Biblioteca Digital
F C E N - U B A

BIBLIOTECA CENTRAL LUIS F LELOIR
BIBLIOTECA CENTRAL LELOIR
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES UBA

Tesis de Posgrado

Mecanismos de señalización inducidos por el factor de crecimiento y transformación Beta 1 (TGF beta sub 1), en fibroblastos de ratón Swiss 3T3

Cadenas, María Belén

2000

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:
Cadenas, María Belén. (2000). Mecanismos de señalización inducidos por el factor de crecimiento y transformación Beta 1 (TGF beta sub 1), en fibroblastos de ratón Swiss 3T3. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3296_Cadenas.pdf

Cita tipo Chicago:
Cadenas, María Belén. "Mecanismos de señalización inducidos por el factor de crecimiento y transformación Beta 1 (TGF beta sub 1), en fibroblastos de ratón Swiss 3T3". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2000.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3296_Cadenas.pdf

EXACTAS UBA
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

UBA
Universidad de Buenos Aires

Dirección: Biblioteca Central Dr. Luis F. Leloir, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires.
Intendente Güiraldes 2160 - C1428EGA - Tel. (++54 +11) 4789-9293

Contacto: digital@bl.fcen.uba.ar

Universidad de Buenos Aires

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

"Mecanismos de Señalización Inducidos por el Factor de Crecimiento y Transformación Beta 1 ($TGF\beta_1$), en Fibroblastos de Ratón Swiss 3T3"

María Belén Cadenas

Director: Dr. Luis Jiménez de Asúa

Consejero: Dr. Luis Ielpi

Instituto de Investigaciones Bioquímicas

"Fundación Campomar"

№ 3 2 0 8

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires

2000

RESUMEN

"Mecanismos de Señalización Inducidos por el Factor de Crecimiento y Transformación Beta 1 ($TGF\beta_1$), en Fibroblastos de Ratón Swiss 3T3"

La superfamilia del TGFβ está formada por polipéptidos que regulan diferencialmente la división celular, en mamíferos. Dependiendo del tipo celular, el $TGF\beta_1$ puede inhibir, promover o potenciar la división celular. En monocapas confluentes y aquietadas de la línea celular Swiss 3T3, el $TGF\beta_1$ (0,5–2 ng/ml) no induce, ni inhibe la proliferación celular. Sin embargo, este factor es capaz de potenciar la proliferación inducida por la $PGF_{2\alpha}$ (300 ng/ml) [Gómez de Alzaga et al., 1994]. De las señales activadas por la $PGF_{2\alpha}$, se buscó cúales eran las más importantes en la sinergia con el $TGF\beta_1$. Se comenzó estudiando la quinasa C (PKC), a través de la retro-modulación con 12-tetradecanoilforbol 13-acetato (TPA, 800 nM, 96 hs.), o Briostatina 1 (100 nM, 96 hs.). En la condición de retro-modulación de la PKC, se observó que el $TGF\beta_1$ (1,0 ng/ml) era capaz de inducir la proliferación celular (50 % de células en fase S, después de 28 hs. de estimulación, y 50 % de aumento en el número de células, después de 48 hs. de estimulación), siendo ésta dependiente, tanto de la concentración del factor, como de la concentración de los compuestos que retro-modulan la PKC. En las células pretratadas con TPA, la fase G_1 tiene unas 6 a 7 horas más, que en las células sin pretratar. En la primer condición, el $TGF\beta_1$ induce la expresión de la ciclina D_1, y en correlación a la mayor duración de la fase G_1, ocurre horas más tarde después de la estimulación (10-12 hs.), comparado con las células sin pretratar, estimuladas con $PGF_{2\alpha}$ (6-9 hs.) [Sauane et al., 2000]. Fue interesante observar, que la $PGF_{2\alpha}$, induce la expresión de la ciclina D_1, en células pretratadas con TPA, aún cuando en esta condición no es mitogénica, y a pesar que la CDK4 se halle presente. Este resultado lleva a plantear que la expresión de la ciclina D_1, no necesariamente indica que la célula se dividirá, y además que es independiente de la PKC. Con el uso del anticuerpo monoclonal anti PKCα [Leach et al., 1988], se observó que esta enzima está ausente en el momento de agregado el $TGF\beta_1$, en células pretratadas con TPA. La inhibición directa de la PKC con el inhibidor específico GF 109203X (10 μM), agregado una hora antes a células sin pretratar, no fue suficiente para permitir que el $TGF\beta_1$ indujera la mitogénesis. El GF es capaz de inhibir parcialmente la sinergia entre el $TGF\beta_1$ y la $PGF_{2\alpha}$, mientras que inhibe totalmente la sinergia entre el $TGF\beta_1$ y el OAG, en células sin pretratar. Es decir que la PKC no es suficiente, pero sí necesaria en la primer sinergia, y sí muy importante en la última. El agregado de GF por períodos prolongados, no logra retro-modular la PKC. Los receptores del $TGF\beta_1$, detectados con el uso de anticuerpos, están presentes en ambas condiciones, y la medición del transporte de glucosa, inducido por este factor, pone en evidencia que la actividad de los mismos, no se ve alterada por el pretratamiento con TPA. El agregado de ácido okadaico (5 nM), junto al $TGF\beta_1$, en células sin pretratar, induce la síntesis de ADN (10 % de células en fase S), indicando la presencia de fosfatasas de ser/thr, pero no sería el único

