

Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Medicina
Instituto de Investigaciones Biomédicas
Instituto de Fisiología Celular

**“Los correpresores nucleares Ski y SnoN son regulados
diferencialmente por TGF- β en hepatocitos”**

Tesis

Que para obtener el título de:
Licenciado en Investigación Biomédica Básica

Presenta:
Genaro Vázquez Victorio

Director de Tesis
Dra. Marina Macías Silva



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

Expresar para ser

“Somos todos humanos cuidadosos de nuestro ser, y por ello anhelantes de futuro. Pues si el futuro es el signo constante de incertidumbre en nuestra vida, sin embargo sabemos que tenemos un futuro, y tener un futuro es la máxima riqueza: la de una juventud. La riqueza ya lograda del pasado es una fortuna precaria, que se disuelve si no se renueva, y sólo puede renovarse de cara al porvenir: lo que se tiene ganado no exime de seguir buscando.” “Son muchos los caminos del cuidado, y se llaman **vocaciones**. Pero la vocación de la vida no es el camino de una profesión, sino aquello que nos movió a elegirla; más aún, lo que nos sigue moviendo a ejercerla de un cierto modo. Las profesiones se ejercen, en efecto, pero el ejercicio de la vida implica una motivación y decisión más hondas, de las cuales deriva el sentido que para nosotros hayamos de lograr las vocaciones particulares, y el de cuanto hagamos aparte de la profesión. Una forma de vida, más que una profesión, es lo que da carácter a nuestro ser, aquello en que cada quien emplea su cuidado mayormente. Pues a la llamada de la vida –y llamada es lo que significa vocación- no hay nadie que preste oídos sordos.”

Eduardo Nicol, *La vocación Humana*.

Consejo a un joven poeta

-Pregunta usted si sus versos son buenos. Me lo pregunta a mí. Antes se lo ha preguntado a otros. Los envía a las revistas. Los compara con otras poesías, y se inquieta cuando ciertas redacciones rechazan sus ensayos. Ahora (ya que usted me ha permitido aconsejarle), ruégole que abandone todo eso. Usted mira a lo exterior, y esto es, precisamente, lo que no debe hacer ahora. Nadie le puede aconsejar ni ayudar; nadie. Solamente hay un medio: vuelva usted sobre sí. Investigue la causa que le impele a escribir; examine si ella extiende sus raíces en lo más profundo de su corazón. Confíese si no le sería preciso en el supuesto que escribir le estuviera vedado. Esto ante todo: pregúntese en la hora más serena de su noche: “¿dedo escribir?”. Ahonde en sí mismo hacia una profunda respuesta; y si resulta afirmativa, si puede afrontar tan seria pregunta con un fuerte y sencillo “debo”, construya entonces su vida según esta necesidad; su vida tiene que ser, hasta en su hora más indiferente e insignificante, un signo y testimonio de este impulso...

Rainer Maria Rilke, *Cartas a un joven poeta*.

Fragmento de “Oda al Hígado” Pablo Neruda

Modesto,
organizado
amigo,
trabajador
profundo,
déjame darte el ala
de mi canto,
el golpe
de aire,
el salto
de mi oda:
ella nace
de tu invisible
máquina,
ella vuela
desde tu infatigable
y encerrado molino,
entraña
delicada
y poderosa,
siempre
viva y oscura.
Mientras

el corazón suena y atrae
la partitura de la mandolina,
allí adentro
tú filtras
y repartes,
separas
y divides,
multiplicas
y engrasas,
subes
y recoges
los hilos y los gramos
de la vida, los últimos
licores,
las íntimas esencias.
Viscera
submarina,
medidor
de la sangre,
vives
lleno de manos
y de ojos,
midiendo y trasvasando
en tu escondida
cámara
de alquimista...

Agradecimientos personales

A mi familia

Mi padre, José Luis: por apoyarme en todo momento, por respetar mis decisiones y por enseñarme a lograr mis sueños.

Mi madre, Gloria: por cuidar de mí con tanto amor, por ser tan fuerte ante las adversidades y por querer tanto a tu familia.

Mis hermanos, José Luís y Leonardo: por compartir su vida conmigo, por estar conmigo en los malos momentos y por todos los momentos en que nos hemos divertido.

Mi hermana, Gabriela: por todo lo que hemos pasado juntos todos estos años, por ser un ejemplo de vida, por corregirme en todo momento y por ser una gran amiga a quien le debo tanto.

A mis amigos

Diana, Sandra y Cristian: Por su enorme amistad, por soportar mis groserías y por sus valiosos consejos.

José René: Por su amistad incondicional a lo largo de la licenciatura.

José, Georgina, Valeria, Marco, Ana Lilia, Bernardo y José Miguel: Por ser parte en esta etapa de mi vida (licenciatura).

Ursula, Luciana, Adrián, Martha, Lucía, Adelma, Ana Bertha y Miguel Ángel: Por su enorme compañía durante las rotaciones de la licenciatura.

Paola, Marco Antonio y Marcela: por su amistad y los buenos momentos que pasamos dentro y fuera del laboratorio.

Laboratorio 225 Norte: por su valiosa compañía.

Agradecimientos académicos

A mis tutores

A la Dra. Marina Macías Silva: Por permitirme ser parte de su laboratorio, por su paciencia conmigo y por toda su valiosa asesoría.

A la Dra. Aleida Vázquez Macías: Por enseñarme a trabajar tan rigurosamente en el laboratorio.

A la Bióloga Aída Gabriela Guzmán López: Por introducirme en el trabajo de laboratorio y por su gran amistad.

A la Dra. Rosa Laura Camarena Mejía: Por su enorme paciencia y por ser un ejemplo del trabajo en el laboratorio.

A la Dra. Adela Rodríguez Romero: Por permitirme trabajar en su laboratorio y por todo el apoyo recibido.

A la Dra. Alejandra Hernández Santoyo: por todo lo que aprendí en la rotación, por su gran paciencia y por los buenos momentos.

A mis sinodales (el Dr. Rolando Hernández, la Dra. Erika Patricia Rendón Huerta, el Dr. Enrique Ortega Soto y el Dr. Jaime Iván Velasco Velásquez): Por valiosa crítica y comentarios sobre esta tesis.

Apoyo en este trabajo

A la Bióloga Marcela Sosa Garrocho: por su apoyo en la elaboración de las hepatectomías e inmunoblots realizados en este trabajo.

Al Maestro Marco Antonio Briones Orta: por el apoyo en la realización de las hepatectomías.

ÍNDICE

	Página
Abreviaturas	1
Resumen	3
Abstract	4
1. INTRODUCCIÓN	5
1.1 La vía canónica de señalización del TGF- β	6
1.2 Mecanismos de señalización del TGF- β dependientes de las proteínas Smad.....	9
1.3 Vías alternas de señalización del TGF- β independientes de las Smad.....	10
1.4 Los correpresores transcripcionales Ski y SnoN.....	12
1.5 Regulación de la vía del TGF- β mediada por los correpresores Ski y SnoN.....	14
1.6 Regulación de las proteínas Ski y SnoN mediada por TGF- β	16
1.7 Función y organización del hígado.....	18
1.8 Regeneración hepática.....	20
1.9 El papel del TGF- β en la regeneración hepática.....	21
2. ANTECEDENTES	22
3. HIPÓTESIS	25
4. OBJETIVO GENERAL	25
5. OBJETIVOS PARTICULARES	25
6. MATERIALES Y METODOS	26
6.1 Aislamiento de hepatocitos de rata (<i>Rattus norvegicus</i>).....	26
6.2 Hepatectomía parcial de hígado de rata.....	27
6.3 Cultivo celulares.....	27
6.4 Tratamiento con TGF- β y extracción de proteínas totales.....	28
6.5 Inmunoprecipitación (IP).....	28
6.6 Inmunoblot.....	29
7. RESULTADOS	30
7.1 Los correpresores Ski y SnoN son resistentes a la degradación mediada	

por TGF- β en hepatocitos quiescentes, pero no en hepatocitos en proliferación.....	30
7.2 Ski y SnoN adquieren sensibilidad a la degradación mediada por TGF- β durante el proceso de regeneración hepática en hepatocitos.....	35
7.3 Smurf2 y APC se encuentran presentes en hepatocitos en proliferación.....	36
8. DISCUSIÓN.....	39
9. CONCLUSIONES.....	43
10. PERSPECTIVAS.....	43
11. Bibliografía.....	44
12. Apéndice.....	51

Abreviaturas

α-MEM	<i>Alfa Modified Eagle's Medium</i>
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
APC	Complejo Promotor de la Anafase
BMP	Proteínas Morfogenéticas de Hueso
C-terminal	Carboxilo Terminal
Co-Smad	Smad Común
CDK	Cinasa Dependiente de Ciclinas
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
ECL	<i>Enhanced Quimioluminiscence</i>
EMT	Transición Epitelio-Mesénquima
EGF	Factor de Crecimiento Epidérmico
ERK	Cinasa Relacionada a la Señalización Extracelular
GDF	Factores de Crecimiento y Diferenciación
HBSS	<i>Hank's Balanced Salt Solution</i>
HC	Hepatocitos en Cultivo
HF	Hepatocitos Frescos
HSC	Células Estrelladas Hepáticas
HGF	Factor de Crecimiento de Hepatocitos
HAT	Acetilasa de Histonas
HDAC	Desacetilasa de Histonas
I-Smad	Smad Inhibitoria
IL-6	Interleucina 6
IP	Inmunoprecipitación
ITS	Insulina-Transferrina-Selenito
JNK	Cinasa de la Región NH ₂ -Terminal de Jun
KRB	Krebs-Ringer-Bicarbonato
MH1	Dominio 1 Homólogo a Mad
MH2	Dominio 2 Homólogo a Mad
MAPK	Proteína Cinasa Activada por Mitógenos
MEC	Matriz Extracelular

MEKK	<i>MAPK/ERK kinase kinase</i>
MFB	Miofibroblasto
MKK	<i>MAPK Kinase</i>
NH₂-terminal	Amino Terminal
N-CoR	Correpresor de Receptor Nuclear
ORF	Marco de Lectura Abierto
PBS	Solución de Buffer de Fosfatos
PDVF	Difluoruro de Polivinilideno
PH	Post-Hepatectomía
Pen/Strep	Penicilina/Estreptomicina
PP2A	<i>Serine/Threonine Protein Phosphatase 2A</i>
RAR	Receptor para Ácido Retinoico
R-Smad	Smad Regulada por Receptor
ROCK	<i>Rho-associated protein kinase</i>
S6K	<i>p70 ribosomal protein S6 kinase</i>
SAC	Complejo Activado de las proteínas Smad
STAT	<i>Signal Transducers and Activators of Transcription</i>
SBE	Elementos de Unión a las Smad
SFB	Suero Fetal Bovino
SMA	Actina de Músculo Liso
SOCS	Supresores de la Señalización Mediada por Citocinas
TA	Temperatura Ambiente
TAK1	<i>TGF-beta-activated kinase 1</i>
TβRI/II	Receptor de TGF-β tipo I/II
TGF-β	Factor de Crecimiento Transformante Beta
TNTE	Tris-NaCl-Tritón-EDTA

Resumen

Las proteínas de la superfamilia del factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) regulan múltiples procesos celulares incluyendo proliferación, crecimiento, apoptosis, diferenciación y migración. El TGF- β ejerce sus efectos, principalmente, a través de la activación de las proteínas Smad2/3 y regula la transcripción de múltiples genes blanco. Los correpresores Ski y SnoN regulan de manera negativa la vía de señalización del TGF- β bloqueando la actividad transcripcional de las proteínas Smad. Las proteínas Ski y SnoN son degradadas por la activación de los receptores del TGF- β y este proceso depende del contexto celular. Además, la sensibilidad de los hepatocitos a los efectos del TGF- β correlaciona con su estado de proliferación. Por lo tanto, en este trabajo estudiamos si el TGF- β regula de modo diferencial los niveles de Ski y SnoN en hepatocitos quiescentes y en proliferación. En hepatocitos quiescentes, observamos que las proteínas Ski y SnoN son resistentes a la degradación mediada por TGF- β . Por el contrario, los niveles de estos correpresores disminuyeron en los hepatocitos en proliferación tanto en el modelo de hepatocitos en cultivo como en los hepatocitos en regeneración, en respuesta al TGF- β . La proteína SnoN es ubiquitinada por las ligasas E3, Smurf2 y APC y es degradada vía proteosoma. De acuerdo con lo anterior, decidimos estudiar cuál de estas dos ligasas de ubiquitina está involucrada en la degradación de Ski y SnoN en hepatocitos en proliferación. Nosotros observamos que ni la proteína Smurf2 ni el complejo APC interactúan con SnoN en hepatocitos en proliferación. Ahora, como una perspectiva queda el estudiar por qué Ski y SnoN son resistentes a los efectos de TGF- β en hepatocitos en reposo. Además, estudiar, si esta regulación diferencial de los correpresores Ski y SnoN tiene algún efecto en la regulación transcripcional de genes dependientes de TGF- β .

Abstract

SnoN and Ski nuclear co-repressors are regulated differentially by TGF- β in hepatocytes

TGF- β controls diverse cellular processes such as growth, proliferation and apoptosis. TGF- β signals mainly through the activation of Smad2/3, and regulates transcription of TGF- β -dependent genes. Ski and SnoN co-repressors regulate TGF- β signalling by blocking Smad transcriptional activity. Ski and SnoN are degraded by TGF- β , and SnoN sensitivity to degradation depends on the cellular context. Moreover, hepatocytes' sensitivity to TGF- β also correlates with their proliferation state. Thus, we aimed to study whether TGF- β downregulates Ski and SnoN levels when hepatocytes are proliferating. In quiescent hepatocytes, we observed that Ski and SnoN are insensitive to degradation when challenged with TGF- β . On the contrary, Ski and SnoN co-repressors protein levels decrease in proliferating and regenerating hepatocytes. SnoN is ubiquitinated by Smurf2 and APC E3 ligases and degraded via proteasome. Therefore, we decided to study which of those ligases is involved in TGF- β -dependent Ski and SnoN degradation in hepatocytes. We observed that neither Smurf2 nor APC interact with SnoN protein in proliferating hepatocytes. Now, we want to study why Ski and SnoN are resistant to degradation by TGF- β in quiescent hepatocytes. In addition, we want to explore if SnoN and Ski resistance to degradation in arrested hepatocytes has a significant effect on TGF- β -dependent transcriptional regulation.

INTRODUCCIÓN

Las proteínas de la superfamilia del factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) regulan múltiples procesos celulares incluyendo proliferación, crecimiento, apoptosis, diferenciación y migración^{33,42}. Estos factores controlan la especificación celular en el desarrollo temprano, desde *D. melanogaster* hasta los mamíferos. Existen cerca de 42 marcos de lectura abiertos (ORF) que codifican para los miembros de esta familia de proteínas en humano, 9 ORF en la mosca de la fruta y 6 ORF en *C. elegans*. Las citocinas de la superfamilia del TGF- β se caracterizan por contener seis residuos de cisteína conservados entre sus miembros, además de compartir ciertas características estructurales y funcionales⁴². La forma activa de las citocinas de la familia del TGF- β es un dímero que es estabilizado por interacciones hidrofóbicas y puentes disulfuro. La superfamilia del TGF- β se divide en la familia de las proteínas morfogenéticas de hueso (BMP) y los factores de crecimiento y diferenciación (GDF); y en la familia de las activinas y de los TGF- β ⁴² (Tabla 1).

Tabla 1. Miembros de la superfamilia del TFG- β	
Subfamilia	Funciones
Factor de crecimiento transformante beta: TGF- β 1, TGF- β 2 y TGF- β 3 TGF- β 4 (pollo) TGF- β 5 (<i>Xenopus</i>)	<ul style="list-style-type: none"> • Inhibición del crecimiento • Inmunodepresión • Producción de MEC • Diferenciación y apoptosis
Activinas: Activina A-E.	<ul style="list-style-type: none"> • Regulación del desarrollo embrionario • Inducción de Mesodermo • Regulación de la función de la pituitaria
Proteínas morfogenéticas de hueso: BMP2-8 Dpp (<i>Drosophila</i>) y Vg1 (<i>Xenopus</i>) GDF1-3, GDF5-11 y GDF15	<ul style="list-style-type: none"> • Regulación del desarrollo embrionario • Morfogénesis de Hueso • Neurogénesis
Miembros divergentes: AMH/MIS GDNF Inhibina A-B	<ul style="list-style-type: none"> • Diferenciación sexual • Supervivencia de neuronas dopaminérgicas • Regulación de la función de la pituitaria

El TGF- β se caracteriza por sus efectos de inhibición del crecimiento y producir apoptosis en células epiteliales; además de inhibir la función y la proliferación de células del sistema inmune^{10,33}. Sin embargo, se conoce que el TGF- β promueve la proliferación celular⁸, la síntesis de matriz extracelular^{18,45} (MEC) y la secreción de citocinas en fibroblastos⁴⁵. El TGF- β también regula la migración y la proliferación celular en las células endoteliales. Esta característica del TGF- β de tener efectos opuestos depende del contexto celular, es decir de la presencia o ausencia de factores reguladores indispensables para activar múltiples genes dependientes de TGF- β ⁴⁵. El TGF- β utiliza un sistema de señalización básico, el cual puede ser leído de diferentes formas dependiendo del tipo celular, el estadio de diferenciación y el ambiente extracelular.

