bloquearon con TBS/leche (Solución 1), durante 2 horas, después se incubaron con el anticuerpo primario (  $\kappa$ -B $\alpha$  (conejo), Raf-1 (conejo), p42/p44 (ratón), n-myc (ratón), ciclina E (conejo)), se incubaron toda la noche a 4 °C, después las membranas se lavaron tres veces durante 15 minutos con TBS 1X, y se colocó el anticuerpo secundario adecuado a cada anticuerpo primario en una solución de TBS/leche, y se incubó por 3 horas, después se lavaron las membranas en TBS 1X, se les agregó líquido de quimioluminiscencia (Boehringer Mannheim), y se detectaron con autoradiografía (Hames 1981).

Los anticuerpos utilizados fueron los siguientes:

Anticuerpo	Marca	Origen	Concentración empleada
Ciclina E	Santa Cruz	policlonal de conejo	1µg/ml
Iκ-B	Santa Cruz	policlonal de conejo	1µg/ml
ERK1/2	Santa Cruz	monoclonal	1µg/ml
n-myc	Boehringer	monoclonal	1µg/ml
Raf-1	Santa Cruz	policlonal de conejo	1µg/ml

**ENSAYO DE MOVILIDAD ELECTROFORÉTICA (EMSA).** Se utilizaron células Hep-G2-WT y células Hep-G2-S32/36 tratadas con HGF (50ng/ml) durante 24 horas y sin tratar. Para la visualización del complejo NF-κB-ADN, se llevaron al cabo reacciones de unión en 20 µl de buffer B (20mM HEPES pH 7.9, 60 mM KCL, 20% glicerol, 0.25 mM EDTA, 0.125 mM EGTA, 1mM DTT, 4mM MgCl<sub>2</sub>, 4 mM espermidina, 200 mM NaCl, 25 mg/ml BSA, 2 µg poli(di-Dc) y 8 µg de extracto nuclear), por 15 minutos en hielo, 100 pg de un oligonucleótido marcado (aproximadamente 100,000 cpm) fueron agregados, y la reacción fue incubada 30 minutos en hielo. El complejo proteína-ADN fue resuelto por electroforesis en un gel de poliacrilamida al 6% en TBE 0.5X. El gel fue aspirado, secado y expuesto a una película a -70° C por 12 horas y se reveló. La secuencia de los oligonucleótidos utilizados fue la siguiente:

κB: 5' -AGTTGAGGGGACTTTCCCAGGC-3'

3' - TCAACTCCCCTGAAAGGGTCCG -5'

Competidor heterólogo:

AP-1: 5'GATCCTTCGTGACTCAGCGGGATCCTTCGTGACTCAGCGG- 3'

3'CTAGGAAGCACTGAGTCGCCCTAGGAAGCACTGAGTCGCC 5'

( Frantz 1994).

**DETERMINACIÓN DE LA IC<sub>50</sub> (CONCENTRACIÓN INHIBITORIA MEDIA):** Para determinar la concentración de cisplatino (Bristol) que se utilizó en los ensayos de protección de apoptosis se sembraron células Hep-G2-WT con medio DMEM sin suero en placas de cultivo de 96 pozos, y se aplicaron diversas concentraciones

micromolares de cisplatino ( 0, 10, 20, 30, 40, 50 y 60) durante 24 horas, al cabo de las cuales se midió la viabilidad con el método de cristal violeta a una absorbancia de 570 nm. Se obtuvo la concentración de 32 micromolar como la IC50 para los experimentos de protección del proceso apoptótico.

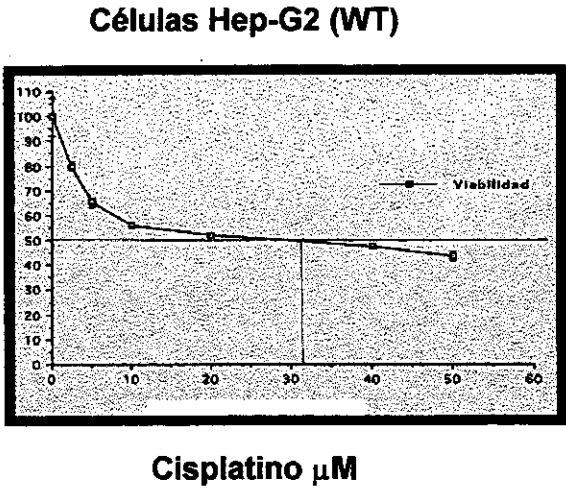


FIGURA 3.- Gráfica de células Hep-G2 tratadas con diferentes concentraciones micromolares de cisplatino durante 24 horas, para obtener la IC 50.

**ENSAYO DE PROTECCIÓN DE APOPTOSIS;** Las células Hep-G2-WT, Hep-G2-S32/36, Hep-G2-SEK-AL, se sembraron en cajas de cultivo de 96 pozos (1000 células /pozo) se sembraron nueve pozos para cada línea celular con 100  $\mu\text{l}$  de medio DMEM más SFB al 10 %, se dejaron tres días con medio sin suero, después dieciocho pozos se pretrataron 48 horas con HGF (100 ng/ml), nueve pozos pretratados se utilizaron como control (células expuestas únicamente a HGF), a los nueve pozos pretratados restantes se les aplicó cisplatino 32  $\mu\text{M}$  y se dejaron 24 horas, a los nueve pozos sin pretratar restantes únicamente se les aplicó cisplatino 24 horas también a manera de control, se fijaron en etanol frío al

70 %, y se tiñeron con cristal violeta, se midió la viabilidad en el lector de ELISA a una absorbancia de 570 nm.

#### **TINCIÓN CON BROMURO DE ETIDIO PARA APOPTOSIS:**

Células Hep-G2-WT se sembraron en laminillas para cultivo, 100,000 células por laminilla, una laminilla se trató con cisplatino a la concentración de 32  $\mu$ M por 24 horas , y otra sirvió de control, después se desechó el medio de cultivo, se lavaron con PBS 1X, se eliminó el PBS IX, y se fijaron con etanol al 70% frío, las laminillas se incubaron 10 minutos a -20°C, se desechó el etanol, se secaron, y se incubaron en PBS 1X a 37 °C con 10  $\mu$ l de RNAsa (10  $\mu$ g/ml) durante 2 horas, después se les agregó 10  $\mu$ l de Bromuro de etidio (10 mg/ml) y se incubaron 15 minutos a temperatura ambiente, se lavaron con PBS 1X, se les colocó medio de montaje (glicerol-PBS 1X 1:1) y un cubreobjetos, después se observaron al microscopio con luz UV a un aumento de 10X y se les tomó la fotografía.

**ANÁLISIS ESTADÍSTICO:** Los datos obtenidos de las curvas de proliferación para las células Hep-G2-WT, Hep-G2-S32/36 y Hep-G2-SEK-AL y ensayos de protección de apoptosis fueron analizados con la prueba estadística de t de student a un 95% de significancia, y graficados con el programa de Cricket grafic y Harvard grafic.