impedimento, por el cual el $TGF\beta_1$ no es mitogénico en las células Swiss 3T3. En el estudio de las sinergias del $TGF\beta_1$ con insulina y PGE_1, se observó que, en células pretratadas con TPA, PGE_1 no induce la proliferación, ni potencia la inducción de esta última por el $TGF\beta_1$ solo o agregado con insulina. De estos resultados se concluye, que la PKC es necesaria para que la PGE_1 potencie la sinergia entre el $TGF\beta_1$ más insulina. La falta de potenciación entre el $TGF\beta_1$ y la PGE_1, podría indicar un camino de señalización en común. Inhibiendo la PKA con PKI, péptido inhibidor (1 nM), y también con el uso del inhibidor H-89 (1 nM), se encontró que la inhibición de esta enzima no altera la inducción de la proliferación por el $TGF\beta_1$, en células pretratadas con TPA. Con el uso del inhibidor genisteina (10 μM), se observó que las quinasas de tirosina están involucradas en la sinergia del $TGF\beta_1$ y la $PGF_{2\alpha}$, en ambas condiciones, y en la inducción de la proliferación por el $TGF\beta_1$, en células pretratadas con TPA. El uso de lovastatina (80 μM) y mevalonato (800 μM), puso en evidencia la importancia relativa de la isoprenilación de proteínas, en la sinergia entre el $TGF\beta_1$ y la $PGF_{2\alpha}$, en ambas condiciones. El $TGF\beta_1$ no activa la MAPK (ERK 1/2) en ninguna condición, ni potencia la actividad, ni la presencia de la misma, en la sinergia con la $PGF_{2\alpha}$. La actividad de esta enzima se midió, a través de la inmunoprecipitación y fosforilación de la mielina básica, y con el anticuerpo anti ERK 1/2, bifosforilado (forma activa). El $TGF\beta_1$ induce la translocación de la Smad4 (medida por inmunoflourescencia, con anticuerpo anti Smad4), en ambas condiciones, y ésta no se ve alterada en las sinergias de este factor y la $PGF_{2\alpha}$. En conclusión, el $TGF\beta_1$ induce la proliferación celular en células Swiss 3T3, que han sido pretratadas con compuestos capaces de retro-modular la PKC, es decir, primero activada y luego degradada. La inducción de la ciclina D_1, debe ocurrir por una vía alternativa a ERK 1 y 2. El pretratamiento con TPA lleva a las células a una fase G_0 diferente de la misma fase en la que se encuentran las células confluentes y aquietadas, sin pretratar. El $TGF\beta_1$ activa las moléculas señalizantes específicas de su camino de señalización, y éstas deben interaccionar con factores de transcripción u otros compuestos, que surgen por el pretratamiento con TPA, haciendo que la fase G_1 sea más larga, tiempo en el cual se sintetizan y/o modifican compuestos necesarios para inducir la proliferación celular.

Palabras claves: $TGF\beta_1$, PKC, TPA, ciclo celular, mecanismos de señalización, $PGF_{2\alpha}$, Swiss 3T3.

SUMMARY

"Signalling Mechanisms Induced by Transforming Growth Factor Beta 1 ($TGF\beta_1$), in Swiss 3T3 Fibroblasts"