La vía canónica de señalización del TGF- β

El TGF- β ejerce sus efectos en la célula a través de la formación de un complejo entre un dímero del receptor tipo II (T β RII) y un dímero del receptor tipo I (T β RI)^{10,42} (Tabla 2). El TGF- β une a un tercer receptor, el receptor tipo III o betaglicano, que está involucrado en la presentación del TGF- β al T β RII⁴².

Tabla 2. Combinación entre los receptores tipo I y tipo II para los miembros de la superfamilia del TGF- β

Receptor Tipo II	Receptor Tipo I	R-Smad
BMPRII	ALK-2 (ActRI) ALK-3 (BMP-RIA) ALK-6 (BMP-RIB)	Smad1, Smad5 y Smad8
ActRII, ActRIIB ActRIIB	ALK-4 (ActRIB) ALK-7	Smad2 Smad2
T β RII	ALK-5 (T β RI) ALK-1 ALK-2	Smad2 y Smad3 Smad1 y Smad5
AMHR	ALK-3 ALK-2 ALK-6	Smad1 y Smad5

El receptor tipo II contiene un dominio de cinasa de residuos de treonina/serina, que se encuentra activado de manera constitutiva, y una vez que se forma el heterodímero entre los receptores, el T β RII fosforila al receptor tipo I en la región GS. La región GS es rica en residuos de serina y treonina, lo que permite la activación del dominio de cinasa de serina/treonina del T β RI. El receptor tipo I une y fosforila a las proteínas Smad2/3 o Smad reguladas por receptor (R-Smad) en la región carboxilo terminal (C-terminal)^{20,30}, con la ayuda de una proteína unida a membrana, SARA, que mantiene a las proteínas Smad2/3 cerca del T β RI para ser activadas en el momento que el TGF- β une a los receptores. Las proteínas Smad2/3 activadas por fosforilación unen a la proteína Smad4 o Smad común (Co-Smad) y este nuevo complejo Smad activado es capaz de traslocarse al núcleo¹⁹, donde ejerce sus efectos de regulación a nivel transcripcional en múltiples genes blanco (Fig. 1).

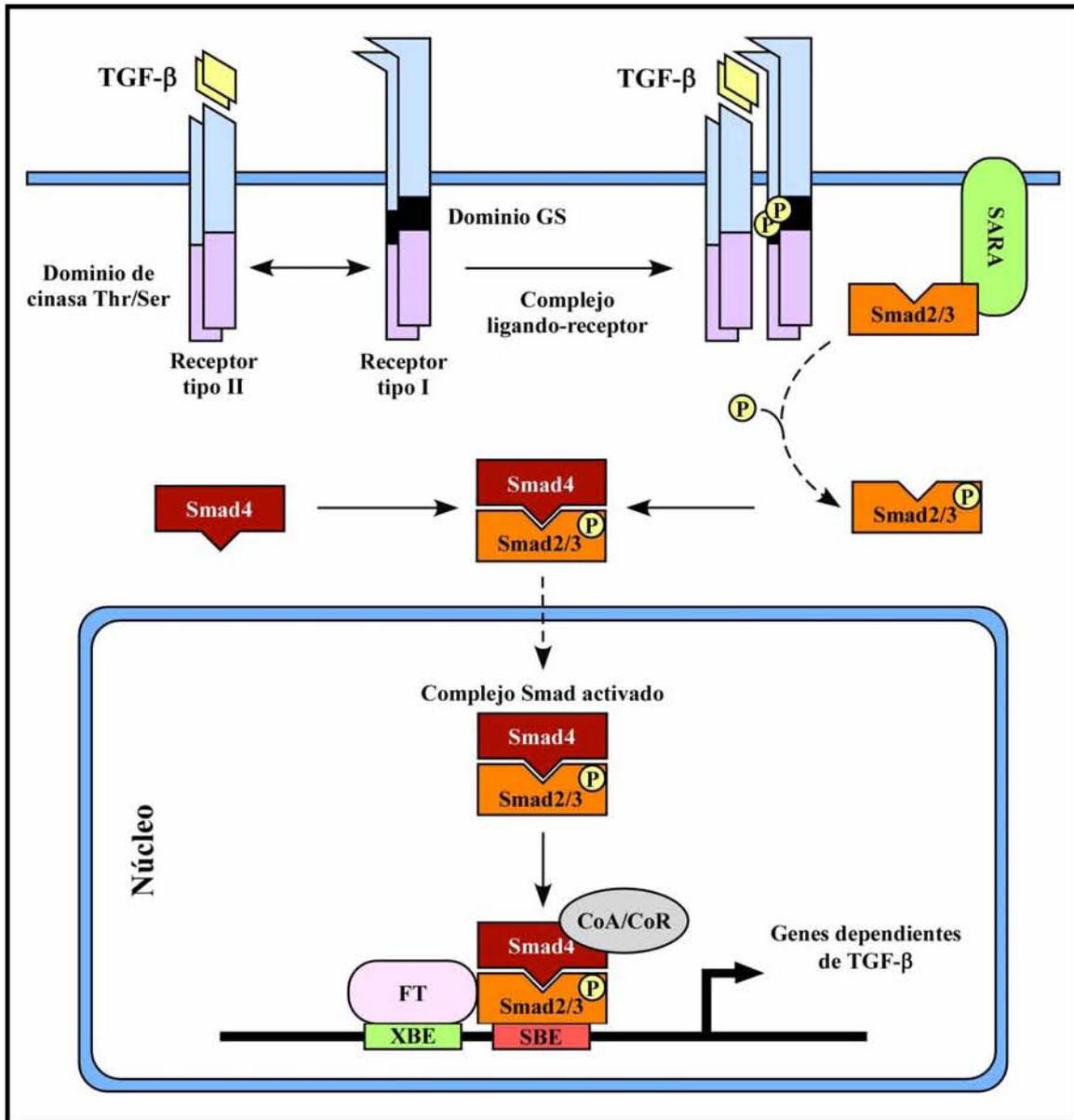


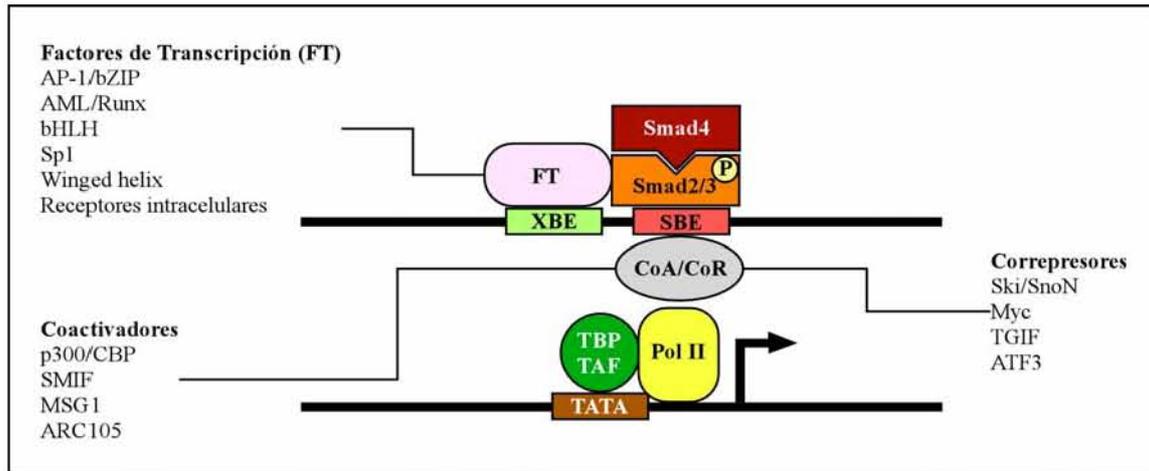
Figura 1. Vía de señalización canónica del TGF- β . El TGF- β ejerce sus efectos a través de la unión del receptor tipo II con el receptor tipo I. Las proteínas R-Smad son presentadas al receptor tipo I activado mediante la proteína SARA que se encuentra anclada al receptor. La proteína Smad4 une a las proteínas Smad2/3 activadas y el complejo activado de las proteínas Smad trasloca al núcleo donde se une a elementos de regulación específicos de las Smad (SBE) en el promotor y regula la transcripción de múltiples genes blanco de TGF- β . El complejo activado de las proteínas Smad une a cofactores (FT) que unen a secuencias específicas en el promotor (XBE), coactivadores (CoA) y correpresores (CoR) transcripcionales permitiendo a las proteínas Smad controlar la transcripción de manera positiva o negativa.

Mecanismos de señalización del TGF- β dependientes de las proteínas Smad

La unión del complejo activado de las proteínas Smad (SAC) a los elementos de unión a las Smad (SBE) en los promotores, permite el control transcripcional de un gran número de genes dependientes del TGF- β . Las proteínas Smad están formadas por tres dominios principales que son: 1) el dominio 1 homólogo a Mad (MH1) localizado en la región amino terminal (NH₂-terminal), 2) la región puente o *linker*, que es la región encargada de unir a los dominios MH1 y MH2, y 3) el dominio 2 homólogo a Mad (MH2) en el extremo C-terminal. El dominio MH1 es la región responsable de unir al ADN en secuencias conservadas (CAGAC), aunque solo las proteínas Smad3 y Smad4 son capaces de unirse a los SBE, debido a que la proteína Smad2 contiene una secuencia de aminoácidos extra en el MH1 que interrumpe el motivo *β -hairpin*, motivo indispensable para la unión a los SBE. El dominio MH2, es la secuencia de regulación de las Smad debido a que es la región involucrada en la unión al receptor T β RI, en la activación transcripcional, en la formación del complejo activo de las proteínas Smad, y además de que es la región en donde las R-Smad son fosforiladas en el motivo SSXS.

Las proteínas R-Smad y Smad4 son capaces de reclutar a un sin número de cofactores, de coactivadores y de correpresores en los dominios MH1 y MH2 principalmente^{2,15} (Fig. 2). La unión de factores de transcripción, junto con las proteínas Smad, a secuencias específicas en el DNA permite una alta afinidad de unión y selectividad por los promotores que contienen los elementos de regulación indispensables. Un ejemplo claro de unión a cofactores, es la interacción entre los factores transcripcionales FoxO y las proteínas Smad en el promotor de *p15* y *p21*⁴¹, donde la unión de ambos factores transcripcionales es indispensable para la activación transcripcional de ambos genes²⁵. Las proteínas p15 y p21 son inhibidores de cinasas dependientes de ciclina (CDK), que están involucradas en los efectos de inhibición del crecimiento mediado por TGF- β ⁴¹. El reclutamiento de corre reguladores a través de las proteínas Smad, controla de manera positiva o negativa el proceso de transcripción de genes dependientes de TGF- β ⁹. Las proteínas Smad unen a p300 y a CBP, que son coactivadores que poseen

actividad de acetilasas de histonas (HAT), y esta interacción permite la activación de la transcripción de sus genes blanco. Por otro lado, las proteínas Smad unen a correpresores como TGIF^{58,59}, c-Myc y las oncoproteínas SnoN y Ski^{28,59}; todos estos correpresores unen a desacetilasas de histonas (HDAC) las cuales reprimen la transcripción.



Modificada de Derynck R., *et al.* 2003

Figura 2. El complejo activado de las proteínas Smad. Las proteínas Smad reconocen a los elementos de regulación SBE en los promotores de los genes blanco del TGF- β (aunque no son las únicas secuencias regulatorias en el promotor) y requieren de la unión de otros cofactores transcripcionales específicos para regular a su gen blanco. Entre los múltiples factores transcripcionales que unen a las proteínas Smad encontramos al factor transcripcional AP-1 y al factor Sp1 que unen a secuencias ricas en GC¹⁵. Las proteínas Smad también unen a coactivadores que regulan positivamente la transcripción del gen blanco, entre los cuales encontramos al coactivador clásico p300/CBP. Las proteínas Smad regulan la transcripción negativamente a través de la unión de correpresores como TGIF⁵⁸, c-Myc y las oncoproteínas Ski y SnoN.

Vías alternas de señalización del TGF- β independientes de las Smad

Aunque la vía de las proteínas Smad es la vía canónica del TGF- β , éste no es el único medio por el cual el TGF- β ejerce sus efectos en la célula (Fig. 3). El TGF- β puede activar otras vías de señalización que son activadas por estrés, como la vía clásica de las MAP cinasas como ERKs, p38 y JNK^{9,14,17,19,63}. El TGF- β también

puede activar a RhoA, que es una proteína G pequeña involucrada en la formación de fibras de estrés (síntesis de SMA) y degradación de E-cadherina, procesos característicos en la transición de epitelio a mesénquima (EMT)⁴. La activación de estas vías alternas por TGF- β depende de la actividad de cinasa del receptor tipo I. Esta activación procede rápidamente y es independiente de la síntesis de proteínas, aunque se desconocen los mecanismos por los cuales se activan estas vías por el T β RI. Se propone que el TGF- β activa directamente algunos intermediarios para las ERKs y las cinasas p38/JNK, como Ras²¹ y TAK1⁴⁵, respectivamente. Además en algunos casos se ha observado un retraso en la activación de p38, ésto se relaciona con el hecho de que el TGF- β induce la expresión de la proteína GADD45 β , que es un activador de MEKK4 en la vía de p38⁵². El TGF- β también activa a la fosfatasa PP2A, que es un regulador negativo de la cinasa S6 (S6K) que regula la elongación traduccional³³.