## **DISCUSIÓN.**

Los factores de crecimiento participan en múltiples procesos tales como proliferación, diferenciación y motilidad mediando sus efectos vía receptores tirosina cinasa. El tipo de respuesta depende del receptor y ligando que se expresan diferencialmente por varios tipos celulares (Vargas 2000).

El factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) es una citocina producida por células derivadas del mesénquima. Este factor es pleiotrópico pudiendo ser mitogénico, motogénico y morfogénico en diversas células, así como también citostático y citotóxico en células tumorales. Asimismo juega un papel importante en la regeneración de órganos, embriogénesis así como en la hematopoyesis temprana ( Longati 1996, Vargas 2000).

Los efectos provocados por este factor se llevan al cabo al unirse a su receptor en membrana denominado c-met. Cuando el ligando se une a su receptor se estimula la actividad intrínseca del mismo y se modula la transducción de señales. Esta modulación de una o más proteínas intracelulares permite finalmente la activación o inhibición de proteínas efectoras y en muchas instancias esto resulta en la alteración de la expresión genética. (Shenk 1999).

El objetivo de este trabajo fue determinar la participación de tres vías de transducción activadas por estrés como las vías MAP cinasas, (ERKs, SAPK/JNK) y la vía de NF- $\kappa$ B, en los efectos mediados por HGF.

### **EFFECTOS CELULARES DE HGF.**

Se utilizó como modelo de estudio la línea celular de hepatocarcinoma Hep-G2, y así como se ha reportado en otras líneas celulares (Tajima 1992), este factor provocó un crecimiento en esta línea celular dependiente de la concentración, siendo 50 ng/ml la concentración en la que más respuesta hubo a diferencia de otras líneas celulares, en las cuales con una concentración menor o mayor se observa el fenómeno de proliferación celular. Por otra parte se ha visto que HGF aumenta la motilidad en varios tipos celulares (Tajima 1992), y en nuestro modelo



de estudio (Hep-G2), también se observó dispersión con la exposición a HGF. Se ha reportado que algunos factores de crecimiento como por ejemplo PDGF, participan en la protección del proceso apoptótico inducido por agentes antineoplásicos, aunque los mecanismos por los cuales se previene el proceso apoptótico por parte de estos factores son desconocidos (Bardelli 1996). Se analizó si este factor podría ser protector de apoptosis utilizando el fármaco cisplatino, que ya se ha reportado como inductor de este tipo de muerte en varios tipos celulares. (Barry 1990). Los resultados obtenidos nos indicaron que realmente este factor está involucrado con la protección del proceso apoptótico, en este caso inducido por la droga antineoplásica cisplatino en la línea celular Hep-G2. Estos resultados concuerdan con los reportados por Liu y cols. en 1998, en donde encontraron que células del epitelio renal se protegían por HGF del proceso apoptótico inducido por otro fármaco como la estaurosporina.

Una vez observado los efectos provocados por este factor en la línea Hep-G2 se analizó la participación de las vías de transducción SAP/JNK y NF- $\kappa$ B. En la bibliografía no se ha reportado alguna relación directa entre estas dos vías y los efectos mediados por HGF.

Se observó que la actividad de unión a NF- $\kappa$ B aumentó con la exposición al factor de crecimiento de hepatocitos, a diferencia de las células sin tratar. Resultado que concuerda con el reportado por Meléndez y Maldonado en 1999, de que la línea celular A431 cuando es expuesta a HGF aumenta la actividad de unión de NF- $\kappa$ B. Para correlacionar la activación de las vías de NF- $\kappa$ B y SAPK por el factor de crecimiento de hepatocitos, se utilizaron dominantes negativos de las mismas, la característica de estos dominantes es que en lugar de tener residuos de serina se sustituyen por alanina. Esta mutación previene la fosforilación inducible y aumenta la vida media de la proteína (Kaltschmidt 1999). En las dos líneas se realizaron los mismos experimentos de dispersión, proliferación y protección de apoptosis, al igual que en las células Hep-G2-WT. El fenómeno de dispersión se inhibió al bloquear esta vía con el dominante negativo.

Con respecto al papel protector de apoptosis de este factor se expusieron al fármaco cisplatino las dos líneas y se observó un comportamiento similar al de las

células Hep-G2-WT, en cuanto al porcentaje de protección, indicándonos que ninguna de estas vías parece estar involucrada con el papel protector de HGF en el proceso apoptótico en esta línea celular, pudiendo ser este provocado por otros mecanismos (Bardelli 1996). Como el reportado por Mildner en 1999, de la participación de la vía de la fosfatidilinositol 3-cinasa en la inhibición de apoptosis por HGF inducida por luz UV, o en el caso de la asociación de HGF con un miembro anti-apoptótico perteneciente a la familia de Bcl-2 (BAG-1).

En relación a la vía de SAPK/JNK, por los resultados obtenidos se concluyó que no hay una relación en la activación de esta vía y los efectos provocados por este factor.

Los resultados de proliferación, nos indican que en las células transfectadas con el dominante negativo de NF- $\kappa$ B, se inhibió la proliferación celular y esto correlaciona con reportes recientes, en los cuales a NF- $\kappa$ B se le atribuye un papel importante en el proceso de proliferación con otros estímulos (Guttridge 1999).

La forma en la cual esta familia de factores de transcripción parece tener un papel importante con el proceso proliferativo es mediante la regulación de algunas proteínas importantes dentro del ciclo celular (ciclinas, myc, p53 etc.)

En nuestro modelo de estudio analizamos dos proteínas importantes en el ciclo celular myc y ciclina E, myc porque juega un papel importante en el crecimiento celular y diferenciación (Thompson 1998), y ciclina E porque es el regulador primario en la iniciación de la fase S (Pinos 1996).

Los resultados nos indican que al utilizar dominantes negativos de la vía de NF- $\kappa$ B se inhibe también la modulación de estas dos proteínas (myc y ciclina E), lo que concuerda con la inhibición de la proliferación, así como también se inhibió la actividad de unión de NF- $\kappa$ B, resultados que correlacionan con el hecho de inhibir la activación de NF- $\kappa$ B.

La vía de MAP cinasa, es una de las vías en las cuales se ha reportado una relación directa con HGF, en el proceso de dispersión, vía la fosfatidilinositol 3 cinasa (PI-3) en algunas líneas celulares (Sipeki 1999).

Se analizaron tres proteínas importantes en esta vía (p42/p44, Raf-1), y los resultados concuerdan con los obtenidos con otras proteínas analizadas, en donde

el utilizar dominantes negativos afecta la modulación de éstas.

Estos resultados nos indican una participación importante de la vía de NF- $\kappa$ B en los efectos mediados por HGF, en relación al proceso de proliferación y de dispersión y a la vez una relación con la vía de MAP cinasa, ya que esta vía se ha visto involucrada también en el proceso mitogénico inducido por HGF, y se vio afectada cuando la vía de NF- $\kappa$ B fue inhibida con el dominante negativo.