TGFβ is a superfamily of polypeptides that can differencially regulate mammalian cell division. Depending upon $TGF\beta_1$ interaction with various cell types, its action can cause inhibition, promotion , as well as potentiation of cell division. In confluent resting Swiss 3T3 cells, $TGF\beta_1$ (0,5-2 ng/ml) neither not induce, nor inhibits cellular proliferation. However, this factor enhances $PGF_{2\alpha}$ (300 ng/ml) proliferative response, in this cell type [Gómez de Alzaga et al., 1994]. Of $PGF_{2\alpha}$-induced signalling activities, our endeavour was focused in to those involved in the synergy with $TGF\beta_1$. The first activity studied was protein kinase C (PKC), through it's "down-modulation" either with the phorbol ester, 12-tetradecanoylphorbol 13-acetate (TPA, 800 nM, 96 hs), or Bryostatin 1 (100 nM, 96 hs). In PKC "down-modulated" cells, $TGF\beta_1$ can induce entry in S phase (50 % of cells in S phase, after 28 hs of stimulation, and 50 % more cells, upon 48 hs of stimulation), being dependent upon factor concentration, as well as on PKC-"down-modulating" compounds concentration. In TPA-treated cells, the G_1 phase is of 6 to 7 hs more, than cells without treatment. In the first condition, $TGF\beta_1$ induced cyclin D_1 expression, and in correlation with the G_1 phase extension time, this expression occurs hours latter after stimulation (10-12 hs), compared with cells without treatment, stimulated with $PGF_{2\alpha}$ (6-9 hs) [Sauane et al., 2000]. It was interesting to observe that $PGF_{2\alpha}$ induced cyclin D_1 expression in TPA-treated cells, eventhough in this condition failed to induce mitogenesis, and even with CDK4 presence. This results implie that cyclin D_1 expression, does not necessarily indicate that cells are going to divide, and that such event is independent of PKC activity. Using monoclonal antibody anti PKCα [Leach et al., 1988], we reveal that this enzyme is absent upon $TGF\beta_1$ addition, in TPA-treated cells. PKC direct inhibition with GF 109203X (10 μM), PKC-specific inhibitor, added 1 hour prior to cells without treatment, was not enough to allow $TGF\beta_1$ induce mitogenesis. GF inhibited parcially the synergy between $TGF\beta_1$ and $PGF_{2\alpha}$, and prevent totally the action between $TGF\beta_1$ and OAG, in cells without treatment. Thus, PKC is not sufficient, but yet necessary in the first synergy, and important in the last one. GF added for long periods of time, is not capable of down-modulates PKC. $TGF\beta_1$ receptors, detected by antibodies, are present in both conditions, and glucose transport measurements, induced by this factor, puts in evidence, that receptor activities are not altered by TPA treatment. Okadaic acid (5 nM) added with $TGF\beta_1$, in cells without treatment, induce DNA synthesis (10 % of cells in S phase), indicating the existence of ser/thr phosphatases. However, this would not be the only retrain for $TGF\beta_1$ to induce mitogenesis in Swiss 3T3 cells. In the synergies study between $TGF\beta_1$, insulin and PGE_1, it was observed that in TPA-treated cells, PGE_1 neither induce proliferation, nor enhances $TGF\beta_1$ action, added without or with insulin. From this findings we conclude that PKC is necessary for

PGE_1 to enhance the synergy between $TGF\beta_1$ and insulin. The lack of synergy between PGE_1 and $TGF\beta_1$, may indicate that they share common signalling pathways. PKA inhibited using PKI (1 nM), peptide inhibitor, and H-89 (1 nM) inhibitor, reveal that this activity is not involved in $TGF\beta_1$-induced proliferation, in TPA-treated cells. The use of inhibitor Genistein (10 μM), enable to show that tirosine kinases activities might be involved in the synergy between $TGF\beta_1$ and $PGF_{2\alpha}$, in both conditions, as well as for the $TGF\beta_1$-induced proliferation in TPA-treated cells. Using lovastatin (80 μM) and mevalonate (800 μM), indicated the relative importance of protein isoprenylation in the synergy between $TGF\beta_1$ and $PGF_{2\alpha}$, under both conditions. $TGF\beta_1$ did not activate MAPK (ERK1/2) in any condition, nor enhanced it´s activity or presence in the synergy between $PGF_{2\alpha}$. MAPK activity measured by immunoprecipitation and phosphorylation of myelin basic protein, as well as by immunodetection with antibody anti ERK 1/2 biphosphorylated (active form). Thus, this results indicated that MAPK activity was induced only by $PGF_{2\alpha}$, and was not altered by $TGF\beta_1$ addition. Smad4 translocation induced specifically by $TGF\beta_1$ (measured by immunofluorescence with antibody anti Smad4), in both conditions, is not altered in the synergy with $PGF_{2\alpha}$. We conclude that $TGF\beta_1$ induces proliferation in Swiss 3T3 cells, whose PKC had been "down-modulated" by specific compounds, thus, first activated and then degraded. Cyclin D_1 induction by $TGF\beta_1$ may occurs via an alternative mechanisms to ERK 1/2 action. TPA treatment leave the cells in a different G_0 state, compared with the same state in which confluent and resting Swiss 3T3 cells are. $TGF\beta_1$ activated its specific signalling molecules, and this ones may interact with transncription factors or other compounds, which appeared by TPA treatment, thus lengthening G_1 phase duration, required for the synthetisis and/or modification of compounds necessaries to induce cellular multiplication.

Key words: $TGF\beta_1$, PKC, TPA, cell cycle, signalling mechanisms, $PGF_{2\alpha}$, Swiss 3T3.

a mis padres,

a mis hermanos,

a mis ahijados,

a mis sobrinos,

a mis amigos

INDICE

INTRODUCCION 1

INTRODUCCION GENERAL 2
CICLO CELULAR 3
REGULACION DEL INICIO DEL CICLO CELULAR 6
CAMINOS DE SEÑALIZACION INTRACELULAR EN LA PROLIFERACION 11
Quinasa C (PKC) 19
FACTORES DE CRECIMIENTO 26
PROSTAGLANDINA F 2 ALFA ($PGF_{2\alpha}$) 27
EL FACTOR DE CRECIMIENTO Y TRANSFORMACION BETA ($TGF\beta_1$) 29
MODELO EXPERIMENTAL 37