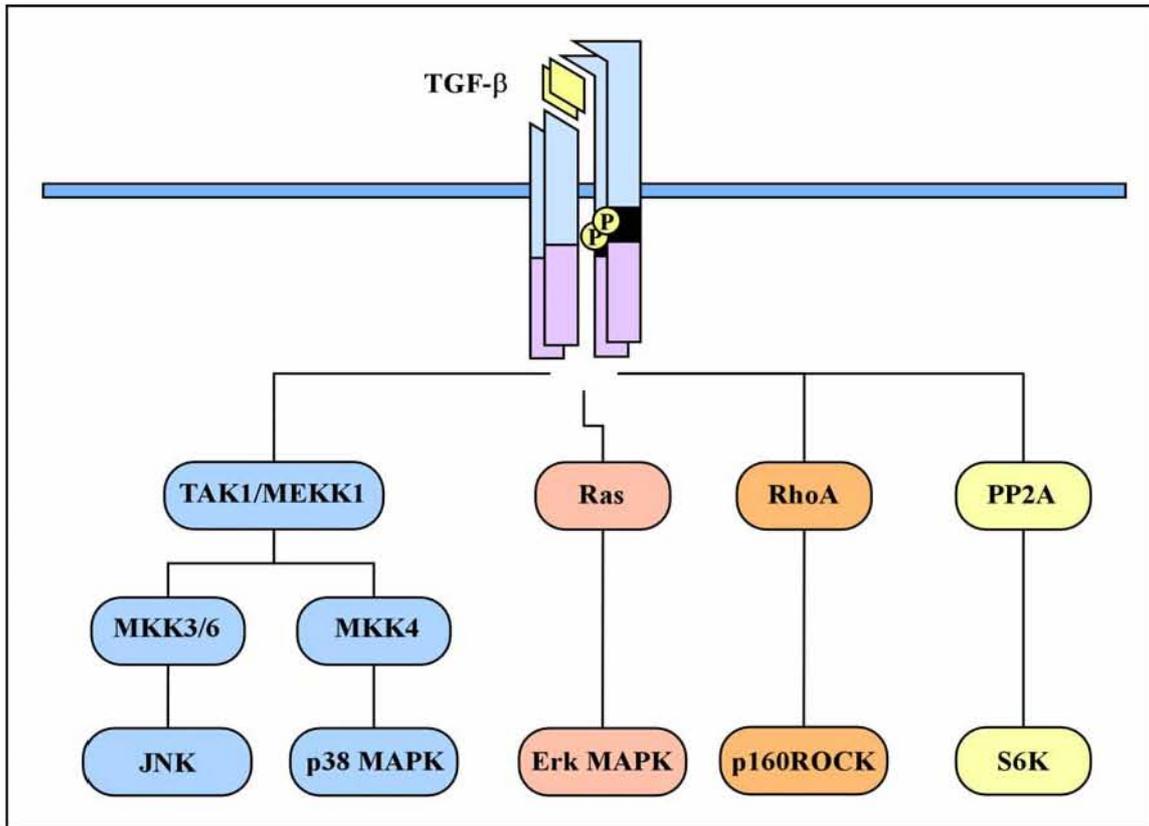
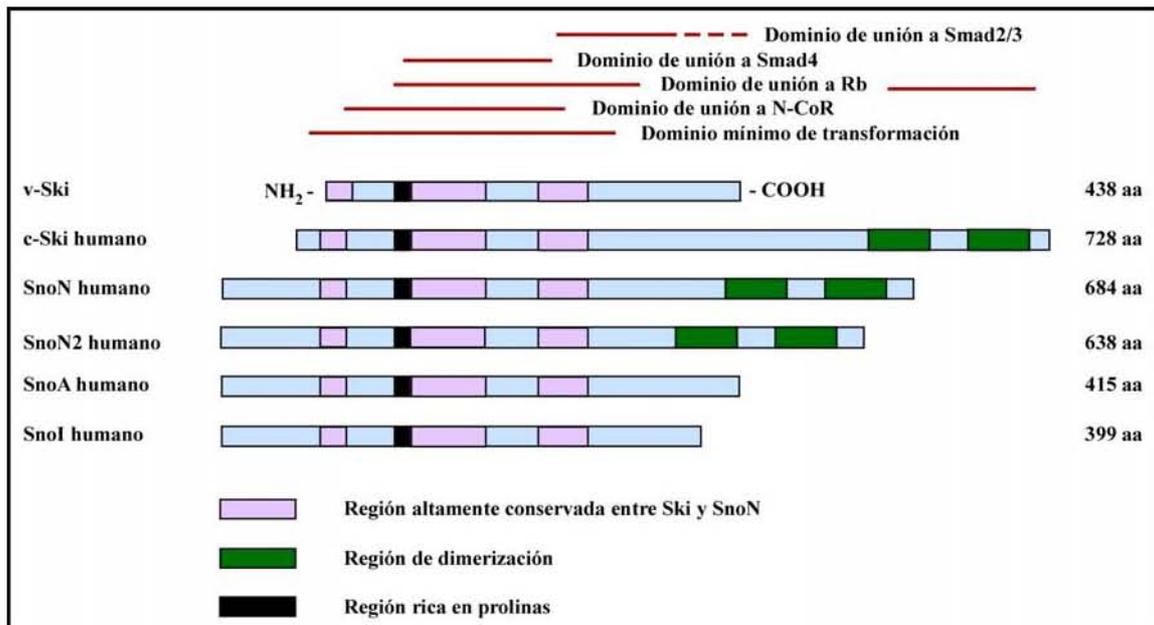


Figura 3. Señalización del TGF- β independiente de las proteínas Smad. Además de la vía clásica, el TGF- β ejerce sus efectos mediante mecanismos independientes de las proteínas Smad; la activación de estas vías es dependiente de la actividad de cinasa del receptor tipo I. La vía de las MAP cinasas son activadas por TGF- β ; esta activación es independiente de la síntesis de proteínas. El TGF- β puede regular la reorganización del citoesqueleto mediante la activación de la GTPasa pequeña RhoA⁴.

Los correpresores transcripcionales Ski y SnoN

Las proteínas Ski y SnoN pertenecen a la familia de oncoproteínas Ski²⁸. La oncoproteína Ski se identificó como una proteína (v-Ski) que inducía la transformación oncogénica de fibroblastos embrionarios de pollo. c-SnoN y tres isoformas de SnoN (SnoN2, SnoA y SnoI), derivadas del procesamiento alternativo del ARN mensajero de *snoN*, son proteínas homólogas de c-Ski, y fueron identificadas posteriormente en el humano. Los miembros de esta familia tienen una secuencia mínima de transformación altamente conservada cerca del extremo NH₂-terminal (Fig. 4). Esta secuencia de homología a Ski es necesaria y

suficiente para la actividad transformante de las proteínas Ski y SnoN²⁸. El extremo C-terminal es una secuencia altamente variable entre los miembros de esta familia aunque es la región responsable de la formación de homodímeros y heterodímeros entre SnoN, SnoN2 y Ski³⁶.



Modificada de Liu X., *et al.* 2001

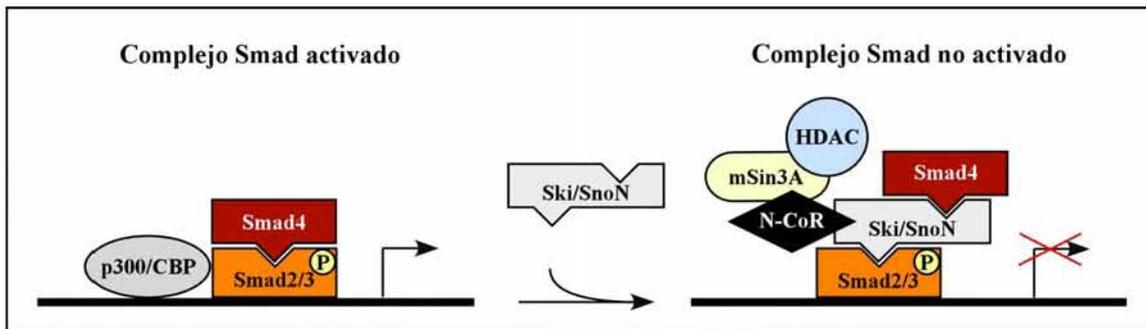
Figura 4. Familia de proto-oncoproteínas Ski. Los miembros de la familia de las proteínas Ski contienen una región altamente conservada en el dominio NH₂-terminal indispensable para la transformación celular característica de esta familia. La capacidad de unir a las proteínas Smad es la responsable de sus efectos de transformación. La proteínas Ski, SnoN y la forma alternativa de SnoN, SnoN2, contienen una región de dimerización que permite la formación de homodímeros y heterodímeros. Además estas proteínas pueden unir proteínas independientes de la vía del TGF- β como retinoblastoma (Rb), el factor Glí3, perteneciente a la vía de *Sonic Hedgehog*, y el receptor de ácido retinoico (RAR). Ski y SnoN pueden reclutar a otros correpresores transcripcionales como N-CoR.

La sobre-expresión de los correpresores Ski y SnoN induce la transformación y el crecimiento independiente de anclaje en fibroblastos embrionarios de pollo²⁸; además induce la diferenciación a músculo en células embrionarias de pollo³⁵. Sin embargo, esta reportado que las proteínas SnoN y Ski pueden actuar como

proteínas supresoras de tumores en algunos tipos celulares^{28,43}. Los ratones heterocigotos para *sno* (*sno*^{+/-}) y *ski* (*ski*^{+/-}) son más susceptibles a tumorigénesis por carcinógenos^{28,44}. Además, el ratón *sno*^{+/-} desarrolla linfomas de manera espontánea con respecto al ratón silvestre (*sno*^{+/+})³⁷. Los correpresores Ski y SnoN son indispensables para el desarrollo embrionario temprano, debido a que los ratones *knockout* para ambas proteínas mueren en estadios tempranos del desarrollo^{3,28}. SnoN es indispensable para la formación del blastocisto²⁸. Ski participa en el desarrollo del sistema nervioso central y el desarrollo del músculo esquelético^{3,28}.

Regulación de la vía del TGF-β mediada por los correpresores Ski y SnoN

Los correpresores SnoN y Ski son reguladores negativos de los efectos ejercidos por el TGF-β y de las proteínas BMP^{1,28,48,50}; esta regulación negativa es la principal responsable de su actividad transformante^{28,64}. La sobre-expresión de Ski y SnoN bloquea los efectos de inhibición del crecimiento regulados por TGF-β²⁹. Las proteínas Ski y SnoN interactúan directamente con las proteínas Smad2/3 y Smad4 en diferentes sitios¹⁶ (Fig. 4), aunque c-Ski puede también interactuar con las proteínas Smad1/5/8, que son reguladas por la vía de las BMP. Esta interacción le permite a Ski y SnoN ser reclutados a los promotores de genes dependientes de TGF-β⁵⁰, reprimiendo la habilidad de las proteínas Smad para activar la transcripción^{1,29,38,48,61} (Fig. 5). Con estudios de cristalografía, se observó que Ski interactúa con Smad4, en la misma región en la cual Smad4 une a las proteínas Smad2/3 fosforiladas^{28,60}. Por lo tanto, la unión de SnoN o Ski con Smad4 interfiere en la interacción de Smad4 y las proteínas R-Smad, bloqueando la formación de un complejo activo de las proteínas Smad⁶⁰. También está reportado que Ski y SnoN bloquean la unión de coactivadores, como p300/CBP, a las proteínas Smad activas.



Modificada de Luo K. 2004

Figura 5. Mecanismo de represión de Ski y SnoN para el complejo activo de las proteínas Smad. Las proteínas Ski y SnoN se unen directamente a las proteínas Smad a través de diferentes regiones¹⁶. La unión de Ski y SnoN con las proteínas Smad es dependiente de ligando (TGF- β)²⁸. La capacidad de ambos correpresores de interactuar con las proteínas Smad2/3 y la proteína Smad4 en distintos sitios¹⁶ les permite a Ski y SnoN bloquear el complejo activado de las proteínas Smad; además Ski y SnoN reclutan a correpresores como N-CoR y desacetilasas de histonas (HDAC) bloqueando la transcripción de genes blanco de las proteínas Smad.

Las oncoproteínas SnoN y Ski tienen la capacidad de unirse a otros correpresores como el correpresor de receptor nuclear N-CoR⁵³ y las proteínas reclutadoras de desacetilasas de histonas²⁸ HIPK2, MeCP2 y mSin3A, lo que permite el bloqueo de la transcripción en genes blanco de las proteínas Smad (Fig. 5). Aunque hay pocos estudios, se ha reportado que Ski puede interactuar con otras proteínas independientes de la vía de señalización del TGF- β , como el receptor del ácido retinoico alfa⁷ (α -RAR), el factor Gli3, la proteína retinoblastoma (Rb) y el factor Skip²⁸. El correpresor Ski funciona también como regulador negativo de los genes controlados por estas proteínas. Sin embargo, está reportado que Ski funciona como coactivador en la unión con el factor transcripcional NF-1²⁷. Por otro lado, en lo que refiere a SnoN, se ha reportado que se requiere de la presencia de este correpresor para la activación transcripcional de promotores dependientes de TGF- β ⁴⁰.

Regulación de las proteínas Ski y SnoN mediada por TGF- β

El TGF- β regula a los correpresores SnoN y Ski a diferentes niveles^{28,47,49}; aunque no es la única señal que regula los niveles de estas proteínas^{54,62}. La forma activa de las proteínas Smad2/3 une e induce la degradación de las proteínas Ski y SnoN, mediante la formación de un complejo con ligasas E3 de ubiquitina, a través de un proceso dependiente del proteosoma 26S⁴⁹. La proteína Smurf2 es una ligasa de ubiquitina con un dominio HECT que se une al motivo PY de Smad2 a través de su dominio WW. La proteína Smad2 sirve de adaptador entre las proteínas SnoN y Smurf2, lo que permite a esta última ubiquitinar a SnoN⁶ (Fig. 6). El complejo promotor de la anafase (APC), es otra ligasa E3 de ubiquitina que interacciona indirectamente con SnoN⁵⁶. La unión de APC con SnoN depende de la secuencia de destrucción (*Dead-box*) que está localizada en el extremo NH₂-terminal de SnoN. Esta secuencia se encuentra en proteínas que participan en el ciclo celular. Las proteínas CDH1 o CDC20 se unen a la secuencia de destrucción, lo que permite el reconocimiento de APC a su proteína blanco. La proteína CDH1 une a SnoN permitiendo la formación del complejo SnoN-CDH1-APC⁵⁶, que depende también de la interacción con Smad3⁴⁶. Al ensamblarse este complejo, APC ubiquitina a SnoN dirigiéndolo a su degradación (Fig. 6). Aunque se desconoce por completo si ocurre un proceso similar en la degradación de la proteína Ski por TGF- β , se ha reportado que su degradación es también dependiente del proteosoma 26S⁴⁹. Además, se supone que las ligasas de ubiquitina, mencionadas anteriormente, participan en su degradación.

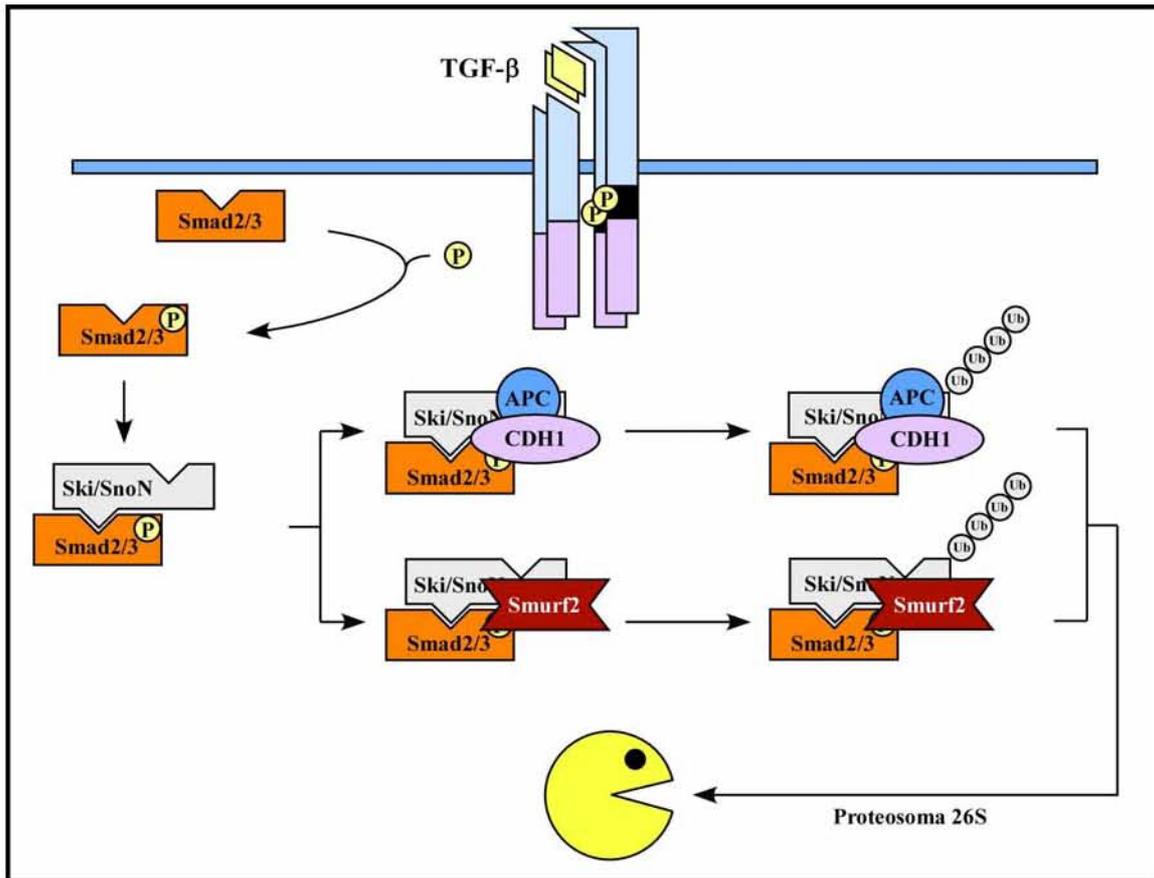


Figura 6. Degradación de Ski y SnoN mediada por TGF- β dependiente del proteosoma 26S. Los correpresores Ski y SnoN se unen a las proteínas Smad activas regulando negativamente al complejo activado de las proteínas Smad. La interacción de Ski y SnoN con las proteínas Smad activadas promueve la degradación de ambos correpresores, siendo un proceso dependiente del proteosoma 26S. Existen hasta el momento descritas dos ligasas E3 de ubiquitina que interaccionan con la proteína SnoN: la proteína nuclear Smurf2 y el complejo promotor de la anafase (APC). La degradación de la proteína SnoN requiere de la unión de Smad2/3 con Smurf2, que contiene el motivo PY que es reconocido por Smurf2⁶. SnoN contiene la secuencia *Dead box* que es reconocida por la proteína CDH1 la cual se une a APC.