Una posible explicación del porque se puede dar una interacción entre estas dos vías, es debido probablemente a que NF- $\kappa$ B, transactiva genes involucrados en producir receptores para factores de crecimiento, por su parte cuando factores de crecimiento se unen a su receptor se activan distintas vías incluyendo la de las MAP cinasas, lo cual nos explicaría por que al inhibir la vía de NF- $\kappa$ B también se bloquea la vía de MAP cinasa.

En 1997 Osthoff sugirió que las MAP cinasas (p38 y JNK) pueden participar en la regulación de la actividad transcripcional de NF- $\kappa$ B.

Entender los procesos de transducción de señales es una meta importante para incrementar nuestro conocimiento de los papeles de HGF/SF y c-met en el desarrollo normal, diferenciación, así como también en condiciones patológicas como el cáncer permitiendo implicaciones clínicas en un futuro.

# RESULTADOS

## EFFECTOS CELULARES DEL FACTOR DE CRECIMIENTO DE HEPATOCITOS (HGF)

Con el fin de analizar el efecto del factor de crecimiento de hepatocitos sobre la proliferación, células de hepatocarcinoma Hep-G2 se expusieron a diferentes concentraciones de HGF (0, 1, 5, 10, 25, 50, 100 ng/ml) durante 24 horas, se fijaron y se midió la viabilidad utilizando cristal violeta a una longitud de onda de 570 nm. En la figura 4, podemos observar que las células crecieron de una manera dependiente de la concentración del factor, siendo 50 ng/ml la concentración a la cual se alcanzó la meseta. Por esta razón, esta concentración fue usada en los siguientes experimentos.

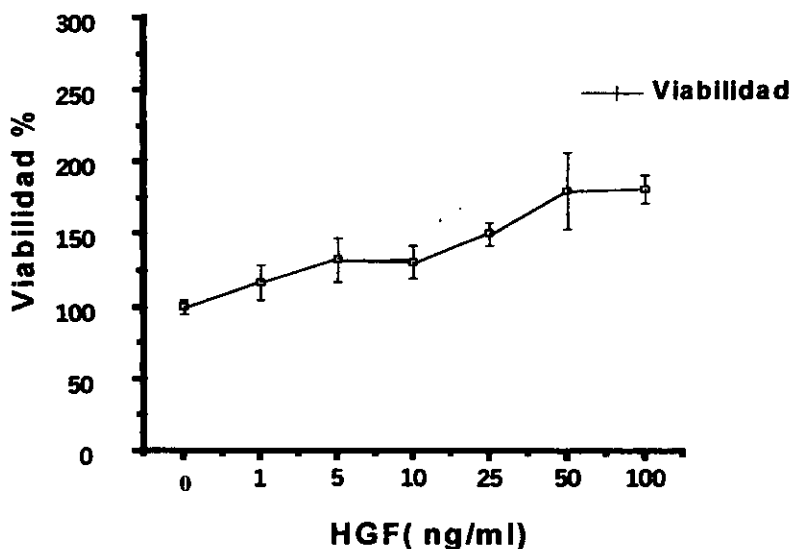


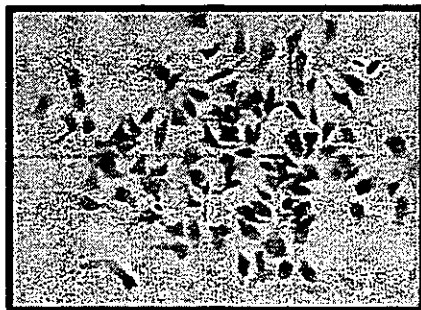
Figura 4. Curva de proliferación. Células Hep-G2 tratadas con diferentes concentraciones del factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), durante 24 horas Gráfica realizada con los resultados de tres experimentos.

Como se esperaba, se observó un efecto de dispersión en las células Hep-G2-WT tratadas con HGF, a diferencia de las células sin tratar, que formaron colonias apretadas (Figura 5).

### Células Hep -G2 (WT)



**Control**



**Tratadas**

**50 ng/ml HGF**

Figura 5. Dispersión de células Hep-G2 tratadas con HGF (50ng/ml) durante 24 horas, teñidas con cristal violeta. Control y tratadas.

Con el fin de observar el efecto protector de apoptosis del HGF, se realizó un ensayo de citotoxicidad con el método de cristal violeta. Para este fin se sembraron células Hep-G2 en placas de 96 pozos, se dejaron tres días con medio DMEM sin suero, se pretrataron con HGF (100ng/ml) durante 48 horas, después se les aplicó cisplatino (32 $\mu$ M) durante 24 horas, y se midió la viabilidad con cristal violeta.

En la figura 6 se puede observar un efecto citotóxico del cisplatino de alrededor del 50 %, mientras que en las células pretratadas con HGF y luego tratadas con cisplatino, decreció el porcentaje de viabilidad solo un 30 %. La diferencia entre

estos dos tratamientos fue de 20 % y de acuerdo a la prueba estadística t de student, estos resultados fueron significativos, indicándonos que existe un efecto protector de este factor en esta línea celular.

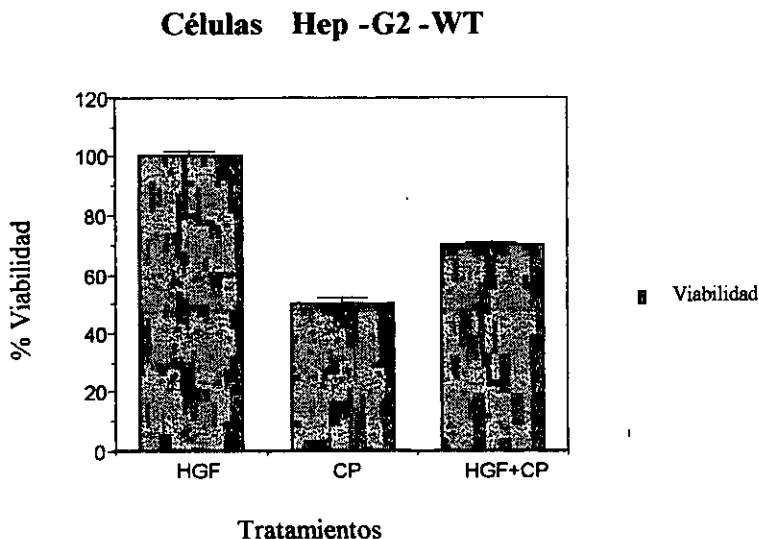


Figura 6. Curva de viabilidad, utilizando células Hep-G2-WT, tratadas con HGF a la concentración de 100ng/ml, cisplatino 32  $\mu$ M, y pretratadas con HGF ( 100ng/ml) 48 horas y después con cisplatino 24 horas. Valores correspondientes a dos experimentos realizados por triplicado.