OBJETIVOS 38

ANTECEDENTES DEL TRABAJO DE TESIS 39
OBJETIVOS DE LA TESIS 40

RESULTADOS Y CONCLUSIONES 42

1-Estimulación de la Síntesis de ADN Inducida por el $TGF\beta_1$ 43
2-Condiciones de Pretratamiento con TPA 46
3-La Inducción de la Síntesis de ADN, es dependiente de la Concentración del $TGF\beta_1$ 48
4-Medición de la Fase G_1 y Entrada en la Fase S 48
5- Inducción de la Síntesis de la Ciclina D_1 52
6- Pretratamiento de la Línea Celular Swiss 3T3 con Briostatina 1 54
7- Reversibilidad del Pretratamiento con TPA y Briostatina 1 56
8- Retromodulación de la PKC 59
9- Inhibidores de la PKC 61
10- Activadores de la PKC 62
11- Receptores del $TGF\beta_1$ 66
12- Actividad de los Receptores del $TGF\beta_1$: Transporte de Glucosa 68
13- Sinergias entre el $TGF\beta_1$ y otros Factores u Hormonas 69
14- Mecanismos de Señalización 72
A) Inhibidores de la Activación de la Quinasa A 73
B) Inhibición de la Activación de las Quinasas en Tirosina 75
C) Estudio de la Quinasa Activada por Mitógenos (MAPK) 76
D) Activación de las Smads 82

SINTESIS Y DISCUSION 87

MATERIALES Y METODOS 98

A.1. Medios y Soluciones 99
A.2 Línea Celular 104
A.3. Medición de la Proliferación Celular: Síntesis de ADN y Número de Células. 107
A.4. Transporte de Glucosa. 108
A.5. Extracción de Proteínas. 109
A.6. Cuantificación de Proteínas. 110

A.7. Electroforesis de Proteínas y Transferencia a Membrana de Nitrocelulosa (Técnica de "Western Blot"). 111
A.8. Inmunodetección de Proteínas Transferidas a Membranas de Nitrocelulosa. 111
A.9. Ensayo de Actividad de MAPK. 112
A.10. Detección por Inmunofluorescencia de Smad4. 112

APENDICE 114

ABREVIATURAS 115
FORMULAS 120

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS 122

AGRADECIMIENTOS 137

INTRODUCCION

INTRODUCCION GENERAL

Cuando una célula prolifera debe coordinar la replicación del ADN y la separación de los cromosomas, asegurando la duplicación completa del genoma y la segregación correcta de la clase y número adecuado de los cromosomas para cada célula hija. Es por esta razón, que la proliferación celular es un fenómeno que se encuentra regulado y coordinado por mecanismos de alta complejidad. El esclarecimiento de los mecanismos que controlan la proliferación, resulta del estudio del ciclo celular. Identificar los eventos básicos que regulan dicho ciclo, no sólo es de vital importancia para comprender los mecanismos de la reproducción de los organismos, sino también para poder ahondar en el conocimiento de los procesos fisiológicos tales como la regeneración de órganos, la cicatrización de tejidos, la inmunidad celular, y de otros procesos alterados como el cáncer.

A comienzos de 1900 los científicos ya habían descripto las grandes etapas del ciclo celular. Si bien, algunos detalles pueden variar en el ciclo, en las distintas especies, la duplicación del material genético y su separación en dos células hijas, son requerimientos universales. En términos generales, el ciclo celular puede describirse como una sucesión de fases denominadas G_1, S, G_2 y M, en función de la síntesis de ADN y de la condensación de cromosomas [Pardee, 1989]. La fase G_1, comprende el espacio de tiempo entre la separación de las células hijas de un ciclo anterior, hasta el comienzo de síntesis de ADN del ciclo que se inicia. Esta fase, se caracteriza por una intensa actividad bioquímica, en la que el tamaño de la célula se duplica, al igual que sus estructuras citoplasmáticas; es decir, es una etapa de crecimiento. Durante la fase S (S de síntesis), se lleva a cabo la duplicación del ADN nuclear y la síntesis de proteínas involucradas en la misma. En la fase G_2, se ensamblan las estructuras específicas y necesarias para la separación de los cromosomas en la fase M (M de mitosis). En esta última fase, los cromosomas se condesan, se separan y finalmente la célula se divide, dando origen a dos células hijas, con igual contenido genético [para más detalles ver Murray y Hunt, 1993].

Es interesante observar, cómo las células de un vertebrado adulto son miembros de una sociedad compleja, donde lo primordial es la supervivencia del organismo como un todo, y no la de cada célula individual. Es por esta razón, que algunas detienen su división, otras proliferan, e incluso otras toman la decisión de morir, aún cuando las condiciones nutricionales sean las adecuadas para la subsistencia. La gran mayoría de las células de un organismo multicelular, se encuentran en estado no proliferativo o de quiescencia (quietud ó detención en cuanto a la división celular), llamado G_0, aunque retienen la capacidad de entrar en el ciclo una vez estimuladas (con excepción de las neuronas y las células del musculo estriado). Cuando una célula completa la división se determina si continua en ciclo, muere, se diferencia ó si entra

nuevamente en fase G_0. El tiempo en el que las células permanecen en este último estado, depende del tipo celular y de las condiciones fisiológicas.

