



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Regulación diferencial de los niveles de las proteínas andamio IQGAP1 e IQGAP2
durante la transdiferenciación de los hepatocitos

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Maestro en Ciencias

PRESENTA:

Q.F.B. Yuli Aranda López

TUTOR PRINCIPAL

Dra. Marina Macías Silva

(Instituto de Fisiología Celular)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. Susana Castro Obregón (Instituto de Fisiología Celular)

Dra. Ángeles Tecalco Cruz (Instituto de Investigaciones Biomédicas)

Ciudad de México, mayo 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

El presente trabajo se realizó bajo la dirección de la Dra. Marina Macías Silva en el laboratorio 225 Norte del Departamento de Biología Celular y Desarrollo, en el Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México.

El proyecto fue apoyado por los donativos de PAPIIT/DGAPA/UNAM No. IN208115 y IN208118, y de CONACYT No. 240224.

AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS

A la Dra. Marina Macías Silva por sus valiosas enseñanzas, por su confianza y su apoyo brindados durante este tiempo.

A la Biól. Marcela Sosa Garrocho, Técnica Académica del laboratorio, por su asesoría en las técnicas para llevar a cabo este proyecto.

A la M. en C. Diana G. Ríos López y al M. en C. David Martínez Pastor, por su ayuda en la parte técnica de este proyecto.

A los miembros de mi comité tutorial:

Dra. Susana Castro Obregón y Dra. Ángeles C. Tecalco Cruz, por sus enseñanzas y consejos que recibí durante el desarrollo de este proyecto.

A los miembros del jurado para la obtención del grado: Dr. Jesús A. García-Sáinz, Dra. Victoria E. Chagoya Hazas, Dra. Erika P. Rendón Huerta, Dr. Ignacio Camacho Arroyo y Dra. Claudia González Espinosa, por sus valiosas observaciones realizadas a este trabajo.

A los miembros de la Unidad de Biología Molecular del IFC, UNAM, por su asesoría, apoyo técnico y servicios de generación de oligonucleótidos y secuenciación: Dra. Laura Ongay Larios, Biól. Ma. Guadalupe Códiz Huerta y M. en C. Minerva Mora Cabrera.

A los miembros del taller del IFC, UNAM: el Ing. Aurey Lobato Galván y el Ing. Manuel Ortínez Benavides, por su aportación en el mantenimiento del equipo del laboratorio.

A los miembros de la Unidad de Cómputo del IFC, UNAM, por su asesoría, apoyo técnico y servicios prestados: M. en C. Gerardo Coello Coutiño, M. en C. Ana María Escalante Gonzalbo, Ing. Juan Manuel Barbosa Castillo y Ing. Ivett Rosas Arciniega, y demás miembros de la unidad.

Al Dr. Fernando García Hernández, y miembros de la Unidad de Imagenología del IFC, UNAM, por su asesoría y apoyo técnico.

A los miembros de Bioterio del IFC, UNAM, por su asesoría y apoyo técnico: Dra. Claudia V. Rivera Cerecedo y Dr. Héctor Malagón.

Al Programa de Apoyo a los Estudios del Posgrado (PAEP), por el financiamiento otorgado para asistir a congresos que enriquecieron mi formación profesional y personal.

Al CONACYT, por la beca otorgada durante el posgrado.

DEDICATORIA

A mi pequeña gran familia: Ángela, Mauricio y Luis, por su amor incondicional y por todo el apoyo que siempre me han brindado. Son mi más grande inspiración.

A mis amigos, los que a pesar del tiempo y la distancia siempre están presentes.

A mis compañeros del laboratorio, por los que están y por los que se fueron: Dianita, Marce, Isabel, Paula, David, Reyna, Marintia, Anabel y Genaro, personas con las que aprendí y de quienes aprendí.

LISTA DE ABREVIATURAS	4
RESUMEN.....	6
I. INTRODUCCIÓN.....	7
1. El hígado.....	7
2. El proceso de EMT.....	8
3. La citocina TGF-β.....	10
3.1 La vía de señalización del TGF-β.....	11
3.2 Las proteínas Smad.....	12
3.3 Regulación de la activación de las proteínas Smad	15
3.4 Regulación de la activación de las proteínas Smad por otras vías de señalización.....	16
4. El TGF-β y la fibrosis.....	17
4.1 El TGF-β y las células estrelladas.....	18
4.2 Los hepatocitos y la transición epitelio-mesénquima.....	18
5. Las proteínas andamio (scaffolds) funcionan como integradores de señales	19
6. Las proteínas IQGAP.....	20
6.1 La proteína IQGAP1	21
6.2 La proteína IQGAP2	21
II. ANTECEDENTES.....	23
III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	24
IV. HIPÓTESIS.....	24
V. OBJETIVOS.....	25
VI. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	26
VII. MATERIALES y MÉTODOS (ver anexos para detalles).....	28
1. Cultivo primario de hepatocitos de rata.....	28
2. Microscopía óptica.....	28
3. Líneas celulares.....	29
4. Extracción de RNA total de hepatocitos por el método de TRIzol.....	29
5. Extracción de RNA de hepatocitos utilizando el kit Direc-zol TM (Zymo Research).....	30
6. RT- PCR.....	30
7. Obtención de extractos celulares de proteínas.....	31
8. Western Blot.....	32
9. Inmunofluorescencia.....	32

10. Análisis estadístico.....	33
VIII. RESULTADOS.....	34
1. Los hepatocitos sufren un proceso de transdiferenciación al mantenerlos en cultivo. 34	
1.1 Durante el proceso de transdiferenciación hay cambios en los niveles de expresión de los marcadores de fenotipo epitelial y mesenquimal.....	35
1.2 El proceso de transdiferenciación de los hepatocitos favorece cambios en los niveles de fosforilación de la proteína Smad2	40
2. Las proteínas IQGAP se expresan diferencialmente en células hepáticas.....	42
3. La regulación de IQGAP1 por la citocina TGF- β es dependiente del contexto celular hepático.	45
4. La abundancia de las proteínas IQGAP1 e IQGAP2 es regulada por el proceso de transdiferenciación que sufren los hepatocitos.....	47
5. El gen <i>Iqgap1</i> es regulado positivamente por la citocina TGF- β en hepatocitos de 1 día de cultivo.	48
IX. DISCUSIÓN.....	50
X. CONCLUSIÓN.....	56
XI. PERSPECTIVAS.....	56
XII. REFERENCIAS.....	57
XIII. ANEXO.....	65
<i>Imagen 1. Arquitectura del lobulillo hepático</i>	<i>7</i>
<i>Imagen 2. El proceso de EMT</i>	<i>9</i>
<i>Imagen 3. La vía canónica de señalización del TGF-β.....</i>	<i>12</i>
<i>Imagen 4. La estructura de las proteínas Smad.....</i>	<i>14</i>
<i>Imagen 5. Patrón de fosforilación de las proteínas Smad.....</i>	<i>17</i>
<i>Imagen 6. Diagrama de los dominios de las proteínas IQGAP.....</i>	<i>20</i>
<i>Imagen 7. Posibles mecanismos de regulación de las proteínas IQGAP1 e IQGAP2 en hepatocitos normales mantenidos en cultivo.</i>	<i>53</i>
<i>Figura 1. Los hepatocitos en cultivo primario muestran un cambio en su morfología: de tipo epitelial (1 día) a un tipo fibroblasto observable desde los cuatro días de cultivo.....</i>	<i>34</i>
<i>Figura 2. Los hepatocitos de rata en cultivo primario adquieren la morfología tipo fibroblasto después de 7 días en cultivo</i>	<i>36</i>
<i>Figura 3. Los hepatocitos de rata en cultivo primario adquieren la morfología tipo fibroblasto después de 7 días en cultivo</i>	<i>37</i>
<i>Figura 4. Los hepatocitos de rata en cultivo primario adquieren la morfología tipo fibroblasto después de 7 días en cultivo</i>	<i>38</i>

<i>Figura 5. Caracterización del proceso de transdiferenciación que llevan a cabo los hepatocitos de rata en cultivos primarios</i>	<i>40</i>
<i>Figura 6. El proceso de transdiferenciación de los hepatocitos produce cambios en el nivel de fosforilación de la proteína Smad2</i>	<i>41</i>
<i>Figura 7. Los niveles basales de las proteínas IQGAP1 e IQGAP2 cambian dependiendo del tipo celular.....</i>	<i>43</i>
<i>Figura 8. La proteína IQGAP1 se localiza en la membrana celular.....</i>	<i>44</i>
<i>Figura 9. Los niveles de las proteínas de la familia IQGAP no son regulados por el TGF-β en células de hepatocarcinoma HepG2</i>	<i>45</i>
<i>Figura 10. Los niveles de la proteína IQGAP1 no son regulados por el TGF-β en células C9....</i>	<i>46</i>
<i>Figura 11. El gen Iqgap1 y la proteína son regulados positivamente por la citocina TGF-β en hepatocitos de rata en cultivo primario de 1 día</i>	<i>49</i>
<i>Tabla 1. Secuencias de los oligonucleótidos utilizados en la reacción de PCR para amplificar los genes de interés.</i>	<i>69</i>
<i>Tabla 2. Anticuerpos primarios utilizados para la detección de las proteínas de interés mediante inmunoblot.....</i>	<i>69</i>
<i>Tabla 3. Anticuerpos primarios utilizados para la detección de las proteínas de interés por inmunofluorescencia.</i>	<i>70</i>

LISTA DE ABREVIATURAS

Akt/PKB: Protein Kinase B
ALK: Activin Receptor-Like Kinase
APC: Adenomatous Polyposis Coli
 α SMA: Smooth Muscle Actin α
BMP: Bone Morphogenetic Protein
CamKII: Ca²⁺ / calmodulin-dependent kinase II
CD44: receptor for hyaluronan
Cdc42: Cell division cycle 42
CDK: Cyclin-Dependent Kinases
Co-Smad: Common Smad
Dab2: Disabled homolog 2
DNA: Deoxyribonucleic acid
Dok-1: Docking protein 1
ECM: Extracellular Matrix
EGFR: Epidermal Growth Factor Receptor
EMT: Epithelial-Mesenchymal Transition
Erk: Extracellular signal-regulated kinase
Gadd45b: *growth arrest and DNA damage inducible beta*
Gapdh: *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*
GDF: Growth Differentiation Factor
GDNF: Glial-Derived Neurotrophic Factor
GSK-3: Glycogen Synthase Kinase 3
HOP: Hsp70/Hsp90 organizing protein
HSC: Hepatic Stellate Cells
IEGs: IFN Effector Genes
IFN: Interferon
IL-6: Interleukin 6
IQGAP: IQ motif containing GTPase activating protein
Iqgap1: *IQ motif containing GTPase activating protein 1*
Iqgap2: *IQ motif containing GTPase activating protein 2*
I-Smads: Inhibitor Smads
JNK: c-Jun N-terminal kinase
KSR: Kinase Suppressor of Ras
LAP: Latency-associated Peptide
LTBP: Latent TGF beta Binding Protein
M3: muscarinic acetylcholine receptor
mAKAP: Muscle-Specific A Kinase Anchoring Protein
MAPK: Mitogen-activated Protein Kinases
Mekk1: MAP/Erk kinase kinase 1

MH: *mad* homology
M-MLV: Murine Leukemia Virus
NES: Nuclear Export Signal
NFκB: Nuclear Factor Kappa B
NMuMG: mouse mammary gland epithelial cell
Pai-1: plasminogen activator inhibitor-1
PI3k: Phosphoinositide 3-kinase
PKC: Protein Kinase C
PSD95: Post-Synaptic Density Protein 95
Rac1: Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1
R-Smads: Receptor activated Smad
RT-PCR: Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction
SARA: Smad Anchor for Receptor Activation
SBE: Smad Binding Element
Smad7: SMAD family member 7
Smurf: Smad ubiquitination-related factor
Sno: *ski* novel gene
TEAD: TEA domain transcription factor
TGF-β: Transforming Growth Factor beta
TLR4: Toll-Like Receptor 4
TβR: Transforming Growth Factor beta receptor
VEGFR2: Vascular Endothelial Growth Factor Receptor Type 2
YAP: Yes-Associated Protein
ZEB: Zinc finger E-box-binding homeobox

RESUMEN

Los hepatocitos son células diferenciadas que cumplen funciones metabólicas importantes para mantener la homeostasis del organismo. Cuando estas células son aisladas y se mantienen en cultivo por periodos prolongados pierden sus características epiteliales, ya que pasan por un proceso de transdiferenciación del tipo EMT (del inglés *Epithelial-Mesenchymal Transition*) para dar origen a células con características tipo fibroblasto.

El proceso de EMT puede ser regulado por una gran variedad de estímulos, entre los que destaca el TGF- β (del inglés *Transforming Growth Factor beta*). Esta citocina es capaz de regular múltiples procesos celulares que incluyen la proliferación celular, la diferenciación celular y la apoptosis. En condiciones patológicas puede promover el desarrollo de la fibrosis, la progresión de tumores y la metástasis. Como resultado de un análisis *in silico* se ha propuesto que el gen *Iqgap1* podría ser regulado a nivel transcripcional por el TGF- β durante el proceso de EMT.

Las proteínas IQGAP (del inglés *IQ motif containing GTPase activating protein*) funcionan como proteínas andamio o *scaffold*, y forman una familia que comprende tres miembros: IQGAP1, IQGAP2 e IQGAP3. Todas las isoformas se encuentran diferencialmente expresadas en el organismo, siendo de particular interés el cambio de expresión que ocurre entre las isoformas IQGAP1 e IQGAP2 en el contexto hepático, ya que, se ha observado que las líneas celulares de hepatocarcinoma con fenotipos más agresivos tienen mayores niveles de IQGAP1 y menores niveles de IQGAP2.

En el presente trabajo estudiamos cuáles son los efectos del proceso de transdiferenciación y de la citocina TGF- β sobre los niveles de expresión de las proteínas IQGAP1 e IQGAP2 en hepatocitos. Nuestros resultados muestran que el estímulo con el TGF- β , por tiempos cortos, es capaz de regular positivamente los niveles de expresión del transcrito de *Iqgap1* y de la proteína en hepatocitos de rata en cultivo primario, que aún conservan el fenotipo epitelial, y no en las líneas celulares HepG2 y C9. Por otro lado, durante el proceso de transdiferenciación de los hepatocitos mantenidos en cultivo primario se presenta una expresión diferencial de las proteínas IQGAP: un aumento de IQGAP1 y una disminución de IQGAP2.

I. INTRODUCCIÓN

1. El hígado

El hígado es un órgano único que posee una alta capacidad regenerativa y participa en múltiples funciones relacionadas con la digestión, detoxificación, equilibrio de electrolitos y la homeostasis (Fabregat et al., 2016; Meyer et al., 2015). Particularmente el hígado humano es la víscera de mayor tamaño del organismo y su peso en el individuo adulto es de unos 1500 g, está dividido en dos lóbulos, izquierdo y derecho. Este órgano se encuentra organizado en unidades estructurales y funcionales denominadas lobulillos (**Imagen 1**). Dentro de cada lobulillo hepático, los hepatocitos están localizados en tres zonas: la zona 1 es donde se encuentran los hepatocitos cerca de la triada portal (integrada por la vena porta, la arteria hepática y el conducto biliar); la zona 3 es donde se encuentran los hepatocitos cerca de la vena central y, por último, los hepatocitos que se encuentran en la interfaz entre ambas zonas constituyen la zona 2. Esta zonación tiene implicaciones metabólicas, ya que los hepatocitos periportales se encargan de procesos como la gluconeogénesis, la síntesis de colesterol y la síntesis de urea; por su parte, los hepatocitos pericentrales llevan a cabo la glucólisis, la síntesis de ácidos biliares y la síntesis de glutamina (Russell & Monga, 2017; Stanger, 2015).

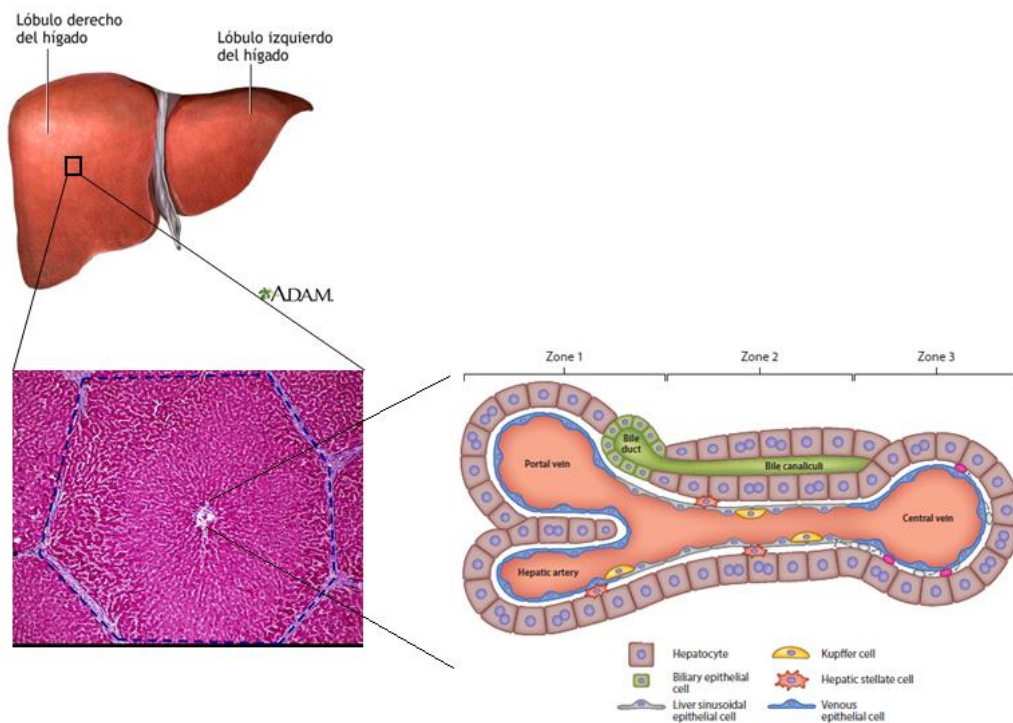


Imagen 1. Arquitectura del lobulillo hepático. Modificado de Russell & Monga, 2017.

En el lobulillo hepático se encuentran las células parenquimales (hepatocitos y colangiocitos) y las no parenquimales (las células estrelladas, los fibroblastos, las células endoteliales y las células de Kupffer) (**Imagen 1**).

Los hepatocitos constituyen aproximadamente el 60% del número total de células del hígado, y aproximadamente el 80% de la masa hepática. Son las células encargadas de producir grandes cantidades de albúmina, factores de coagulación, y de mediar el metabolismo de fármacos a través de las enzimas del citocromo P450. La capacidad de estas células para llevar a cabo todas las funciones metabólicas es debida principalmente a su polaridad. La membrana basolateral se encuentra frente al espacio de Disse, donde el intercambio de metabolitos aumenta gracias a la presencia de microvellosidades; la membrana apical está separada de la membrana basolateral por medio de uniones estrechas y forma parte de la red de los conductos biliares (Meyer et al., 2015; Stanger, 2015). Por su parte, los colangiocitos o células biliares epiteliales, forman los conductos a través de los cuales la bilis producida por los hepatocitos llega al intestino. Estas células son metabólicamente menos activas que los hepatocitos, pero se encargan de la síntesis de bicarbonato.

Dentro de las células no parenquimales encontramos a los fibroblastos, cuya presencia mantiene la arquitectura normal del hígado; también a las células de Kupffer, que son las células del sistema inmunológico tipo macrófagos, encargadas de fagocitar agentes extraños como bacterias y virus; por último, encontramos a las células estrelladas hepáticas o HSC (del inglés *Hepatic Stellate Cells*), cuya función principal es el almacenamiento de vitamina A y, cuando han sido activadas, son importantes productoras de componentes de la matriz extracelular (Stanger, 2015). De manera particular, los hepatocitos son células altamente diferenciadas, que se mantienen en estado quiescente y que poseen una gran plasticidad. Sin embargo, bajo ciertos estímulos los hepatocitos son capaces de llevar a cabo un proceso de transdiferenciación, que puede dar origen a otros tipos celulares diferenciados como los colangiocitos, o bien, dar origen a células con características tipo fibroblasto a través del proceso de EMT.

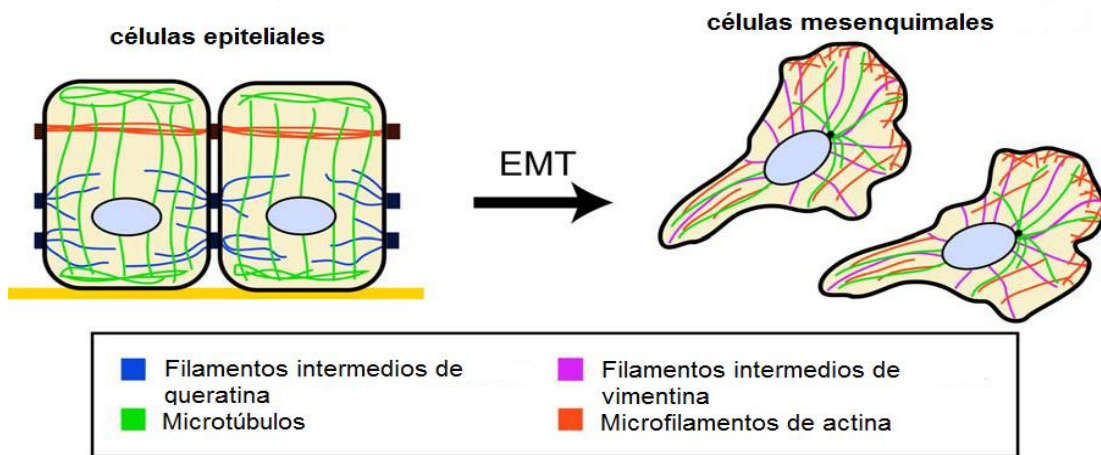
2. El proceso de EMT.