### **EFFECTOS MOLECULARES DEL FACTOR DE CRECIMIENTO DE HEPATOCITOS**

En primer lugar se realizó un ensayo de cinasa para determinar la actividad de SAPK (Stress-Activated Protein Kinase) mediante la fosforilación del sustrato final de la vía c-Jun. Para este fin se utilizaron diversos tiempos (0, 5, 15, 30, y 1 hora) de exposición a HGF (50ng/ml). No se observó gran cambio en la fosforilación de c-Jun, en ninguno de los tiempos analizados (Figura 7).

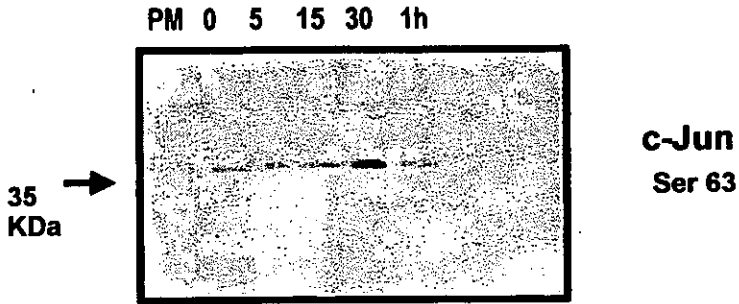


Figura 7. Ensayo de Western blot para observar la fosforilación de c-Jun (sustrato final de la vía de SAPK), células Hep-G2-WT expuestas a HGF (50 ng/ml) a diferentes tiempos. Imagen representativa.

A continuación se analizó la capacidad de unión del factor de transcripción NF- $\kappa$ B. El ensayo de EMSA se realizó con la exposición de células Hep-G2-WT a HGF (50 ng/ml) por 24 horas. Se observó un incremento en la capacidad de unión a las 24 horas, a diferencia de las células sin exposición a este factor (Figura 8).



Figura 8. Ensayo de movilidad electroforética para sitios NF- $\kappa$ B. Línea 1 células Hep-G2-WT sin tratar, línea 2 células Hep-G2-WT tratadas con HGF (50ng/ml). Imagen representativa de tres experimentos.

## **PARTICIPACIÓN DE NF- $\kappa$ B Y SAPK EN LOS EFECTOS CELULARES DEL HGF**

Las células Hep-G2, se transfectaron con dos plásmidos dominantes negativos para las vías de NF- $\kappa$ B y SAPK, obteniendo así tres líneas celulares;

- 1.-Hep-G2-WT; transfectadas únicamente con los vectores (pcDNA3, pRcCMV)
- 2.-Hep-G2-S32/36; transfectadas con el dominante negativo de I $\kappa$ -B $\alpha$
- 3.-Hep-G2-SAPK; transfectadas con el dominante negativo de SEK-AL

Para corroborar que las células estuvieran realmente transfectadas con el dominante negativo de NF- $\kappa$ B se realizó un western contra I $\kappa$ -B $\alpha$  ( Figura 9).

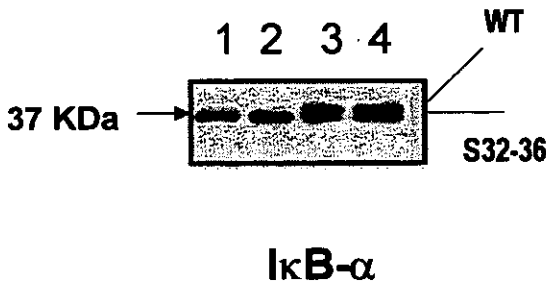


Figura 9. Western blot de células Hep-G2 para la proteína I $\kappa$ B  $\alpha$ ; Extractos citosólicos. 1-2 Células Hep-G2-WT, 3-4 Células Hep-G2-S32/S36. Imagen representativa.

En la figura 9 podemos observar el I $\kappa$ B $\alpha$  endógeno y el transfectado.

También se hizo un ensayo de retardo para medir la capacidad de unión a NF- $\kappa$ B en las células transfectadas con el dominante negativo de I- $\kappa$ B $\alpha$  (células Hep-G2-s32/s36), a las 24 horas de exposición a HGF (50ng/ml), y no se observó cambio alguno en comparación con las células Hep-G2-WT figura 10. Esto comprueba la ausencia en la capacidad de unión de este factor mediada por el dominante negativo.



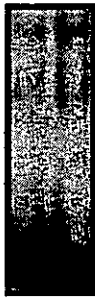


Figura 10; Ensayo de movilidad electroforética de las células Hep-G2-s32/36, Línea 1: células Hep-G2-S32/36 a las 0 horas de tratamiento. Línea 2: células Hep-G2-S32/36 a las 24 horas de tratamiento con HGF (50 ng/ml). Imagen representativa de tres experimentos.

Se realizaron tres experimentos de viabilidad por triplicado con estas tres líneas celulares expuestas a HGF (50ng/ml) durante 24 horas, y se obtuvo la siguiente gráfica Figura 11.

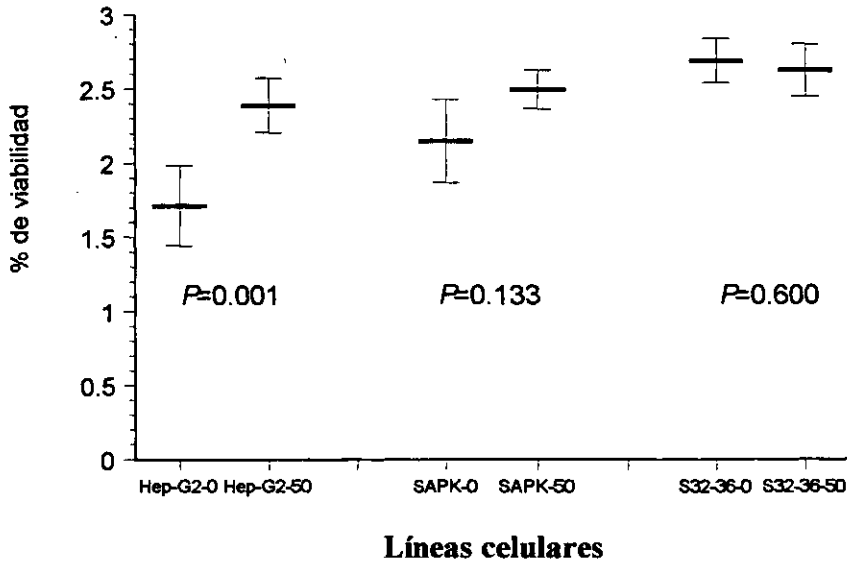


Figura 11. Gráfica de las células Hep-G2-WT, Hep-G2-S32/36 y Hep-G2-SEK-AL, control y expuestas 24 horas a HGF (50 ng/ml).