El control fisiológico del inicio de la proliferación, es externo y está ejercido por factores humorales producidos por células cercanas ó distantes, llamados usualmente "mitógenos" ó "factores de crecimiento", los que ejercen su acción a través de una secuencia ordenada de señales y eventos concatenados, que culminan en la replicación del ADN y en la división mitótica [Jiménez de Asúa *et al.*, 1979; Rozengurt, 1986]. Una vez iniciado el ciclo, ya en la fase G1 tardío, el proceso se independiza de los factores extracelulares y es regulado por controles intracelulares [Hartwell y Weinert, 1989; Murray y Kirschner, 1989]. Los factores externos, inducen el cambio de la maquinaria intracelular para pasar de G_0 a G_1. En cambio, las células tumorales son relativamente independientes de los factores extracelulares y su ciclo es más corto debido fundamentalmente, a una reducción de la fase G_1, donde muchas de las actividades necesarias para la división celular, ya se encuentran iniciadas.

CICLO CELULAR

El ciclo celular, como ya se mencionó, es el ciclo de eventos que ocurre en una célula durante su división. En sus comienzos, fue descripto en base a la observación microscópica y a la marcación de la síntesis *de novo* del ADN. Hoy en día, el estudio del ciclo celular, ha revelado que no sólo ocurre una duplicación del contenido nuclear, sino también del contenido citoplasmático, y que además existen expresiones cíclicas de diferentes proteínas y procesos dentro del ciclo celular, que pueden ser observados como ciclos en paralelo ó en serie. Es por esta razón, que un complejo grupo de procesos nucleares y citoplásmaticos, deben coordinarse durante el ciclo celular, para llevar a cabo la tarea de una correcta proliferación. Actualmente, la inquietud central, está enfocada en tratar de explicar cómo se realiza esta coordinación.

En los últimos años, los estudios del ciclo celular, revelaron que existe un sistema de control que coordina al ciclo como un todo. Las proteínas de este sistema de control, están conservadas a lo largo de la evolución; esto hace posible la transferencia de varias de estas proteínas de origen humano, a células de levadura. Por lo tanto, el sistema de control puede ser estudiado en una variedad de organismos eucariotas, y de esta manera se pueden usar los hallazgos obtenidos en todos ellos, para unificar el mecanismo de cómo una célula crece y se divide.

El sistema de control, coordina una serie de eventos claves del ciclo celular que aseguran una correcta división celular. Estos eventos son iniciados por una familia de quinasas de proteínas en serina/treonina (ser/thr) muy conservadas: las quinasas dependientes de ciclinas (CDKs)

[Meyerson et al., 1991; Pines y Hunter, 1991]. Los eventos claves ó el control de puntos específicos del ciclo celular, en el cual están implicadas las CDKs son los siguientes: la determinación de iniciar una única vuelta de replicación del ADN, la iniciación de la síntesis de ADN, y la iniciación de la mitosis; es decir, son necesarias para la progresión de las distintas fases del ciclo (figura N°1). Las CDKs para ser activadas deben unirse a sus subunidades regulatorias, una familia de proteínas llamadas ciclinas [Evans et al., 1983: Hunt, 1991]. Por esta razón, dicho ciclo puede ser visto como una sucesión de diferentes actividades ciclina-CDK. Los diferentes complejos ciclina-CDK, dirigen a la célula a través de la mayoría de los puntos de control del ciclo celular, y en mamíferos algunas CDKs tienen un rol más claramente definido que otras [Pines y Hunter, 1995]. La mayoría de las CDKs, están presentes en cantidades constantes y en exceso, con respecto a las ciclinas, a lo largo de todo el ciclo celular. Esto significa, que la actividad de las CDKs puede ser regulada a través del control de la cantidad de las ciclinas. El origen del nombre de las ciclinas, se debe a que los genes que las codifican, en mamíferos, se transcriben de manera dependiente del ciclo celular. Por lo tanto, dos puntos importantes de control en la regulación de las CDKs, está en la síntesis y la degradación de algunas ciclinas, en puntos específicos del ciclo celular [Morgan, 1995; Pines, 1995].