La adquisición de un fenotipo mesenquimal por parte de una célula epitelial se da a través de un proceso denominado transición epitelio-mesénquima. La EMT es un proceso fisiológico que

juega un papel muy importante durante el desarrollo embrionario, en la cicatrización de heridas, y en la regeneración de tejidos. A este proceso se le ha dividido en tres tipos: 1-EMT durante el desarrollo y la embriogénesis; 2-EMT en la cicatrización de heridas/la regeneración de tejidos /fibrosis, y la 3- EMT en neoplasias (Kalluri & Weinberg, 2009).

Para comprender a detalle el proceso de la EMT, es importante definir algunas características de las células epiteliales y de las células mesenquimales. Las células epiteliales son completamente adherentes y están estrechamente unidas. Usualmente forman monocapas en las cuales las células muestran una polaridad. Por otro lado, las células mesenquimales, no son polarizadas y poseen la capacidad de migrar, ya que, carecen de conexiones intercelulares (**Imagen 2**) (Choi & Diehl, 2009; Moustakas & Heldin, 2016; Nalluri, O'Connor, & Gomez, 2015).

La EMT comienza con la pérdida de los contactos célula-célula y de la polaridad apico-basal; también, hay un incremento en la expresión de factores transcripcionales como: Snail/Slug, ZEB1/2 y Twist. Asimismo, hay una reorganización de los componentes del citoesqueleto, por lo que las células se vuelven motiles y hay un incremento en la síntesis de metaloproteasas (MMP), lo cual está relacionado con su capacidad invasiva (Katsuno, Lamouille, & Derynck, 2013).



Marcadores de fenotipo epitelial	Marcadores de fenotipo mesenquimal
E-cadherina, Citoqueratina, ZO-1, Laminina-1, miR200	N-cadherina, FSP-1, Fibronectina, Snail, Slug, α SMA, Twist, miR21, Vimentina

Imagen 2. El proceso de EMT implica cambios en los niveles de expresión de los componentes de citoesqueleto, la reorganización de los filamentos intermediarios, microtúbulos y los microfilamentos de actina. Estos cambios pueden mediar la adquisición del fenotipo mesenquimal. Imagen modificada de Nalluri et al., 2015.

La EMT puede ser inducida por una gran diversidad de estímulos, entre ellos, destacan los inducidos por los factores de crecimiento y las citocinas, por los componentes de la matriz extracelular, por la hipoxia y por las señales mecánicas. A la citocina TGF- β , se le considera como uno de los reguladores maestros de la EMT, y se ha demostrado que induce este proceso en los contextos celulares del desarrollo, la fibrosis y el cáncer (Katsuno et al., 2013; Nalluri et al., 2015).

El TGF- β hace uso de la vía dependiente de las proteínas Smad (vía canónica) y de otras vías de señalización que no dependen de las proteínas Smad (vías no canónicas) como las MAPK: Erk, JNK y p38; así como también de la vía de Rho-GTPasas y la vía de PI3K-Akt (Katsuno et al., 2013; Zavadil & Böttinger, 2005). La activación de las vías no canónicas requiere de la presencia de proteínas adaptadoras o andamio (*scaffolds*) que faciliten la interacción entre el complejo de receptores T β R y las proteínas iniciadoras de la cascada de señalización para cada una de las vías (Zhang, 2009).

Durante las primeras etapas de la EMT, el TGF- β promueve la activación del promotor del gen *Snail*, a través de la unión directa del complejo Smad3/4. Posteriormente, la unión de la proteína Snail con el complejo Smad3/4 induce una disminución en la expresión de marcadores epiteliales como la E-cadherina (Cicchini et al., 2015) y las citoqueratinas, así como el incremento en los marcadores mesenquimales como la N-cadherina y la vimentina (Nalluri et al., 2015).

3. La citocina TGF- β .

La superfamilia del TGF- β comprende una gran variedad de moléculas que incluyen a los TGF-betas, activinas, inhibinas, proteínas morfogénicas de hueso o BMPs (del inglés *Bone Morphogenetic Proteins*), factores de crecimiento y diferenciación o GDFs (del inglés *Growth and Differentiation Factors*), y los factores neurotróficos derivados de la glía o GDNFs (del inglés *Glial-Derived Neurotrophic Factors*) (Massagué, 1998). En particular, el factor de crecimiento transformante beta, TGF- β , es una citocina con múltiples funciones, sus efectos dependen principalmente del tipo celular y de la fisiología del tejido donde ésta ejerce su acción. Esta citocina es capaz de modular las respuestas inflamatorias, la proliferación celular, la apoptosis, y la diferenciación celular. A través de diversos mecanismos, el TGF- β , participa en la

reparación de heridas, en el desarrollo de la fibrosis, en la progresión de tumores y en la metástasis (Meng, Tang, Li, & Lan, 2015; Siegel & Massagué, 2003).

En mamíferos se han identificado tres isoformas: TGF- β 1, TGF- β 2 y TGF- β 3. Después de que esta citocina ha sido sintetizada, es liberada de la célula en forma latente, es decir, asociada con el péptido asociado a la latencia o LAP (del inglés *Latency-Associated Peptide*). Luego, este complejo se une a una glicoproteína de unión a TGF- β o LTBP (del inglés *Latent TGF- β Binding Protein*), la cual se une a la proteína LAP a través de un puente disulfuro. La proteína LTBP está implicada en la secreción y el almacenamiento del TGF- β en la matriz extracelular, y eventualmente participa en la activación del TGF- β , el cual puede ser liberado de las proteínas LAP y LTBP por medio de diferentes estímulos como son: las especies reactivas de oxígeno, cambios en el pH, y por la acción de enzimas como la plasmina. La forma bioactiva de esta citocina es un dímero cuyos monómeros están unidos por puentes disulfuro (Massagué, 1998; Meng et al., 2015).

3.1 La vía de señalización del TGF- β .

El TGF- β 1 y otros ligandos de esta familia de citocinas como el TGF- β 2, el TGF- β 3, las activinas y las BMPs, señalizan a través de receptores transmembranales con actividad de cinasa de residuos de serina y treonina: los receptores tipo II, que son cinasas constitutivamente activas, y de los cuales se han identificado 5 receptores; y los receptores tipo I, también conocidos por sus siglas en inglés como ALKs (del inglés *Activin Receptor-Like Kinases*), de los cuales se han identificado 7. Los receptores activos median sus acciones a través de sus proteínas efectoras, las proteínas Smad, para regular múltiples funciones celulares (Itoh, Itoh, Goumans, & Dijke, 2000; Siegel & Massagué, 2003).

En la vía de señalización canónica, la unión del TGF- β al receptor tipo II llamado T β RII, provoca que se reclute al receptor T β RI también conocido como ALK5 (*Activin Receptor-Like Kinase 5*). Una vez que ambos receptores forman un complejo, el receptor tipo II transfosforila al receptor tipo I en una secuencia rica en glicinas y serinas del dominio GS. La fosforilación de estos residuos provoca que el receptor tipo I o T β RI se active, lo cual lleva a la fosforilación de las proteínas Smad2 y Smad3, las cuales forman un complejo heterotrimérico con la proteína Smad4.

Este complejo de las proteínas Smad2/3/4 es translocado al núcleo para regular la transcripción de sus genes blanco, lo cual es llevado a cabo en colaboración con varios co-activadores o en su caso con co-represores (**Imagen 3**). La unión de las proteínas Smad se da en los sitios de unión a Smad o SBEs (del inglés *Smad Binding Elements*) presentes en el DNA, y localizados en las regiones promotoras de los genes blanco (Massagué, 1998; Massagué, Seoane, & Wotton, 2005).

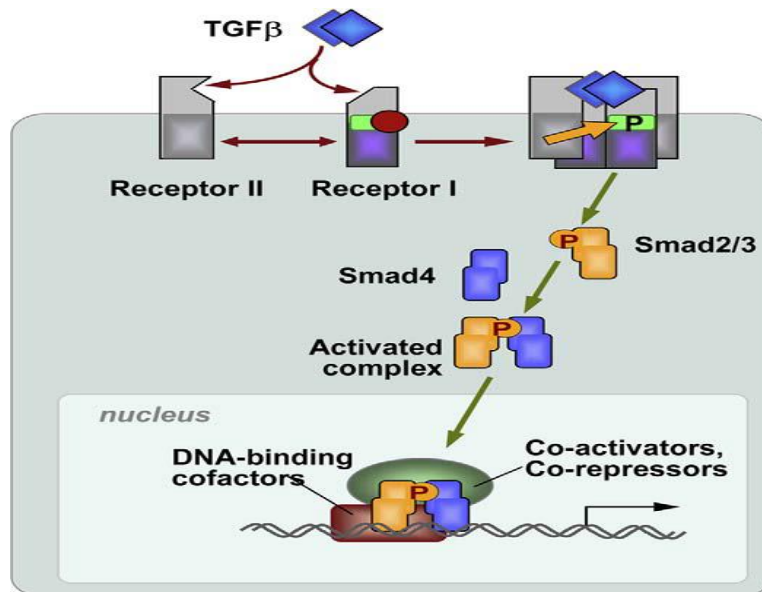


Imagen 3. La vía canónica de señalización del TGF-β. Tomada de Massagué & Gomis, 2006

Cabe mencionar que en algunos tipos celulares, como por ejemplo las células estrelladas hepáticas (HSC), el TGF-β1 puede adicionalmente señalizar vía ALK1, lo cual involucra la fosforilación de las proteínas Smad1, Smad5 y Smad8 (Meindl-Beinker, Matsuzaki, & Dooley, 2012).

3.2 Las proteínas Smad.

Se sabe que ocho proteínas Smad son codificadas por el genoma humano, así como cuatro en *Drosophila* y tres en *C. elegans* (Massagué, 1998). Solo cinco de las ocho proteínas codificadas en humanos (Smad1, 2, 3, 5 y 8) son sustrato de los receptores tipo I para los miembros de la familia del TGF-β, a las cuales se les conoce como Smad reguladas por receptor o bien R-Smad. A su vez, el subgrupo de las R-Smad puede clasificarse en dos grupos: las BMP-Smad y las TGF-β/Activina-Smad. Las proteínas Smad1, Smad5 y Smad8 son fosforiladas por los receptores para

BMP tipo I (ALK-2, ALK-3 y ALK-6); mientras que las proteínas Smad2 y Smad3 son activadas por los receptores tipo I para TGF- β y activina (ALK-5 y ALK-4, respectivamente) (Massagué et al., 2005; Wrana, 2000).

A la proteína Smad4 se le conoce como Co-Smad, ya que forma complejos con todas las R-Smad. A las Smad6 y Smad7, se les conoce como I-Smad, ya que, son proteínas inhibitorias que actúan al interferir con la unión de las R-Smad al receptor, o bien, previenen las interacciones entre las R-Smad y la Co-Smad (Itoh et al., 2000; Massagué et al., 2005). La señalización del TGF- β 1 induce la expresión de la proteína Smad7, la cual interactúa con el receptor T β RI, por lo que compite por el sitio de unión de Smad2 y Smad3. Así, la unión de Smad7 forma parte del asa de retroalimentación negativa que lleva a la inhibición de la fosforilación de las R-Smad, y por lo tanto a la inhibición de la vía (Macias, Martin-Malpartida, & Massagué, 2015).

La estructura molecular de las Smad muestra que son proteínas formadas por alrededor de 500 aminoácidos, su dominio N-terminal es globular y se denomina MH1 (del inglés *Mad-homology 1*) el cual está altamente conservado en todas las R-Smad y en la proteína Smad4, no así, en las I-Smad. Posteriormente se encuentra la región *linker* o puente rico en prolinas, dicha región conecta a los dominios MH1 y MH2 (del inglés *Mad-homology 2*). El dominio MH2 esta conservado en todas las proteínas Smad (Shi & Massagué, 2003).

Las R-Smad y la Smad4 pueden unir al DNA a través de un dominio tipo horquilla β (β -hairpin) que se encuentra en su dominio MH1, esta interacción es estabilizada por la unión de un átomo de zinc. La región *linker* posee motivos PY que son reconocidos por los dominios WW de algunas ligasas E3 de ubiquitina, como las proteínas Smurf (del inglés *Smad ubiquitination regulatory factor*). La región *linker* también posee sitios de fosforilación para diversas cinasas (*Mitogen-Activated Protein Kinases*, MAPKs; y *Cyclin-dependent Kinases*, CDKs), y en la región *linker* de la proteína Smad4 se encuentra la señal de exportación nuclear. Hacia el extremo C-terminal encontramos al dominio MH2. En las R-Smad este dominio contiene un motivo Ser-X-Ser, en cual es fosforilado por el receptor tipo I activado. Además, a través de este dominio las proteínas Smad interactúan con co-activadores o con co-represores transcripcionales (Derynck & Zhang, 2003; Massagué et al., 2005).

Una vez que las R-Smad han sido fosforiladas en los residuos de serina, entonces se unen a la proteína Smad4, por medio de una interacción entre las serinas fosforiladas y la región básica que

se encuentra en el C-terminal de la Co-Smad (**Imagen 4**). La interacción entre las proteínas Smad, lleva a la formación de heterotrímeros (en general 2 R-Smad-Smad4) (Massagué, 2012).

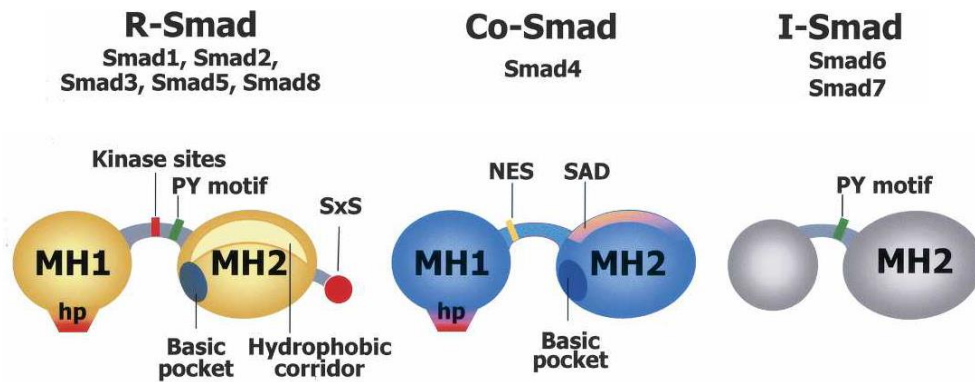


Imagen 4. La estructura de las proteínas Smad. La estructura de estas proteínas comprende dos dominios globulares denominados MH1 y MH2 y una región variable denominada *linker*. En la región *linker* encontramos motivos PY que son blanco de unión para ligasas de ubiquitina como las Smurf y sitios que son blancos de fosforilación de diversas cinasas. Las R-Smad y la Co-Smad contienen estructura β -hairpin (hp) la cual les permite interactuar con el DNA. Tomada de Massagué et al., 2005)

Una vez que el complejo de las proteínas Smad es translocado al núcleo, entonces las R-Smad pueden interactuar con regiones específicas en el DNA conocidas como elementos de unión a las Smad (SBE), cuya secuencia básica es 5'-CAGAC-3', y se localizan en las regiones promotoras de los genes blancos del TGF- β (Siegel & Massagué, 2003). Entre los genes que son inducidos por esta citocina encontramos a los que codifican para proteínas de la matriz extracelular como la colágena tipo I y II, el inhibidor del activador del plasminógeno tipo 1 (*pai-1*), y la elastina, entre otros. Además, el TGF- β causa la inhibición de la transcripción de diversos genes, como *c-myc* y *cdc25A*; la regulación negativa de estos genes media los efectos antiproliferativos de la citocina (Keeton, Curriden, van Zonneveld, & Loskutoff, 1991; Massagué, 1998). La inducción o la inhibición de los genes blanco del TGF- β , depende en gran parte de los factores que son asociados al complejo de las proteínas Smad-DNA.

3.3 Regulación de la activación de las proteínas Smad

La fosforilación de las serinas en la región C-terminal de las proteínas Smad es un evento crítico, que define el inicio de la cascada de señalización mediada por el TGF- β . Para que estas proteínas se activen de manera óptima se requiere de la presencia de otras proteínas que faciliten la interacción entre las proteínas Smad y el receptor T β RI. Una de las proteínas adaptadoras que favorecen la interacción entre las R-Smad y el complejo de los receptores es la proteína SARA (del inglés *Smad Anchor for Receptor Activation*), la cual es un miembro de las proteínas asociadas a membrana con dominios FYVE. Esta proteína adaptadora facilita la interacción de las R-Smad y el T β RI a través de su dominio de unión a Smad y de su región carboxilo terminal. Una vez que las R-Smad han sido fosforiladas, la afinidad de estas por la proteína SARA y el receptor T β RI disminuye, lo cual conlleva a la disociación de este complejo en sus elementos individuales (Itoh et al., 2000; Kang, Liu, & Derynck, 2009; Ten Dijke & Hill, 2004). En un estudio realizado en la línea celular de riñón HKC se mostró que la presencia de la proteína SARA ayuda a mantener el fenotipo epitelial de estas células, y que su ausencia afecta los niveles de la proteína Smad2 al aumentar su ubiquitinación (Runyan, Hayashida, Hubchak, Curley, & Schnaper, 2009).

Otras proteínas que también ayudan a la activación de las proteínas Smad son: la endofina, que ayuda a la activación de la proteína Smad1 en la cascada de señalización mediada por los BMPs; la proteína Axina, la cual se puede encontrar formando complejos con la proteína Smad3 y el receptor T β RI activo, y por ende favorecer la fosforilación de Smad3; la proteína Dok-1 (del inglés *Docking protein 1*), la cual es requerida en la vía de señalización mediada por activinas; y la proteína Dab2 (del inglés *Disabled homolog 2*), la cual participa en la internalización de los receptores del TGF- β (Derynck & Zhang, 2003; Kang et al., 2009).

La unión de las proteínas Smad a los microtúbulos es otra forma de cómo pueden ser reguladas. Existe evidencia de que las proteínas Smad2, Smad3 y Smad4 interaccionan con el componente principal de los microtúbulos, la β -tubulina; sin embargo, una vez que la región carboxilo terminal de la proteína Smad2 ha sido fosforilada, ésta se disocia de la β -tubulina (C. Dong, Li, Alvarez, Feng, & Goldschmidt-Clermont, 2000).

3.4 Regulación de la activación de las proteínas Smad por otras vías de señalización.

La activación de las proteínas Smad puede darse también por la fosforilación de las serinas/treoninas presentes en la región *linker*. Por ejemplo, las MAPK como las Erk (del inglés *Extracellular signal-Regulated Kinases*) fosforilan el dominio MH1 de la proteína Smad2, y además a la región *linker* de las proteínas Smad1, Smad2 y Smad3. La fosforilación de las proteínas Smad también puede estar mediada por MEKK1 (del inglés *MAP/Erk Kinase Kinase I*); MEKK1 incrementa la fosforilación de Smad2 y su unión con Smad4, favoreciendo así su translocación hacia el núcleo y su actividad transcripcional. Por su parte, JNK (del inglés *c-Jun N-terminal Kinase*) fosforila a la proteína Smad3 fuera del motivo SSXS del C-terminal, con lo que se favorece su entrada al núcleo y por lo tanto la transcripción de genes. La activación de la proteína CamKII (del inglés *Ca²⁺/calmodulin-dependent Kinase II*) induce la fosforilación de la región *linker* y del dominio MH1 de Smad2, con lo cual puede inhibir su translocación al núcleo y por ende su actividad transcripcional. Además, la proteína PKC (del inglés *Protein Kinase C*) puede fosforilar a los dominios MH1 de Smad2 y Smad3, y en el caso de Smad3 esto afecta su unión al DNA (Derynck & Zhang, 2003).

Dado que las proteínas Smad pueden ser fosforiladas tanto en la región C-terminal como en la región *linker*, se ha establecido un código de fosforilación de las isoformas (**Imagen 5**). A través de estos patrones de fosforilación se pueden regular diferentes respuestas celulares, por ejemplo: señales citostáticas por la pSmad3C; señales mitogénicas por la pSmad3L (Ser-213) y señales invasivas/ fibrogénicas por la pSmad2L (Ser-245/250/255) y por la pSmad3L (Ser-204) (Matsuzaki, 2013; Yoshida, Murata, Yamaguchi, Matsuzki, & Okazaki, 2016).

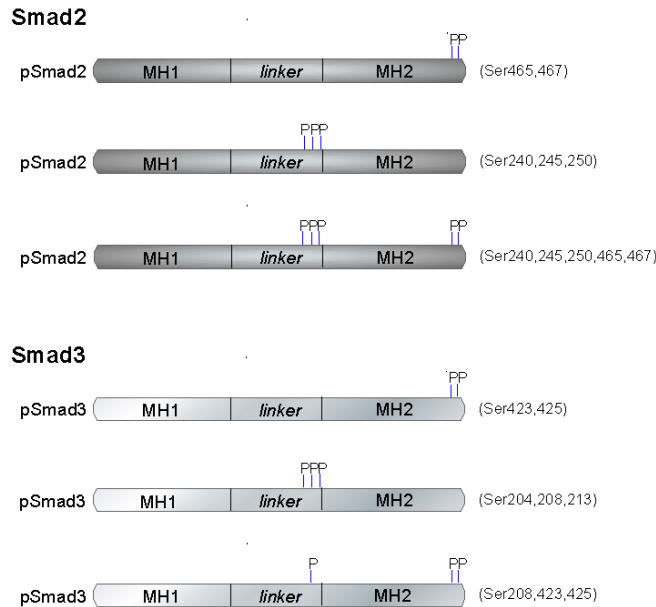


Imagen 5. Patrón de fosforilación de las proteínas Smad. Las proteínas Smad2 y Smad3 pueden ser fosforiladas tanto en la región carboxilo terminal y en la región *linker*. La fosforilación de la región *linker* depende de cinasas de la familia de MAPK, de la cinasa GSK-3 (del inglés *Glycogen Synthase Kinase 3*), de las CDKs, entre otras.