En donde podemos observar un incremento significativo en la proliferación de células Hep-G2-WT tratadas con HGF (50ng/ml), a diferencia de las otras dos líneas celulares. En la línea celular Hep-G2-SEK-AL, se observa un ligero incremento en la proliferación pero haciendo un análisis estadístico de los datos se observó que este incremento no fue significativo. Con respecto a la línea celular Hep-G2-S32/36 no se observó un aumento en la proliferación lo que concuerda con el análisis estadístico de los datos.

A continuación se realizó un experimento de dispersión con las células Hep-G2-S32/36 en donde se trataron las células con DMEM sin suero durante tres días, y después con HGF (50 ng/ml) 24 horas, y se puede observar que existen colonias dispersas y apretadas al igual que las células control. Figura 12.

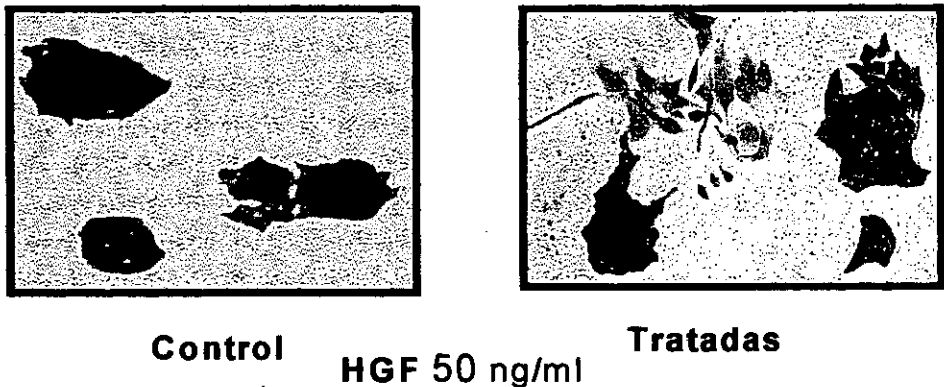


Figura 12. Dispersión de células Hep-G2-S32/S36 control y tratadas con HGF (50 ng/ml), teñidas con cristal violeta

El experimento de protección de apoptosis se hizo de manera semejante al de las células Hep-G2-WT. Con respecto a las células Hep-G2-SEK-AL se observó un decremento del 60 %, cuando se aplicó únicamente cisplatino, y un decremento del 40 % cuando estas células se pretrataron con HGF (100ng/ml) durante 48 horas. En las células Hep-G2-S32/36 se observó un comportamiento similar

siendo el decremento del 40 % cuando estas células son tratadas únicamente con cisplatino y del 10 % cuando están pretratadas con HGF, estos resultados parecen indicarnos, que el proceso de protección de apoptosis es debido a otros mecanismos independientes de estas vías, en este modelo de estudio (Figura 13).

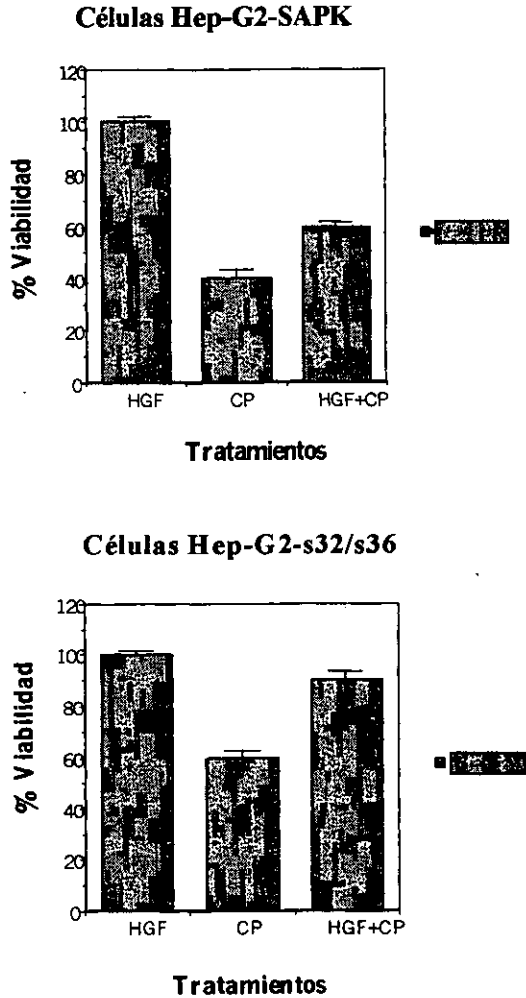
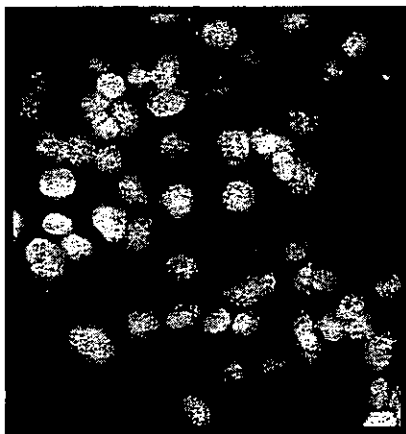
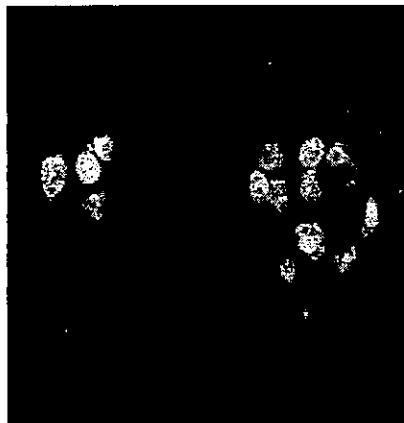


Figura 13. Curvas de viabilidad de las células Hep-G2-S32/36 y Hep-G2-SEK-AL, tratadas con HGF (50ng/ml), cisplatino 32 $\mu$ M, y pretratadas con HGF 48 horas y cisplatino durante 24 horas. Valores correspondientes a tres experimentos realizados por triplicado.

Para corroborar que el cisplatino indujo el proceso apoptótico en las células Hep-G2-WT, se realizó una tinción con bromuro de etidio para observar la fragmentación de los núcleos. En la figura 14 se observan los núcleos de células control (sin exposición a cisplatino), y los núcleos de células expuestas a cisplatino (32  $\mu\text{M}$ ) durante 24 horas, podemos observar como la viabilidad disminuye considerablemente en las células expuestas al cisplatino así como también se observan núcleos fragmentados, a diferencia de las células control.



**a) Núcleos control**



**b) Núcleos tratados**

FIGURA 14.- Tinción con Bromuro de Etidio de células Hep-G2-WT a) células Hep-G2-WT control, b) células Hep-G2-WT tratadas con cisplatino 32  $\mu\text{M}$  durante 24 horas. Imagen representativa.