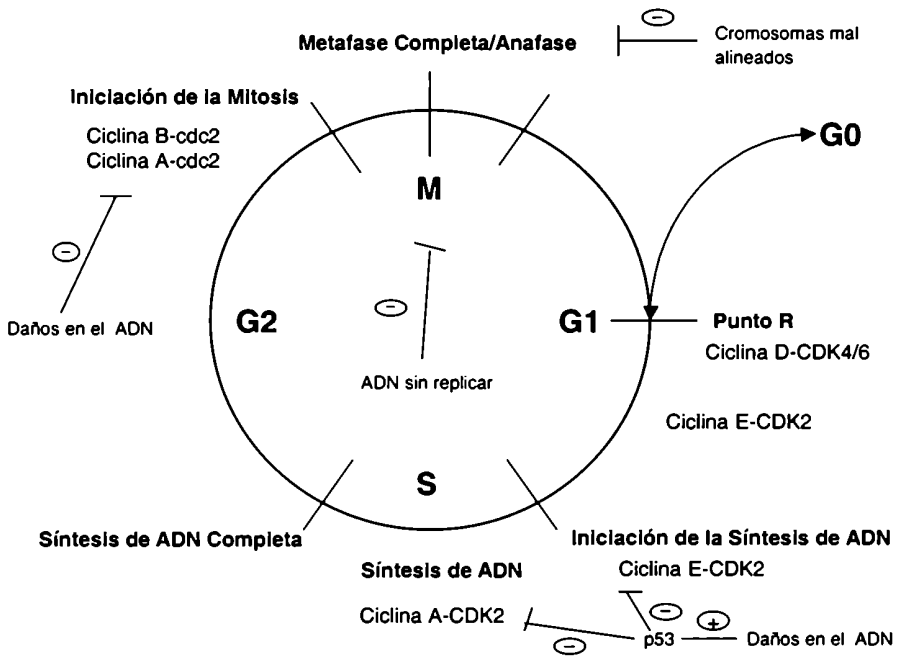


Figura N°1. Puntos de Control y Chequeo del Ciclo Celular. (Basado en Pines, 1995)

En forma general, se puede decir, que la actividad quinasa de todas las CDKs puede ser controlada de la misma manera: por la síntesis de ciclinas, unión a las ciclinas, proteólisis de ciclinas, fosforilación y desfosforilación del complejo por otras quinasas y fosfatasas, y por la unión de inhibidores [Morgan, 1995; Pines, 1995]. La gran variedad de maneras diferentes en que la actividad de las CDKs puede ser regulada, permite al ciclo celular responder, tanto a señales externas como a señales internas, generadas por eventos precedentes en el ciclo celular. Más aún, la proliferación descontrolada de algunas células cancerígenas, pueden adscribirse a defectos en la maquinaria ciclina-CDK.

La actividad total del complejo ciclina-CDK, es conferida por una quinasa de ser/thr, que fosforila a dicho complejo, y se llama actividad quinasa que activa el complejo ciclina-CDK (CAK) [Solomon et al., 1992]. Una de las actividades CAK purificada hasta el momento, es el complejo ciclina H-CDK7, cuya actividad aparece constante a lo largo del ciclo celular. Se encontró además, que este complejo forma parte a su vez, de un complejo mayor, que forma el factor de transcripción TFIIH [Feaver et al., 1994; Roy et al., 1994]. TFIIH es parte de la maquinaria basal de transcripción, y también es requerido para la reparación del ADN. Por lo tanto, el complejo ciclina H-CDK7 llevaría a cabo dos funciones en la célula, uniendo potencialmente la reparación del ADN y la transcripción, a otros eventos del ciclo celular [Poon y Hunter, 1995].

Entre los puntos de control del ciclo celular, se encuentran los llamados puntos de chequeo [Hartwell y Weinert, 1989], donde la célula es capaz de responder a las condiciones adversas, deteniendo el ciclo celular en dichos puntos. La detención del ciclo celular, está mediado por señales específicas, que activan los puntos de chequeo, los cuales en condiciones normales están en silencio, y casi siempre ocurre a través de la modulación específica de los complejos ciclina-CDK. Por ejemplo, el daño al ADN es capaz de detener las células después de la fase S y antes de la mitosis, de tal forma que ó bien el daño es reparado, ó la célula sufre apoptosis. Esto previene que las mutaciones en el ADN sean replicadas, y además que los daños en el ADN, interfieran con la separación de las cromátidas hermanas en la mitosis. Otro punto de chequeo importante, se activa cuando los cromosomas son alineados incorrectamente en metafase, causando la permanencia de las células en dicha fase, hasta que el error es corregido. Sin embargo, uno de los sellos característicos de las células cancerígenas es su inestabilidad genética, donde los cromosomas son frecuentemente rearreglados, ó aún perdidos cuando las células se dividen, y esto indica que algunos de los puntos de chequeos no deben operar en estas células, ya sea porque se pierden, ó son capaces de ignorar aquellos puntos de chequeos, que normalmente previenen a las células de llevar a cabo la mitosis, con cromosomas mal alineados ó no balanceados [Hartwell y Kastan, 1994]. Las bases moleculares para estos cambios se deben en parte, a diferencias en la regulación y composición de complejos ciclina-CDK.

La comprensión de los mecanismos que controlan el ciclo celular, continuan aumentando rápidamente. Con el avance de la identificación de los componentes del ciclo celular, que están desregulados en células transformadas, comparadas con las no transformadas, aparece la posibilidad de nuevos blancos para terapias anti cáncer.

REGULACION DEL INICIO DEL CICLO CELULAR

El interés principal de este estudio está centrado en el inicio de la proliferación celular y dado que la regulación de dicho inicio varía en células de mamíferos de acuerdo al tipo crecimiento, solo se hara incapié en el crecimiento celular que depende del anclaje a un sustrato [Assoian, 1997].