4. El TGF- β y la fibrosis

La fibrosis es un proceso patofisiológico complejo que se caracteriza por la desregulación de la síntesis y degradación de los componentes de la matriz extracelular, ECM (del inglés *Extra-Cellular Matrix*). La excesiva acumulación de la ECM provoca la cicatrización y engrosamiento de los tejidos y, por lo tanto, interfiere con la homeostasis de los tejidos afectados. El TGF- β es considerado uno de los principales orquestadores en el desarrollo de la fibrosis. Esta citocina favorece el desarrollo de esta patología al promover la diferenciación de células quiescentes como los fibroblastos a miofibroblastos, los cuales son células capaces de secretar componentes de la ECM (Walton, Johnson, & Harrison, 2017; Zhao, Zhu, & Sun, 2016). Frecuentemente este proceso se desarrolla en órganos como el corazón, los pulmones, los riñones y el hígado.

En particular, la fibrosis hepática es el resultado del daño crónico que sufre el hígado debido a diversas patologías como el abuso de alcohol, la infección con el virus de la hepatitis C, o la esteatohepatitis no alcohólica, entre otras. En estas condiciones es posible encontrar mayores

niveles del TGF- β activo circulante, lo cual incrementa la destrucción de los hepatocitos sanos, así como la activación de las células estrelladas hepáticas y su transdiferenciación hacia miofibroblastos (Bataller & Brenner, 2005; Dooley & Ten Dijke, 2012).

4.1 El TGF- β y las células estrelladas.

El TGF- β participa en la activación de las células estrelladas hepáticas y en su transdiferenciación a miofibroblastos. La activación de este tipo celular es inducida por la señalización alterada del TGF- β , lo cual conlleva a la pérdida de su estado quiescente, lo que implica la pérdida de los depósitos de vitamina A, la expresión de la proteína α SMA (del inglés *Smooth Muscle Actin α*), el incremento de su proliferación y de su contractilidad, el incremento en la síntesis de las colágenas tipo I, III y IV, así como, de proteoglicanos (como la desmina, biglicano y decorina), y de glicoproteínas (como la laminina y la fibronectina) (Gressner, Rizk, Kovalenko, Weiskirchen, & Gressner, 2008; Meindl-Beinker & Dooley, 2008; Stanger, 2015). Esta producción incrementada de los componentes de la matriz extracelular juega un papel importante durante el desarrollo de la fibrosis (Taura, Iwaisako, Hatano, & Uemoto, 2016). Sin embargo, resulta controversial que las HSC sean las únicas productoras de la matriz extracelular, cuando solamente constituyen el 10% de las células totales en el hígado. Se ha propuesto que en la producción de los componentes de la matriz extracelular participan otras poblaciones celulares hepáticas como: los fibroblastos portales y los fibrocitos y, las células epiteliales como los colangiocitos y los hepatocitos, después de sufrir un proceso de transdiferenciación tipo EMT (Taura et al., 2016).

4.2 Los hepatocitos y la transición epitelio-mesénquima.

Una de las primeras observaciones de que los hepatocitos pasan por un proceso de EMT bajo el estímulo con la citocina TGF- β , fue realizada por Kaimori et al., 2007. Dicho grupo mostró que los hepatocitos cultivados y estimulados con la citocina TGF- β cambian su fenotipo hacia uno mesenquimal. Los cambios observados después del tratamiento con la citocina TGF- β incluyen: la disminución de la expresión de las proteínas E-caderina y albúmina, la sobreexpresión de las

proteínas vimentina (la cual es un marcador mesenquimal) y la colágena tipo I, y el aumento en los niveles del RNAm de *Snail*.

Por otro lado, los hepatocitos en cultivo primario que fueron aislados de hígados cirróticos murinos adquieren un fenotipo mesenquimal más rápido que los hepatocitos aislados de hígados sanos. El proceso de EMT de los hepatocitos de hígados cirróticos ocurre sin haber sido tratados con el TGF- β ; el tratamiento con esta citocina exacerba aún más el fenotipo mesenquimal de estas células. Además, la supervivencia de estas células es dependiente de la vía de MAPK, mientras que la supervivencia de los hepatocitos aislados de hígados sanos depende de la vía de PI3K/Akt (Kaimori et al., 2007; Nitta, Kim, Mohuczy, & Behrns, 2008).

También, a través de estudios de seguimiento de linaje en modelos *in vivo* de fibrosis, se muestra que los hepatocitos llevan a cabo el proceso de EMT (Gu et al., 2017; Zeisberg et al., 2007). Sin embargo, este tema sigue siendo controversial, ya que, otros grupos han mostrado evidencia en contra de este proceso de transdiferenciación de los hepatocitos *in vivo* (Chu et al., 2011; Taura et al., 2010).

5. Las proteínas andamio (*scaffolds*) funcionan como integradores de señales

Las proteínas andamio o *scaffolds*, son moléculas capaces de unir múltiples componentes de señalización para facilitar la interacción entre ellos y, por ende, favorecer las respuestas celulares. Estas proteínas pueden modificar los eventos de comunicación en tiempo, espacio y en relación dosis-respuesta. Los *scaffolds* favorecen la concentración local de proteínas específicas, producen cambios conformacionales y pueden unir elementos que son compartidos por distintas cascadas de señalización (Good, Zalatan, & Lim, 2012; Zeke, Lukács, Lim, & Reményi, 2009). Algunos ejemplos de las proteínas *scaffold* son: Ste5, KSR1/2, β -arrestina 2, Paxilina, PSD95, HOP, mAKAP, e IQGAP1, entre muchas otras (Brown & Sacks, 2006; Good et al., 2012; Zeke et al., 2009).

En particular, IQGAP1 participa en las cascadas de señalización de un gran número de receptores (EGFR, VEGFR2, CD44, M3, GluR4), lo que le permite regular una gran variedad de procesos celulares (Brown & Sacks, 2006).

6. Las proteínas IQGAP

Las proteínas IQGAP (del inglés *IQ motif containing GTPase activating proteins*) son una familia de proteínas altamente conservadas que regulan distintos procesos celulares como son la adhesión celular, la migración celular, y la citocinesis, entre otras. Hasta la fecha, tres proteínas IQGAP han sido identificadas en humanos y se denominan IQGAP1, IQGAP2 e IQGAP3. IQGAP1 fue descubierta en 1994 (Weissbach et al., 1994), seguida dos años después de IQGAP2 (la cual es 62% idéntica a IQGAP1), mientras que IQGAP3 fue aislada en 2007. Esta familia de proteínas comparte ciertas características, entre ellas la similitud de sus secuencias (**Imagen 6**). Sin embargo, difieren principalmente en las funciones que desempeñan, en su distribución en los tejidos y en su localización subcelular. La proteína IQGAP1 es expresada ubicuamente, mientras que la expresión de IQGAP2 se localiza principalmente en el hígado, aunque también pueden detectarse en bajos niveles en la próstata, tiroides, las glándulas salivales, plaquetas, el riñón y los testículos; y la expresión de IQGAP3 se restringe al cerebro, pulmón, los testículos, intestino delgado y al colón (White, Brown, & Sacks, 2009; White, Erdemir, & Sacks, 2012).

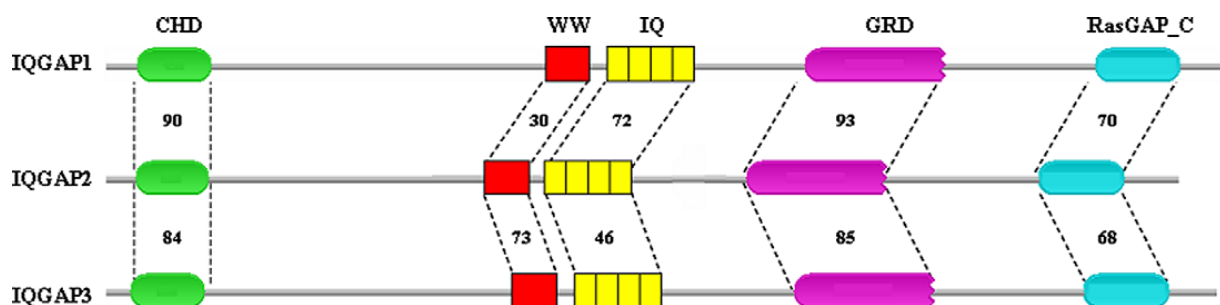


Imagen 6. Diagrama de los dominios de las proteínas IQGAP. Esta familia de proteínas cuenta con un dominio de unión a calponina CHD, un dominio de unión a poli-prolina WW, cuatro motivos IQ, un dominio de activación de GTPasa y un dominio único de esta familia RasGAP_C. Tomada de White, Brown & Sacks, 2009.

Estas proteínas cuentan con los dominios de homología a calponina (CHD), una región de unión a poliprolinas (WW), cuatro motivos de isoleucina/glutamina (IQ), un dominio de activación de GTPasa (GDR) y un dominio único de estas proteínas el Ras GAP_C terminal (Smith, Hedman, & Sacks, 2015; White et al., 2009).

6.1 La proteína IQGAP1

La isoforma más estudiada de esta familia de proteínas es IQGAP1. Se sabe que esta proteína interactúa con más de 100 proteínas. La función de andamio la desempeña dentro de la vía de las MAPK, ya que, se une a los componentes como K-Ras, B-Raf, MEK y Erk (Jameson et al., 2013; Roy, Li, & Sacks, 2004). También, interactúa con proteínas que regulan el citoesqueleto de actina como: Ca^{2+} /calmodulina, Cdc42, Rac1 y actina (Swart-Mataraza, Li, & Sacks, 2002). Además, IQGAP1 interactúa con mTOR (del inglés *mammalian Target of Rapamycin*) y con las cinasas que modulan la activación de Akt, durante los procesos como el crecimiento celular y la sobrevivencia (Hedman, Smith, & Sacks, 2015). Adicionalmente, puede modular la actividad de factores co-transcripcionales, por ejemplo, IQGAP1 se une a la proteína YAP (del inglés *Yes-Associated Protein*) miembro de la vía de Hippo e inhibe la formación del complejo YAP-TEAD dentro del núcleo, por lo tanto, se afecta la actividad transcripcional dependiente de YAP (Sayedyahosseini, Li, Hedman, Morgan, & Sacks, 2016).

El aumento en los niveles de expresión de esta proteína se ha asociado a patologías severas como el cáncer; la sobreexpresión de IQGAP1 está asociada con el incremento en la proliferación, la invasión y la angiogénesis de los tumores (Dong et al., 2008; Jadeski, Mataraza, Jeong, Li, & Sacks, 2008). Es por ello por lo que al gen que codifica para IQGAP1 se le ha considerado un proto-oncogen.

Específicamente en líneas celulares de cáncer de hígado, los niveles de la isoforma IQGAP1 están aumentados (White et al., 2010; Xia et al., 2014). En modelos murinos de cáncer de hígado, se ha observado que los tumores de estos ratones muestran un incremento en la expresión citoplasmática de IQGAP1, un aumento en los niveles de ciclina D1 y la disminución de E-caderina en la membrana. Además, en este estudio se muestra que el 86% de los ratones deficientes de *Iqgap2* desarrollan cáncer de hígado entre los 18-24 meses de edad. (Schmidt, Chiariello, Capilla, Miller, & Bahou, 2008).

6.2 La proteína IQGAP2

Otro de los miembros de la familia IQGAP es la proteína IQGAP2. Esta isoforma fue identificada como una proteína de 180 kDa que se expresa principalmente en el hígado y como andamio con capacidad de unirse a las proteínas Ca^{2+} /calmodulina, Cdc42 y Rac1 (Brill et al., 1996). Un

decremento en los niveles de expresión de IQGAP2 han sido observados en patologías como el cáncer de hígado, próstata y gastrointestinal (Kumar, Hassan, Pattnaik, Mohapatra, & Dixit, 2017).

Dentro del contexto hepático, a IQGAP2 se le ha atribuido un papel supresor de tumores, ya que, regula la vía Wnt/ β -catenina. En este modelo se propone que IQGAP2 forma parte del complejo APC-Axina-GSK3 β , lo que impide que β -catenina sea translocada hacia el núcleo y active sus genes blanco (Schmidt et al., 2008). También se ha descrito su papel como supresor de tumores en otros tipos de cáncer como: el gástrico, donde se ha observado que el promotor de este gen está altamente metilado; y en el cáncer de próstata, en el cual la presencia de IQGAP2 disminuye los niveles de proliferación de las líneas celulares DU145 y PC3, y regula positivamente los niveles de E-caderina al inhibir la activación de la proteína Akt (Xie et al., 2012).

Además, en los hígados de ratones knockout de *Iqgap2*, se observa una disminución de la captación de ácidos grasos de cadena larga, lo cual impide el desarrollo de la esteatosis hepática cuando estos ratones son alimentados con dietas ricas en grasas. Esto sugiere que IQGAP2 tiene un papel importante en el metabolismo de lípidos (Chiariello, LaComb, Bahou, & Schmidt, 2012). Asimismo, a IQGAP2 se le ha considerado parte de los IEGs (del inglés *IFN effector genes*), ya que participa en la respuesta a la infección por el virus de la hepatitis C al mediar la señalización de los IFN (del inglés *Interferon*) tipo I. En este caso, IQGAP2 interacciona con la subunidad RelA del factor de transcripción NF κ B, y juntos participan en la inducción por IFN de genes cuyas proteínas poseen propiedades antivirales (Brisac et al., 2016).

Por otra parte, se sabe que la presencia de IQGAP2 favorece el desarrollo de la enfermedad inflamatoria del intestino, ya que participa en la vía de señalización de TLR4-NF κ B. Esta vía se encarga de la producción de IL-6 (del inglés *Interleukin 6*), la cual es necesaria para el reclutamiento de macrófagos y neutrófilos al sitio de daño, lo que promueve el desarrollo de la inflamación (Ghaleb et al., 2015).

II. ANTECEDENTES.

Como ya hemos revisado, el TGF- β realiza una gran variedad de funciones celulares. En general se ha observado que en células normales con un fenotipo epitelial los efectos inducidos por la citocina TGF- β son anti-proliferativos y pro-apoptóticos. Sin embargo, bajo ciertas condiciones puede inducir procesos como EMT. Por lo tanto, algunos estudios en modelos experimentales de EMT y los análisis *in silico*, han permitido proponer que el gen *Iqgap1* puede ser un blanco potencial de la vía del TGF- β .

Las células NMuMG (*mouse mammary gland epithelial cell*), son un modelo experimental que permite estudiar tanto el efecto antiproliferativo y la EMT en respuesta al estímulo con la citocina TGF- β . Xie y colaboradores haciendo uso de este modelo, analizaron 15,000 genes a través de un microarreglo, de los cuales identificaron que 939 genes están regulados por TGF- β y, sólo en el caso de 7 de estos genes, no se había descrito que esta citocina participara en su regulación. Entre ellos está el gen *Iqgap1*, el cual es regulado positivamente después del tratamiento con la citocina TGF- β durante 1, 6 y 24 horas (Xie et al., 2003).

En otro estudio, Coulouarn et al. 2008 utilizando el modelo de hepatocitos de ratón en cultivo primario y microarreglos, mostraron firmas de expresión temporales dependientes del TGF- β . De acuerdo con los datos obtenidos, se sugiere que *Iqgap1* es un gen de respuesta temprana (0.5-2 horas) y que es regulado negativamente por el TGF- β (Coulouarn, Factor, & Thorgeirsson, 2008). La discrepancia entre ambos estudios sobre la regulación del gen *Iqgap1* puede deberse a que se emplean contextos celulares diferentes. A la fecha, la regulación de la región promotora del gen *Iqgap1* aún no se ha estudiado. Por lo tanto, mediante un análisis *in silico* realizado en nuestro laboratorio (Tavares Cornejo, 2015) se delimitó la región promotora del gen *Iqgap1* y dentro de ella, se identificaron 4 posibles sitios de unión a las Smad (SBE).

Por otra parte, cabe mencionar que sólo hay un reporte que muestra la relación entre la vía del TGF- β y la proteína IQGAP1. Este grupo mostró que en las células estrelladas de hígado, la proteína IQGAP1 promueve la degradación del receptor T β RII a través del reclutamiento de la ligasa de ubiquitina Smurf1, por lo tanto, IQGAP1 evita la activación de esta vía de señalización, y con ello que este tipo celular sufra el proceso de transdiferenciación y adquiera las características de un miofibroblasto (Liu et al., 2013). A la fecha, no hay evidencia de que el gen *Iqgap2* y su proteína sean regulados por la citocina TGF- β y/o por el proceso de EMT.

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Durante el desarrollo de ciertas patologías, como en el cáncer, los hepatocitos son células capaces de transdiferenciarse y dar origen a células con características mesenquimales. Se ha observado que, en líneas celulares de hepatocarcinoma, el cambio de fenotipo epitelial hacia uno mesenquimal favorece el aumento en la expresión de la proteína IQGAP1 y la disminución de la expresión de la proteína IQGAP2. En un modelo *in vitro* de EMT inducido por el TGF- β en las células NMuMG y a través del análisis *in silico* de las firmas de expresión inducidas por el TGF- β en hepatocitos de ratón, se ha propuesto que el gen *Iqgap1* es un blanco de esta vía de señalización que puede ser regulado de manera positiva o negativa.

Hasta ahora no se cuenta con estudios experimentales que validen estos antecedentes. Es por ello, que en nuestro trabajo investigamos si el gen y la proteína de *Iqgap1* son regulados por la vía del TGF- β , dentro del contexto hepático y durante el proceso de EMT. Además, analizamos si la expresión de *Iqgap2* y de su proteína son susceptibles a ser regulados por la citocina TGF- β y por el proceso de EMT.

IV. HIPÓTESIS

La expresión de *Iqgap1* es regulada positivamente mientras que la expresión de *Iqgap2* es regulada negativamente durante el proceso de transdiferenciación (epitelio-mesénquima) de los hepatocitos y por la citocina TGF- β .

V. OBJETIVOS

Objetivo General

Estudiar los efectos que ejercen el proceso de EMT y la citocina TGF- β sobre los niveles de expresión de las proteínas IQGAP1 e IQGAP2 en hepatocitos con diferentes contextos celulares.

Objetivos Particulares:

- 1.- Caracterizar el proceso de transdiferenciación de los hepatocitos de rata en cultivo primario de un fenotipo epitelial hacia un fenotipo tipo fibroblasto.
- 2.- Comparar los niveles de expresión basales de las proteínas IQGAP1 e IQGAP2 entre los hepatocitos de rata en cultivo primario y dos diferentes líneas celulares hepáticas: HepG2 (hepatocito transformado) y C9 (célula hepática inmortalizada, no transformada).
- 3.- Evaluar el curso temporal de los efectos tempranos de la citocina TGF- β sobre los niveles de expresión de IQGAP1 e IQGAP2 en las líneas celulares hepáticas HepG2 y C9.
- 4.- Evaluar el curso temporal de los efectos tempranos de la citocina TGF- β sobre los niveles de expresión de IQGAP1 e IQGAP2, en hepatocitos de rata en cultivo primario con morfología epitelial (1 día de cultivo) y con morfología tipo fibroblasto (7 días de cultivo).

VI. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Objetivo 1.- Caracterizar el proceso de transdiferenciación de los hepatocitos de rata en cultivo primario de un fenotipo epitelial hacia un fenotipo tipo fibroblasto.

- a) Analizar la morfología de los hepatocitos de 1 día y 7 días de cultivo (cuboidal vs fibroblastoide) por medio de microscopía óptica.
- b) Evaluar por inmunoblot la presencia de marcadores del fenotipo de los hepatocitos de 1 día y de 7 días de cultivo tratados en ausencia o presencia del TGF- β por diferentes tiempos (< 4h):
 - Marcadores de fenotipo epitelial: albúmina y HNF4 α .
 - Marcador de fenotipo mesenquimal: vimentina.
 - Control de carga: β -tubulina
- c) Observar por inmunofluorescencia la presencia de marcadores del fenotipo de los hepatocitos cultivados por 1 día y 7 días:
 - Marcador de fenotipo epitelial: albúmina y HNF4 α .
 - Marcador de fenotipo mesenquimal: vimentina.
- d) Analizar los niveles de fosforilación de la proteína Smad2 en la región C-terminal y en la región *linker*.

Objetivo 2.- Comparar los niveles de expresión basales de las proteínas IQGAP1 e IQGAP2 entre los hepatocitos de rata en cultivo primario y dos diferentes líneas celulares hepáticas: HepG2 (hepatocito transformado) y C9 (célula hepática inmortalizada, no transformada).

- a) Observar los niveles de cada proteína mediante inmunoblot, a partir de un extracto total de proteínas obtenido de cultivos de células C9 y HepG2.
- b) Evaluar por inmunoblot la presencia de marcadores del fenotipo epitelial y mesenquimal en las células C9 y HepG2 y en hepatocitos de cultivo primario.
 - Marcadores de fenotipo epitelial: albúmina y HNF4 α .
 - Marcador de fenotipo mesenquimal: vimentina.
 - Control de carga: β -tubulina

- c) Determinar por inmunofluorescencia la localización subcelular de la proteína IQGAP1 en las células C9 y HepG2.

Objetivo 3.- Evaluar el curso temporal de los efectos tempranos de la citocina TGF- β sobre los niveles de expresión de IQGAP1 e IQGAP2 en las líneas celulares hepáticas HepG2 y C9.