NF- $\kappa\text{B}$  se encuentra involucrado en otros procesos además del de protección de apoptosis, uno de ellos es la proliferación, en donde regula a algunas proteínas del ciclo celular. Asimismo, los resultados obtenidos con el dominante negativo de NF- $\kappa\text{B}$  señalan la participación de este factor en el proceso de proliferación al inhibirlo. Para apoyar este dato se realizó un análisis de dos proteínas que participan en ciclo celular; n-myc y ciclina E. En estos experimentos se utilizaron

células Hep-G2-WT y células Hep-G2-S32/36, las cuales se trataron con HGF (50 ng/ml) a diferentes tiempos (0, 30, 1, 3, 12, 24 y 48 horas). En la figura 15 se puede observar que en las células Hep-G2-WT la mayor expresión de la proteína n-myc, se observó a las 12 y 24 horas, a diferencia de las células transfectadas en las que se observó la misma densidad de la banda en esta proteína en todos los tiempos analizados.

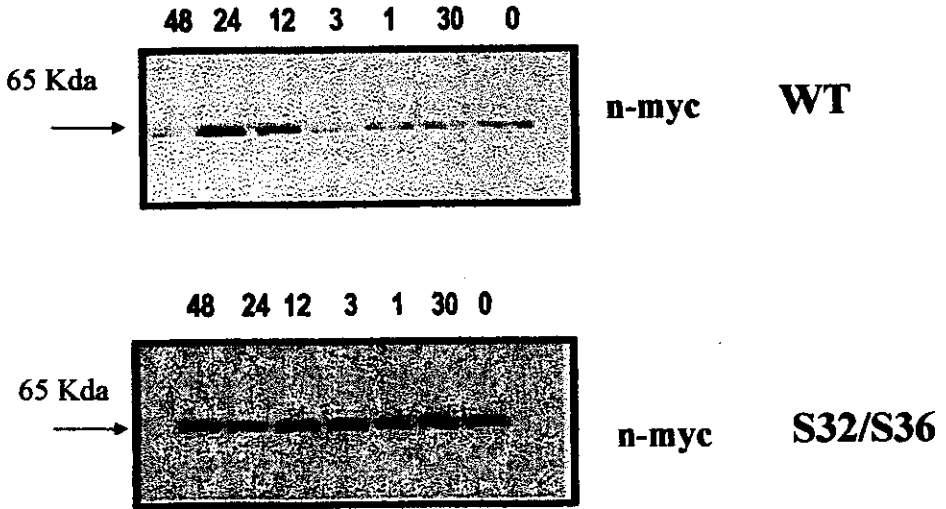


Figura 15. Ensayo de Western blot para la proteína n-myc. Extractos citosólicos de células Hep-G2-WT y Hep-G2-s32/s36, expuestas a HGF (50 ng/ml) a diversos tiempos. Imagen representativa.

Con respecto al análisis de Western de la proteína ciclina E, en las células Hep-G2-WT se observó que hay una mayor expresión de esta proteína a las 24 horas de exposición a HGF (50 ng/ml), mientras que en las células transfectadas (Hep-G2-S32/36) los niveles de expresión de esta proteína no cambiaron. Figura 16.

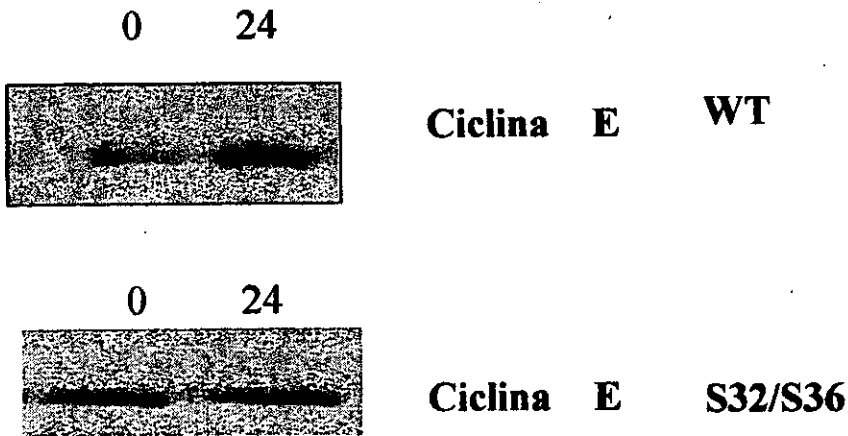


Figura 16. Ensayo de Western blot para la proteína ciclina E. Extractos nucleares de células Hep-G2-WT y Hep-G2-s32/36, expuestas a HGF (50ng/ml). Imagen representativa.

Con respecto a la vía de MAP cinasa se analizaron tres proteínas dentro de la vía (ERK1/2 ) y Raf-1.

En relación a las proteínas p42/p44 en las células Hep-G2-WT, se encontró que ambas proteínas se fosforilan a las 3 y 12 horas de exposición a HGF ( 50ng/ml), mientras que en las células transfectadas (Hep-G2-S32/36) únicamente se encontró fosforilada la proteína de 42 Kda. Figura 17.

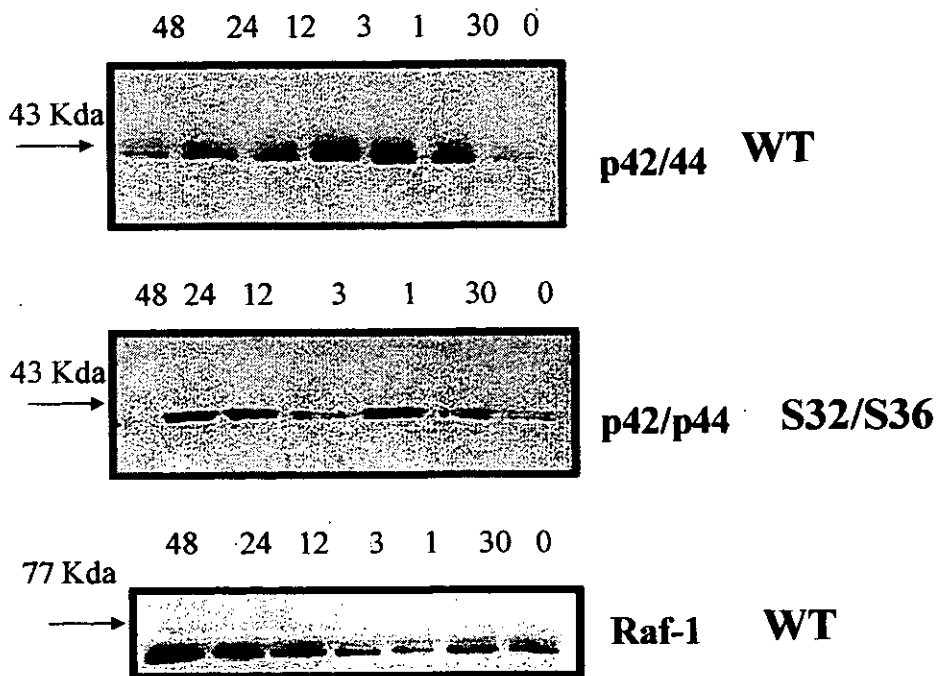


Figura 17. Ensayo de Western blot para las proteínas p42/p44 y Raf-1. Extractos citosólicos de células Hep-G2-WT y Hep-G2-s32/36, expuestas a HGF (50ng/ml) a diversos tiempos. Imagen representativa.