Las células en el estado G_0 difieren de las que están en G_1 en muchas propiedades [Baserga, 1985; Denhardt *et al.*, 1986; Cross *et al.*, 1989]. En G_0 las células tienen un tamaño menor debido a un metabolismo más lento en lo que se refiere a la biosíntesis de proteínas y ARN, a las actividades enzimáticas, al transporte a través de la membrana, y los ribosomas están en su mayoría como monosomas [Baserga, 1985; Denhardt *et al.*, 1986; Cross *et al.*, 1989]. Cuando las células de mamíferos y de levaduras se tornan quiescentes, aparecen algunos ARNs y proteínas nuevos [Schneider *et al.*, 1988; Verma *et al.*, 1988]. Una vez estimuladas, las células que están en G_0 requieren más tiempo para llegar a S, y en esta transición también hay diferencias en la expresión génica, con aquellas células que están en la transición G_1/S [Pardee, 1989; Almendral *et al.*, 1988; Bravo, 1990; Nathans, 1992]. Se ha establecido, que muchos genes, que son inducidos en células estimuladas por mitógenos, ó reprimidos cuando están en G_0, tales como c-myc y c-fos, no se encuentran regulados durante la progresión en el ciclo celular de células que proliferan asincrónicamente [Hann *et al.*, 1985; Bravo *et al.*, 1986]. La diferencia entre G_0 y G_1 es fundamental en la proliferación celular, ya que la velocidad de aumento de una población celular, es dependiente de la fracción de células que se encuentran en ciclo comparadas con aquellas que están todavía en G_0 [Pardee, 1989].

La limitación del crecimiento por remoción de nutrientes, factores de crecimiento ó inhibición de la síntesis proteica, usualmente causan detención en G_1. Estos resultados indicarían, que la coordinación del crecimiento con la división celular, se llevaría a cabo a través de eventos específicos en la fase G_1. Es por esta razón, que se considera a la fase G_1 como un período funcional, durante el cual la célula, una vez que ha recibido la señal externa, monitorea el ambiente y su propio crecimiento, para realizar un paso decisivo, en el cual se compromete a replicar el ADN y completar el ciclo de división [Polymenis y Schmidt, 1999]. Los puntos de control de la fase G_1, donde se toma la decisión para iniciar el ciclo celular, son los más

influenciados por situaciones extremas, y no sorprendentemente los componentes involucrados en la regulación de esta decisión son aquellos que están más estrechamente implicados con el cáncer.

El punto de la fase G_1 donde la célula toma distintas decisiones acerca de si se divide, diferencia, muere o permanece en G_0, se lo suele denominar "Punto de Restricción" (R), pero aquí se lo definirá como el punto después del cual, la célula no necesita estar expuesta al mitógeno y se compromete a completar la parte remanente del ciclo celular, de una manera esencialmente automática. Si los mitógenos son agregados cuando el crecimiento es propicio, luego la célula decidirá proseguir y pasará a través de R. Es por esta razón, que este punto también se lo llama punto de "Compromiso" (C), (en inglés "Commitment", C) [Pardee, 1989]. Por lo tanto, el punto R divide a la fase G_1 en temprana/intermedia y tardía; la primera definida por la dependencia del mitógeno, y la segunda, independiente de la señal externa.

El modelo molecular que explica los eventos que ocurren en el punto R, se ejemplifica en el esquema de la figura N°2 (basada en Assoian, 1997, y Planas-Silva y Weinberg, 1997). La propuesta de la familia de supresores tumorales del retinoblastoema (pRb y p107), como moléculas claves en R, se basa en que las mismas sufren una fosforilación extensiva, que sucede en el mismo lapso de tiempo, en el que la célula transcurre por dicho punto. En su forma hipofosforilada, pRb tiene una configuración que inhibe la división celular, ya que se une y secuestra a miembros de la familia de factores de transcripción E2F, formando así un complejo, que actúa como represor de la transcripción. Esta familia de factores de transcripción está relacionada con el programa de la proliferación en mamíferos, debido a que se une a los promotores de varios genes involucrados en la síntesis de ADN, como el de la ADN polimerasa α, quinasa de timidina, ribonucleótido reductasa, así como también a los de las ciclinas E y A [De Gregori et al., 1995]. La hiperfosforilación de pRb libera a E2F [Kouzarides, 1995]. De esta forma, pRb mantendría la puerta del punto R cerrada, hasta que las señales apropiadas disparen la fosforilación del mismo. Esto permitiría abrir la puerta y la célula avanzaría a lo largo de G_1. De acuerdo a este esquema, se propone que las señales, que influencian el pasaje a través del punto R, deben hacerlo mayormente a través de su habilidad en influenciar la fosforilación de pRb.