- a) Analizar los niveles de expresión de los RNAm y de las proteínas de *Iqgap1* e *Iqgap2* por medio de RT-PCR e inmunoblot, en células HepG2, tratadas en ausencia o presencia de TGF- β por diferentes tiempos (< 2 h).
- b) Estudiar los niveles de expresión de los RNAm y de las proteínas de *Iqgap1* e *Iqgap2* por medio de RT-PCR e inmunoblot, en células C9, tratadas en ausencia o presencia de TGF- β por diferentes tiempos (< 2 h).

Objetivo 4.- Evaluar el curso temporal de los efectos tempranos de la citocina TGF- β sobre los niveles de expresión de IQGAP1 e IQGAP2, en hepatocitos de rata en cultivo primario con morfología epitelial (1 día de cultivo) y con morfología tipo fibroblasto (7 días de cultivo).

- a) Analizar los niveles de las proteínas IQGAP1 e IQGAP2 mediante inmunoblot, en hepatocitos de 1 día y 7 días de cultivo, tratados en ausencia o presencia de TGF- β por diferentes tiempos (< 2 h).
- b) Observar mediante inmunoblot los niveles de fosforilación de la proteína Smad2 en el motivo SXS del C-terminal, en hepatocitos de 1 día y 7 días de cultivo, tratados en ausencia o presencia de TGF- β por diferentes tiempos (< 2 h).
- c) Evaluar los niveles de los RNAm y de las proteínas de *Iqgap1* e *Iqgap2* por medio de RT-PCR en hepatocitos de 1 día de cultivo tratados en ausencia o presencia de TGF- β por diferentes tiempos (< 2 h).

VII. MATERIALES y MÉTODOS (ver anexos para detalles)

1. Cultivo primario de hepatocitos de rata.

Los hepatocitos fueron aislados a partir de hígados de ratas Wistar macho con un peso de 200-300g. Los hígados de rata fueron perfundidos con la solución de Krebs-Ringer sin calcio para remover toda la sangre presente. Posteriormente, los hígados se perfundieron con solución de Krebs-Ringer con calcio, y posteriormente con una solución con colagenasa tipo IV durante 20-35 min. La suspensión celular obtenida a partir de la digestión fue filtrada y se realizaron 2 lavados con la solución de Krebs-Ringer con calcio, centrifugando a 600 rpm por 2 min; el sobrenadante fue descartado. Se midió la viabilidad de las células obtenidas con la tinción de Azul de Tripano al 0.4%.

En condiciones estériles, la suspensión celular se lavó 1 vez con PBS estéril + antibióticos (100 U/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomina), centrifugando a 600 rpm por 2 min. Se adicionaron 25 mL de PBS estéril y el pellet de células se resuspendió gentilmente, después se adicionaron 25 mL de la solución de Percoll. La suspensión celular se centrifugó a 800 rpm por 5 min, y el sobrenadante con las células muertas fue descartado.

Los hepatocitos obtenidos fueron resuspendidos en medio de *Attachment* (suplementado con suero fetal bovino al 10%) y sembrados en cajas petri de 100 mm de diámetro, previamente tratadas con colágena tipo I para favorecer su adhesión. Todas las cajas se incubaron durante 3 h a 37°C y 5% CO₂; posteriormente a todas las cajas se les cambió el medio por el medio de *Feeding* (libre de suero), para mantenerlos en cultivo durante un periodo de 1 a 7 días. Para los cultivos mantenidos por 7 días, los cambios de medio se realizaron cada dos días.

2. Microscopía óptica.

Los cultivos primarios de hepatocitos de rata fueron observados durante los diferentes días de cultivo y se llevó un registro de los cambios morfológicos que presentaron. Las imágenes fueron adquiridas con ayuda del microscopio invertido de contraste Leica DMIL al cuál se le adaptó la cámara Moticam 2300.

3. Líneas celulares.

La línea celular HepG2 se mantuvo en medio MEM suplementado con FBS al 10% y con antibióticos (100 U/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomicina). Estas células se caracterizan por ser adherentes y tener fenotipo epitelial. Fue derivada del hepatocarcinoma de un hombre caucásico de 15 años.

La línea celular C9 (Clona 9) se derivó del hígado normal de una rata macho. La línea se mantuvo en medio DMEM de baja glucosa suplementado con FBS al 10% y con antibióticos (100 U/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomicina). Estas células se caracterizan por ser adherentes con morfología epitelial.

4. Extracción de RNA total de hepatocitos por el método de TRIzol.

Al terminar cada tratamiento correspondiente, cada uno de los cultivos se lisó en 1-5 mL de TRIzol (Thermo Fisher Scientific), y se siguieron las instrucciones de acuerdo con el fabricante. Posteriormente, a cada muestra se le adicionó 0.2 mL de cloroformo por cada 1 mL de TRIzol utilizado y se mezcló con ayuda del vórtex durante 15 seg, las muestras se incubaron a temperatura ambiente por 3 min. Las muestras se centrifugaron a 3,500 rpm a 4 °C por 45 min.

La fase acuosa de cada muestra fue recuperada y se le adicionaron 0.5 mL de isopropanol frío por cada 1 mL de TRIzol utilizado. Las muestras se mezclaron gentilmente y se incubaron a temperatura ambiente por 10 min y después se centrifugaron a 3,500 rpm a 4 °C por 45 min. Al terminar este paso, se descartó el sobrenadante y un pellet era visible. Dicho pellet se lavó con 1 mL de etanol al 75% /H₂O DEPC (H₂O con Dietilpirocarbonato) a 3,500 rpm a 4 °C por 5 min. El sobrenadante fue descartado y el pellet se dejó secando a temperatura ambiente por 20 min. Finalmente, cada pellet fue resuspendido en un volumen adecuado de agua libre de RNAsas (H₂O con DEPC) previamente calentada a 55°C. Todas las muestras de RNA se almacenaron a -70°C hasta su uso.

5. Extracción de RNA de hepatocitos utilizando el kit Direc-zol™ (Zymo Research).

Al terminar cada tratamiento correspondiente, cada uno de los cultivos se lisó en 1-2 mL de TRIzol (Thermo Fisher Scientific), y se siguieron las instrucciones de acuerdo con el fabricante. A cada una de las muestras se le adicionó un volumen 1:1 de etanol al 100% en relación con el volumen de TRIzol en el que se lisaron las muestras. Las muestras se mezclaron vigorosamente. La totalidad del volumen se transfirió a las columnas Zymo-spin IICG y se siguieron las instrucciones de acuerdo con el fabricante.

6. RT- PCR.

Para cada muestra, el RNA total extraído fue cuantificado con ayuda del espectrofotómetro a una longitud de onda de 260 nm a partir de una solución de 2 μ L del RNA muestra en 500 μ L de H₂O-DEPC. Una vez cuantificados, se tomó el volumen necesario para tener 2 μ g de RNA por muestra y se llevaron a un volumen de 8 μ L con H₂O-DEPC. Enseguida, a cada muestra de 2 μ g de RNA se le adicionó 1 μ L de hexámeros 50 μ M, 1 μ L de coctel de dNTP's 10 mM y se llevaron todas las muestras a un volumen final de 12 μ L con H₂O-DEPC. Las muestras se incubaron a 65°C por 5 min en el termociclador, al finalizar, se incubaron en hielo. A cada una de las muestras se le agregó 4 μ L de Buffer 5X para M-MLV RT y 2 μ L de DTT 0.5 mM (ditiotreitól). Luego, las muestras se incubaron a 37°C por 2 min en el termociclador. Finalmente, a cada una de las muestras se le agregó 1 μ L de la enzima retro-transcriptasa M-MLV. Se utilizó el siguiente programa en el termociclador para la obtención del cDNA de cada muestra: 25°C por 10 min, 37°C por 50 min, 72°C por 15 min, y se dejaron a 4°C hasta que las muestras de cDNA se almacenaron a -20°C.

➤ Reacción de PCR con Taq Máster Mix.

A 1 μ L del cDNA (\sim 100ng) obtenido para cada muestra se le agregó 0.5 μ L de cada solución de oligonucleótido 10 μ M correspondiente al gen que se deseaba analizar (véase Anexo Tabla 1). A cada una de las muestras, se les agregó 4 μ L de H₂O inyectable y 6 μ L de *Taq PCR máster mix kit*, el volumen final fue de 12 μ L. Finalmente, en el termociclador se editaron los programas

correspondientes para cada gen. Los productos obtenidos de esta reacción fueron analizados mediante electroforesis en geles de agarosa al 1.5 % y teñidos con bromuro de etidio.

➤ **Reacción de PCR con Taq polimerasa**

A 1 μL del cDNA ($\sim 100\text{ng}$) obtenido de cada muestra se le agregó 0.5 μL de la solución de cada oligonucleótido 10 μM correspondiente al gen que se deseaba analizar (**véase Anexo Tabla 1**). A cada una de las muestras, se les agregó 12.4 μL de H_2O inyectable, 1 μL de dNTP's 10 mM, 2.4 μL de Mg^{2+} 50 mM, 6 μL de buffer 10X y por último 0.2 μL de la enzima Taq DNA polimerasa. El volumen final fue de 20 μL . Finalmente, en el termociclador se editaron los programas correspondientes para cada gen. Los productos obtenidos de esta reacción se analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 1.5 % teñidos con bromuro de etidio.

7. Obtención de extractos celulares de proteínas.

La obtención de los extractos celulares se realizó mediante la lisis de las células en 1 mL de buffer RIPA, suplementado con un cóctel de inhibidores de proteasas y fosfatasa (**ver anexo**). La lisis procedió en agitación a 4°C durante 1h. Al terminar esta incubación, las muestras fueron centrifugadas a 11,000 rpm a 4°C por 10 min. Los sobrenadantes obtenidos fueron recuperados en microtubos nuevos, y congelados rápidamente en un baño de etanol a -70 °C. Las muestras se almacenaron a -70°C hasta su uso.

Por el método de Bradford se midió la concentración de proteínas. La cuantificación se realizó en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 595 nm y se utilizaron 2-4 μL de cada una de las muestras. Se prepararon alícuotas con una concentración de 50 μg y 100 μg de proteínas totales y se les agregó buffer Laemmli 6x. Después todas las muestras se desnaturalizaron a 95°C por 5 min, se dejaron enfriando a temperatura ambiente y se guardaron -20°C.

Luego, mediante electroforesis en geles desnaturalizantes de poliacrilamida (SDS-PAGE), las proteínas fueron separadas. La electroforesis se realizó a voltaje constante de 45V durante toda la noche en buffer de corrida.

8. Inmunoblot.

Una vez que las proteínas fueron adecuadamente separadas mediante la electroforesis en los geles de poliacrilamida, se procedió a realizar la transferencia a la membrana de PVDF (fluoruro de polivideno). La transferencia se realizó a 320 mA por 3 h. Al terminar el tiempo de la transferencia, la membrana PVDF fue bloqueada con TBST 1x/ leche descremada al 5% a temperatura ambiente, en agitación, durante 1 h.

La membrana PVDF se colocó junto con la dilución del anticuerpo primario correspondiente (**véase en Anexo Tabla 2**) y se incubó toda la noche a 4 °C y en agitación. Al día siguiente, la membrana se incubó con el anticuerpo secundario adecuado (acoplado a peroxidasa de rábano) para cada anticuerpo primario (en diluciones 1: 10,000 - 1: 20,000) en TBST/leche descremada al 5% a temperatura ambiente, en agitación, durante 1 h. La detección de las proteínas de interés se realizó con el kit de quimioluminiscencia Millipore a una dilución adecuada (1:10 – 1:15) y con el uso de placas para autoradiografía sensibles al azul.

9. Inmunofluorescencia.

Para llevar a cabo este protocolo, previamente cubreobjetos de 18 mm de diámetro fueron tratados con una solución 1mg/mL de colágena tipo I para favorecer la adherencia de los hepatocitos y con una solución 0.1mg/mL de poli-lisina para favorecer la adherencia de las células C9 y HepG2. Entre 1×10^5 - 2×10^5 hepatocitos recién aislados, fueron sembrados sobre los cubreobjetos y mantenidos en medio de *attachment* durante 3 h. Posteriormente, se reemplazó el medio por medio de *feeding* y se mantuvieron en cultivo durante 1 y 7 días. En el caso de las células C9 y HepG2, se sembraron aproximadamente 80 mil células y se permitió que llegaran a confluencia.

A cada pozo se le retiró el medio de cultivo y las células se lavaron una vez con PBS 1x. Después, las células se fijaron con una solución de paraformaldehído al 4% y se incubaron durante 15 min a temperatura ambiente. Se retiró el paraformaldehído y las células se lavaron tres veces con PBS 1x. El siguiente paso fue permeabilizar las células con metanol durante 6 min a -20°C; transcurrido este tiempo se adicionó 1 mL de PBS 1x a cada pozo y se procedió a lavar tres

veces con PBS 1x. Una vez que las células fueron permeabilizadas, se realizó el bloqueo con suero de caballo al 10% en PBS 1x, y se incubó por 1 h a temperatura ambiente.

Las diluciones de los anticuerpos primarios (**véase en Anexo Tabla 3**) se prepararon en una solución de PBS 1x con suero de caballo al 10%. Cada muestra se incubó con su anticuerpo primario correspondiente a 4°C durante toda la noche.

Al día siguiente, las muestras se lavaron al menos tres veces con PBS 1x por 5 min en agitación. Se prepararon las diluciones de los anticuerpos secundarios en suero de caballo al 10% y se incubaron con la muestra correspondiente durante 1 h a temperatura ambiente. Al finalizar el tiempo de esta incubación, las células se lavaron tres veces con PBS 1x por 5 min en agitación.

Para el montaje de las muestras, las células se lavaron una vez con 1 mL de H₂O estéril. Sobre un portaobjeto limpio se colocó la solución de montaje/DAPI y se colocó el cubreobjetos cuidadosamente para evitar la formación de burbujas. La preparación se selló sobre la orilla de cada cubreobjetos con una capa homogénea de barniz de uñas. La adquisición de las imágenes se realizó mediante microscopía confocal haciendo uso del microscopio Olympus FV10 y las imágenes fueron analizadas con el software ImageJ.

10. Análisis estadístico.

Se realizó el análisis estadístico de las densitometrías obtenidas de los resultados del inmunoblot, utilizando la prueba ANOVA de una vía y considerando una diferencia significativa con un valor de $p < 0.05$.

VIII. RESULTADOS

1. Los hepatocitos sufren un proceso de transdiferenciación al mantenerlos en cultivo.

Cuando los hepatocitos son cultivados por periodos prolongados pierden su polaridad y adquieren un fenotipo mesenquimal; este cambio de fenotipo se caracteriza por cambios en su morfología y por la adquisición de marcadores de fenotipo mesenquimal y la pérdida de marcadores de fenotipo epitelial. Este proceso es inducido de manera más rápida cuando los hepatocitos son estimulados con la citocina TGF- β (Godoy et al., 2009; Kaimori et al., 2007; Nitta et al., 2008).

En la Figura 1 se pueden observar las imágenes representativas del proceso de transdiferenciación de los hepatocitos cuando se mantienen en cultivo durante diferentes días. En ellas podemos notar que, los hepatocitos de rata en cultivo primario muestran una morfología poligonal durante el primer día de cultivo. Sin embargo, con el transcurso de los días de cultivo, los hepatocitos adquieren una morfología tipo fibroblasto desde el día 4 de cultivo y que se mantiene hasta el día 7 de cultivo.

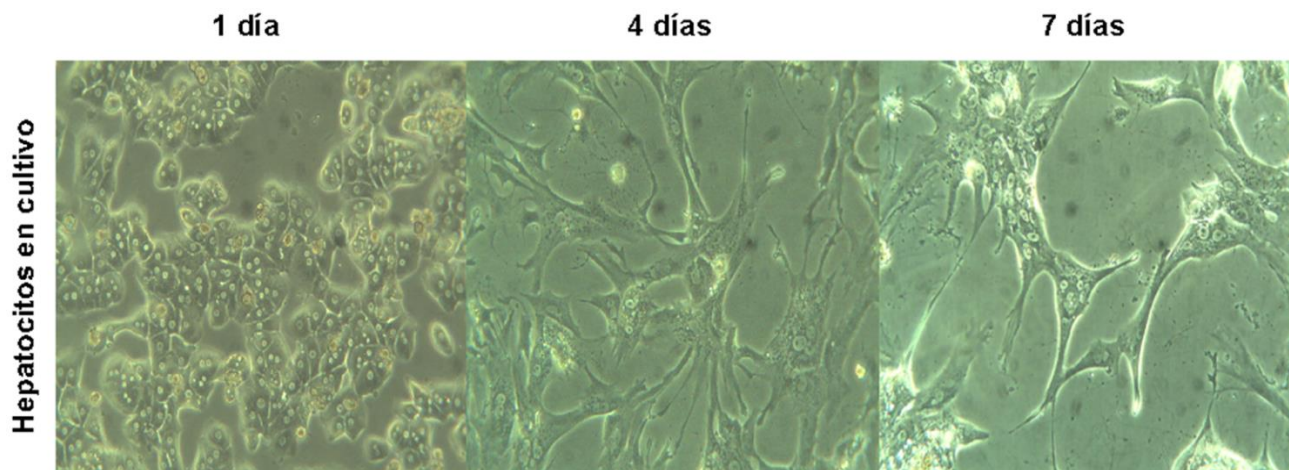


Figura 1. Los hepatocitos en cultivo primario muestran un cambio en su morfología: de tipo epitelial (1 día) a un tipo fibroblasto observable desde los cuatro días de cultivo. Imágenes obtenidas por microscopía óptica. Aumento 10X. Se muestran imágenes representativas de 5 experimentos independientes.

1.1 Durante el proceso de transdiferenciación hay cambios en los niveles de expresión de los marcadores de fenotipo epitelial y mesenquimal

El proceso de transdiferenciación observado en los hepatocitos en cultivo primario (**Figura 1**) fue acompañado por cambios en los niveles de proteínas que se han asociado al fenotipo epitelial y mesenquimal.

Con la finalidad de corroborar que los hepatocitos estaban perdiendo sus características epiteliales en el transcurso de los días de cultivo, se evaluó la presencia de los marcadores de fenotipo a través de las técnicas de inmunofluorescencia e inmunoblot. Se eligieron como marcadores de fenotipo epitelial funcional a las proteínas albúmina y HNF4 α (del inglés *Hepatocyte Nuclear Factor 4 alpha*) y como marcador de fenotipo mesenquimal a la proteína vimentina (Zeisberg & Neilson, 2009).

En la figura 2, podemos observar que, en los hepatocitos de 7 días de cultivo, la abundancia de la proteína albúmina es menor en comparación con los niveles mostrados en los hepatocitos de 1 día de cultivo. También, observamos que la proteína albúmina se encuentra distribuida en el citoplasma de las células. Por su parte en la figura 3 podemos observar que, la expresión de la proteína HNF4 α fue más abundante en los hepatocitos de 1 día de cultivo y se detectó en menores niveles en los hepatocitos de 7 días de cultivo; esta proteína se localiza principalmente en el núcleo. Mientras tanto, en la figura 4 podemos apreciar que tanto en los hepatocitos de 1 día de cultivo como los hepatocitos de 7 días de cultivo expresaron a la proteína vimentina, pero esta proteína está formando estructuras más organizadas en los hepatocitos de 7 días de cultivo.