Está reportado que el TGF- β puede inducir la transcripción del gen que codifica para la proteína SnoN a partir de las 2 horas de tratamiento en algunas líneas celulares. Por lo tanto, el TGF- β incrementa los niveles del correpresor SnoN, lo que inhibe la función del complejo activo de las proteínas Smad, y termina con la señalización mediada por TGF- β ²⁸, lo que funciona como un mecanismo de

regulación negativa^{47,64}. No se conoce ninguna citocina que regule los niveles del correpresor Ski, aunque se ha observado una recuperación de la proteína Ski después de retirar el estímulo por TGF- β .

Otro mecanismo por el cual la señalización del TGF- β puede ser terminada, es una asa de retroalimentación negativa. Se ha observado que uno de los genes que responden al complejo activado de las proteínas Smad, es el gen que codifica para la proteína Smad7 o Smad inhibitoria (I-Smad). La proteína Smad7 impide la unión de las proteínas Smad2/3 al receptor tipo I, evitando que sean fosforiladas. La proteína Smad7 también dirige a degradación al receptor tipo I mediante la interacción con las proteínas Smurf1/2, que son ligasas E3 de ubiquitina^{12,22,42}.

Función y organización del hígado

El hígado controla el metabolismo de múltiples compuestos como carbohidratos, aminoácidos, lípidos, cuerpos cetónicos, proteínas del plasma y ácidos biliares, así como también está involucrado en la eliminación de xenobióticos⁵⁵. Por lo cual, se considera al hígado como un centro metabólico y de defensa. El hígado funciona como el principal proveedor de energía en el organismo, sintetizando glucógeno cuando existe un exceso de glucosa en el torrente sanguíneo, y liberando glucosa para mantener procesos que requieren una gran aportación de esta fuente de energía. El hígado también alberga otras vías metabólicas que utilizan como fuente de energía lípidos y proteínas, con el propósito de mantener la homeostasis del organismo. La producción de sales biliares en el hígado permite al organismo un procesamiento de lípidos. Debido a que el hígado es el centro regulador de procesos indispensables para el organismo, se requiere de un control estricto para mantener la estructura y función normal del hígado⁵¹.

El hígado está compuesto de dos principales tipos celulares⁵⁵: el primer grupo lo conforman los hepatocitos o células parenquimatosas, que son las células encargadas de todos los procesos metabólicos que se llevan a cabo en el hígado. Los hepatocitos son el tipo celular más abundante, siendo alrededor de un 80%

del total del número de células en el hígado. El otro grupo esta compuesto por las células no parenquimatosas, que comprende a las células estrelladas hepáticas (HSC), las células endoteliales y las células de Kupffer (macrófagos). Las células no parenquimatosas abarcan el 20% restante del total de las células en el hígado (Fig. 7). La función de las HSC es el almacenamiento de ésteres de retinol (vitamina A) y el recambio de proteínas de la matriz extracelular en el hígado normal. Sin embargo, las HSC están relacionadas a procesos patológicos que resultan en fibrosis, que es la síntesis no controlada de proteínas de la MEC causados por daño al hígado, en donde las HSC son activadas y se transdiferencian a miofibroblastos (MFB). Las células endoteliales dan forma a los sinusoides, que regulan la entrada de componentes del plasma al espacio de *Disse*, en donde las células parenquimatosas los capturan para metabolizarlos. Las células de Kupffer se encuentran en los sinusoides y participan en la respuesta inmune que se lleva a cabo de manera específica en el hígado.

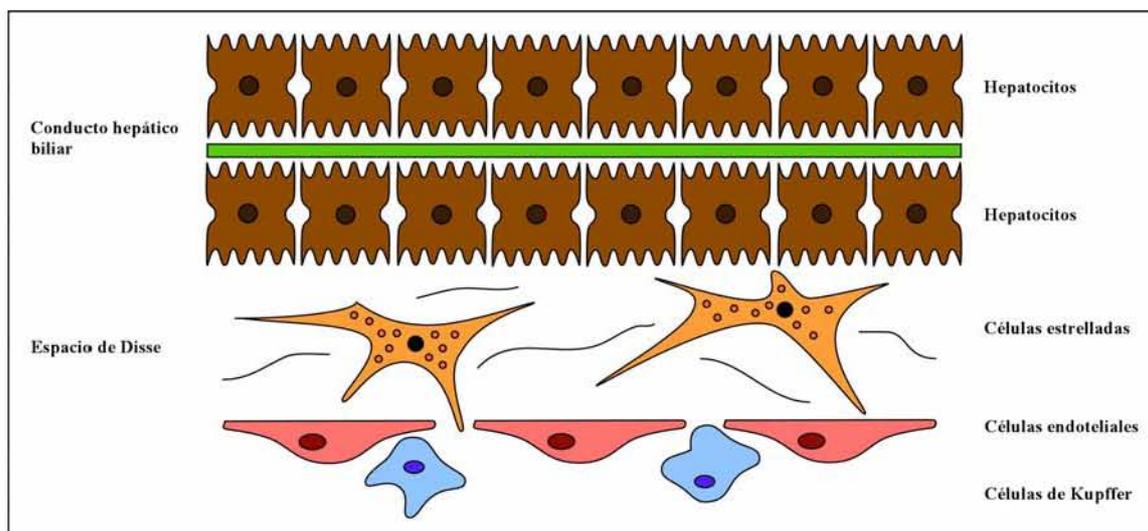


Figura 7. Arquitectura celular funcional del hígado. El hígado esta compuesto de dos principales tipos celulares: las células parenquimatosas (hepatocitos) y las células no parenquimatosas. Los hepatocitos son los responsables de regular el metabolismo de múltiples compuestos. Las células no parenquimatosas abarcan a las células estrelladas hepáticas (HSC), las células endoteliales y las células de Kupffer (macrófagos). Las células endoteliales forman los sinusoides en el lóbulo hepático que permite el paso de complejos macromoleculares en el espacio de Disse. La salida de

los pigmentos y sales biliares es a través de los conductos biliares hepáticos que se encuentran entre los hepatocitos.

Regeneración hepática

El hígado tiene la capacidad de regenerarse después de haber sufrido un daño o por la remoción de un fragmento del hígado (hepatectomía parcial)³⁴. Esta característica particular del hígado se debe a la enorme capacidad de proliferación y diferenciación de los hepatocitos, además de que los hepatocitos nunca pierden sus funciones metabólicas básicas durante todo el proceso de regeneración⁵¹. Está reportado que los hepatocitos se dividen de una a dos veces a las 24 horas después de la hepatectomía parcial (PH)⁵¹. En el caso de las células no parenquimatosas, se observa que proliferan a partir de las 48 horas PH⁵¹. Estudios de trasplante de hígado indican que células madre de médula ósea pudieran diferenciarse a hepatocitos, aunque la participación de estas células no es la responsable de la recuperación total del volumen hepático⁵¹. Además, este proceso requiere de un cambio completo en la arquitectura celular del hígado. Los hepatocitos forman aglomerados (*clusters*) de 8-10 células debido a su rápida proliferación, lo que provoca una disminución en la longitud de los sinusoides⁵. También se observa la activación de las HSC, indispensable para el proceso de fibrogénesis y la reorganización de las células endoteliales^{5,51}.

El proceso de regeneración hepática y muchos de los mecanismos que participan en este han sido estudiados ampliamente³⁴, aunque aún no se tiene una idea clara de lo que sucede a lo largo de todo el proceso de regeneración. Está reportada la participación de múltiples citocinas en el proceso regeneración hepática, de las cuales destacan el factor de crecimiento hepático (HGF), el factor de crecimiento epidérmico (EGF), la interleucina 6 (IL-6) y el TGF- β ⁵¹. El HGF es la principal citocina que induce la proliferación en hepatocitos. IL-6 tiene una función de protección a los efectos apoptóticos, generados en un hígado en regeneración, en los hepatocitos. También se conocen la participación de un gran número de factores transcripcionales como AP1, FoxO, STAT3 y C/EBP β ⁵¹. La participación de los supresores de la señalización mediadas por citocinas (SOCS) que

previenen la activación de las proteínas STAT, mediante la interacción con las cinasas JAK fosforiladas, y el TGF- β regulan la terminación de la regeneración hepática. Se ha demostrado que la señalización de IL-6 regula positivamente los niveles de SOCS3, y correlaciona con la regulación negativa de la fosforilación de STAT3 y la terminación de la señalización de IL-6.

El papel del TGF- β en la regeneración hepática

El principal factor de crecimiento que regula negativamente la proliferación de las células hepáticas es el TGF- β ⁵, de aquí que se proponga al TGF- β como la citocina encargada de regular el tamaño final del hígado en regeneración. Se ha reportado que la perfusión del TGF- β retrasa el crecimiento del hígado en regeneración, aunque no detiene el proceso totalmente. El TGF- β se encuentra presente durante todo el proceso de regeneración hepática^{31,51}. Las células estrelladas y las células de Kupffer son los principales tipos celulares encargados de la producción de TGF- β en los modelos de daño hepático por tetracloruro de carbono (CCl₄) y hepatectomía parcial. Los hepatocitos también producen TGF- β , aunque en cantidades mucho menores. Todas las células hepáticas son capaces de proliferar a pesar de la presencia de esta citocina, aunque esta presencia no concuerda con los efectos pro-apoptóticos y de inhibición de la proliferación conocidos para el TGF- β , y mencionados anteriormente. Se conoce que activa y bloquea la proliferación en hepatocitos³⁴.

ANTECEDENTES

Existen reportes de la insensibilidad a los efectos ejercidos por el TGF- β en diferentes tipos de cáncer^{8,26}. Los correpresores Ski y SnoN se encuentran sobre-expresados o adquieren resistencia a la degradación por TGF- β en algunos tipos de cancer²⁸. En estos casos, la vía de señalización del TGF- β se encuentra bloqueada, lo que permite a estas células escapar de sus efectos de inhibición del crecimiento, bloqueo de la proliferación y apoptosis²⁴. Existen reportes de la resistencia a los efectos ejercidos por el TGF- β en procesos celulares como en la transdiferenciación que sufren las células estrelladas hepáticas, aunque no se conoce bien los mecanismos como las células pueden limitar los efectos mediados por TGF- β , y el proceso de regeneración hepática en donde los correpresores Ski y SnoN están involucrados.

En el proceso de transdiferenciación de las células estrelladas hepáticas a miofibroblastos, se observa un cambio en la sensibilidad de las HSC a los efectos mediados por el TGF- β ¹¹. En condiciones normales, las HSC responden al TGF- β mediante la formación del complejo activo de las proteínas Smad. La formación de este complejo regula múltiples genes dependientes del TGF- β , como los genes que regulan la inhibición del crecimiento. Por el contrario, los miofibroblastos no responden al efecto de bloqueo de la proliferación regulado por TGF- β , aún cuando el ligando esté presente¹¹. Sin embargo, otros procesos regulados positivamente por TGF- β como la síntesis de proteínas de MEC y la secreción autocrina de TGF- β 1 no se encuentran inhibidos en los miofibroblastos. La expresión de los receptores al TGF- β no se encuentra disminuida en MFB, aunque la unión del ligando a los receptores se reduce en las HSC activadas. Además, a pesar de que se forma el complejo activo de las proteínas Smad en presencia del TGF- β en los miofibroblastos, este complejo no puede unirse a los elementos SBE (CAGA box) como está reportado¹¹. Este reporte indica que la vía del TGF- β dependiente de las proteínas Smad en las HSC activadas se encuentra bloqueada por un mecanismo no conocido que permite el bloqueo específico de algunos efectos ejercidos por TGF- β .

En el modelo de regeneración hepática en ratón^{34,31}, se propone un mecanismo de resistencia a los efectos del TGF- β en donde se observa la presencia de TGF- β aún cuando las células hepáticas se encuentran en proliferación. Tanto en el modelo de hepatectomía parcial, como en el tratamiento con CCl₄, está reportado el incremento de los correpresores SnoN y Ski durante las primeras fases de la regeneración, aunque el incremento en los niveles de ambas proteínas ocurre a diferentes tiempos³¹. En el caso particular de SnoN, se conoce que en ratón la isoforma SnoN2 es la más abundante, aunque se presume que tiene las mismas funciones que la isoforma SnoN. Los niveles de SnoN (SnoN2) se incrementan entre las 2 h y las 48 h después de la PH. Los niveles del correpresor Ski se incrementan entre las 24 h y las 72 h después de la PH, poco después del incremento de los niveles de SnoN. En este reporte, se observa la interacción de las proteínas R-Smad fosforiladas con la proteína Smad4 y con las proteínas Ski y SnoN. Además se observa un incremento en la transcripción del gen que codifica para SnoN en hepatocitos y en células no parenquimatosas, aunque el incremento es más evidente en hepatocitos. Este incremento en los correpresores Ski y SnoN durante la regeneración hepática, sugiere un mecanismo en el que SnoN y Ski regulan negativamente los efectos de la inhibición del crecimiento mediados por TGF- β en células hepáticas, mediante el bloqueo del complejo activo de las proteínas Smad en presencia de TGF- β .

Existe un reporte que muestra la resistencia de la proteína SnoN a la degradación mediada por TGF- β ¹³. En este trabajo, los autores observan que la resistencia a los efectos de inhibición del crecimiento por TGF- β , correlaciona con la incapacidad del TGF- β para regular negativamente a *c-myc* en células provenientes de cáncer de esófago. La regulación negativa de *c-myc* por TGF- β es dependiente de la activación de las proteínas Smad, además de su interacción con el factor de transcripción p107⁹. En dicho reporte se observa que Smad2/3 son fosforiladas por TGF- β , lo que permite la unión de las R-Smad con Smad4. Sin embargo, las proteínas Smad activadas son incapaces de bloquear la transcripción de *c-myc* aunque p107 esté presente. En algunos tipos celulares,

existe una resistencia a la degradación de SnoN mediada por TGF- β , lo que correlaciona con el grado de malignidad celular. Aquí se observa que la degradación de SnoN es indispensable para la regulación negativa de *c-myc*. Además, la incapacidad del TGF- β para degradar a la proteína SnoN bloquea los efectos de inhibición del crecimiento en estas células. En relación con este trabajo, está reportado que el incremento en los niveles del correpresor Ski correlaciona con el progreso en la malignidad del carcinoma escamoso esofágico¹³, además de la disminución en los niveles de p21.

Es por lo tanto importante estudiar la regulación de los correpresores Ski y SnoN, y cómo sucede tal regulación dentro de la célula y los procesos relacionados en esta regulación diferencial. En los antecedentes mencionados anteriormente, observamos que en los tipos celulares empleados existe una relación entre su estado de proliferación y la sensibilidad de las células al TGF- β . Se conoce la relación entre el estado de proliferación de los hepatocitos y la respuesta a los efectos de TGF- β . Los hepatocitos con mayor capacidad proliferante son más susceptibles a los efectos apoptóticos de TGF- β ¹⁷. Por lo que decidimos estudiar la regulación de los correpresores Ski y SnoN en los hepatocitos en diferentes estados de proliferación con la idea de observar si este cambio en susceptibilidad a los efectos de TGF- β , en relación con la capacidad de proliferación de los hepatocitos, esta relacionada con un cambio en la regulación de ambos correpresores por TGF- β .

HIPÓTESIS

Si la degradación de los correpresores Ski y SnoN inducida por el TGF- β en las células depende del estado proliferativo de las mismas, entonces el TGF- β causará la degradación de Ski y SnoN en hepatocitos en proliferación, provenientes de cultivos primarios o de hígados en regeneración, mientras que este efecto no se observará en hepatocitos recién aislados o en reposo.

OBJETIVO GENERAL

Estudiar la regulación de los correpresores nucleares SnoN y Ski mediada por TGF- β , en los hepatocitos de rata en reposo o en proliferación.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Estudiar la degradación de los correpresores SnoN y Ski mediada por TGF- β , en hepatocitos quiescentes (hepatocitos frescos), hepatocitos en cultivos primarios (hepatocitos en proliferación), y en la línea celular HepG2 que proviene de un hepatoma humano (células hepáticas transformadas).
2. Estudiar la degradación causada por TGF- β de SnoN y Ski en el modelo de regeneración hepática en rata (hepatectomía parcial).
3. Determinar por qué ocurre la degradación de los correpresores SnoN y Ski mediada por TGF- β en los hepatocitos en proliferación y la línea celular HepG2, pero no en hepatocitos en reposo.