La proteína Raf-1 se detectó únicamente en células Hep-G2-WT, y se puede observar que no existe gran diferencia en los niveles de fosforilación de esta proteína. Figura 17.

## CONCLUSIONES

- 1.- El factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) indujo el crecimiento de células de hepatocarcinoma Hep-G2 de una manera dosis-respuesta.
- 2.- El factor de crecimiento de hepatocitos provocó dispersión en la línea celular Hep-G2.
- 3.- El factor de crecimiento de hepatocitos protegió a las células Hep-G2 del proceso apoptótico inducido por el fármaco cisplatino.
- 4.- Las vías de transducción de SAPK/JNK y NF- $\kappa$ B, no participan en la protección del proceso apoptótico inducido por este factor (HGF).
- 5.- La vía de SAPK/JNK no está involucrada en los efectos provocados por este factor, en esta línea celular.
- 6.- La vía de NF- $\kappa$ B participó en el proceso de proliferación inducido por este factor en esta línea celular.
- 7.- La vía de las ERKs participan en los efectos provocados por este factor (mitogénicos y motogénicos), en esta línea celular.



## **BIBLIOGRAFIA**

**Amati, B., Brooks, M.W., Levy, N., Littlewood, T.D., Evan, G.I., y Land, H.** 1993. Oncogenic activity of the c-myc protein requires dimerization with Max. Cell. 72: 233-245.

**Aravamudan, B., Watabe, M., y Watabe, K.** 1993. Characterization of the 5' flanking region of the hepatocyte growth factor gene. BBRC. 195. 346-353.

**Bardelli, A., Longati, P., Albero, D., Goruppi, S., Schneider., Ponzetto, C., y Comoglio, M. P.** 1996. HGF receptor associates with the anti-apoptotic protein BAG-1 and prevents cell death. EMBO Journal. 15(22). 6205-6212.

**Bellas, RE, Sonenshein GE.** 1999. Nuclear factor kappa B cooperates with c-Myc in promoting murine hepatocyte survival in a manner independent of p53 tumor suppressor function. Cell Growth Differ. 10 (5): 287-294.

**Birchmeier, C., y Gherardi E.** 1998. Developmental roles of HGF/SF and its receptor, the c-met tyrosine kinase. Trends in cell Biology. 8: 405-409.

**Bissonnette, R.D., Echeverri, F., Mahboubi, A.** 1992. Apoptotic cell death induced by c-myc is inhibited by bcl-2. Nature 359: 552-559.

**Britta-Mareen, E., Pahl, L.H., Henkel, T., y Baeuerle, A.** 1995. Phosphorylation of human I $\kappa$ B $\alpha$  on serines 32 and 36 controls I $\kappa$ B $\alpha$  proteolysis and NF- $\kappa$ B activation in response to diverse stimuli. The EMBO Journal. 14 (2). 2876-2883.

**Cheng, M., Olivier, P., y Sherr, J. C.** 1999. The p21 and p27 CDK inhibitors are essential activators of cyclin D-dependent kinases in murine fibroblasts. The EMBO Journal. 18(6): 1571-1583.

**Chirgadze, Y.D.,** Hepple, J., y Gherardi E. 1998. Insights into the structure of hepatocyte growth factor/scatter factor (HGF/SF) and implications for receptor activation. FEBS Letters. 430. 126-129.

**Conner, E.A.,** Teramoto T., Wirth P.J. Kiss, A. Garfield, S. Y Thorgeirsson, S.S. 1999. HGF-mediated apoptosis via p53/bax-independent pathway activating JNK1. Carcinogenesis. 20(4): 583-590.

**Douziech N.,** Calvo, E., Lainé, J., y Morisset, J. 1999. Activation of MAP Kinases in Growth Responsive Pancreatic Cancer Cells. Cell Signal. 11(8) 591-602.

**Dunsmore, S.,** Rubin, S. J., Kovacs, O. S., Chedid, M., Parks, C.W., y Welgus, G.H. 1996. Mechanisms of Hepatocyte Growth Factor Stimulation of Keratinocyte Metalloproteinase Production. JBC. 271(40). 24576-24582.

**Elend, M.,** y Eilers, M. 1999. Cell growth: Downstream of myc to growth or to cycle?. Current Biology. 936-938.

**Evan, G. I.,** Wyllie, A. H., Gilbert, C.S. 1992. Induction of apoptosis in fibroblasts by c-myc protein. Cell . 69:119-128.

**Fanidi, A.,** Harrington E.A. 1992. Cooperative interaction between c-myc and bcl-2 proto-oncogenes. Nature 359: 554-556.

**Frantz B.** 1994. Calcineurin acts in synergy with PMA to inactivate I $\kappa$ B/MAD3, an inhibitor of NF- $\kappa$ B. The EMBO Journal. 13(4):861-870.

**Frost. J.A.,** Geppert. T.D., Cobb, M.H., y Feramisco, J.R. 1994. A requirement for extracellular signal-regulated kinase (ERK) function in the activation of AP-1 by Ha-Ras, phorbol1-2 myristate 13- acetate, and serum. Proc. Natl. Acad. Sci.91:3844-3848.

**Guttridge, D., Albanese, C. Rether, Y. J, Pestell, G. R. y Baldwin S.A.** 1999. NF- $\kappa$ B Controls Cell Growth and Differentiation through Transcriptional Regulation of Cyclin D1. Molecular and Cellular Biology. 19(8): 5785-5799.

**Grumont JR, Rourke, J. I., Lorraine, A. Strasser, A. y Gerondakis, S.** 1999. B Lymphocytes Differentially Use the Rel and Nuclear Factor  $\kappa$ B1 (NF- $\kappa$ B1) Transcription Factors to Regulate Cell Cycle Progression and Apoptosis in Quiescent and Mitogen-activated Cells. J. Exp. Med. 187 (5). 663-674.

**Hames, B.D.** 1981. in: Gel Electrophoresis of proteins: A practical approach. (Hames.B.D. and Rickwood, D., eds) IRL Press, Oxford. 315-340.

**Hartman, P.S.** 1991. Crystal violet. Biotechniques. 11: 747-748.

**Hinz, M., Krappmann D. y cols.** 1999. NF- $\kappa$ B function in Growth Control: Regulation of Cyclin D1 Expression and G0/G1-to- S-phase Transition. JBC. 19(4). 2690-2698.