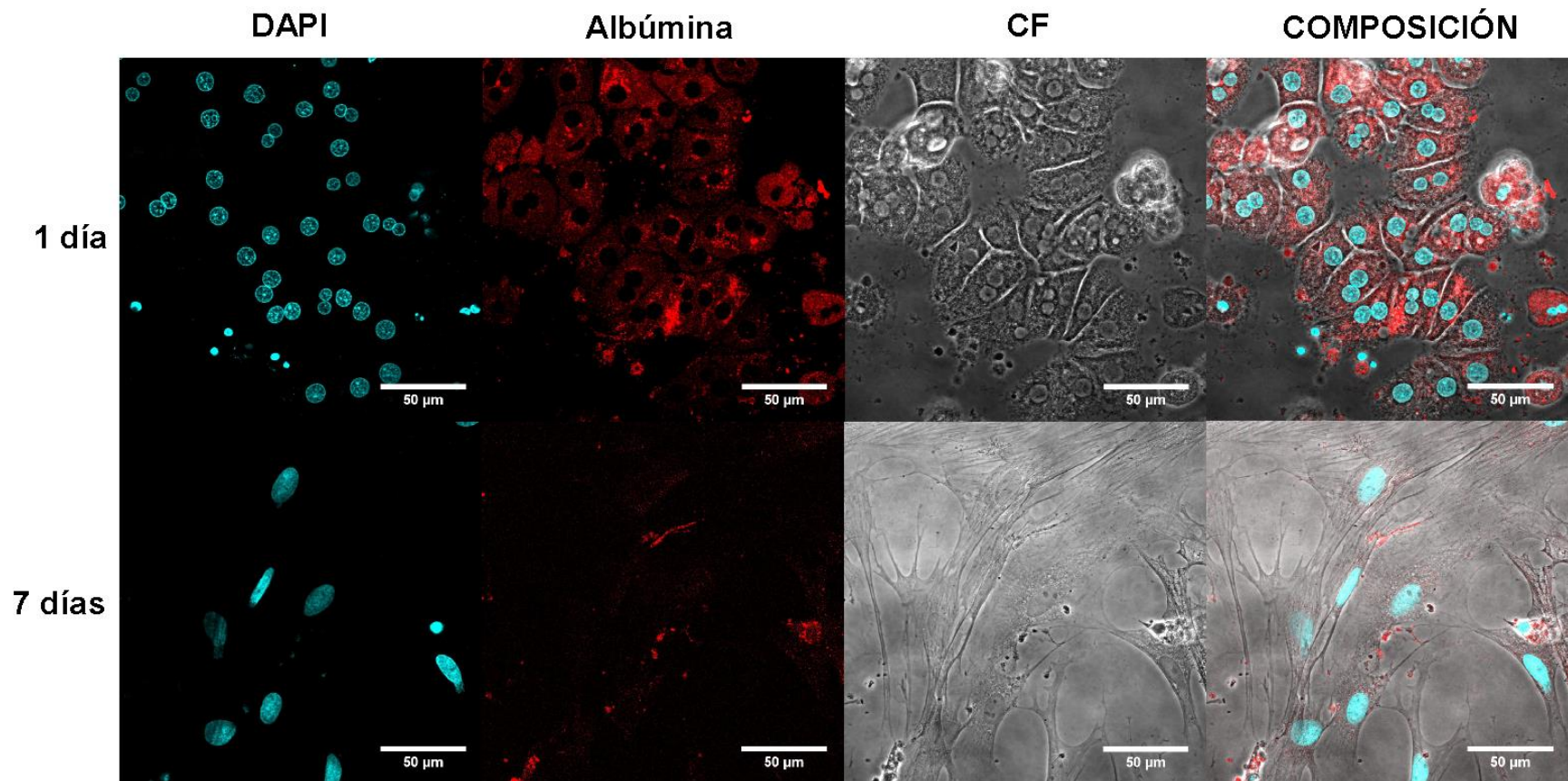


Figura 2. Los hepatocitos de rata en cultivo primario adquieren la morfología tipo fibroblasto después de 7 días en cultivo. Inmunofluorescencias para detectar en los hepatocitos de 1 y 7 días de cultivo el marcador epitelial albúmina analizado por microscopía confocal. Se muestran imágenes representativas de 2 experimentos independientes. CF: contraste de fases. La barra de escala representa 50μm

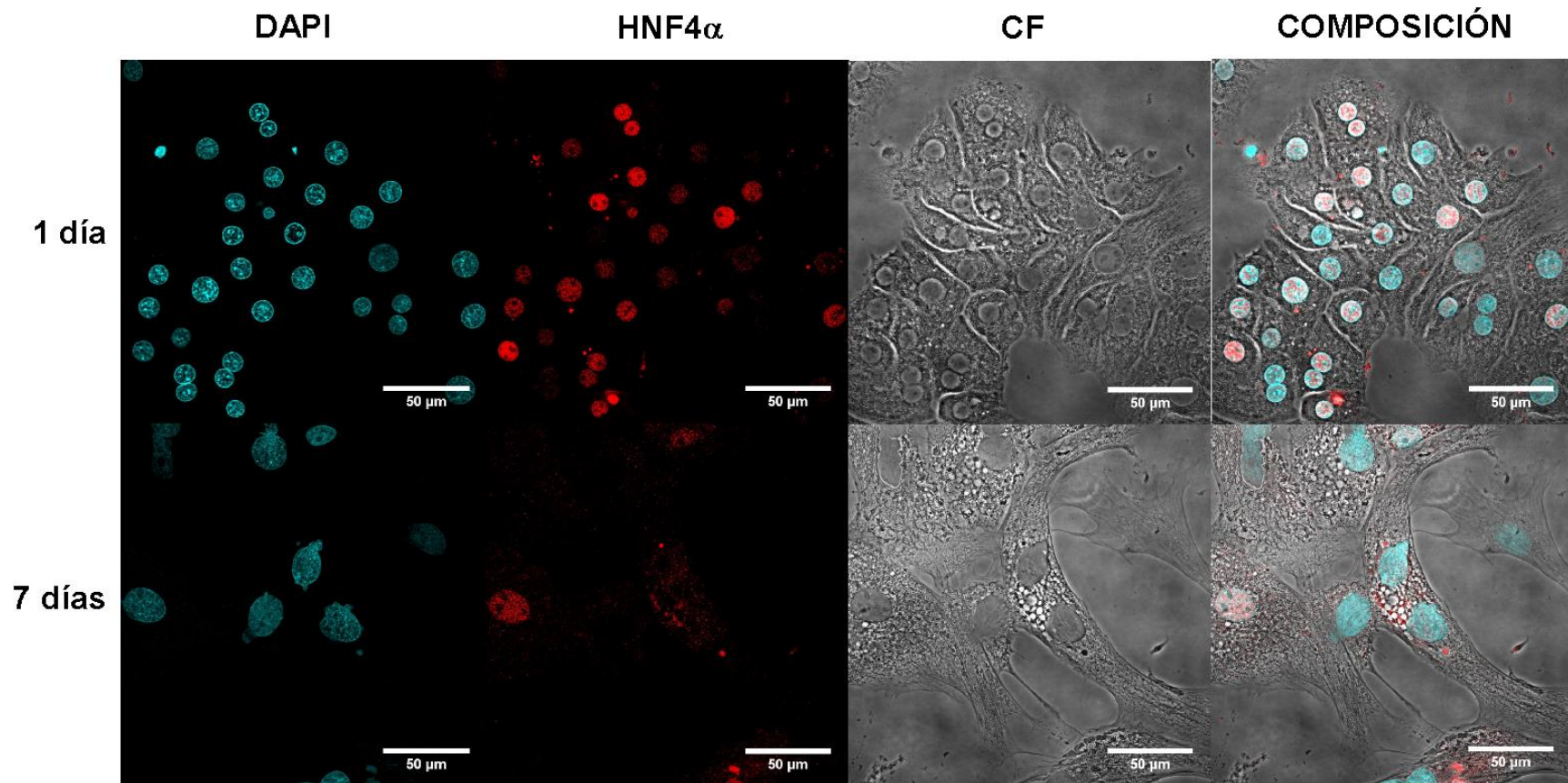


Figura 3. Los *hepatocitos de rata en cultivo primario* adquieren la *morfología tipo fibroblasto* después de 7 días en cultivo. Inmunofluorescencias para detectar en los hepatocitos de 1 y 7 días de cultivo el marcador epitelial HNF4 α analizado por microscopía confocal. Se muestran imágenes representativas de 2 experimentos independientes. CF: contraste de fases. La barra de escala representa 50 μm .

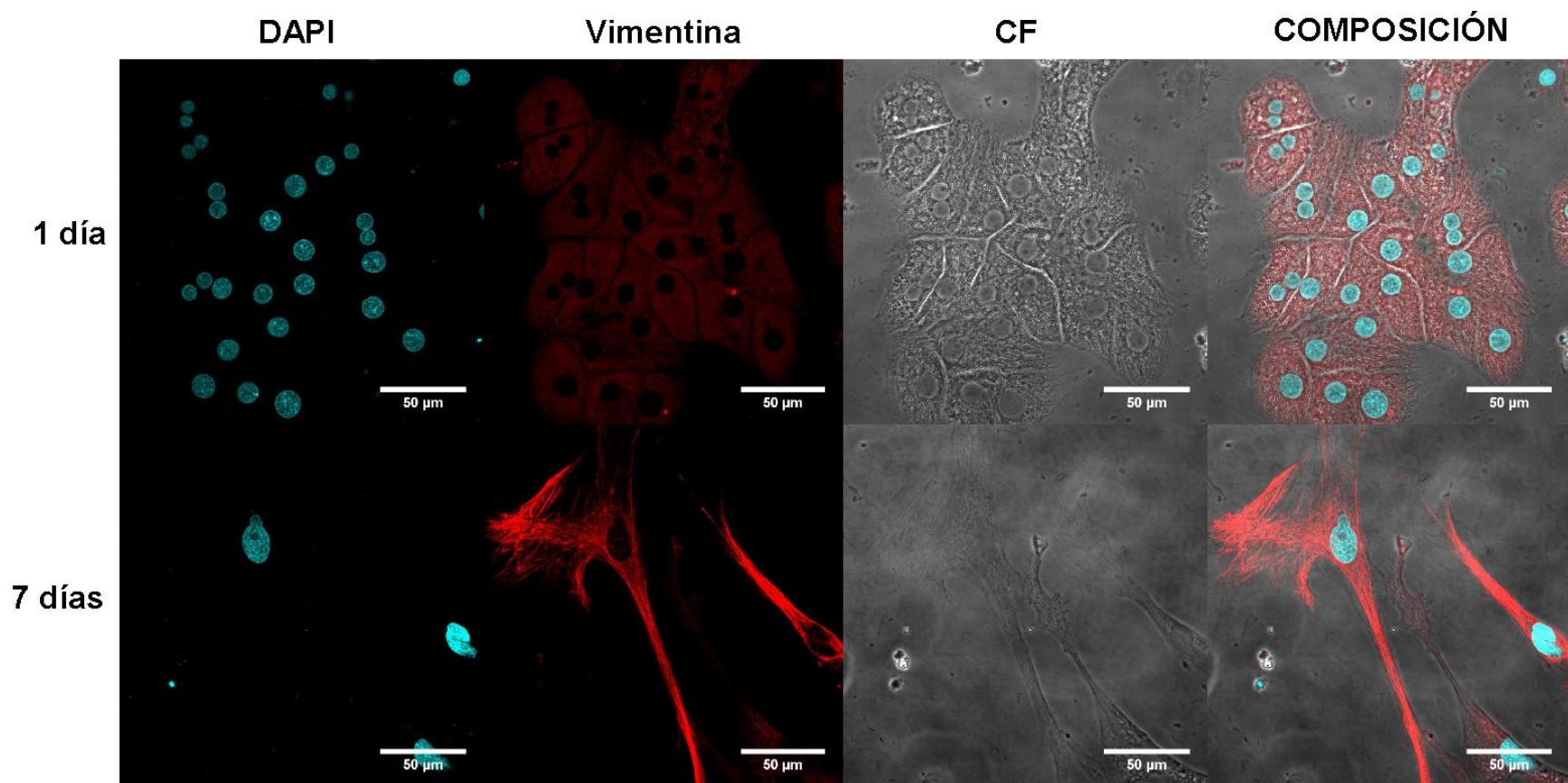


Figura 4. Los *hepatocitos de rata en cultivo primario* adquieren la *morfología tipo fibroblasto* después de 7 días en cultivo. Inmunofluorescencias para detectar en los hepatocitos de 1 y 7 días de cultivo el marcador mesenquimal vimentina analizado por microscopía confocal. Se muestran imágenes representativas de 2 experimentos independientes. CF: contraste de fases. La barra de escala representa 50 µm.

Además, a partir de los lisados totales obtenidos de los hepatocitos de 1 y de 7 días de cultivo se detectó por inmunoblot la presencia de los marcadores albúmina y vimentina en un curso temporal de tratamiento con la citocina TGF- β . Para ello, los estímulos se realizaron con 0.2 nM de la citocina TGF- β durante 0.5, 1, 2 y 4 h en hepatocitos cultivados por 1 día y en hepatocitos cultivados durante 7 días.

En la figura 5, podemos apreciar que los niveles basales de la proteína albúmina son más abundantes en los hepatocitos de 1 día de cultivo; mientras que, niveles muy bajos de albúmina son detectados en hepatocitos después del séptimo día de cultivo. El solo hecho de cultivar los hepatocitos durante un día, provoca una disminución en los niveles de la proteína albúmina, ya que pueden ser detectados en niveles más altos en los hepatocitos recién aislados o frescos (datos no mostrados). Otro de los marcadores de fenotipo, la proteína vimentina, es más abundante en los hepatocitos transdiferenciados y se encuentra en bajos niveles en los hepatocitos de 1 día de cultivo.

En la evaluación de los niveles de ambos marcadores de fenotipo analizados por inmunoblot, el estímulo durante diferentes tiempos con la citocina TGF- β no disminuye la abundancia de la proteína albúmina, ni tampoco provoca un aumento en los niveles de la proteína vimentina. Cabe señalar que el curso temporal de tratamiento con la citocina TGF- β utilizado en este experimento fue corto (el tiempo máximo de estímulo fueron 4 h), en comparación a los cursos temporales que se han reportado en la literatura y en los cuales se observan cambios en los niveles de estos marcadores después del estímulo con esta citocina (Kaimori et al., 2007; Nitta et al., 2008; Zeisberg et al., 2007).

WB
Hepatocitos en cultivo primario

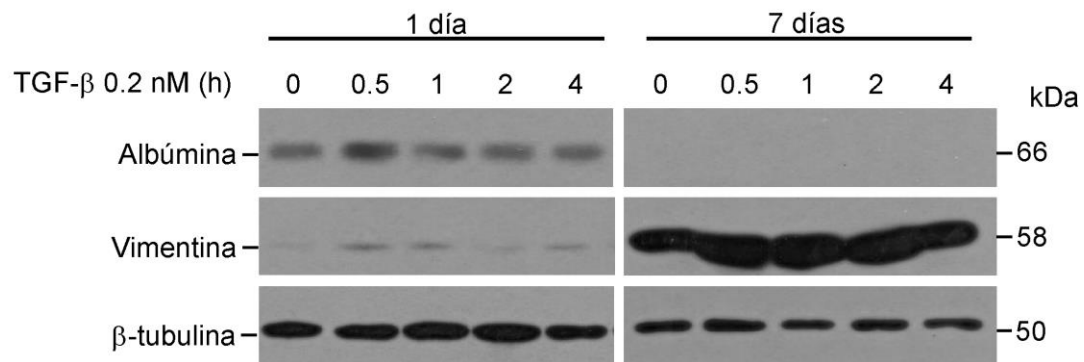


Figura 5. Caracterización del proceso de transdiferenciación que llevan a cabo los hepatocitos de rata en cultivos primarios. WB para detectar el cambio en la abundancia del marcador epitelial albúmina y del marcador mesenquimal vimentina en hepatocitos de 1 día y 7 días de cultivo bajo un curso temporal de tratamiento con el TGF-β. N=3

Los resultados obtenidos muestran que los hepatocitos de rata en cultivo primario pasan por un proceso de transdiferenciación parcial, en el cual se ven afectadas características funcionales como la síntesis de albúmina, lo que se acompaña de la pérdida del factor de transcripción HNF4α, un regulador maestro que mantiene el fenotipo epitelial de los hepatocitos, y adquieren marcadores de un fenotipo mesenquimal (vimentina) cuando se mantienen por periodos prolongados en cultivo.

1.2 El proceso de transdiferenciación de los hepatocitos favorece cambios en los niveles de fosforilación de la proteína Smad2

Otro de los aspectos que se evaluó fue si el cambio en el fenotipo de los hepatocitos en cultivo primario produce o no cambios en la respuesta al estímulo con el TGF-β. Para ello, se obtuvieron los lisados totales de los hepatocitos en cultivo primario de 1 y 7 días tratados con 0.2 nM de la citocina TGF-β durante 1 y 3 h y se analizaron por inmunoblot los niveles de fosforilación de la proteína Smad2 tanto en la región C-terminal como en la región *linker*.

Como podemos observar en la figura 6, los hepatocitos transdiferenciados muestran mayores niveles de fosforilación de la proteína Smad2 en la región C-terminal con respecto a los hepatocitos de 1 día de cultivo. De manera interesante, también observamos que la proteína Smad2 es fosforilada en la región *linker* sólo en los hepatocitos de 7 días de cultivo, lo que nos sugiere que las vías no canónicas del TGF- β están activas. Una de las vías no canónicas (independientes de las proteínas Smad) del TGF- β que también se ha asociado al proceso de EMT es la vía de MAPK. Lo que observamos es que los niveles basales de fosforilación de las proteínas Erk1/2 son mayores en los hepatocitos transdiferenciados respecto a los hepatocitos de 1 día de cultivo.

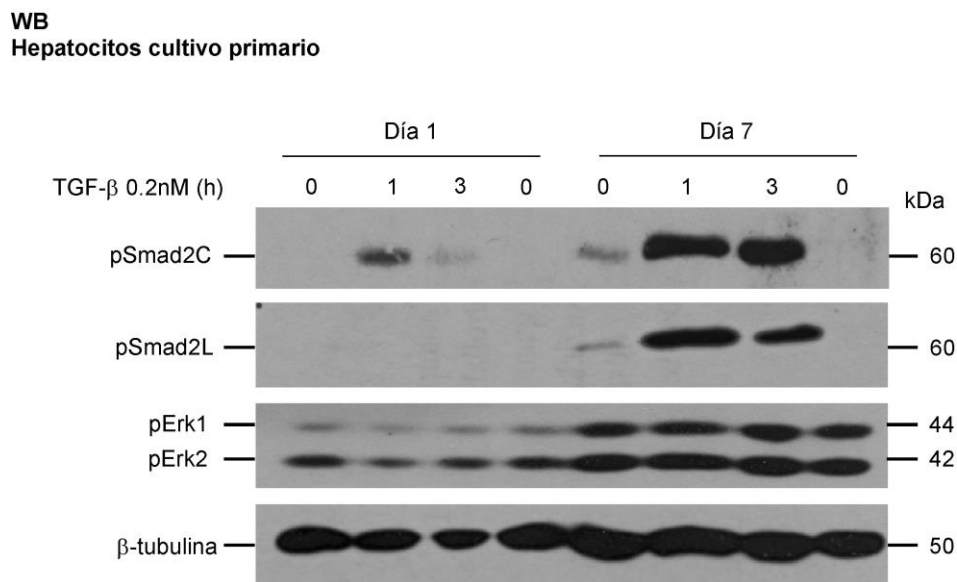


Figura 6. El proceso de transdiferenciación de los hepatocitos produce cambios en el nivel de fosforilación de la proteína Smad2. WB para detectar el cambio en los niveles de fosforilación de la proteína Smad2 en la región C-terminal y en la región *linker*; así como, de la forma fosforilada de la proteína Erk en hepatocitos de 1 y 7 días e cultivo tratados en ausencia y presencia de 0.2 nM de TGF- β . N=2

Estos resultados nos sugieren que las vías del TGF- β independientes de las proteínas Smad, también podrían estar participando en el proceso de transdiferenciación de los hepatocitos en cultivo.

2. Las proteínas IQGAP se expresan diferencialmente en células hepáticas.

La abundancia de la proteína IQGAP1 es ubicua en todos los órganos del cuerpo, excepto en el hígado, donde la isoforma más abundante es IQGAP2. La alteración de los niveles de ambas proteínas se ha observado en líneas celulares de cáncer de hígado. Es interesante que, en las líneas de hepatocarcinoma con características morfológicas mesenquimales existe una mayor abundancia de la isoforma IQGAP1, mientras que la isoforma IQGAP2 se encuentra en menores niveles (White et al., 2010).

Con la finalidad de evaluar cómo se encontraban los niveles basales de las proteínas IQGAP1 e IQGAP2 se procedió a realizar un análisis comparativo de sus niveles mediante inmunoblot, a partir de los lisados totales obtenidos de las líneas celulares hepáticas HepG2 y C9 (de acuerdo a ATCC, las líneas celulares HepG2 y C9 poseen características morfológicas epiteliales); de los hepatocitos recién aislados/frescos del hígado de rata, los cuales son un modelo más representativo de los hepatocitos que se encuentran en el hígado; y de los hepatocitos aislados de hígado de rata mantenidos en cultivo durante 1 día y 7 días,

En la figura 7, podemos observar que los mayores niveles de la proteína IQGAP1 son detectados en las células transformadas HepG2, en las células C9, y en los hepatocitos de 7 días de cultivo que han pasado por un proceso de transdiferenciación. En el caso de la proteína IQGAP2, observamos que se expresa principalmente en células con fenotipo epitelial, es decir, en las células HepG2 y en los hepatocitos frescos; mientras que, se encuentra en menores niveles en hepatocitos de 1 día de cultivo y de 7 días. Es interesante observar que en las células C9, la isoforma IQGAP2 no es detectada.

Para caracterizar el fenotipo de las células analizadas, también se evaluó la expresión de marcadores de fenotipo epitelial y mesenquimal en todos los tipos celulares. Como podemos observar en la figura 7, las células HepG2, así como los hepatocitos frescos y de 1 día de cultivo, muestran una mayor abundancia de las proteínas HNF4 α y albúmina, los cuales son marcadores de fenotipo epitelial. Sorprendentemente, en las células C9 no se logra detectar ninguno de los marcadores de fenotipo epitelial utilizados en este trabajo. Esta línea celular muestra altos niveles de vimentina, similares a los expresados por los hepatocitos de 7 días de cultivo, lo cual nos sugiere que esta línea celular posee características principalmente mesenquimales.

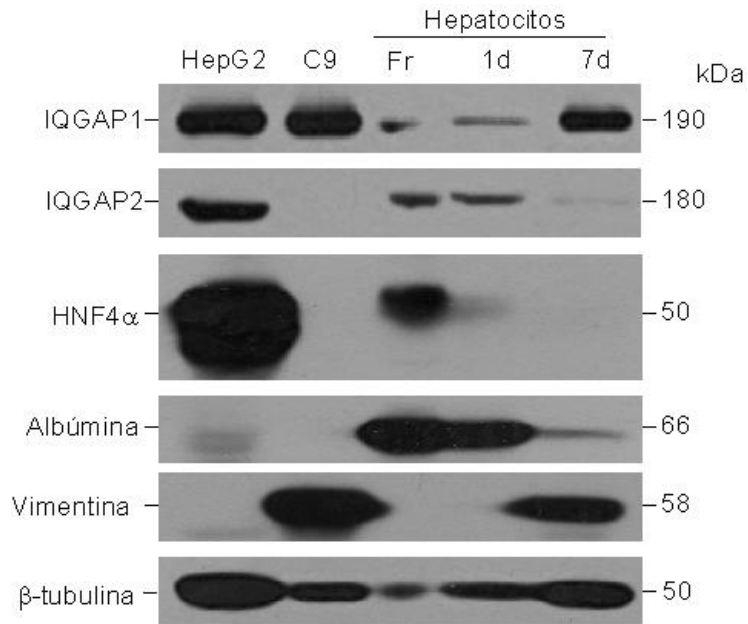


Figura 7. Los niveles basales de las proteínas IQGAP1 e IQGAP2 cambian dependiendo del tipo celular. WB para evaluar los niveles de las proteínas IQGAP1 e IQGAP2 en células de hepatocarcinoma humano, HepG2; en hepatocitos normales inmortalizados, C9; y en hepatocitos de cultivo primario. Además, se muestran los niveles de proteínas que son marcadores de fenotipo epitelial y mesenquimal. Fr: hepatocitos recién aislados/frescos. N=2

Los resultados obtenidos muestran que el cambio del fenotipo epitelial hacia uno mesenquimal tiene una correlación con la abundancia de las proteínas de la familia IQGAP. En células con características morfológicas epiteliales, la proteína IQGAP2 es más abundante, mientras que, la proteína IQGAP1 se encuentra en mayores niveles en las células que poseen características morfológicas mesenquimales.