MATERIALES Y MÉTODOS

*Aislamiento de hepatocitos de rata (*Rattus norvegicus*)*

Para el aislamiento de hepatocitos se utilizaron ratas de la cepa *Wistar* con un peso de 250 g, que fueron proporcionadas por el bioterio del Instituto de Fisiología Celular, UNAM. Las ratas fueron anestesiadas con cloroformo, se realizó una laparotomía y se perfundió el hígado a través de la vena porta con una solución amortiguadora Krebs-Ringer-NaHCO₃ (KRB) sin calcio (CaCl₂). El hígado se lava con solución KRB sin calcio durante 5 min para retirar toda la sangre del hígado, y posteriormente se cambia a la circulación con KRB con CaCl₂, debido a que la actividad de la colagenasa utilizada para la digestión del hígado requiere de calcio. Ambos amortiguadores se gasean con una mezcla de 5% de CO₂ y 95% de O₂ manteniendo la temperatura a 37°C durante todo el proceso de aislamiento.

Para la digestión del hígado se utilizaron 18 mg de colagenasa tipo IV recombinante liofilizada (Worthington), que se disuelve en 20 ml de KRB con CaCl₂; la colagenasa se recircula durante 15-20 min. El hígado digerido se coloca en una caja de petri de plástico de 10 cm, se agrega 15 ml de KRB con calcio y se raspa con una punta de micropipeta de 1 ml, lo que permite disgregar a las células. Las células en suspensión, se filtran con tela de tul y se vierten en un tubo cónico de 50 ml, aforando hasta un volumen de 45 ml. Para separar a los hepatocitos de las demás células, la suspensión se centrifuga por 2 min a 400 rpm, debido a que son el tipo celular con mayor densidad en el hígado; se retira el sobrenadante y el pellet se lava con el KRB con CaCl₂ por 3 veces. El pellet de los hepatocitos se resuspende en 10 ml de KRB con CaCl₂ y se procede a verificar la viabilidad de las células. Para verificar la viabilidad se hace una dilución 1:1 de hepatocitos y de azul de tripano al 0.4%, y se cuentan los hepatocitos no teñidos de azul en un hemocitómetro (Hausser Scientific Horsham, PA). La viabilidad de los hepatocitos tenía que ser de al menos un 70%, aunque algunas veces se obtenía una viabilidad menor al 70%, para poder continuar con el experimento.

Hepatectomía parcial de hígado de rata

Se utilizaron ratas de la cepa *Wistar* de un peso de 250 g, que fueron anestesiadas de manera intramuscular con 0.5 ml de Ketamina y 0.3 ml de Xilazina; se realizó una laparotomía (corte abdominal) y se retiraron los dos tercios anteriores del hígado en todas las ratas³⁴. Las ratas fueron sacrificadas y se aislaron los hepatocitos de hígado completo en regeneración a las 2 h, 48 h y 120 h después de la hepatectomía. Se cuantificó la concentración de proteína de los extractos de proteína totales obtenidos de los hepatocitos en regeneración mediante la técnica de Bradford (BioRad) con el objeto de tener la misma concentración de proteína en cada tratamiento para la inmunoprecipitación.

Cultivo celulares

Cultivo de hepatocitos primarios. Los hepatocitos aislados como se describe anteriormente, se lavan una vez con 25 ml de buffer Williams E más penicilina y estreptomicina (Pen/Strep), y se agrega 25 ml de solución de Percoll. La suspensión se mezcla por inversión y se centrifugan las células por 5 min a 800 rpm y a temperatura ambiente (TA). Después de la centrifugación, se observa un pellet, que contiene hepatocitos viables, y en la parte superior, se observa una capa de células no viables (menos densas). Se aspira el sobrenadante con los hepatocitos no viables, y el pellet de hepatocitos se resuspende en medio de unión (*attachment*) a TA: DMEM/F12 suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) más Pen/Strep. Se cultivaron y se tomaron 6×10^6 de células por caja; las cajas de petri fueron previamente cubiertas con colágena de rata tipo I y almacenadas a 4°C. Los hepatocitos se mantuvieron durante 4 h en dicho medio, para permitir que se adhirieran a la colágena. Después de que las células se han adherido completamente, se cambia el medio de *attachment* por medio de alimentación (*Feeding*) sin suero (SFB) más Pen/Strep. Los hepatocitos se mantuvieron por 24 h en cultivo primario.

Cultivo de la línea celular HepG2, proveniente de un hepatoma humano. Las células se crecieron a confluencia en medio alfa-MEM suplementado con 10% de SFB más Pen/Strep y aminoácidos no-esenciales.

Tratamiento con TGF- β y extracción de proteínas totales

Para cada experimento se utilizaron 200 mg de hepatocitos frescos aislados como se describe anteriormente (peso húmedo) resuspendidos en 1 ml de KRB con CaCl₂; se incubaron en suspensión con una concentración de 0.3 nM de TGF- β , y se incubaron a 37°C. Después de la incubación, los hepatocitos se lavaron con 4 ml de PBS y se retiró el sobrenadante. Las células se resuspendieron en 0.8 ml de TNTE 0.5% más inhibidores de proteasas y fosfatasas; se incubaron por 30 min en agitación a 4°C. El lisado se centrifugó por 5 min a 14000 rpm (20000g) y se depositó el sobrenadante en un microtubo nuevo de 1.5 ml.

En el caso de los cultivos celulares, se retiró el medio DMEM con 10% de SFB y se dejaron a las células con medio de ayuno (DMEM con 0.2% de SFB) por 2h. Se recambió el medio de ayuno (3.5 ml) con una concentración de 0.3 nM de TGF- β . Después de la incubación, se retiró el medio y las células se lavaron con 4 ml de PBS frío. Los extractos celulares se realizaron con 1 ml de buffer de lisis TNTE 0.5% más inhibidores de proteasas y fosfatasas. Las células se rasparon e incubaron con buffer de lisis por 15 min en agitación a 4°C. El lisado se centrifugó por 5 min a 14000rpm (20000g).

Inmunoprecipitación (IP)

Los anticuerpos policlonales anti-Smad2/3 (cabra), anti-SnoN (conejo), anti-Ski (conejo), anti-Smurf2 (conejo) y anti-cdc16 (cabra) se compraron a Santa Cruz Biotechnology Inc. En el caso de los cultivos celulares y los hepatocitos frescos quiescentes, la concentración de proteína de los extractos totales fue la misma debido a que se utilizaron cajas con la misma confluencia de células o el mismo peso húmedo de hepatocitos, respectivamente. Los extractos celulares totales se incubaron con 3 μ l del anticuerpo correspondiente durante toda la noche; el anticuerpo se recuperó con 70 μ l de proteína G recombinante acoplada a una

matriz de agarosa (Invitrogen) en una solución 1:5 en buffer TNTE 0.1%. La proteína G se incubó por 1 h a 4°C; se centrifugó la suspensión por 1 min a 14000 rpm y se lavó 3 veces a la proteína G con buffer TNTE 0.1% a 4°C. Se retiró completamente el buffer TNTE 0.1% de la proteína G. Se agregó buffer de carga (Laemmli 2X) y se incubaron las muestras por 5 min a 100°C, luego se congelaron.

Inmunoblot

Para el inmunoblot se prepararon geles de poliacrilamida al 7.5%, se corrieron los geles a 120 volts. Para la transferencia de proteínas se utilizaron membranas de PVDF (Millipore). La transferencia se corrió a 100 volts por 60 min a 4°C; el buffer de transferencia fue previamente enfriado. Las membranas se bloquearon con leche (sin grasas) al 5% en buffer TBS-T al 0.1% por una hora. El anticuerpo primario (1:1000) se incubó toda la noche en rotación a 4°C. Las membranas se lavaron 3 veces con TBS-T al 0.1% por 10 min; se incubaron con el anticuerpo secundario (1:10,000) en TBS-T al 0.1% por una hora; posteriormente se lavaron las membranas 3 veces con TBS-T al 0.1% por 10 min. Se empleó el reactivo ECL (Amersham Biosciences) en una solución 1:1 de ambos reactivos para el ensayo de quimioluminiscencia; las membranas se incubaron por 1 min con la solución. Las placas de autorradiografía se revelaron por 30 seg, 1 min, 5 min y 10 min dependiendo de la intensidad de la señal. Para la densitometría de las bandas se consideraron de 2 a 3 experimentos independientes; mediante el programa EDAS de KODAK se cuantificó la densidad de las bandas y en el programa Excel de Microsoft se graficaron los datos y se tomó el error estándar (ES) como medida de error experimental. Las unidades relativas derivan de la disminución de la densitometría de las bandas con respecto a la banda control (tiempo cero del tratamiento con TGF- β). Para la densitometría de SnoN en hepatocitos se consideraron las dos bandas obtenidas en el inmunoblot (SnoN/SnoN2), la banda superior corresponde a SnoN y la banda inferior corresponde a SnoN2.

RESULTADOS

Los correpresores Ski y SnoN son resistentes a la degradación mediada por TGF- β en hepatocitos quiescentes, pero no en hepatocitos en proliferación.

Para estudiar la degradación de los correpresores SnoN y Ski en los hepatocitos frescos (en reposo), las células aisladas fueron incubadas con 0.3 nM de TGF- β 1 en un curso temporal de 0 hasta 2 h de tratamiento. Ambos correpresores se encuentran en niveles de proteína muy bajos en los hepatocitos³¹, por lo que fue necesario inmunoprecipitar a ambas proteínas para observarlas en un inmunoblot. Contrario a lo reportado en células epiteliales, el correpresor SnoN (SnoN/SnoN2) mostró resistencia a la degradación mediada por TGF- β en hepatocitos frescos (Fig. 8); además se observó un incremento en los niveles de la proteína SnoN a las 2 h de tratamiento con TGF- β , como está reportado en las células Hep3B (hepatoma humano). El correpresor Ski también fue resistente a la degradación en hepatocitos frescos, sin embargo, no se observó un incremento en los niveles de Ski a las 2 h posteriores al tratamiento con TGF- β (Fig. 8), debido quizás a que el gen que codifica para Ski no parece ser un gen blanco de TGF- β . Para comprobar que la vía del TGF- β esta siendo activada, se inmunoprecipitó a las proteínas Smad2 y Smad3 y se observó la fosforilación de la proteína Smad2 durante el curso temporal de tratamiento con TGF- β . A las 2 h de tratamiento con TGF- β se observó una disminución en la fosforilación de Smad2, aunque esto no afectó el incremento dependiente de TGF- β de los niveles de SnoN. El tiempo en el que las proteínas R-Smad permanecen fosforiladas depende del tipo y contexto celular.

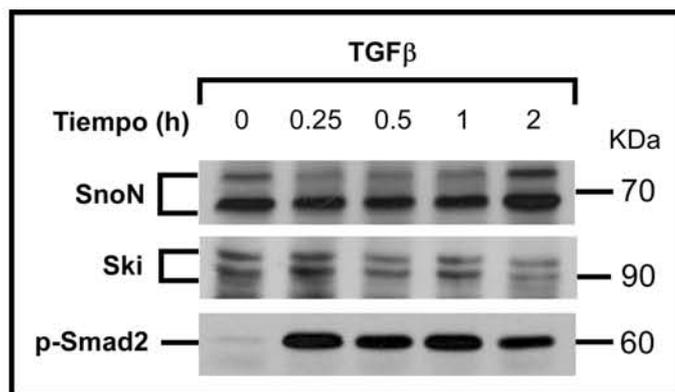


Figura 8. Los correpresores Ski y SnoN son resistentes a la degradación mediada por TGF-β en hepatocitos quiescentes. Se realizó un curso temporal con 0.3 nM de TGF-β1. La fosforilación de la proteína Smad2 (p-Smad2) se tomó como control de la activación de la vía del TGF-β. Las proteínas Ski, SnoN y Smad2/3 se inmunoprecipitaron. Se utilizó un anticuerpo específico para p-Smad2.

En el proceso de regeneración hepática destaca la capacidad de proliferación de los hepatocitos, y su resistencia a los efectos del TGF-β durante esta etapa proliferativa. Decidimos utilizar hepatocitos en estado de proliferación para observar si existía alguna diferencia en la regulación de los correpresores Ski y SnoN por TGF-β, y comparar con lo que ocurre en hepatocitos quiescentes. Los hepatocitos de un día de cultivo, es un modelo *in vitro* de hepatocitos en un estado de proliferación. El correpresor SnoN mostró una sensibilidad a la degradación por TGF-β en una concentración de 0.3 nM en los hepatocitos en cultivo, como se reportó previamente en las células Hep3B (Fig. 9). Los niveles de proteína del correpresor SnoN disminuyeron al rededor de un 50% con respecto al control, y se observó posteriormente una recuperación de los niveles de esta proteína a partir de las 2 h de tratamiento con TGF-β. Los niveles de la proteína Ski también disminuyeron durante la incubación con TGF-β; aunque no disminuyeron en su totalidad, ni regresaron a los niveles basales (Fig. 9). Nuevamente se utilizó la fosforilación de la proteína Smad2 como control de activación de la vía del TGF-β aunque se observó un retardo en la fosforilación de la proteína comparado con los hepatocitos quiescentes donde a los 15 min alcanza un nivel alto de fosforilación.

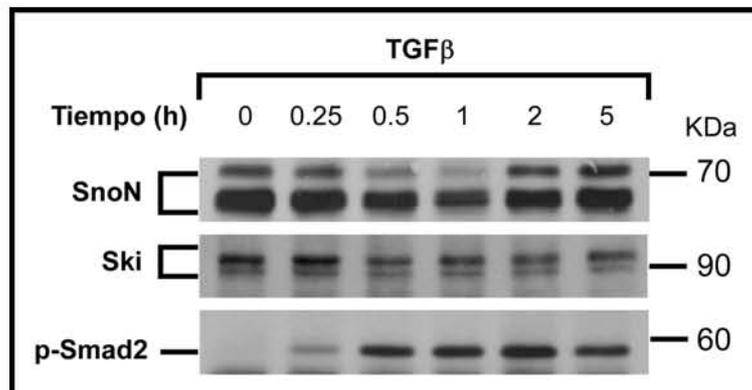


Figura 9. Degradación de los correpresores SnoN y Ski por TGF- β en hepatocitos proliferantes de 1 día de cultivo. Los correpresores Ski y SnoN son sensibles a la degradación por TGF- β en los hepatocitos de un día de cultivo (hepatocitos en proliferación). Se realizó un curso temporal de 5 h con 0.3 nM de TGF- β ; se utilizó la fosforilación de la proteína Smad2 como control de activación de la vía del TGF- β .

Utilizamos como modelo control para estudiar la degradación de los correpresores Ski y SnoN a la línea celular HepG2, que proviene de un hepatoma humano, y en donde esta claramente reportada la degradación de ambas proteínas (Fig. 10). En las células HepG2 se observó una disminución en los niveles de la proteína SnoN durante el curso temporal de tratamiento con 0.3 nM de TGF- β 1. Sin embargo, los niveles de la proteína SnoN se incrementaron a las 2 h posteriores al tratamiento con el TGF- β 1, pero sin recuperar los niveles basales. Los niveles de la proteína Ski disminuyeron en una alta proporción a partir de 1 hora de tratamiento con TGF- β , y estos niveles bajos se mantuvieron durante todo el curso temporal de tratamiento.

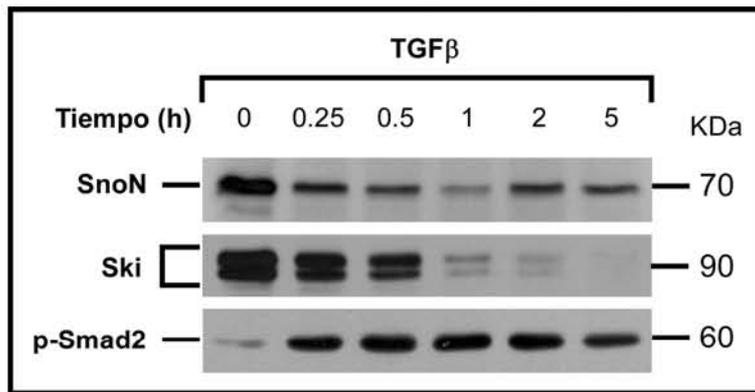


Figura 10. Degradación de los correpresores Ski y SnoN por TGF- β en la línea celular HepG2. Las células HepG2 fueron tratadas con 0.3 nM de TGF- β en un curso temporal de 5h. La degradación del correpresor SnoN se observó como esta reportada en la línea celular Hep3B mientras la degradación de Ski se observó durante todo el tratamiento con TGF- β . La fosforilación de la proteína Smad2 continuo durante todo el tratamiento con TGF- β .