**J. Van Antwerp, D., Martin, J. S. Verma, M. I., y Green R.D.** 1998. Inhibition of TNF-induced apoptosis by NF- $\kappa$ B. Trens in Cell Biology. 8: 107-111.

**J. Sherr, Charles.** 1996. Cancer Cell Cycles. Science. 274. 1672-1676.

**J. May, M., y Ghosh S.** 1997. Rel/NF- $\kappa$ B and I $\kappa$ B proteins: an overview. Seminars in Cancer Biology. 8: 63-73.

**Jeffers, M., Rong, S., y F. Vande W.G.** 1996. Enhanced Tumorigenicity and Invasion-Metastasis by Hepatocyte Growth Factor/Scatter factor-Met Signalling in Human Cells Concomitant with Induction of the Urokinase Proteolysis Network. Molecular and Cellular Biology. 16(3). 115-1125.

**Jhonson, Mark., Koukoulis, G.** 1993. Hepatocyte growth factor induces proliferation and morphogenes in nonparenchymal epithelial liver cells. Hepatology 17, 1052-1061.

**Kaltschmidt, B., Kaltschmidt, C. Hehner P.S. y Schmitz, L.M.** 1999. Repression of NF- $\kappa$ B impairs HeLa cell proliferation by functional interference with cell cycle checkpoint regulators. Oncogene. 18. 3213-3225.

**Kato, G.J., Barrett, J., Villa, G.M., y Dang, C.V.** 1990. An amino-terminal c-myc domain required for neoplastic transformation activates transcription. Mol. Cell. Biol. 10:5914-5920.

**King, W.R. Deshaies, J. R., Peters, M. J., y Kirschner W. M.** 1996. How Proteolysis Drives the Cell Cycle. Science. 274. 1652-1658.

**Lewin, B.** 1990. Driving the cell cycle: M phase kinase, its partners, and substrates. Cell. 61: 743-752.

**Liang Q.** 1998. Signaling by HGF and KGF in corneal epithelial cells; Ras/MAP kinase and Jak-Stat pathways. Invest Ophthalmol Vis Sci. 39 (8), 1329-1338.

**Lindroos, M. P., Zarnegar, R., y Michlopoulos K.G.** 1990. Hepatocyte Growth Factor (Hepatopoiatina A) Rapidly increases in plasma before DNA síntesis ad liver regeneration stimulated by partial hepatectomy and Carbon Tetrachloride Administration. Hepatology. 743-748.

**Liu, Y., Sun, M.A. y Dworkin, D.L.** 1998. Hepatocyte Growth Factor protects Renal Epithelial Cells from Apoptotic Cell Death. BBRC. 246: 821-826.

**Longati, P., Albero, D., y Comoglio M.,** 1996. Hepatocyte growth factor is a

pleiotropic factor protecting cells from apoptosis. Cell Death and Differentiation. 3, 23-28.

**Madhani, D. H.** y Fink, R. G. 1998. The riddle of MAP Kinase signaling specificity. TIBS. 14 (1). 151-155.

**Marcu, K.B.,** Bossone. S.A. 1992. Myc function and regulation. Ann. Rev. Biochem. 61: 809-860.

**Mizuno, K.,** Higuchi, O., Ihle N.J. y Nakamura, T. 1993. Hepatocyte growth factor stimulates growth of hematopoietic progenitor cells. BBRC. 194. 178-186.

**Murray, A.,** y Hunt T. 1993. The Cell Cycle. W.H. Freeman. N.Y.

**Nakamura, T.** 1989. Molecular cloning and expresión of human hepatocyte growth factor. Nature. 342 (23): 440-443.

**Naidu, M.,** y, Rosen M.E. 1996. Role of scatter factor in the pathogenesis of AIDS-related kaposi sarcoma. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 91: 5281-5285.

**Ohtsubo, M.,** y Roberts, J.M. 1993. Cyclin-dependent regulation of G1 in mammalian fibroblast. Science. 259: 1908-1912.

**Ramadori, G.,** Neubauer, K., Nakamura, T., Knittel, T., y Buschenfelde, Z. M. 1992. The gene of Hepatocyte Growth Factor is expressed fat-storing cells of rat liver and is downregulated during cell growth and by transforming growth factor- $\beta$ . BBRC. 183 (2). 739-742.

**Rong, Y. C.,** y Tan Tse-Hua. 1998. Inhibition of the c-Jun N- terminal kinase (JNK) signaling pathway by curcumin. Oncogene. 17: 173-178.

**Sabapathy, K.** 1999. JNK2 is required for efficient T-cell activation and apoptosis but not for normal lymphocyte development. Current Biology. 9: 116-125.

**Sherr, C.J.** 1993. Mammalian G1 cyclins. Cell. 73: 1059-1065.

**Sipeki, S., Bander, E., Buday, L., Farkas, G., Bácsy, E., y Faragó A.** 1999. Phosphatidylinositol 3-kinase Contributes to ERK1/ERK2 MAP kinase Activation Associated with Hepatocyte Growth Factor-induced cell scattering. Cell Signal. 11(2): 885-890.

**Tajima, H. Matsumoto, K., y Nakamura T.** 1992. Regulation of Cell Growth and Motility by Hepatocyte Growth Factor and Receptor Expression in various cell species. Experimental Cell Research. 202: 423-431.

**Thompson Brad E.** 1998. The many roles of c-myc in apoptosis. Annu. Rev. Physiol. 60: 575-560.

**Vargas, A.G., Hoeflich, A., y Jehle, M. P.** 2000. Hepatocyte growth factor in renal failure: Promise and reality. Kidney International. 57: 1426-1436.

**Wang, W.** 1999 . A NF- $\kappa$ B/c-myc-dependent survival pathway is targeted by corticosteroids in immature thymocytes. J. Immunol 162 (1): 314-322.

**Whiteside, T., y Israel, A.** 1997. I $\kappa$ B proteins: structure, function and regulation. Seminars in Cancer Biology. 8: 75-82.

**Zanke, W. B., Boudreau, K., Rubie, E., Winnett, E., Tibbles, A.L. y Woodgett, R. J.** 1996. The stress-activated protein kinase pathway mediates cell death following injury induced by cis-platinum, UV irradiation or heat. Current Biology. 6(5). 606-613.

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

**Zarnegar, R., Muga, S., Rahija, R. y Michalopoulos, G. 1990. Tissue distribution of hepatopoietin a: A heparin-binding polypeptide growth factor for hepatocytes. Proc. Natl. Acad. Sci. Cell Biology. 87: 1252-1256.**

**Zarnegar, R., DeFrances, M., Kost, P.D., Lindroos, P., y Michalopoulos, K.G. 1991. Expression of Hepatocyte Growth Factor mRNA in Regenerating Rat Liver After Partial Hepatectomy. BBRC. 171 (1). 559-565.**

**Zioncheck F. T. 1995. Sulfated Oligosaccharides Promote Hepatocyte Growth Factor Association and Govern its mitogenic Activity. JBC. 270 (28):16871-16878**