Por otra parte, se sabe que la proteína IQGAP1 se encuentra asociada a las proteínas que están presentes en las uniones celulares adherentes, por ejemplo, a las cadherinas (E-cadherina, N-cadherina, y VE-cadherina). La sobreexpresión de IQGAP1 reduce la interacción que existe entre la proteína E-cadherina y el citoesqueleto de actina, lo cual tiene como consecuencia que las uniones célula-célula se debiliten. Dado que observamos que la proteína IQGAP1 se encuentra en altos niveles en diferentes líneas celulares y con el objetivo de corroborar cuál era la localización subcelular de la proteína IQGAP1 se realizó la detección de esta proteína por la técnica de

inmunofluorescencia en los diferentes contextos celulares. En la figura 8, podemos observar que en las células C9 y HepG2 la proteína IQGAP1 se localizó principalmente en la membrana celular de dichas células. En lo que respecta a la detección de esta proteína en hepatocitos en cultivo primario, no hemos logrado observar a esta proteína mediante esta técnica. Un paso importante que debemos realizar será caracterizar si los hepatocitos después de 1 día de cultivo son capaces de formar íntegramente las uniones célula-célula.

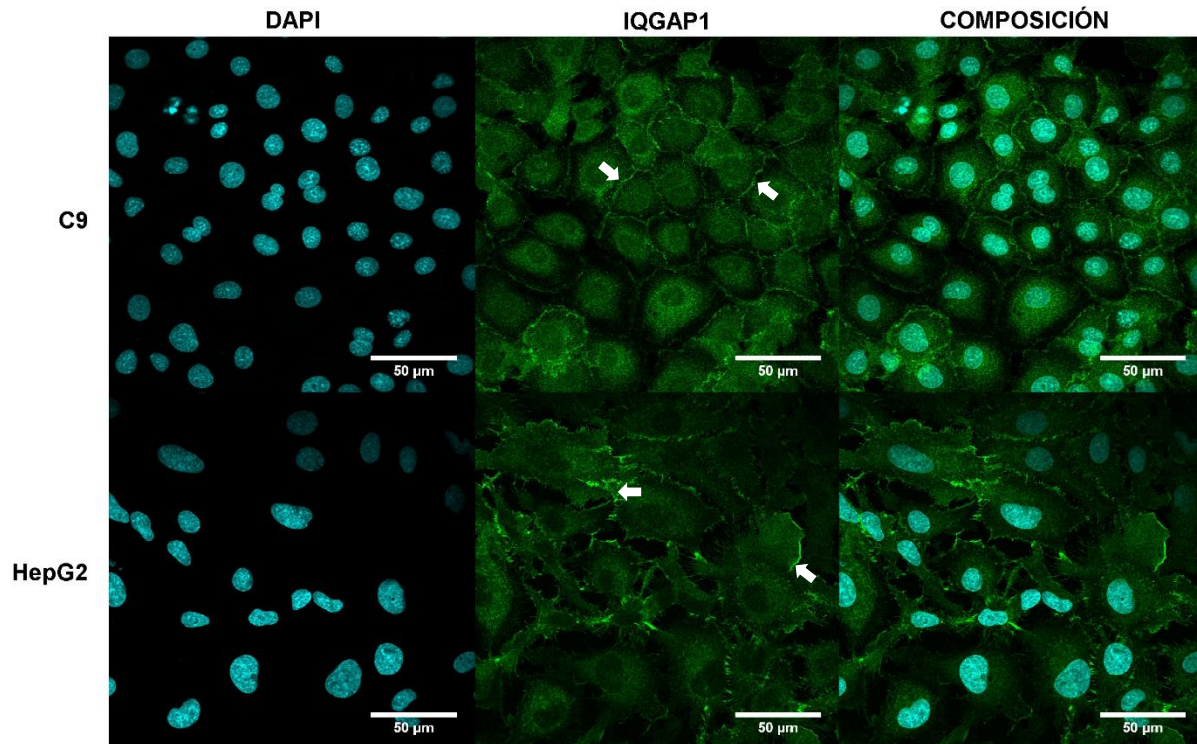


Figura 8. La proteína IQGAP1 se localiza en la membrana celular. Inmunofluorescencias para detectar a la proteína IQGAP1 en las células C9 y HepG2. Imágenes obtenidas por microscopía confocal. La barra de escala representa 50μm.

Los resultados obtenidos nos sugieren que los altos niveles basales de la proteína IQGAP1 y su localización en la membrana celular de las células C9 y HepG2, podría favorecer en estas células la capacidad de moverse.

3. La regulación de IQGAP1 por la citocina TGF- β es dependiente del contexto celular hepático.

Con base en la observación de que las proteínas IQGAP se expresan diferencialmente dependiendo del fenotipo celular, el siguiente objetivo fue evaluar el efecto del estímulo con la citocina TGF- β sobre los niveles de las proteínas IQGAP1 e IQGAP2. Para ello, se realizaron cursos temporales de tratamiento con 0.3 nM de la citocina TGF- β durante 0.5, 1 y 2 h en las líneas celulares HepG2 y C9. A partir de los lisados totales obtenidos de las células HepG2 y C9 se analizaron los niveles de las proteínas IQGAP1 e IQGAP2, de la forma fosforilada de la proteína Smad2 en la región C-terminal (como control de que la vía del TGF- β estaba activa) y como control de carga se evaluaron los niveles de las proteínas β -actina o β -tubulina.

En la figura 9, se muestra el curso temporal de tratamiento con el TGF- β y su efecto sobre los niveles de las proteínas IQGAP en la línea celular de hepatocarcinoma humano, HepG2. El análisis por densitometría nos muestra que los niveles de las proteínas IQGAP1 e IQGAP2 no son modificados por el tratamiento con la citocina TGF- β .

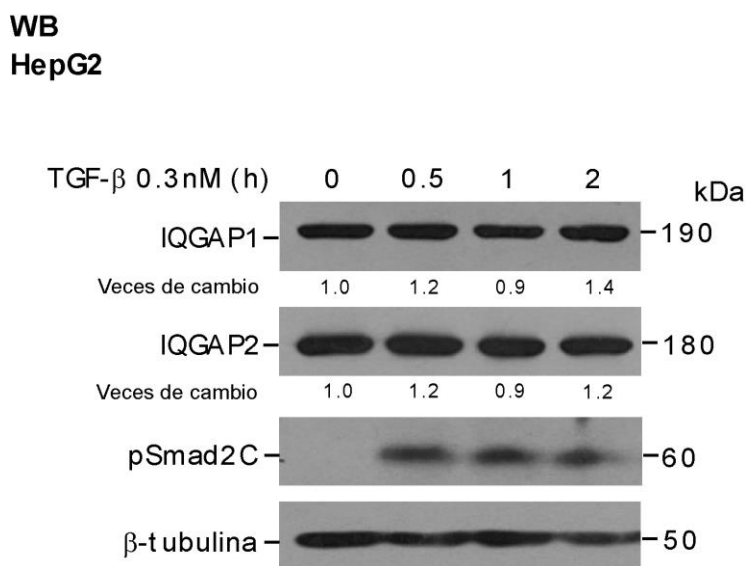


Figura 9. Los niveles de las proteínas de la familia IQGAP no son regulados por el TGF- β en células de hepatocarcinoma HepG2. Western blot para detectar los niveles de las proteínas IQGAP1 e IQGAP2. Los números debajo de las bandas de las proteínas IQGAP1 e IQGAP2 indican las veces de cambio respecto al control sin tratamiento con el TGF- β , resultados representativos de 3 experimentos independientes.

Dado que no observamos efecto del estímulo con el TGF- β sobre los niveles de las proteínas IQGAP 1 y 2, es posible que se encuentren alterados los mecanismos implicados en la regulación de esta proteína en el contexto celular hepático transformado.

En la figura 10, se muestra el efecto de la citocina TGF- β sobre las células C9, las cuales poseen un fenotipo parecido a los hepatocitos de 7 días de cultivo. En este contexto celular, el análisis por densitometría nos muestra que el estímulo con TGF- β no induce cambios en los niveles de la proteína IQGAP1 durante los diferentes tiempos de estímulo. De manera interesante, no se detectó la expresión de la isoforma IQGAP2 en este contexto celular.

WB
C9

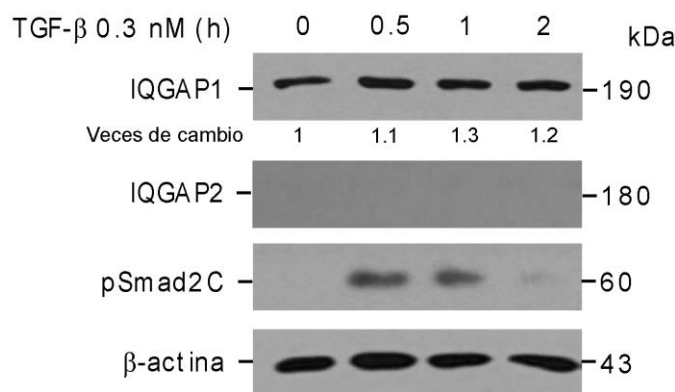


Figura 10. Los niveles de la proteína IQGAP1 no son regulados por el TGF- β en células C9. Western blot para detectar los niveles de la proteína IQGAP1 e IQGAP2 en las células C9 después del tratamiento con la citocina TGF- β por diferentes tiempos. Los números debajo de las bandas de la proteína IQGAP1 indican las veces de cambio respecto al control sin tratamiento con el TGF- β , resultados representativos de 4 experimentos independientes.

Dado que no observamos un efecto del tratamiento con el TGF- β sobre los niveles de la proteína IQGAP1, podemos asociar este hecho con que la línea celular C9 posee más características mesenquimales que epiteliales (**Figura 7**). Como lo observaremos en la siguiente sección, en los hepatocitos que han adquirido características mesenquimales, los niveles de la proteína IQGAP1 parecen que no son regulados por esta citocina.

4. La abundancia de las proteínas IQGAP1 e IQGAP2 es regulada por el proceso de transdiferenciación que sufren los hepatocitos.

Dado que observamos que durante el proceso de transdiferenciación de los hepatocitos en cultivo primario, los niveles basales de la proteína IQGAP1 aumentaron y los de IQGAP2 disminuyeron (**Figura 7**), se evaluó cuál era el efecto de la citocina TGF- β y del proceso de transdiferenciación sobre los niveles de IQGAP1 e IQGAP2 en hepatocitos de 1 día y 7 días de cultivo (transdiferenciados). Para ello, se realizó un curso temporal con la citocina TGF- β para conocer si las proteínas IQGAP1 e IQGAP2 eran blancos de la vía de señalización de esta citocina. Los estímulos se realizaron con 0.2 nM de la citocina TGF- β durante 0.5, 1 y 2 h en hepatocitos cultivados por 1 día y en hepatocitos cultivados durante 7 días. Se realizó el análisis por inmunoblot de las proteínas de interés IQGAP1 e IQGAP2, de la proteína pSmad2C (como control de que la vía estaba activa) y como control de carga se evaluó los niveles de la proteína β -tubulina a partir de los lisados totales obtenidos de los hepatocitos de 1 y 7 días de cultivo.

En la figura 11 panel A, se observa la imagen representativa del curso temporal de tratamiento con el TGF- β en hepatocitos de 1 y 7 días de cultivo y su efecto sobre los niveles de las proteínas IQGAP1 e IQGAP2. Como se puede observar, en los hepatocitos de 1 día de cultivo, los niveles de la proteína IQGAP1 son regulados positivamente por el TGF- β desde las 0.5 h después del estímulo; mientras que, en los hepatocitos de cultivo primario de 7 días, los niveles de la proteína IQGAP1 son muy altos, lo cual nos impide observar si el estímulo con la citocina TGF- β puede tener un efecto regulador sobre la abundancia de esta proteína. En cuanto a los niveles de la proteína IQGAP2, éstos son más abundantes en los hepatocitos de 1 día de cultivo y disminuyen en los hepatocitos transdiferenciados, tal como lo habíamos observado anteriormente (**Figura 7**), y el estímulo con el TGF- β no provocó cambios en los niveles de esta proteína.

Este resultado nos sugirió que el cambio de fenotipo que sufren los hepatocitos es suficiente para provocar el cambio en los niveles de las proteínas IQGAP (Figura 11 panel A), y como se puede observar en la gráfica de la figura 11 panel B, el TGF- β es capaz de regular positivamente los niveles de la proteína IQGAP1 en los hepatocitos de 1 día de cultivo induciendo un pico máximo de los niveles de esta proteína después de 1 h de tratamiento. Para evaluar si la proteína IQGAP1

puede ser susceptible a la regulación por el TGF- β , será necesario realizar cursos temporales de tratamiento con esta citocina en cultivos de hepatocitos durante los diferentes días del proceso de transdiferenciación.

Hasta ahora no hay reportes que muestren un cambio entre las isoformas 1 y 2 de la familia de proteínas IQGAP durante el proceso de transdiferenciación que llevan a cabo los hepatocitos de cultivo primario. En lo que respecta a los mecanismos implicados en el cambio de expresión entre ambas isoformas durante el proceso de EMT, estos aún no han sido dilucidados.

5. El gen *Iqgap1* es regulado positivamente por la citocina TGF- β en hepatocitos de 1 día de cultivo.

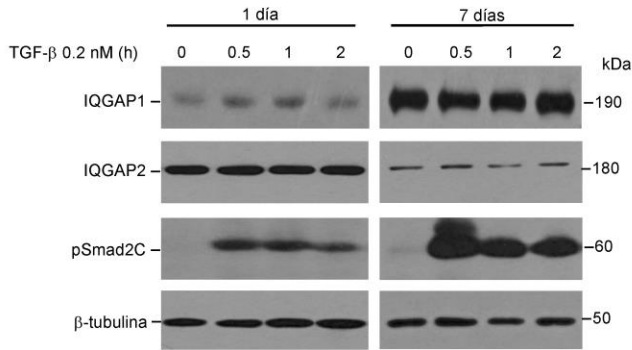
Dado que observamos que la proteína IQGAP1 fue regulada positivamente por el TGF- β sólo en los hepatocitos de 1 día de cultivo (**Figura 11 panel A**) y que el cambio fue estadísticamente significativo (**Figura 11 panel B**), decidimos evaluar si el aumento en los niveles de la proteína estaba relacionado a un aumento en la transcripción del gen *Iqgap1* después del estímulo con esta citocina. Para ello, se realizaron estímulos con 0.2 nM de la citocina TGF- β durante 0.5, 1 y 2 h en los hepatocitos de 1 día de cultivo y se realizó el RT-PCR a partir del RNA total aislado de estas células. Se midieron los niveles de los RNAm de interés *Iqgap1* e *Iqgap2*; así como, los niveles de expresión de *SnoN*, el cual es un gen blanco de la citocina TGF- β (Tecalco-Cruz et al., 2012), que fue utilizado como control de respuesta a este estímulo; mientras que, como control para normalizar los datos se analizó la expresión del gen constitutivo *Gapdh*.

En la figura 11 panel C observamos que, en los hepatocitos de cultivo primario de 1 día los niveles del RNAm de *Iqgap1* son regulados de manera transitoria por la citocina TGF- β alcanzando el pico máximo de expresión a las 0.5 h después del tratamiento. Por otro lado, los niveles del RNAm de *Iqgap2* parecen ser regulados negativamente después de 2h del estímulo con el TGF- β .

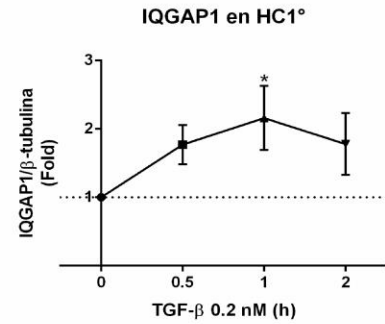
En conjunto estos resultados nos muestran que, la expresión del gen *Iqgap1* y de su proteína son regulados positivamente por el TGF- β y, que existe una correlación entre los niveles del RNAm de *Iqgap1* y la síntesis de la proteína a tiempos cortos de tratamiento con esta citocina, sugiriendo

que tanto el gen como la proteína IQGAP1 son blancos inducidos de manera temprana por esta vía de señalización.

A) WB
Hepatocitos en cultivo primario



B)



C) RT-PCR
Hepatocitos en cultivo primario 1 día

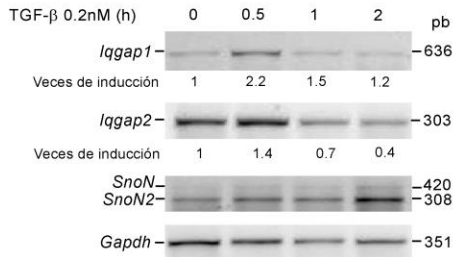


Figura 11. El gen *Iqgap1* y su proteína son regulados positivamente por la citocina TGF-β en hepatocitos de rata en cultivo primario de 1 día. A) Western blot para detectar los niveles de la proteína IQGAP1 e IQGAP2 en hepatocitos en cultivo primario de 1 y 7 días, resultados representativos de 2 experimentos independientes. B) La gráfica muestra el análisis por densitometrías del inmunoblot para la proteína IQGAP1 en hepatocitos de rata en cultivo primario de 1 día. Los datos están representados como el promedio ± EEM de 3 experimentos independientes, * p<0.05 diferencia significativa respecto al grupo no tratado con TGF-β. C) RT-PCR para evaluar los niveles de *Iqgap1* e *Iqgap2* en hepatocitos de cultivo primario con fenotipo epitelial. Los números debajo de las bandas del RNAm de *Iqgap1*, *Iqgap2* indican las veces de cambio respecto al control sin tratamiento con el TGF-β, resultados representativos de 2 experimentos independientes.

IX. DISCUSIÓN

En el presente trabajo describimos que los hepatocitos mantenidos en cultivo primario pasan por un proceso de transdiferenciación del tipo EMT. Durante este proceso observamos que la expresión del factor de transcripción HNF4 α , el cual está involucrado en la diferenciación de los hepatocitos y en la morfogénesis del hígado, disminuye en los hepatocitos de 7 días de cultivo. Adicionalmente, la capacidad funcional de los hepatocitos también se ve disminuida cuando estas células se mantienen durante 7 días en cultivo; esto fue detectado por los bajos niveles de la proteína albúmina en los hepatocitos transdiferenciados. Caso contrario es lo que ocurre con la proteína vimentina, un marcador de fenotipo mesenquimal que se encuentra expresado principalmente en los hepatocitos transdiferenciados. Esta proteína es uno de los principales filamentos intermedios que es ubicuamente expresada por las células mesenquimales normales, por lo que ayuda a las células a mantener su integridad celular y les confiere resistencia a situaciones de estrés (Satelli & Li, 2011).

Por otro lado, nuestros resultados muestran que los niveles basales de las proteínas IQGAP1 e IQGAP2 cambian de acuerdo con el contexto celular hepático, el cual lo definimos en células que poseen características morfológicas epiteliales (hepatocitos de 1 día de cultivo y HepG2) y en células que poseen características morfológicas mesenquimales (hepatocitos de 7 días de cultivo y C9). Los mayores niveles de la proteína IQGAP1, los encontramos en los hepatocitos de 7 días en cultivo, así como en las células C9 y en las células HepG2. Por lo tanto, cabe preguntar: ¿cuál podría ser el papel que está desempeñando IQGAP1 cuando se expresa en altos niveles? En particular, se ha descrito que la presencia de IQGAP1 favorece la proliferación de las células HepG2 al promover la activación de la proteína Akt (Chen et al., 2010). También se ha descrito que, IQGAP1 puede localizarse en el núcleo y favorecer la progresión del ciclo celular (Johnson, Sharma, Brocardo, & Henderson, 2011). Además, es posible que la presencia de IQGAP1 en la membrana celular de las células C9 y HepG2 promueva el debilitamiento de las uniones célula-célula al promover la disociación de la proteína α -catenina del complejo E-cadherina- β -catenina (Briggs & Sacks, 2003). Asimismo, IQGAP1 es una proteína efectora de las Rho-GTPasas como Cdc42 y Rac1, las cuales están implicadas en la regulación del citoesqueleto de actina, y promueven la formación de filopodias y lamelipodias respectivamente. Dichas estructuras

celulares, le confieren a la célula la capacidad de explorar y moverse dentro del entorno que las rodea (Owen et al., 2008; Yilmaz & Christofori, 2009). También es posible que, los altos niveles basales de IQGAP1 faciliten la activación de las otras vías que no dependen de las proteínas Smad, las denominadas vías no canónicas del TGF- β , como las MAPK.