En las siguientes gráficas, observamos el análisis cuantitativo de la degradación de las proteínas Ski y SnoN en los diferentes modelos celulares (Fig. 11 y 12). En el caso de la proteína SnoN se observó un punto máximo de degradación después de 1 hora de incubación con TGF- β en ambos modelos de células en proliferación; mientras que para el caso de los hepatocitos frescos (no proliferativos) observamos una clara resistencia de SnoN a la degradación inducida por TGF- β . Además, la inducción de los niveles de SnoN en los hepatocitos quiescentes, después de 2 h de tratamiento con TGF- β , rebasó considerablemente los niveles basales (Fig. 11). Con respecto a los niveles de la proteína Ski, estos disminuyeron casi en su totalidad en la línea celular HepG2, mientras que en los hepatocitos en cultivo se observó una ligera degradación que se mantuvo durante todo el curso temporal de tratamiento con TGF- β . En los hepatocitos frescos, los niveles de Ski se mantuvieron constantes durante el tratamiento con TGF- β , mostrando que Ski al igual que SnoN muestran resistencia a la degradación inducida por TGF- β en los hepatocitos quiescentes (Fig. 12).

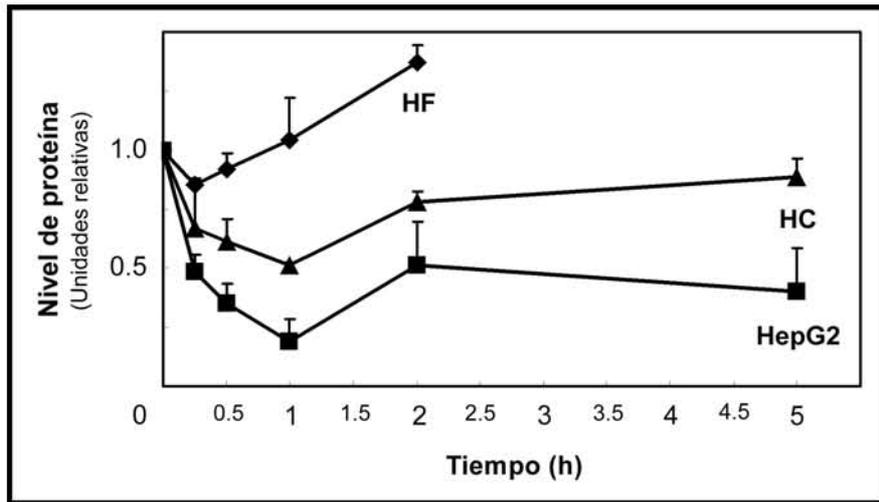


Figura 11. Análisis cuantitativo del nivel de la proteína SnoN en los diferentes tipos celulares . En la gráfica se observa la degradación de la proteína SnoN durante todo el tratamiento con 0.3 nM de TGF- β . En el análisis de la densitometría se utilizó el programa EDAS de KODAK. Hepatocitos frescos (HF); Hepatocitos en cultivo (HC). Se utilizó el ES como medida de error.

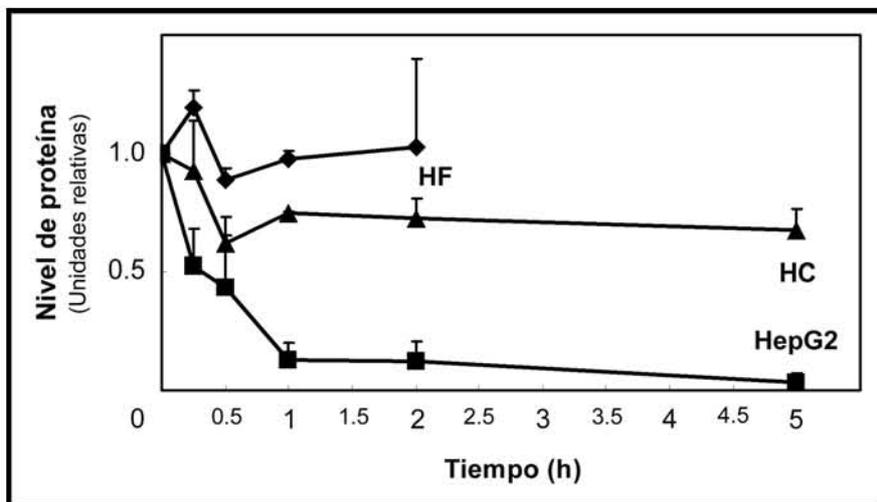


Figura 12. Análisis cuantitativo del nivel de la proteína Ski en diferentes modelos celulares. En la gráfica se observa la degradación de la proteína Ski durante el tratamiento con 0.3 nM de TGF- β . En el análisis de la densitometría se utilizó el programa EDAS de KODAK. Hepatocitos frescos (HF); Hepatocitos en cultivo (HC). Se utilizó el ES como medida de error.

Ski y SnoN adquieren sensibilidad a la degradación mediada por TGF- β durante el proceso de regeneración hepática en hepatocitos.

En el modelo de regeneración hepática, los hepatocitos se encuentran en proliferación, por lo que nos preguntamos si en este modelo también se observaba una sensibilidad de los correpresores SnoN y Ski a la degradación inducida por TGF- β (Fig. 13). Utilizando el modelo de hepatectomía parcial, aislamos hepatocitos de hígados en regeneración a distintos tiempos después de una hepatectomía parcial (PH). Observamos que en las primeras etapas de regeneración, entre las 2 y 48 horas posteriores a la PH, los correpresores SnoN y Ski fueron más susceptibles a la degradación mediada por TGF- β . A las 120 horas posteriores a la PH donde el hígado se ha regenerado casi completamente, se observó una resistencia a los efectos de degradación de Ski y SnoN inducidos por TGF- β , manteniéndose los niveles de ambas proteínas constantes; además en el caso de SnoN se observó un incremento en los niveles de esta proteína después de las 2 h de tratamiento con TGF- β . En los hepatocitos en regeneración, se observa que los niveles de SnoN y Ski disminuyen durante el proceso de regeneración y luego se incrementan conforme el hígado se recupera.

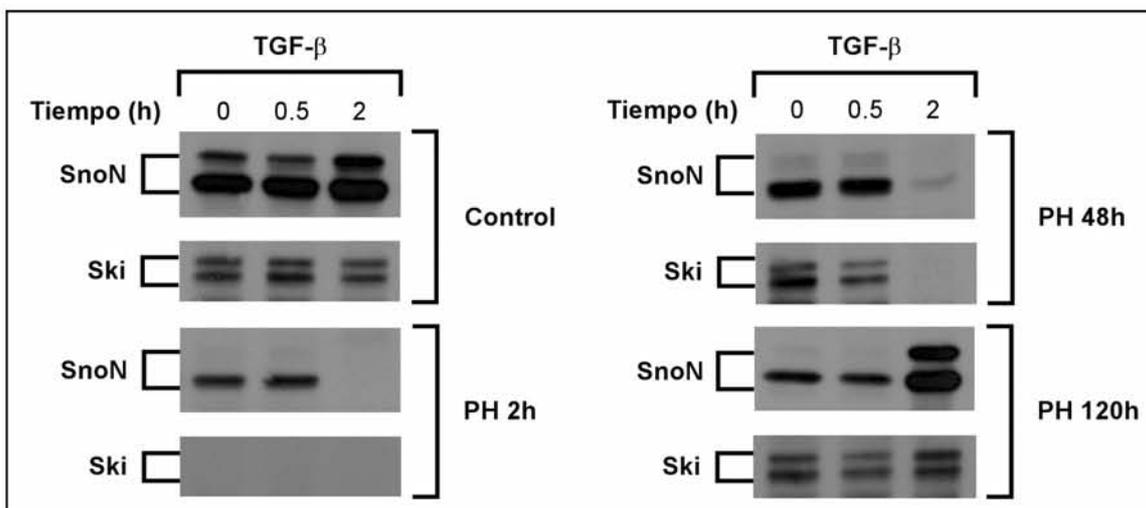


Figura 13. Regulación de los correpresores Ski y SnoN por TGF- β en el modelo de regeneración hepática. Los correpresores SnoN y Ski son sensibles a la degradación mediada por TGF- β en hepatocitos en regeneración. Los hepatocitos fueron incubados en ausencia o presencia de 0.3 nM

de TGF- β por 0.5 h y 2 h. Se utilizaron hígados en regeneración después de 0 h, 2 h, 48 h y 120 h posteriores a una hepatectomía parcial (PH). Este experimento se realizó por duplicado (n=2).

Smurf2 y APC se encuentran presentes en hepatocitos en proliferación pero no interaccionan con SnoN.

Existen dos ligasas E3 de ubiquitina reportadas hasta el momento como las responsables de la degradación de las proteínas SnoN y Ski inducida por el TGF- β . Por lo tanto, decidimos estudiar si alguna de estas proteínas estaba participando en la degradación de SnoN inducida por TGF- β en los hepatocitos. Utilizamos a la línea celular HepG2 como control de la degradación de SnoN; estas células fueron incubadas con el inhibidor específico del proteosoma, MG132, para estabilizar los complejos entre la proteína SnoN y la ligasa de ubiquitina. El tiempo de estimulación con 0.3 nM de TGF- β 1 fue de 30 min debido a que en este tiempo de incubación es donde se observa una degradación de SnoN en hepatocitos. Observamos la presencia de ambas proteínas, Smurf2 y APC, en las células HepG2, utilizando anticuerpos específicos contra Smurf2, y contra la subunidad Cdc16 de APC, en este caso con el fin de inmunoprecipitar todo el complejo APC. Sin embargo, no se pudo observar una interacción clara entre el correpressor SnoN y estas ligasas (Fig. 14).

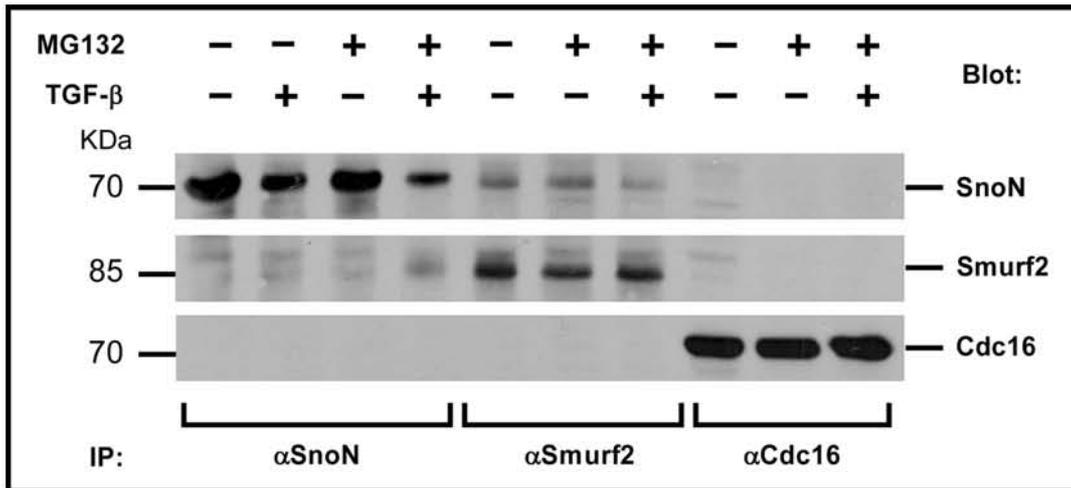


Figura 14. Los correpresores Ski y SnoN no interaccionan con la ligasa de ubiquitina Smurf2 y el complejo promotor de la anafase (APC) en la línea celular HepG2. Se utilizó un anticuerpo que reconoce la subunidad Cdc16 para inmunoprecipitar el complejo APC. En la figura se observa que la proteína Smurf2 y Cdc16 se encuentran presentes en las células HepG2. No se observa una interacción clara del correpresor SnoN con ambas ligasas de ubiquitina. Se utilizó el inhibidor MG132, que es un inhibidor específico del proteosoma, para detener la degradación de la proteína SnoN.

En los hepatocitos en cultivo (en proliferación), también se observa la presencia de las dos ligasas de ubiquitina, Smurf2 y Cdc16. En estas células existe la misma situación que con la línea celular HepG2, en donde no es posible revertir el proceso de degradación de SnoN y Ski con el inhibidor MG132, ni observar la interacción entre SnoN y las ligasas de ubiquitina.

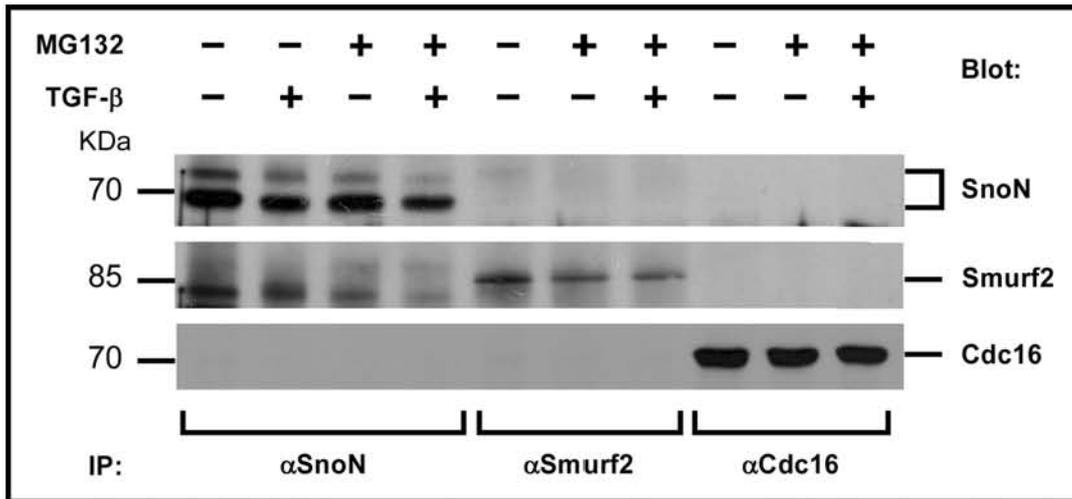


Figura 15. Los correpresores Ski y SnoN no interactan con la ligasa de ubiquitina Smurf2 y el complejo promotor de la anafase (APC) en los hepatocitos en cultivo (en proliferación). Se utilizó un anticuerpo que reconoce la subunidad Cdc16 para inmunoprecipitar el complejo APC. En la figura se observa que la proteína Smurf2 y Cdc16 se encuentran presentes en los hepatocitos. No se observa una interacción del correpresor SnoN con ambas ligasas de ubiquitina. Se utilizó el inhibidor MG132, que es un inhibidor específico del proteosoma, para detener la degradación de la proteína SnoN.

DISCUSIÓN

Los efectos de la inhibición de la proliferación y los pro-apoptóticos mediados por TGF- β en los hepatocitos están descritos en la literatura^{34,45}. Sin embargo, se conoce que los hepatocitos responden de modo diferente al TGF- β cuando están proliferando¹⁷. Los hepatocitos embrionarios, que son células que tienen una gran capacidad de proliferación, son altamente sensibles a los efectos mediados por TGF- β , presentando un incremento en los niveles de la proteína caspasa 3 y una disminución en las proteínas anti-apoptóticas, Bcl-x y cIAP-1¹⁷. La sensibilidad a los efectos del TGF- β disminuye en los hepatocitos en regeneración aislados de una rata adulta, cuya capacidad proliferativa disminuye en comparación con los hepatocitos embrionarios. Probablemente, esta regulación a los efectos del TGF- β en ambos tipos celulares pueda estar relacionado con la regulación diferencial de los correpresores Ski y SnoN, siendo dependiente del estado de proliferación de las células. Muchos de los efectos de inhibición de la proliferación y pro-apoptóticos del TGF- β están mediados por las proteínas Smad. Entonces, la acción de las proteínas Smad dependerá de los cambios en la regulación de las proteínas Ski y SnoN en los hepatocitos.