Por otra parte, observamos que en las líneas celulares de hígado HepG2 y C9, el estímulo con el TGF- β no tiene un efecto regulador sobre los niveles de la proteína IQGAP1. Cabe señalar que, aunque las células HepG2 muestran características epiteliales, tienen un fenotipo transformado, por lo que es probable que diversos mecanismos de regulación, entre ellos los inducidos por el TGF- β , estén alterados. Esto nos muestra que no siempre las líneas celulares son un buen modelo para estudiar el comportamiento de un hepatocito normal.

Además, contrario a lo que pensábamos, las células C9 mostraron un fenotipo mesenquimal muy parecido a los hepatocitos en cultivo primario de 7 días, por lo que consideramos que esta línea celular puede representar un modelo para estudiar el comportamiento de los hepatocitos transdiferenciados con características mesenquimales. Más interesante aún, es el hecho de que en esta línea celular no se ha logrado detectar la presencia de IQGAP2, por lo que será interesante evaluar qué es lo que ocurre a nivel transcripcional con el gen *Iqgap2* y si el TGF- β es capaz de regularlo.

En el modelo de transdiferenciación de los hepatocitos en cultivo primario será importante evaluar: sí el incremento en los niveles de IQGAP1 y la disminución de los niveles de IQGAP2 en los hepatocitos transdiferenciados esta correlacionado con cambios en los niveles de sus respectivos RNAm. En este modelo observamos que, el cambio de fenotipo epitelial hacia el fenotipo mesenquimal promueve un cambio diferencial en los niveles de las proteínas IQGAP1 e IQGAP2 (**Imagen 7 panel A**). Esta expresión diferencial sólo se había observado en muestras provenientes de pacientes con HCC y en líneas celulares de hepatocarcinoma. La isoforma IQGAP1 es detectada en el 84.1% de las muestras de HCC, mientras que la proteína IQGAP2 es detectada sólo en el 22%. En dicho trabajo se descarta que la disminución de los niveles de IQGAP2 sean debidos a la hipermetilación del promotor de *Iqgap2* como ocurre en otros tipos de cáncer, como el gástrico. Mientras tanto, en las líneas celulares HepG2, Hep3B y Huh7, las cuales muestran características morfológicas epiteliales, los niveles de IQGAP1 son menores con

respecto a los niveles de IQGAP2. Pero en las líneas celulares SK-Hep-1, SNU475 y SNU387, las cuales poseen características morfológicas mesenquimales, se observa que la isoforma más abundante es IQGAP1 (White et al., 2010). Nuestro trabajo es el primero en mostrar evidencia de que el cambio entre las isoformas IQGAP1 e IQGAP2 parece estar asociado al cambio de fenotipo de los hepatocitos sanos durante el proceso EMT que ocurre *in vitro*, y que podría ocurrir en la etapa de fibrosis/cirrosis hepática, y apoya la idea de que la expresión diferencial de estas proteínas puede ocurrir independientemente del proceso de transformación de los hepatocitos.

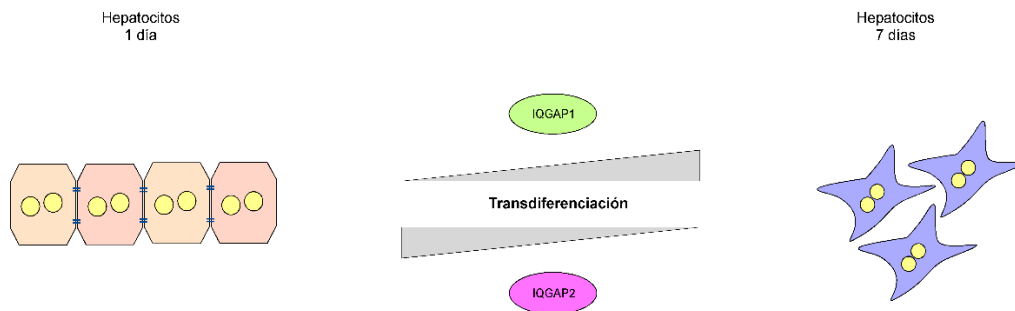
Previamente, en nuestro laboratorio se ha caracterizado la región promotora del gen *Iqgap1*, y en ella se identificaron 4 posibles sitios de unión a las Smad (Tavares Cornejo, 2015), nuestros resultados nos indican que la citocina TGF- β es capaz de regular positivamente los niveles de la proteína IQGAP1, sólo en hepatocitos en cultivo primario de 1 día. Los cambios significativos observados en los niveles de la proteína están relacionados con la inducción temprana (0.5 h después del estímulo con TGF- β) del gen *Iqgap1*. Es importante señalar que, aunque la vía del TGF- β se mantiene activa (esto lo podemos observar en los niveles de fosforilación de la proteína Smad2 en la región C-terminal) durante los diferentes tiempos de estímulo (0.5-2 h), la inducción del gen *Iqgap1* ocurre de manera transitoria (**Imagen 7 panel B**). Puede ser que, a tiempos cortos de estimulación con la citocina TGF- β , las proteínas Smad puedan estar reclutando maquinaria específica que promueva la regulación positiva del gen *Iqgap1* y que, a tiempos más largos de tratamiento, se favorezcan rearrreglos o recambios en los componentes de la maquinaria de la transcripción. Por ejemplo, en el caso específico del gen *gsc* (*goosecoid*) se sabe que, la formación de los complejos Smad2/4 o Smad3/4 pueden ejercer efectos diferentes en la regulación de este gen. En el reporte de Labbé y colaboradores, se mostró que la unión del complejo Smad2/Smad4 y del factor FAST2 a la región promotora del gen *gsc* promueve su inducción. Sin embargo, el dominio MH1 de Smad3 se une al mismo sitio en el DNA que la proteína Smad4, entonces, cuando la proteína Smad3 compite por este sitio impide la unión de Smad4, y esto lleva a la inhibición de la transcripción del gen *gsc*, aún en presencia de FAST2 (Labbé, Silvestri, Hoodless, Wrana, & Attisano, 1998).

Otra posibilidad es la presencia de una fosforilación diferencial de las proteínas Smad, ya sea en la región C-terminal o en la región *linker*, ya que este código de fosforilación puede determinar la

regulación diferencial en la expresión de genes. Por ejemplo, la formación del complejo pSmad2L(Ser245-250-255)/C y pSmad3L(Ser213) con Smad4 promueven la transcripción del gen *Pai-1*, el cual es un factor que facilita procesos como la invasión e induce la deposición de componentes de la matriz extracelular (Matsuzaki, 2013; Yoshida et al., 2016). Será interesante evaluar cuáles son los complejos específicos que se están uniendo a la región promotora del gen *Iqgap1* en los diferentes tiempos de estímulo con el TGF- β mediante ensayos de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP).

Además, los resultados obtenidos en este proyecto nos sugieren que el TGF- β no induce cambios a nivel de la proteína IQGAP2, pero sí a nivel de su RNAm, ya que esta citocina parece regular negativamente la expresión del gen *Iqgap2*. A la fecha, no hay estudios que sugieran que este gen puede ser un blanco potencial de la vía del TGF- β , y está pendiente la caracterización de la región promotora de este gen, así como identificar si existen posibles SBE.

a)



b)

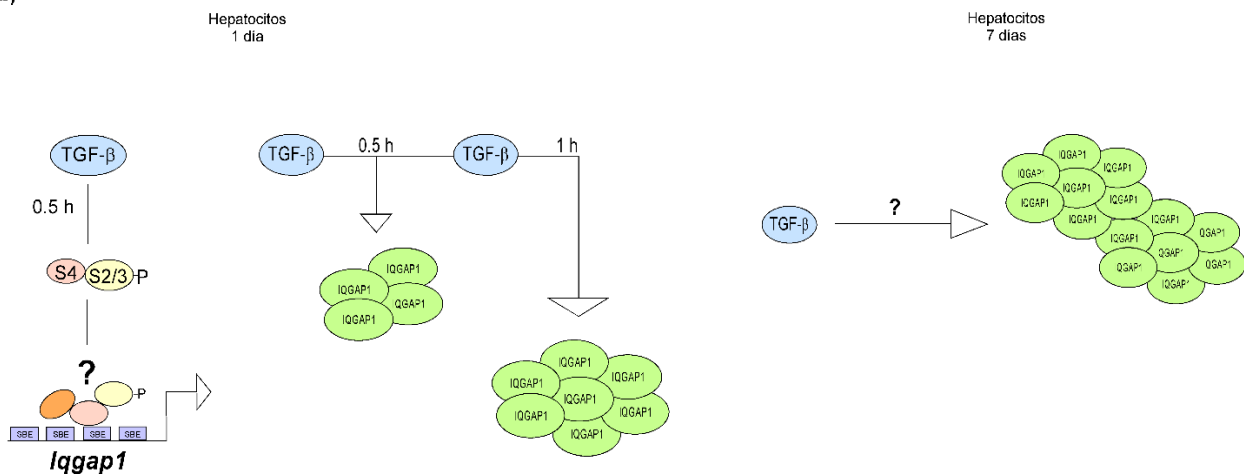


Imagen 7. Posibles procesos implicados en la regulación de las proteínas IQGAP1 e IQGAP2 en hepatocitos normales mantenidos en cultivo. a) El proceso de transdiferenciación de los

hepatocitos en cultivo primario favorece un cambio diferencial en los niveles de las proteínas IQGAP1 e IQGAP2. **b)** El TGF- β es capaz de regular al gen *Iqgap1* de manera temprana y por lo tanto inducir un aumento en los niveles de la proteína a 1h después del estímulo con el TGF- β . En el caso de los hepatocitos de 7 días de cultivo, los niveles de IQGAP1 son tan altos que no observamos si el TGF- β tiene un efecto.

Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que hay dos potenciales mecanismos de regulación en la expresión de IQGAP1, uno a nivel transcripcional y otro a nivel de proteína. Por lo tanto, es posible que:

- i. En los hepatocitos de cultivo primario de 1 día, el TGF- β pueda favorecer un mayor tiempo de vida media del RNAm de *Iqgap1*. Por ello, aunque la inducción del mensajero se da a tiempos cortos de estímulo, podemos observar que los niveles de la proteína aumentan y se mantienen estables al menos durante 1h después del tratamiento.
- ii. El TGF- β y el proceso de EMT podrían inducir una mayor estabilidad de la proteína IQGAP1 al evitar su degradación. Por lo tanto, será interesante evaluar si la abundancia de la proteína IQGAP1 requiere de la síntesis de *novo* o, si ocurren modificaciones post-traduccionales que estén favoreciendo una mayor estabilidad de la proteína.

En referencia al punto ii, se sabe que IQGAP1 es sumoilada con la adición de la proteína SUMO1 en el residuo K1445, esta modificación post-traducciona estabiliza a la proteína porque se reducen sus niveles de ubiquitinación. La relevancia biológica de este tipo de modificación post-traducciona en IQGAP1, radica en que se favorece el crecimiento celular, la migración y la tumorigénesis de células de carcinoma colorrectal (Liang et al., 2017). Tampoco hay que descartar que la regulación de la proteína IQGAP1 dependa de mecanismos indirectos en los que participen proteínas que son blancos de la vía del TGF- β . Por ejemplo, en el contexto de la fibrosis pulmonar, se ha establecido que IQGAP1 tiene un papel clave en la migración de fibroblastos activados por el CTGF (del inglés *Connective Tissue Growth Factor*). El CTGF, es un marcador de fibrosis que es activado transcripcionalmente por TGF- β (Bogatkevich, Ludwicka-Bradley, Singleton, Bethard, & Silver, 2008). Este grupo de trabajo muestra que los niveles de la proteína IQGAP1 aumentan de una manera dependiente de la concentración y del tiempo de exposición al factor CTGF.

Finalmente, se ha sugerido que la proteína IQGAP1 promueve el proceso de EMT en modelos de líneas celulares de cáncer de tiroides y cáncer de endometrio (Dong et al., 2016; Su, Liu, & Song, 2017). Sin embargo, demostrar si el incremento en los niveles de IQGAP1 es una causa o una consecuencia del proceso de transdiferenciación en hepatocitos requiere mayores estudios.

X. CONCLUSIÓN

El proceso de transdiferenciación tipo EMT de los hepatocitos de rata en cultivo primario promueve una expresión diferencial de los niveles de las proteínas IQGAP, favoreciendo el incremento de IQGAP1 y la disminución de IQGAP2. Además, la citocina TGF- β puede regular positivamente el transcrito y la proteína de *Iqgap1* y parece regular de manera negativa los niveles del transcrito de *Iqgap2* en hepatocitos de rata que aún conservan características epiteliales. Dado que el TGF- β es uno de los reguladores del proceso de EMT, es posible que esté involucrado en el incremento de la proteína IQGAP1 durante el desarrollo de patologías como el cáncer de hígado y la fibrosis.

XI. PERSPECTIVAS

- Analizar cuáles son los complejos transcripcionales que están involucrados en la regulación del gen *Iqgap1*.
 - Realizar ensayos de gen reportero en las líneas celulares HepG2 y C9 y determinar si *Iqgap1* es un gen responsivo a TGF- β .
 - Realizar ensayos de ChIP (inmunoprecipitación de la cromatina) y determinar cuál es el complejo de Smad que induce la activación del gen *Iqgap1*.
- Estudiar los mecanismos moleculares por los cuales la isoforma IQGAP2 es menos abundante en hepatocitos transdiferenciados.
- Caracterizar la región promotora del gen *Iqgap2* y determinar la presencia de sitios de unión a las Smad.
- Determinar cuál es el papel funcional de las proteínas IQGAP1 e IQGAP2 durante el proceso de transdiferenciación que llevan a cabo los hepatocitos de rata.

XII. REFERENCIAS

- Bataller, R., & Brenner, D. (2005). Liver fibrosis. *The Journal of Clinical Investigation*, *115*(2), 209–218. <https://doi.org/10.1172/JCI200524282>.The
- Bogatkevich, G. S., Ludwicka-Bradley, A., Singleton, C. B., Bethard, J. R., & Silver, R. M. (2008). Proteomic analysis of CTGF-activated lung fibroblasts: identification of IQGAP1 as a key player in lung fibroblast migration. *AJP: Lung Cellular and Molecular Physiology*, *295*(4), L603–L611. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00530.2007>
- Briggs, M. W., & Sacks, D. B. (2003). IQGAP1 as signal integrator: Ca²⁺, calmodulin, Cdc42 and the cytoskeleton. *FEBS Letters*, *542*(1–3), 7–11. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(03\)00333-8](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(03)00333-8)
- Brill, S., Li, S., Lyman, C. W., Church, D. M., Wasmuth, J. J., Weissbach, L., ... Snijders, A. J. (1996). The Ras GTPase-activating-protein-related human protein IQGAP2 harbors a potential actin binding domain and interacts with calmodulin and Rho family GTPases. *Molecular and Cellular Biology*, *16*(9), 4869–78. <https://doi.org/10.1128/MCB.16.9.4869>
- Briones-Orta, M. A., Sosa-Garrocho, M., Moreno-Alvarez, P., Fonseca-Sánchez, M. A., & Macías-Silva, M. (2006). SnoN co-repressor binds and represses smad7 gene promoter. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *341*(3), 889–894. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.01.041>
- Brisac, C., Salloum, S., Yang, V., Schaefer, E. A. K., Holmes, J. A., Chevaliez, S., ... Chung, R. T. (2016). IQGAP2 is a novel interferon-alpha antiviral effector gene acting non-conventionally through the NF-κB pathway. *Journal of Hepatology*, *65*(5), 972–979. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2016.06.028>
- Brown, M. D., & Sacks, D. B. (2006). IQGAP1 in cellular signaling: bridging the GAP. *Trends in Cell Biology*, *16*(5), 242–249. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2006.03.002>
- Caligaris, C., Vázquez-Victorio, G., Sosa-Garrocho, M., Ríos-López, D. G., Marín-Hernández, A., & Macías-Silva, M. (2015). Actin-cytoskeleton polymerization differentially controls the stability of Ski and SnoN co-repressors in normal but not in transformed hepatocytes. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, *1850*(9), 1832–1841. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2015.05.012>
- Chen, F., Zhu, H.-H., Zhou, L.-F., Wu, S.-S., Wang, J., & Chen, Z. (2010). IQGAP1 is

- overexpressed in hepatocellular carcinoma and promotes cell proliferation by Akt activation. *Experimental and Molecular Medicine*, 42(7), 477. <https://doi.org/10.3858/emm.2010.42.7.049>
- Chiariello, C. S., LaComb, J. F., Bahou, W. F., & Schmidt, V. A. (2012). Ablation of Iqgap2 protects from diet-induced hepatic steatosis due to impaired fatty acid uptake. *Regulatory Peptides*, 173(1–3), 36–46. <https://doi.org/10.1016/j.regpep.2011.09.003>
- Choi, S. S., & Diehl, A. M. (2009). Epithelial-to-mesenchymal transitions in the liver. *Hepatology*, 50(6), 2007–2013. <https://doi.org/10.1002/hep.23196>
- Chu, A. S., Diaz, R., Hui, J. J., Yanger, K., Zong, Y., Alpini, G., ... Wells, R. G. (2011). Lineage tracing demonstrates no evidence of cholangiocyte epithelial-to-mesenchymal transition in murine models of hepatic fibrosis. *Hepatology*, 53(5), 1685–1695. <https://doi.org/10.1002/hep.24206>
- Cicchini, C., Amicone, L., Alonzi, T., Marchetti, A., Mancone, C., & Tripodi, M. (2015). Molecular mechanisms controlling the phenotype and the EMT/MET dynamics of hepatocyte. *Liver International*, 35(2), 302–310. <https://doi.org/10.1111/liv.12577>
- Coulouarn, C., Factor, V. M., & Thorgeirsson, S. S. (2008). Transforming growth factor- β gene expression signature in mouse hepatocytes predicts clinical outcome in human cancer. *Hepatology*, 47(6), 2059–2067. <https://doi.org/10.1002/hep.22283>
- Derynck, R., & Zhang, Y. E. (2003). Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF- β 4. <https://doi.org/10.1038/nature02006>
- Dong, C., Li, Z., Alvarez, R., Feng, X. H., & Goldschmidt-Clermont, P. J. (2000). Microtubule binding to Smads may regulate TGF beta activity. *Molecular Cell*, 5(1), 27–34. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(00\)80400-1](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(00)80400-1)
- Dong, P.-X., Jia, N., Xu, Z.-J., Liu, Y.-T., Li, D.-J., & Feng, Y.-J. (2008). Silencing of IQGAP1 by shRNA inhibits the invasion of ovarian carcinoma HO-8910PM cells in vitro. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research : CR*, 27, 77. <https://doi.org/10.1186/1756-9966-27-77>
- Dong, P., Ihira, K., Xiong, Y., Watari, H., Hanley, S. J. B., Yamada, T., ... Sakuragi, T. (2016). Reactivation of epigenetically silenced miR-124 reverses the epithelial-to-mesenchymal transition and inhibits invasion in endometrial cancer cells via the direct repression of IQGAP1 expression. *Oncotarget*, 7(15).