A pesar de haber demostrado que el TGF- β regula de manera diferencial a los correpresores SnoN y Ski en hepatocitos en reposo en comparación con los hepatocitos en proliferación, no queda claro cómo es que las células en reposo son capaces de evitar la degradación de ambos correpresores por TGF- β . Se tienen reportes que nos indican algunos de los mecanismos posibles involucrados en esta regulación diferencial. Una posibilidad es la localización subcelular de la proteína SnoN y sus efectos en la sensibilidad a la degradación de la proteína SnoN al TGF- β ²³. SnoN se localiza principalmente en el citoplasma de células epiteliales no transformadas, sin embargo, la localización subcelular de SnoN cambia en células transformadas siendo una localización nuclear que es dependiente de la proliferación y diferenciación celular²³. La proteína SnoN presente en el citoplasma es resistente a la degradación mediada por TGF- β , mientras que la proteína SnoN nuclear es fácilmente degradada por TGF- β ;

además, la proteína SnoN citoplasmática regula de manera negativa los efectos transcripcionales de TGF- β de modo muy eficiente en comparación con la proteína SnoN localizada en el núcleo, debido a su sensibilidad a la degradación por TGF- β . En el caso del correpresor Ski se observa una relocalización subcelular dependiente del ciclo celular en distintos tipos celulares; este cambio en la localización le otorga estabilidad a la proteína Ski evitando su degradación dependiente del proteosoma, aunque aun no se conoce si esta degradación es dependiente del TGF- β ³².

Se ha reportado en modelos con ratones *knockout* que la alteración del complejo APC, mediante el silenciamiento de la subunidad APC2, resulta en un aumento en el peso del hígado; lo cual correlaciona con una proliferación no controlada de los hepatocitos en estos ratones. Además, se ha observado que los niveles de la proteína SnoN, que es un blanco de APC, aumentan en estos animales⁵⁷. Esto nos señala que APC está involucrado en la degradación de SnoN en el hígado y que la incapacidad de identificar una interacción de las ligasas de ubiquitina, Smurf2 y APC, con el correpresor SnoN puede deberse: 1) a que no hemos encontrado las condiciones en las cuales sea posible revertir el proceso de degradación de SnoN tanto en la línea celular HepG2 como en los hepatocitos en proliferación; o 2) a que las condiciones del ensayo de inmunoprecipitación no sean las adecuadas para observar la coprecipitación. Otra posibilidad sería que tal interacción no exista en los tipos celulares que empleamos en este trabajo, y que la degradación sea dependiente de otra ligasa de ubiquitina distinta a las reportadas anteriormente. Dentro de esta última posibilidad, resaltaría la regulación específica en los niveles de esta nueva ligasa de ubiquitina dependiente del estado de proliferación de las células. Existe la posibilidad de que una modificación postranscripcional en los correpresores SnoN y Ski, dependiente del estado proliferativo de los hepatocitos, otorgue a ambos correpresores resistencia a la degradación dependiente de TGF- β . La fosforilación del correpresor Ski por la cinasa dependiente de ciclina 2, Cdc2, ha sido reportada. La fosforilación de Ski evita la degradación de la proteína a través del ciclo celular³².

Los correpresores Ski y SnoN son regulados diferencialmente por el TGF- β en los hepatocitos, además este es un proceso dependiente del estado de proliferación de la célula. Sin embargo, solo podemos especular sobre los efectos de esta regulación diferencial. Como se menciona en los antecedentes, la resistencia a la degradación del correpresor SnoN está relacionada con la respuesta de inhibición del crecimiento por TGF- β en células epiteliales transformadas de esófago. Esta respuesta diferencial sugiere que en los hepatocitos quiescentes, la respuesta a los efectos de inhibición del crecimiento mediado por TGF- β , podría ser en menor grado en comparación con los hepatocitos en proliferación (hepatocitos en cultivo y hepatocitos en regeneración).

El TGF- β activo presente en el hígado no inhibe la proliferación de las células hepáticas en el proceso de regeneración hepática. Sin embargo, cuando se perfunde TGF- β a un hígado en regeneración, se detiene la proliferación de los hepatocitos, aunque no se bloquea el proceso de regeneración; además, cuando se inhibe la vía del TGF- β , mediante el silenciamiento del receptor tipo I, en un hígado en regeneración, esto resulta en un incremento en la respuesta de proliferación³⁹. Ésto nos indica que los hepatocitos en proliferación son capaces de responder al TGF- β aún cuando existe un incremento en los correpresores Ski y SnoN. Falta responder si la insensibilidad a los efectos del TGF- β en los hepatocitos sólo depende del incremento en los de las proteínas Ski y SnoN.

Se ha reportado que la disminución de un 40-60% de los niveles endógenos de SnoN es suficiente para afectar la señalización del TGF- β ⁴⁰. En este reporte, la baja en los niveles de SnoN provocó una disminución en la activación transcripcional mediada por TGF- β , además de disminuir los efectos de inhibición del crecimiento por esta citocina. Aunque la respuesta a la disminución de los niveles de SnoN no fue la esperada en dicho artículo, nos permite especular en la disminución observada en este trabajo de alrededor de un 50% en los niveles de la proteína SnoN en hepatocitos en cultivo, como respuesta al tratamiento con

TGF- β . Probablemente, esta disminución sea suficiente para observar una respuesta diferencial a los efectos del TGF- β , mediados por las proteínas Smad, en los diferentes estados de proliferación en los hepatocitos.

DISCUSIÓN

Los efectos de la inhibición de la proliferación y los pro-apoptóticos mediados por TGF- β en los hepatocitos están descritos en la literatura^{34,45}. Sin embargo, se conoce que los hepatocitos responden de modo diferente al TGF- β cuando están proliferando¹⁷. Los hepatocitos embrionarios, que son células que tienen una gran capacidad de proliferación, son altamente sensibles a los efectos mediados por TGF- β , presentando un incremento en los niveles de la proteína caspasa 3 y una disminución en las proteínas anti-apoptóticas, Bcl-x y cIAP-1¹⁷. La sensibilidad a los efectos del TGF- β disminuye en los hepatocitos en regeneración aislados de una rata adulta, cuya capacidad proliferativa disminuye en comparación con los hepatocitos embrionarios. Probablemente, esta regulación a los efectos del TGF- β en ambos tipos celulares pueda estar relacionado con la regulación diferencial de los correpresores Ski y SnoN, siendo dependiente del estado de proliferación de las células. Muchos de los efectos de inhibición de la proliferación y pro-apoptóticos del TGF- β están mediados por las proteínas Smad. Entonces, la acción de las proteínas Smad dependerá de los cambios en la regulación de las proteínas Ski y SnoN en los hepatocitos.

A pesar de haber demostrado que el TGF- β regula de manera diferencial a los correpresores SnoN y Ski en hepatocitos en reposo en comparación con los hepatocitos en proliferación, no queda claro cómo es que las células en reposo son capaces de evitar la degradación de ambos correpresores por TGF- β . Se tienen reportes que nos indican algunos de los mecanismos posibles involucrados en esta regulación diferencial. Una posibilidad es la localización subcelular de la proteína SnoN y sus efectos en la sensibilidad a la degradación de la proteína SnoN al TGF- β ²³. SnoN se localiza principalmente en el citoplasma de células epiteliales no transformadas, sin embargo, la localización subcelular de SnoN cambia en células transformadas siendo una localización nuclear que es dependiente de la proliferación y diferenciación celular²³. La proteína SnoN presente en el citoplasma es resistente a la degradación mediada por TGF- β , mientras que la proteína SnoN nuclear es fácilmente degradada por TGF- β ;

además, la proteína SnoN citoplasmática regula de manera negativa los efectos transcripcionales de TGF- β de modo muy eficiente en comparación con la proteína SnoN localizada en el núcleo, debido a su sensibilidad a la degradación por TGF- β . En el caso del correpresor Ski se observa una relocalización subcelular dependiente del ciclo celular en distintos tipos celulares; este cambio en la localización le otorga estabilidad a la proteína Ski evitando su degradación dependiente del proteosoma, aunque aun no se conoce si esta degradación es dependiente del TGF- β ³².

Se ha reportado en modelos con ratones *knockout* que la alteración del complejo APC, mediante el silenciamiento de la subunidad APC2, resulta en un aumento en el peso del hígado; lo cual correlaciona con una proliferación no controlada de los hepatocitos en estos ratones. Además, se ha observado que los niveles de la proteína SnoN, que es un blanco de APC, aumentan en estos animales⁵⁷. Esto nos señala que APC está involucrado en la degradación de SnoN en el hígado y que la incapacidad de identificar una interacción de las ligasas de ubiquitina, Smurf2 y APC, con el correpresor SnoN puede deberse: 1) a que no hemos encontrado las condiciones en las cuales sea posible revertir el proceso de degradación de SnoN tanto en la línea celular HepG2 como en los hepatocitos en proliferación; o 2) a que las condiciones del ensayo de inmunoprecipitación no sean las adecuadas para observar la coprecipitación. Otra posibilidad sería que tal interacción no exista en los tipos celulares que empleamos en este trabajo, y que la degradación sea dependiente de otra ligasa de ubiquitina distinta a las reportadas anteriormente. Dentro de esta última posibilidad, resaltaría la regulación específica en los niveles de esta nueva ligasa de ubiquitina dependiente del estado de proliferación de las células. Existe la posibilidad de que una modificación postranscripcional en los correpresores SnoN y Ski, dependiente del estado proliferativo de los hepatocitos, otorgue a ambos correpresores resistencia a la degradación dependiente de TGF- β . La fosforilación del correpresor Ski por la cinasa dependiente de ciclina 2, Cdc2, ha sido reportada. La fosforilación de Ski evita la degradación de la proteína a través del ciclo celular³².

Los correpresores Ski y SnoN son regulados diferencialmente por el TGF- β en los hepatocitos, además este es un proceso dependiente del estado de proliferación de la célula. Sin embargo, solo podemos especular sobre los efectos de esta regulación diferencial. Como se menciona en los antecedentes, la resistencia a la degradación del correpresor SnoN está relacionada con la respuesta de inhibición del crecimiento por TGF- β en células epiteliales transformadas de esófago. Esta respuesta diferencial sugiere que en los hepatocitos quiescentes, la respuesta a los efectos de inhibición del crecimiento mediado por TGF- β , podría ser en menor grado en comparación con los hepatocitos en proliferación (hepatocitos en cultivo y hepatocitos en regeneración).

El TGF- β activo presente en el hígado no inhibe la proliferación de las células hepáticas en el proceso de regeneración hepática. Sin embargo, cuando se perfunde TGF- β a un hígado en regeneración, se detiene la proliferación de los hepatocitos, aunque no se bloquea el proceso de regeneración; además, cuando se inhibe la vía del TGF- β , mediante el silenciamiento del receptor tipo I, en un hígado en regeneración, esto resulta en un incremento en la respuesta de proliferación³⁹. Ésto nos indica que los hepatocitos en proliferación son capaces de responder al TGF- β aún cuando existe un incremento en los correpresores Ski y SnoN. Falta responder si la insensibilidad a los efectos del TGF- β en los hepatocitos sólo depende del incremento en los de las proteínas Ski y SnoN.

Se ha reportado que la disminución de un 40-60% de los niveles endógenos de SnoN es suficiente para afectar la señalización del TGF- β ⁴⁰. En este reporte, la baja en los niveles de SnoN provocó una disminución en la activación transcripcional mediada por TGF- β , además de disminuir los efectos de inhibición del crecimiento por esta citocina. Aunque la respuesta a la disminución de los niveles de SnoN no fue la esperada en dicho artículo, nos permite especular en la disminución observada en este trabajo de alrededor de un 50% en los niveles de la proteína SnoN en hepatocitos en cultivo, como respuesta al tratamiento con

TGF- β . Probablemente, esta disminución sea suficiente para observar una respuesta diferencial a los efectos del TGF- β , mediados por las proteínas Smad, en los diferentes estados de proliferación en los hepatocitos.

CONCLUSIONES

- La resistencia a la degradación de Ski y SnoN depende del estado de proliferación de los hepatocitos:
 1. Los correpresores Ski y SnoN son resistentes a la degradación por TGF- β en hepatocitos frescos o hepatocitos quiescentes de rata.
 2. Las proteínas Ski y SnoN pierden la resistencia a la degradación por TGF- β en los hepatocitos de un día de cultivo primario.
 3. Las proteínas Ski y SnoN pierden la resistencia a la degradación por TGF- β en los hepatocitos en regeneración.
- La degradación de las proteínas Ski y SnoN no parece depender de la asociación a las ligasas de ubiquitina Smurf2 y APC.

PERSPECTIVAS

- Encontrar una condición en la cual sea posible revertir la degradación de las proteínas Ski y SnoN inducida por TGF- β , dependiente del proteosoma, en los hepatocitos de un día de cultivo y la línea celular HepG2.
- Estudiar la localización subcelular de los correpresores Ski y SnoN en hepatocitos frescos y de un día de cultivo primario.
- Buscar si existe un cambio en el estado de fosforilación de SnoN y Ski en células en proliferación.

Bibliografía

1. **Akiyoshi S., Inoue H., Hanai J., Kusanagi K., Remoto N., Miyazono K y Kawabata M.** (1999) c-Ski acts as a transcriptional co-repressor in transforming growth factor- β signaling through interaction with Smads. *J Biol Chem* 274: 35269-35277.
2. **Bai R.Y., Koester C., Ouyang T., Hahn S.A., Hammerschmidt M., Peschel C. y Duyster J.** (2002) SMIF, a Smad4-interacting protein that functions as a co-activator in TGF- β signaling. *Nat Cell Biol* 4: 181–190.
3. **Berk M., Desai S.Y., Heyman H.C. y Colmenares C.** (1997) Mice lacking the *ski* proto-oncogene have defects in neurulation, craniofacial, patterning, and skeletal muscle development. *Genes Dev* 11:2029-2039.
4. **Bhowmick N.A., Ghiassi M., Bakin A., Aakre M., Lundquist C.A., Engel M.E., Arteaga C.L. y Moses, H.L.** (2001) Transforming growth factor- β 1 mediates epithelial to mesenchymal transdifferentiation through a RhoA-dependent mechanism. *Mol Biol Cell* 12: 27–36.
5. **Bissell D.M., Roulot D. y George J.** (2001) Transforming growth factor β and the liver. *Hepatology* 34: 859–867.
6. **Bonni S., Wang H.R., Causing C.G., Kavsak P., Strocchein S.L., Luo K. y Wrana J.L.** (2001) TGF- β induces assembly of a Smad2-Smurf2 ubiquitin ligase complex that targets SnoN for degradation. *Nat Cell Biol* 3: 587-595.
7. **Dahl R., Kieslinger M., Beug H. y Hayman M.J.** (1998) Transformation of hematopoietic cells by the Ski oncoprotein involves repression of retinoic acid receptor signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 11187-11192.
8. **Derynck R., Akhurst R.J. y Balmain A.** (2001) TGF- β signaling in tumor suppression and cancer progression. *Nat Genet* 29: 117-129.
9. **Derynck R. y Zhang Y. E.** (2003) Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF- β family signaling. *Nature* 425: 577-584.
10. **Dijke P.T. y Hill S.C.** (2004) New insights into TGF- β -Smad signaling. *Trend Biochem Sci* 29: 265-273.
11. **Dooley S., Delvoux B., Lahme B., Mangasser-Stephan K. y Gressner A.M.** (2000) Modulation of transforming growth factor beta response and

signaling during transdifferentiation of rat hepatic stellate cells to myofibroblasts. *Hepatology* 31: 1094-106.

12. **Ebisawa T., Fukuchi M., Murakami G., Chiba T., Tanaka K., Imamura T. y Miyazono K.** (2001) Smurf1 interacts with transforming growth factor- β type I receptor through Smad7 and induces receptor degradation. *J Biol Chem* 276: 12477–12480.
13. **Edmiston J.S., Yeudall W.A., Chung T.D. y Lebman D.A.** (2005) Inability of transforming growth factor- β to cause SnoN degradation leads to resistance to transforming growth factor- β -induced growth arrest in esophageal cancer cells. *Cancer Res* 65: 4782-4788.
14. **Engel M.E., McDonnell M.A., Law B.K. y Moses H.L.** (1999) Interdependent SMAD and JNK signaling in transforming growth factor- β -mediated transcription. *J Biol Chem* 274: 37413–37420.
15. **Feng X.H., Lin, X. y Derynck R.** (2000) Smad2, Smad3 and Smad4 cooperate with Sp1 to induce p15(Ink4B) transcription in response to TGF- β . *EMBO J* 19: 5178–5193.
16. **He J., Tegen S.B., Krawitz A.R., Martin G.S. y Lou K.** (2003) The transforming activity of Ski and SnoN is dependent on their ability to repress the activity of Smad proteins. *J Biol Chem* 278: 30540-30547.
17. **Herrera B., Álvarez A.M., Beltrán J., Váldez F., Fabregat I. y Fernández M.** (2004) Resistance to TGF- β -induced apoptosis in regenerating hepatocytes. *J Cell Physiol* 201: 385-392.
18. **Hocevar B.A., Brown T.L. y Howe P.H.** (1999) TGF- β induces fibronectin synthesis through a c-Jun N-terminal kinase-dependent, Smad4-independent pathway. *EMBO J* 18: 1345–1356.
19. **Inman G.J., Nicolás F.J. y Hill C.S.** (2002) Nucleocytoplasmic shuttling of Smad 2, 3, and 4 permits sensing of TGF- β receptor activity. *Mol Cell* 10: 283-294.
20. **Itoh S., Thorikay M., Kowanetz M., Moustakas A., Itoh F., Heldin C.H. y Dijke P.T.** (2003) Elucidation of Smad requirement in transforming growth factor- β type I receptor-induced responses. *J Biol Chem* 278: 3751–3761.