[https://doi.org/http://www.impactjournals.com/oncotarget/index.php?journal=oncotarget&page=article&op=view&path\[\]=7754&pubmed-linkout=1](https://doi.org/http://www.impactjournals.com/oncotarget/index.php?journal=oncotarget&page=article&op=view&path[]=7754&pubmed-linkout=1)

- Dooley, S., & Ten Dijke, P. (2012). TGF- β in progression of liver disease. *Cell and Tissue Research*, 347(1), 245–256. <https://doi.org/10.1007/s00441-011-1246-y>
- Fabregat, I., Moreno-Càceres, J., Sánchez, A., Dooley, S., Dewidar, B., Giannelli, G., & ten Dijke, P. (2016). TGF- β signalling and liver disease. *FEBS Journal*, 2219–2232. <https://doi.org/10.1111/febs.13665>
- Ghaleb, A. M., Bialkowska, A. B., Snider, A. J., Gnatenko, D. V., Hannun, Y. A., Yang, V. W., & Schmidt, V. A. (2015). IQ motif-containing GTPase-activating protein 2 (IQGAP2) is a novel regulator of colonic inflammation in mice. *PLoS ONE*, 10(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0129314>
- Godoy, P., Hengstler, J. G., Ilkavets, I., Meyer, C., Bachmann, A., Müller, A., ... Dooley, S. (2009). Extracellular matrix modulates sensitivity of hepatocytes to fibroblastoid dedifferentiation and transforming growth factor β -induced apoptosis. *Hepatology*, 49(6), 2031–2043. <https://doi.org/10.1002/hep.22880>
- Good, M. C., Zalatan, J. G., & Lim, W. A. (2012). Scaffold Proteins : Hubs for Controlling the Flow of Cellular Information, 680(2011), 680–687. <https://doi.org/10.1126/science.1198701>
- Gressner, O. A., Rizk, M. S., Kovalenko, E., Weiskirchen, R., & Gressner, A. M. (2008). Changing the pathogenetic roadmap of liver fibrosis? Where did it start; Where will it go? *Journal of Gastroenterology and Hepatology (Australia)*, 23(7 PT1), 1024–1035. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1746.2008.05345.x>
- Gu, X., Huang, D., Ci, L., Shi, J., Zhang, M., Yang, H., ... Fei, J. (2017). Fate tracing of hepatocytes in mouse liver. *Scientific Reports*, 7(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-15973-7>
- Hedman, A. C., Smith, J. M., & Sacks, D. B. (2015). The biology of IQGAP proteins: beyond the cytoskeleton. *EMBO Reports*, 16(4), 427–446. <https://doi.org/10.15252/embr.201439834>
- Itoh, S., Itoh, F., Goumans, A., & Dijke, P. (2000). Signaling of transforming growth factor- β family members through Smad proteins, 6967, 6954–6967.
- Jadeski, L., Mataraza, J. M., Jeong, H. W., Li, Z., & Sacks, D. B. (2008). IQGAP1 stimulates proliferation and enhances tumorigenesis of human breast epithelial cells. *Journal of Biological Chemistry*, 283(2), 1008–1017. <https://doi.org/10.1074/jbc.M708466200>

- Jameson, K. L., Mazur, P. K., Zehnder, A. M., Zhang, J., Zarnegar, B., Sage, J., & Khavari, P. A. (2013). IQGAP1 scaffold-kinase interaction blockade selectively targets RAS-MAP kinase-driven tumors. *Nature Medicine*, *19*(5), 626–630. <https://doi.org/10.1038/nm.3165>
- Johnson, M., Sharma, M., Brocardo, M. G., & Henderson, B. R. (2011). IQGAP1 translocates to the nucleus in early S-phase and contributes to cell cycle progression after DNA replication arrest. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, *43*(1), 65–73. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2010.09.014>
- Kaimori, A., Potter, J., Kaimori, J., Wang, C., Mezey, E., & Koteish, A. (2007). Transforming Growth Factor- β 1 Induces an Epithelial-to-Mesenchymal Transition State in Mouse Hepatocytes *in Vitro*. *Journal of Biological Chemistry*, *282*(30), 22089–22101. <https://doi.org/10.1074/jbc.M700998200>
- Kalluri, R., & Weinberg, R. a. (2009). Review series The basics of epithelial-mesenchymal transition. *Journal of Clinical Investigation*, *119*(6), 1420–1428. <https://doi.org/10.1172/JCI39104.1420>
- Kang, J. S., Liu, C., & Derynck, R. (2009). New regulatory mechanisms of TGF- β receptor function. *Trends in Cell Biology*, *19*(8), 385–394. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2009.05.008>
- Katsuno, Y., Lamouille, S., & Derynck, R. (2013). TGF- β signaling and epithelial-mesenchymal transition in cancer progression. *Current Opinion in Oncology*, *25*(1), 76–84. <https://doi.org/10.1097/CCO.0b013e32835b6371>
- Keeton, M. R., Curriden, S. a, van Zonneveld, a J., & Loskutoff, D. J. (1991). Identification of regulatory sequences in the type 1 plasminogen activator inhibitor gene responsive to transforming growth factor beta. *The Journal of Biological Chemistry*, *266*(34), 23048–52. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1744101>
- Kumar, D., Hassan, M. K., Pattnaik, N., Mohapatra, N., & Dixit, M. (2017). Reduced expression of IQGAP2 and higher expression of IQGAP3 correlates with poor prognosis in cancers. *PLoS ONE*, *12*(10), 1–23. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0186977>
- Labbé, E., Silvestri, C., Hoodless, P. a, Wrana, J. L., & Attisano, L. (1998). Smad2 and Smad3 positively and negatively regulate TGF beta-dependent transcription through the forkhead DNA-binding protein FAST2. *Molecular Cell*, *2*(1), 109–120. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(00\)80119-7](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(00)80119-7)
- Liang, Z., Yang, Y., He, Y., Yang, P., Wang, X., He, G., ... Liang, S. (2017). SUMOylation of

- IQGAP1 promotes the development of colorectal cancer. *Cancer Letters*, 411, 90–99. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2017.09.046>
- Liu, C., Billadeau, D. D., Abdelhakim, H., Leof, E., Kaibuchi, K., Bernabeu, C., ... Kang, N. (2013). IQGAP1 suppresses T β RII-mediated myofibroblastic activation and metastatic growth in liver. *Journal of Clinical Investigation*, 123(3), 1138–1156. <https://doi.org/10.1172/JCI63836>
- Macias, M. J., Martin-Malpartida, P., & Massagué, J. (2015). Structural determinants of Smad function in TGF- β signaling. *Trends in Biochemical Sciences*, 40(6), 296–308. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2015.03.012>
- Massagué, J. (1998). Tgf- B Signal Transduction.
- Massagué, J. (2012). TGF β signalling in context. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 13(10), 616–630. <https://doi.org/10.1038/nrm3434>
- Massagué, J., & Gomis, R. R. (2006). The logic of TGF β signaling. *FEBS Letters*, 580(12), 2811–2820. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2006.04.033>
- Massagué, J., Seoane, J., & Wotton, D. (2005). Smad transcription factors Smad transcription factors. *Genes & Development*, 19, 2783–2810. <https://doi.org/10.1101/gad.1350705>
- Matsuzaki, K. (2013). Smad phospho-isoforms direct context-dependent TGF-?? signaling. *Cytokine and Growth Factor Reviews*, 24(4), 385–399. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2013.06.002>
- Meindl-Beinker, N. M., & Dooley, S. (2008). Transforming growth factor- β and hepatocyte transdifferentiation in liver fibrogenesis. *Journal of Gastroenterology and Hepatology (Australia)*, 23(SUPPL. 1). <https://doi.org/10.1111/j.1440-1746.2007.05297.x>
- Meindl-Beinker, N. M., Matsuzaki, K., & Dooley, S. (2012). TGF- β signaling in onset and progression of hepatocellular carcinoma. *Digestive Diseases*, 30(5), 514–523. <https://doi.org/10.1159/000341704>
- Meng, X. M., Tang, P. M. K., Li, J., & Lan, H. Y. (2015). TGF- β /Smad signaling in renal fibrosis. *Frontiers in Physiology*, 6(MAR), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fphys.2015.00082>
- Meyer, C., Liebe, R., Breitkopf-Heinlein, K., Liu, Y., Müller, A., Rakoczy, P., ... Dooley, S. (2015). Hepatocyte fate upon TGF- β challenge is determined by the matrix environment. *Differentiation*, 89(5), 105–116. <https://doi.org/10.1016/j.diff.2015.04.001>
- Moustakas, A., & Heldin, C.-H. (2016). *Mechanisms of TGF β -Induced Epithelial–Mesenchymal*

- Transition. Journal of Clinical Medicine* (Vol. 5). <https://doi.org/10.3390/jcm5070063>
- Nalluri, S. M., O'Connor, J. W., & Gomez, E. W. (2015). Cytoskeletal signaling in TGF β -induced epithelial-mesenchymal transition. *Cytoskeleton*, 72(11), 557–569. <https://doi.org/10.1002/cm.21263>
- Nitta, T., Kim, J. S., Mohuczy, D., & Behrns, K. E. (2008). Murine cirrhosis induces hepatocyte epithelial mesenchymal transition and alterations in survival signaling pathways. *Hepatology*, 48(3), 909–919. <https://doi.org/10.1002/hep.22397>
- Owen, D., Campbell, L. J., Littlefield, K., Evetts, K. A., Li, Z., Sacks, D. B., ... Mott, H. R. (2008). The IQGAP1-Rac1 and IQGAP1-Cdc42 interactions: Interfaces differ between the complexes. *Journal of Biological Chemistry*, 283(3), 1692–1704. <https://doi.org/10.1074/jbc.M707257200>
- Roy, M., Li, Z., & Sacks, D. B. (2004). IQGAP1 Binds ERK2 and Modulates Its Activity. *Journal of Biological Chemistry*, 279(17), 17329–17337. <https://doi.org/10.1074/jbc.M308405200>
- Runyan, C. E., Hayashida, T., Hubchak, S., Curley, J. F., & Schnaper, H. W. (2009). Role of SARA (SMAD anchor for receptor activation) in maintenance of epithelial cell phenotype. *Journal of Biological Chemistry*, 284(37), 25181–25189. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.032847>
- Russell, J. O., & Monga, S. P. (2017). Wnt/ β -Catenin Signaling in Liver Development, Homeostasis, and Pathobiology. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis*, 9(November), 1–28. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-020117>
- Satelli, A., & Li, S. (2011). Vimentin in cancer and its potential as a molecular target for cancer therapy. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 68(18), 3033–3046. <https://doi.org/10.1007/s00018-011-0735-1>
- Sayed-yahosseini, S., Li, Z., Hedman, A. C., Morgan, C. J., & Sacks, D. B. (2016). IQGAP1 Binds to Yes-associated Protein (YAP) and Modulates Its Transcriptional Activity. *Journal of Biological Chemistry*, 291(37), 19261–19273. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.732529>
- Schmidt, V. A., Chiariello, C. S., Capilla, E., Miller, F., & Bahou, W. F. (2008). Development of hepatocellular carcinoma in Iqgap2-deficient mice is IQGAP1 dependent. *Molecular and Cellular Biology*, 28(5), 1489–502. <https://doi.org/10.1128/MCB.01090-07>
- Shi, Y., & Massagué, J. (2003). Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the

- nucleus. *Cell*, 113(6), 685–700. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00432-X](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00432-X)
- Siegel, P. M., & Massagué, J. (2003). Cytostatic and apoptotic actions of TGF- β in homeostasis and cancer. *Nature Reviews Cancer*, 3(11), 807–820. <https://doi.org/10.1038/nrc1208>
- Smith, J. M., Hedman, A. C., & Sacks, D. B. (2015). IQGAPs choreograph cellular signaling from the membrane to the nucleus. *Trends in Cell Biology*, 25(3), 171–184. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2014.12.005>
- Stanger, B. Z. (2015). Cellular Homeostasis and Repair in the Mammalian Liver. *Annual Review of Physiology*, 77(1), 179–200. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-021113-170255>
- Su, D., Liu, Y., & Song, T. (2017). Knockdown of IQGAP1 inhibits proliferation and epithelial – mesenchymal transition by Wnt / β -catenin pathway in thyroid cancer, 1549–1559. <https://doi.org/10.2147/OTT.S128564>
- Swart-Mataraza, J. M., Li, Z., & Sacks, D. B. (2002). IQGAP1 is a component of Cdc42 signaling to the cytoskeleton. *Journal of Biological Chemistry*, 277(27), 24753–24763. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111165200>
- Taura, K., Iwaisako, K., Hatano, E., & Uemoto, S. (2016). Controversies over the Epithelial-to-Mesenchymal Transition in Liver Fibrosis. *Journal of Clinical Medicine*, 5(1), 9. <https://doi.org/10.3390/jcm5010009>
- Taura, K., Miura, K., Iwaisako, K., Ö Sterreicher, C. H., Kodama, Y., Penz-Ö Sterreicher, M., & Brenner, D. A. (2010). Hepatocytes do not undergo epithelial-mesenchymal transition in liver fibrosis in mice. *Hepatology*, 51(3), 1027–1036. <https://doi.org/10.1002/hep.23368>
- Tavares Cornejo, M. de J. (2015). *La citocina TGF-beta regula positivamente la expresión del gen IQGAP1*. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Tecalco-Cruz, A. C., Sosa-Garrocho, M., Vázquez-Victorio, G., Ortiz-García, L., Domínguez-Hüttinger, E., & Macías-Silva, M. (2012). Transforming growth factor- β /SMAD target gene SKIL is negatively regulated by the transcriptional cofactor complex SNON-SMAD4. *Journal of Biological Chemistry*, 287(32), 26764–26776. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.386599>
- Ten Dijke, P., & Hill, C. S. (2004). New insights into TGF- β -Smad signalling. *Trends in Biochemical Sciences*, 29(5), 265–273. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2004.03.008>
- Walton, K. L., Johnson, K. E., & Harrison, C. A. (2017). Targeting TGF- β mediated SMAD signaling for the prevention of fibrosis. *Frontiers in Pharmacology*, 8(JUL).

<https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00461>

- Weissbach, L., Settleman, J., Kalady, M. F., Snijders, A. J., Murthy, A. E., Yan, Y. X., & Bernards, A. (1994). Identification of a human RasGAP-related protein containing calmodulin-binding motifs. *Journal of Biological Chemistry*, *269*(32), 20517–20521.
- White, C. D., Brown, M. D., & Sacks, D. B. (2009). IQGAPs in cancer: A family of scaffold proteins underlying tumorigenesis. *FEBS Letters*, *583*(12), 1817–1824. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2009.05.007>
- White, C. D., Erdemir, H. H., & Sacks, D. B. (2012). IQGAP1 and its binding proteins control diverse biological functions. *Cellular Signalling*, *24*(4), 826–834. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2011.12.005>
- White, C. D., Khurana, H., Gnatenko, D. V., Li, Z., Odze, R. D., Sacks, D. B., & Schmidt, V. A. (2010). IQGAP1 and IQGAP2 are reciprocally altered in hepatocellular carcinoma. *BMC Gastroenterology*, *10*(1), 125. <https://doi.org/10.1186/1471-230X-10-125>
- Wrana, J. L. (2000). Regulation of Smad Activity. *Cell*, *100*(2), 189–192. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81556-1](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81556-1)
- Xia, F.-D., Wang, Z.-L., Chen, H.-X., Huang, Y., Li, J.-D., Wang, Z.-M., & Li, X.-Y. (2014). Differential expression of IQGAP1/2 in Hepatocellular carcinoma and its relationship with clinical outcomes. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention : APJCP*, *15*(12), 4951–6. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24998570>
- Xie, L., Law, B. K., Aakre, M. E., Edgerton, M., Shyr, Y., Bhowmick, N. A., & Moses, H. L. (2003). Transforming growth factor beta-regulated gene expression in a mouse mammary gland epithelial cell line. *Breast Cancer Research : BCR*, *5*(6), R187-98. <https://doi.org/10.1186/bcr640>
- Xie, Y., Yan, J., Cutz, J. C., Rybak, A. P., He, L., Wei, F., ... Tang, D. (2012). IQGAP2, A candidate tumour suppressor of prostate tumorigenesis. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, *1822*(6), 875–884. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2012.02.019>
- Yilmaz, M., & Christofori, G. (2009). EMT, the cytoskeleton, and cancer cell invasion. *Cancer and Metastasis Reviews*, *28*(1–2), 15–33. <https://doi.org/10.1007/s10555-008-9169-0>
- Yoshida, K., Murata, M., Yamaguchi, T., Matsuzaki, K., & Okazaki, K. (2016). Reversible Human TGF- β Signal Shifting between Tumor Suppression and Fibro-Carcinogenesis: Implications of Smad Phospho-Isoforms for Hepatic Epithelial-Mesenchymal Transitions.

- Journal of Clinical Medicine*, 5(1), 7. <https://doi.org/10.3390/jcm5010007>
- Zavadil, J., & Böttinger, E. P. (2005). TGF- β and epithelial-to-mesenchymal transitions. *Oncogene*, 24(37), 5764–5774. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1208927>
- Zeisberg, M., & Neilson, E. G. (2009). Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions. *Journal of Clinical Investigation*, 119(6), 1429–1437. <https://doi.org/10.1172/JCI36183>.protected
- Zeisberg, M., Yang, C., Martino, M., Duncan, M. B., Rieder, F., Tanjore, H., & Kalluri, R. (2007). Fibroblasts derive from hepatocytes in liver fibrosis via epithelial to mesenchymal transition. *Journal of Biological Chemistry*, 282(32), 23337–23347. <https://doi.org/10.1074/jbc.M700194200>
- Zeke, A., Lukács, M., Lim, W. A., & Reményi, A. (2009). Scaffolds: interaction platforms for cellular signalling circuits. *Trends in Cell Biology*, 19(8), 364–374. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2009.05.007>
- Zhang, Y. E. (2009). Non-Smad pathways in TGF- β signaling. *Cell Research*, 19(1), 128–139. <https://doi.org/10.1038/cr.2008.328>
- Zhao, Y., Zhu, R., & Sun, Y. (2016). Epithelial-mesenchymal transition in liver fibrosis (Review). *Biomedical Reports*, 269–274. <https://doi.org/10.3892/br.2016.578>

XIII. ANEXO.

I. Soluciones empleadas en el aislamiento y cultivo de hepatocitos.

Solución Krebs-Ringer.

Para 1 L en agua desionizada, adicionar los siguientes *reactivos:

NaCl 120 mM

KCl 4.75 mM

KH₂PO₄ 1.2 mM

MgCl₂ 1.2 mM

NaHCO₃ 24 Mm

Ajustar el pH a 7.4

Solución Krebs-Ringer con calcio. Adicionar solo a 0.3 L de la solución anterior:

CaCl₂ 1.27 mM

Mantener la solución con gaseo constante de O₂ y mantener la temperatura a 37°C.

*Se reporta la concentración final de cada reactivo en el volumen total de la solución.

Medio de attachment. Para 500 mL.

Medio DMEM/F12 pH 7.4	500 mL
BSA	100 mg
Hepes	1.5 mL
NaHCO ₃	255 mg
Galactosa	500 mg
Prolina	15 mg
Glutamina	10 mL
ITS	5 mL
SFB	50 mL
Penicilina/Estreptomicina 100X	5 mL
Gentamicina 50mg/ml	0.5 mL

Esterilizar por filtración y almacenar a 4°C.

Medio de feeding.

Incluye los mismos reactivos que el medio de attachment, excepto el SFB. Esterilizar por filtración y almacenar a 4°C.

Medio MEM (Minimum Essential Medium)

Disolver un sobre de medio MEM (Gibco) en 1 L de agua desionizada, adicionar 1.5g de bicarbonato de sodio y ajustar el pH a 7.4. Esterilizar por filtración y almacenar a 4°C. Adicionar 10 mL de Piruvato de Sodio 100 mM (Gibco).

Medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)

Disolver un sobre de medio DMEM (Gibco) en 1 L de agua desionizada, adicionar 1.5g de bicarbonato de sodio y ajustar el pH a 7.4. Esterilizar por filtración y almacenar a 4°C. Adicionar 10 mL de L-Glutamina 200 mM (Gibco).

II. Soluciones empleadas en la lisis celular.

PBS 1x

137 mM NaCl

2.7 mM KCl

10 mM Na₂HPO₄

1.8 mM KH₂PO₄

Buffer de lisis RIPA

50 mM Tris-HCl

150 mM NaCl

1 mM EDTA

1% Nonidet P-40

0.5% Desoxicolato de sodio

0.1% SDS

Inhibidores de fosfatasa y proteasas. Concentración final en el buffer de lisis.

NaF	25 Mm
NaPPi	1 Mm
NaVO ₄	1 Mm
PMSF	1 Mm
Inhibidor de tripsina	0.1 mg/mL
Pepstatina	0.1 mg/mL
Leupeptina	0.1 mg/mL
Benzamidina	0.1 mg/mL
β-glicerofosfato	0.1 mg/mL

III. Soluciones para realizar la electroforesis de proteínas.

Solución de Laemmli 2x

100 mM Tris pH 6.8

20% glicerol

2% SDS

0.05% Azul de bromofenol

100 mM DTT

Buffer de corrida

25 mM Tris base

190 mM glicina

0.1% SDS

Buffer de transferencia 1x

25 mM Tris base

190 mM glicina

20% metanol

Buffer de lavado: TBST 1x

20 mM Tris base

150 mM NaCl

0.1% Tween 20

Solución de bloqueo

5% leche en polvo descremada en buffer TBST 1x.

IV. Secuencias oligonucleótidos utilizados en la RT-PCR

Tabla 1. Secuencias de los oligonucleótidos en dirección 5'-3' utilizados en la reacción de PCR para amplificar los genes de interés.

Gen	Oligo Fw	Oligo Rw	Tamaño (pb)
<i>β actina</i>	GGTCTCAAACATGATCTGGG	GCTGCATAAACTCGTGGTCA	237
<i>Gapdh</i>	GGTGTGAACCACGAGAAATAT GAC	CTCCAGGCGGCATGTCAGATCCAC	351
<i>Iqgap1</i>	CAAAGGTGGATCAGATTCAAG	GGTGAGCATTATCACCCAGAA	636
<i>IQGAP1</i>	GTGAAATCATCAACACCCAC	TTCCTGGTATTTGTTCTTTGG	542
<i>Iqgap2</i>	CAGTCGCGCTATAAGAAATCTG GC	GCTGAAAGCTGGCATCTGTATCCC	303
<i>SnoN</i>	CTGCTGCGTCCCAGTCTA	TGAACTGCTCAGCATCTCCACCTC CAT	308
<i>Smad7</i>	GCCCTCTCTGGATATCTTCT	GCTGCATAAACTCGTGGTCA	319

V. Condiciones de los anticuerpos utilizados para detectar las proteínas de interés por inmunoblot e inmunofluorescencia.

Tabla 2. Anticuerpos primarios utilizados para la detección de las proteínas de interés mediante inmunoblot.

Anticuerpo	Marca	Dilución utilizada
anti β-actina	C4, Santa Cruz Biotechnology	1:2000
anti β-tubulina	Sigma Aldrich	1:2000
anti-HN4α	Sc-6556, Santa Cruz Biotechnology	1:1000
Anti-Albúmina	Sc-46293, Santa Cruz Biotechnology	1:1000
Anti-Vimentina	V-6630, Sigma Aldrich	1:1000
anti-IQGAP1	H-109, Santa Cruz Biotechnology	1:3000
anti-IQGAP1	C-9, Santa Cruz Biotechnology	1:1000

anti-IQGAP2	A-4, Santa Cruz Biotechnology	1:1000
anti-pSmad2C	3101, Cell Signaling	1:2000
anti-pSmad2L	3104S, Cell Signaling	1:2000
pERK1/2	9101S, Cell Signaling	1:2000

Tabla 3. Anticuerpos primarios utilizados para la detección de las proteínas de interés por inmunofluorescencia.

Anticuerpo	Marca	Dilución utilizada	Dilución Ab Secundario	Localización
Anti-HNF4 α	Sc-6556, Santa Cruz Biotechnology	1:200	1:500	Núcleo y citoplasma
Anti Albúmina	Sc-46293, Santa Cruz Biotechnology	1:150	1:500	Citoplasma
Anti Vimentina	v-6630, Sigma-Aldrich	1:100	1:500	Citoplasma, filamentos intermedios
Anti-IQGAP1	H-109, Santa Cruz Biotechnology	1:200	1:500	Membrana celular, citoplasma