21. **Janda E., Lehmann K., Killisch I., Jechlinger M., Herzig M., Downward J., Beug H. y Grunert S.** (2002) Ras and TGF- β cooperatively regulate epithelial cell plasticity and metastasis: dissection of Ras signaling pathways. *J Cell Biol* 156: 299–313.
22. **Kavsak P., Rasmussen R.K., Causing C.G., Bonni S., Zhu H., Thomsen G.H. y Wrana J.L.** (2000) Smad7 binds to Smurf2 to form an E3 ubiquitin ligase that targets the TGF- β receptor for degradation. *Mol Cell* 6: 1365–1375.
23. **Krakowski A., Laboureau J., Mauviel A., Bissell M.J. y Lou K.** (2005) Cytoplasmic SnoN in normal tissues and nonmalignant cells antagonizes TGF- β signaling by sequestering of the Smad proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 12437-12442.
24. **Kretzschmar M., Doody J., Timokhina I. y Massagué J.** (1999) A mechanism of repression of TGF- β /Smad signaling by oncogenic Ras. *Genes Dev* 13: 804–816.
25. **Labbe E., Silvestri C., Hoodless P.A., Wrana J.L. y Attisano L.** (1998) Smad2 and Smad3 positively and negatively regulate TGF- β -dependent transcription through the forkhead DNA-binding protein FAST2. *Mol Cell* 2: 109–120.
26. **Lehmann K., Janda E., Pierreux C.E., Rytomaa M., Schulze A., McMahon M., Hill C.S., Beug H., y Downward J.** (2000) Raf induces TGF- β production while blocking its apoptotic but not invasive responses: a mechanism leading to increased malignancy in epithelial cells. *Genes Dev* 14: 2610–2622.
27. **Liu X., Sun Y., Weinberg R.A. y Lodish H.F.** (2001) Ski/Sno and TGF- β signaling. *Cytokine Growth Factor Rev* 12: 1-8.
28. **Lou K.** (2004) Ski and SnoN: negative regulators of TGF- β signaling. *Curr Opin Genet Dev* 14: 65-70.
29. **Luo K., Stroschein S.L., Wang W., Chen D., Martens E., Zhou S. y Zhou Q.** (1999) The Ski oncoprotein interacts with the Smad proteins to repress TGF- β signaling. *Genes Dev* 13: 2196-2206.

30. **Macias-Silva M., Abdollah S., Hoodless P.A., Pirone R., Attisano L. y Wrana J.L.** (1996) MADR2 is a substrate of the TGF- β receptor and its phosphorylation is required for nuclear accumulation and signaling. *Cell* 87: 1215-1224.
31. **Macías-Silva M., Li W., Leu J.L., Crissey M.A.S. y Taub R.** (2002) Up-regulated transcriptional repressors SnoN and Ski bind Smad proteins to antagonize transforming growth factor- β signals during liver regeneration. *J Biol Chem* 277: 28483-28490.
32. **Marcelain K. y Hayman M.J.** (2005) The Ski oncoprotein is upregulated and localized at the centrosomes and mitotic spindle during mitosis. *Oncogene* 24: 4321-4329.
33. **Massagué J.** (2000) How cell read TGF- β signals. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1: 169-178.
34. **Michalopoulos G. K. y DeFrances M. C.** (1997) Liver regeneration. *Science* 276: 60-66.
35. **Namciu S., Lyons G.E., Micales B.K., Heyman H.C., Colmenares C. y Stavnezer E.** (1995) Enhanced expression of mouse *c-ski* accompanies terminal skeletal muscle differentiation *in vivo* and *in vitro*. *Dev Dyn* 204: 291-300.
36. **Pearson-White S. y Crittenden R.** (1997) Proto-oncogene Sno expression, alternative isoforms and immediate early serum response. *Nucl Acid Res* 25: 2930-2937.
37. **Pearson-White S. y McDuffie M.** (2003) Defective T-cell activation is associated with augmented transforming growth factor β sensitivity in mice with mutations in the *Sno* gene. *Mol Cell Biol* 23: 5446-5459.
38. **Pessah M., Marais J., Prunier C., Ferrand N., Lallemand F., Mauviel A. y Atfi A.** (2002) c-Jun associates with the oncoprotein Ski suppresses Smad2 transcriptional activity. *J Biol Chem* 277: 29094-29100.
39. **Romero-Gallo J., Sozmen E.G., Chytil A., Russell W.E., Whitehead R., Parks W.T, Holdren M.S., Her M.F., Gautam S., Magnuson M., Moses H.L. y Grady W.M.** (2005) Inactivation of TGF- β signaling in hepatocytes

results in an increased proliferative response after partial hepatectomy. *Oncogene* 24: 3028-3041.

40. **Sarker K.P., Wilson S.M. y Bonni S.** (2005) SnoN is a cell type-specific mediator of transforming growth factor- β responses. *J Biol Chem* 280: 13037-13046.
41. **Seoane J., Le H.V., Shen L., Anderson S.A. y Massague J.** (2004) Integration of Smad and forkhead pathways in the control of neuroepithelial and glioblastoma cell proliferation. *Cell* 117: 211-223.
42. **Shi Y y Massagué J.** (2003) Mechanisms of TGF- β signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell* 113: 685-700.
43. **Shinagawa T., Dong H.D., Xu M., Maekawa T. y Ishii S.** (2000) The *sno* gene, which encodes a component of the histone deacetylation complex, acts as a tumor suppressor in mice. *EMBO J* 19: 2280-2291.
44. **Shinagawa T., Nomura T., Colmenares C., Ohira M., Nakagawara A. y Ashii S.** (2001) Increased susceptibility to tumorigenesis of *ski*-deficient heterozygous mice. *Oncogene* 20: 8100-8108.
45. **Siegel P.M. y Massagué J.** (2003) Cytostatic and apoptotic actions of TGF- β in homeostasis and cancer. *Nat Rev Cancer* 3: 807-818.
46. **Stroschein S.L., Bonni S., Wrana J.L. y Lou K.** (2001) Smad3 recruits the anaphase-promoting complex for ubiquitination and degradation of SnoN. *Genes Dev* 15: 2822-2836.
47. **Stroschein S.L., Wang W., Zhou S., Zhou Q. y Luo K.** (1999) Negative feedback regulation of TGF- β signaling by the SnoN oncoprotein. *Science* 286: 771-774.
48. **Sun Y., Liu X., Eaton E.N., Lane W.S., Lodish H.F. y Weinberg R.A.** (1999) Interactions of the Ski oncoprotein with Smad3 regulates TGF- β signaling. *Mol Cell* 4: 499-509.
49. **Sun Y., Liu X., Eaton E.N., Lodish H.F. y Weinberg R.A.** (1999) SnoN and Ski protooncoproteins are rapidly degraded in response to transforming growth factor β signaling. *Proc Natl Acad Sci* 96(22): 12442-12447.

50. **Suzuki H., Yagi K., Kondo M., Kato M., Miyazono K. y Miyazawa K.** (2004) c-Ski inhibits the TGF- β signaling pathway through stabilization of inactive Smad complexes on Smad-binding elements. *Oncogene* 23: 5068-5076.
51. **Taub R.** (2004) Liver regeneration: from myth to mechanism. *Nature Rev Mol Cell Biol* 5: 836-847.
52. **Takekawa M., Tatebayashi K., Itoh F., Adachi M., Imai K. y Saito H.** (2002) Smad-dependent GADD45 β expression mediates delayed activation of p38 MAP kinase by TGF- β . *EMBO J* 21: 6473–6482.
53. **Ueki N. y Hayman M.J.** (2003) Signal-dependent N-CoR requirement for repression by the Ski oncoprotein. *J Biol Chem* 278: 24858-24864.
54. **Vázquez-Macias A., Ruíz-Mendoza A.B., Fonseca-Sánchez M.A., Biones-Orta M.A. y Macías-Silva M.** (2005) Downregulation of Ski and SnoN co-repressors by anisomycin. *FEBS Lett* 579: 3701-3706.
55. **Vidal-Vanaclocha F.** (1997) Functional heterogeneity of liver tissue: from cell lineage diversity to sublobular compartment-specific pathogenesis. Texas, USA. *R. G. Landes Company and Chapman & Hall*: 1-32.
56. **Wan Y, Liu X. y Kirschner M.W.** (2001) The Anaphase-promoting complex mediates TGF- β signaling by targeting SnoN for destruction. *Mol Cell* 8: 1027-1039.
57. **Wirth K.G., Ricci R., Giménez-Abián J.F., Taghybeeglu S., Kudo N.R., Jochum W., Vasseur-Cognet M. y Nasmyth K.** (2004) Loss of the anaphase-promoting complex in quiescent cells causes unscheduled hepatocyte proliferation. *Genes Dev* 18: 88-98.
58. **Wotton D., Knoepfler P.S., Laherty C.D., Eisenman R.N. y Massagué J.** (2001) The Smad transcriptional corepressor TGIF recruits mSin3. *Cell Growth Differ* 12: 457–463.
59. **Wotton D., Lo R.S., Lee S. y Massagué J.** (1999) A Smad transcriptional corepressor. *Cell* 97: 29–39.

60. **Wu J.W., Krawitz A.R., Chai J., Li W., Zhang F., Lou K. y Shi Y.** (2002) Structural mechanism of Smad4 recognition by the nuclear oncoprotein Ski: insights on Ski-mediated repression of TGF- β signaling. *Cell* 111:357-367.
61. **Xu W., Angelis K., Danielpour D., Haddad M.M., Bischof O., Campisi J., Stavnezer E. y Medrano E.E.** (2000) Ski acts as a co-repressor with Smad2 and Smad3 to regulate the response to type β transforming growth factor. *Proc Natl Acad Sci* 97: 5924-5929.
62. **Yang J., Zhang X., Li Y. y Liu Y.** (2003) Downregulation of Smad transcriptional corepressors SnoN and Ski in the fibrotic kidney: an amplification mechanism of TGF- β 1 signaling. *J Am Nephrol* 14: 3167-3177.
63. **Yu L., Hebert M.C. y Zhang Y.E.** (2002) TGF- β receptor-activated p38 MAP kinase mediates Smad-independent TGF- β responses. *EMBO J* 21: 3749–3759.
64. **Zhu Q., Pearson-White S. y Luo K.** (2005) Requirement of the SnoN oncoprotein in transforming growth factor β -induced oncogenic transformation of fibroblast cells. *Mol Cell Biol* 25: 10731-10744.

Apéndice

Aislamiento y cultivo de hepatocitos

Buffer Krebs-Ringer-NaHCO₃

NaCl	120 mM
KCl	4.75 mM
KH ₂ PO ₄	1.2 mM
MgSO ₄	1.2 mM
NaHCO ₃	24 mM
CaCl ₂	1.27 mM
pH	7.34-7.4
Temperatura	37°C
Gas [%]	95%O ₂ /5% CO ₂

Azul de Tripano 0.4%

Azul de Tripano	40 mg
Buffer KRB con CaCl ₂	10 ml

Colagenasa IV

Colagenasa IV	18 mg
Buffer KRB con CaCl ₂	18 ml

Solución de Percoll (200 ml)

180 ml de Percoll
18 ml de HBSS 10X
2 ml de Hepes 1 M

Medio Williams E (500 ml)

500 ml H ₂ O desionizada
5 ml Hepes 1 M pH 7.4

HBSS (Hank's Balanced Salt Solution) sin Ca^{2+} / Mg^{2+} /Rojo de fenol (500 ml)

500 ml de HBSS

5 ml Hepes 1M

38 mg EGTA pH 7.4

Medio de adherencia (Attachment)

DMEM	500 ml
BSA	100 mg
Hepes 1 M	1.5 ml
Piruvato de sodio 100 mM	5 ml
NaHCO ₃	255 mg
Galactosa	500 mg
Prolina	15 mg
Glutamina 200 mM	10 ml
Gentamicina 50 mg/ml	0.5 ml
Penicilina/Estreptomicina 100X	5 ml
ITS	5 ml
Suero Fetal Bovino	50 ml

Medio de alimentación (Feeding)

DMEM	500 ml
BSA	100 mg
Hepes 1 M	1.5 ml
Piruvato de sodio 100 mM	5 ml
NaHCO ₃	255 mg
Galactosa	500 mg
Prolina	15 mg
Glutamina 200 mM	10 ml
Gentamicina 50 mg/ml	0.5 ml
Penicilina/Estreptomicina 100X	5 ml
ITS	5 ml

Colagena tipo I de cola de rata (1 mg/ml)

50 ml de Ácido acético 0.2 M

20 ml de colágena 3.48 mg/ml

Para la elaboración de cajas petri para el cultivo de hepatocito se cubre las cajas petri con colagena tipo I de cola de rata con una concentración de 1 mg/ml; se recupera la colagena restante; y se secan las cajas en la campana de flujo laminar por 30 min bajo luz UV en condiciones estériles.

Cultivos celulares

Medio α -MEM complementado

Para prepara un litro de medio α -MEM, al que previamente se ha ajustado el pH entre 7.2 a 7.4 y se ha esterilizado por filtración se le agrega lo siguiente:

SFB	100 ml
Pen/Strep	10 ml
Aminoácidos esenciales	10 ml

PBS sin Ca^{2+}/Mg^{2+} 10X

NaCl	134 mM
KCl	2.7 mM
Na ₂ HPO ₄	4.3 mM
KH ₂ PO ₄	1.4 mM

Inmunoprecipitación de proteína e inmunoblot

Buffer TNTE 0.1 % (100 ml)

10 ml	TN 10 X
0.2 ml	EDTA 0.5 M (pH 8)
1 ml	Tritón 10%
89 ml	H ₂ O

Buffer TNTE 0.5% (100 ml)

10 ml	TN 10 X
0.2 ml	EDTA 0.5 M (pH 8)
5 ml	Tritón 10%
85 ml	H ₂ O

TN 10 X (100 ml)

50 ml	Tris 1 M
30 ml	NaCl 5 M
20 ml	H ₂ O

Inhibidores de fosfatasa y proteasas (1 ml)

10 µl	Ortovanadato de sodio 100 mM (H ₂ O)
10 µl	Pirofosfato de sodio 100 mM (H ₂ O + HCl 8 mM)
25 µl	Fluoruro de sodio 1 M (H ₂ O)
5 µl	PMSF 1 M (isopropanol)
2 µl	β-glicerofosfato 0.5 M (TE pH 7.4)
2 µl	Benzamidina 50 mg/ml (TE pH 7.4)
2 µl	Inhibidor de tripsina 50 mg/ml (TE pH 7.4)
2 µl	Dihidrocloreuro de antipaina 5 mg/ml (TE pH 7.4)
2 µl	Aprotinina 5 mg/ml (DMSO)
2 µl	Pestatina A 5 mg/ml (DMSO)
2 µl	Leupeptina 5 mg/ml (TE pH 7.4)

Aforar en 1 ml de buffer TNTE 0.5%

Solución de acrilamida/bis-metil-acrilamida (30% / 0.8%)

87.6 g	acrilamida
2.4 g	bis-metil-acrilamida
300 ml	de H ₂ O desionizada

1.5 M de Tris-HCl pH8.8

18.15 g Tris base

100 ml de H₂O

0.5 M de Tris-HCl pH6.8

6 g Tris base

100 ml de H₂O

Buffer de corrida 10X pH8.3 (1 litro)

Tris base	30.2 g
Glicina	144 g
SDS 10%	100 ml
H ₂ O	aforar a un litro

Buffer TBS 10X pH8.1-8.5

Tris base	30.3 g
Glicina	144.5 g
H ₂ O	aforar a un litro

Buffer TBS-T 0.1% (1 litro)

Buffer TBS 10X	100 ml
Tween	1 ml
H ₂ O	900 ml