La fosforilación de pRb se inicia por los complejos ciclinas-CDKs, que contienen ciclinas tipo D y las CDK 4 ó 6, que utilizan a este tipo de ciclinas como subunidades regulatorias, por esta razón se las suele denominar, CDK socias de ciclina D [Kato et al., 1993; Horton et al., 1995]. Las ciclinas tipo D (D1, D2, y D3), son las primeras ciclinas que aparecen en el ciclo celular [Motokura et al., 1991 y 1992; Withers et al., 1991; Xiong et al., 1991]. Poseen una vida media muy corta (alrededor de 20 minutos) [Matsushime et al., 1992], que las hace interesantes como móleculas reguladoras del punto R, ya que la inhibición de la síntesis proteica antes de este punto y no después de él, bloquea la proliferación [Rossow et al., 1979]. Son sensibles a la presencia de

los factores de crecimiento, dado que la remoción del suero, bloquea la transcripción de las mismas, y en forma paralela, ocurre una rápida degradación proteica. De todas las ciclinas, las tipo D son las más fuertemente implicadas como proto-oncogenes [Motokura et al., 1991; Withers et al., 1991], y poseen un motivo proteico, L-X-C-X-E, que las hace capaz de unirse directamente a pRb [Dowdy et al., 1993]. Un aspecto importante de la ciclina D, es la regulación de su degradación en el ciclo celular (protéolisis mediada por ubiquitina, a través del reconocimiento de secuencias PEST), que consecuentemente, inactiva a su socia CDK y contribuye a la irreversibilidad del progreso del ciclo.

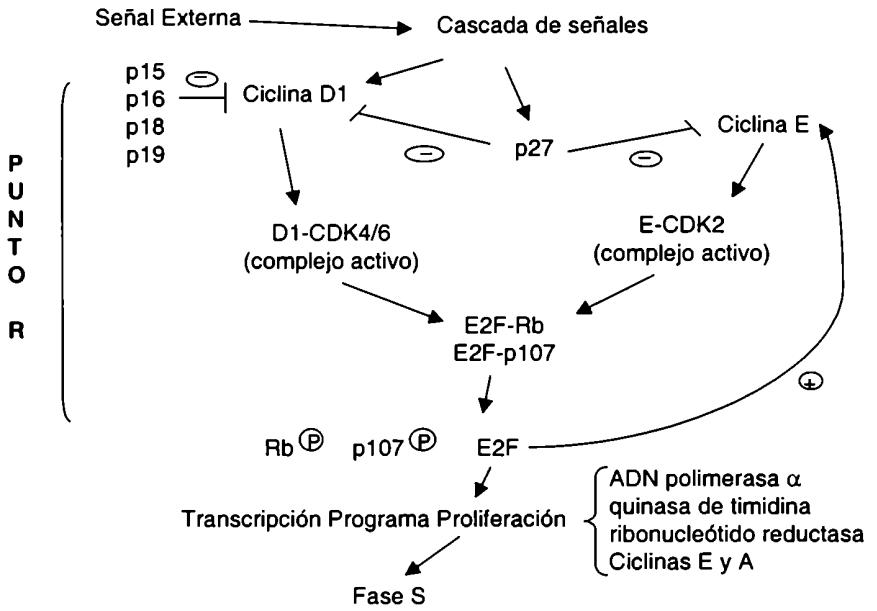


Figura N°2. Regulación del Punto R.

Las quinasas socias de la ciclinas D, CDK4 y CDK6 [Kato et al., 1994; Xiong et al. 1992], se unen a dicha ciclina (cada una por separado), en el lapso de tiempo antes de R. Los complejos D-CDK4/6 activados, inician la fosforilación de pRb y es probable que sigan activos a lo largo del G_1 temprano/intermedio para mantener esta fosforilación. Por lo tanto, si las ciclinas tipo D desaparecen en cualquier momento de este período, tanto porque se removieron los mitógenos ó se agregó cicloheximida inhibiendo su síntesis, es muy probable que la fosforilación inicial de pRb desaparezca rápidamente, por fosfatasas constitutivamente activas, bloqueándose así el ciclo celular.

A su vez los complejos ciclina D-CDK están regulados de forma negativa por la familia de inhibidores INK4, que se unen a la forma monomérica de CDK4 y CDK6. Las proteínas de la

familia INK4 incluyen a p15, p16, p18 y p19, de las cuales, p16 ha sido implicada como un importante supresor tumoral [Nobori et al., 1994; Spruck III et al., 1994].

De acuerdo a las evidencias, los complejos ciclina D-CDK4/6 solo inician la fosforilación de pRb, pero no la completan, y esto parece reflejarse también en que no son determinantes para el pasaje a través de R [Resnitzky y Reed, 1995; Connell-Crowley et al., 1997]. Los complejos activados de ciclina E-CDK2, que se activan en el tiempo en que la célula transcurre por R, son los que terminan de hiperfosforilar a pRb, y estas fosforilaciones parecen depender de las fosforilaciones iniciadas por los complejos D-CDK4/6 [Hatakeyama et al., 1994; Resnitzky y Reed, 1995]. Sin las fosforialciones previas, el complejo E-CDK2 no pueden hiperfosforilar a pRb, y la célula no podría pasar por el punto R, ya que no se liberaría el factor de transcripción E2F. Por lo tanto, la transición del punto R parece depender de la activación del complejo E-CDK2 [Koff et al., 1992].

Otra clase de inhibidores de los complejos ciclina-CDK incluyen a las proteínas p21, p27 y p57 [Sherr y Roberts, 1995], y son capaces de unirse a una gran variedad de estos complejos. Estos inhibidores solo se unen a la ciclina y a la CDK, una vez que ellas forman el complejo, y se requiere más de una molécula del inhibidor, para inhibir la actividad quinasa. Esto significa, que los complejos ciclinas-CDK pueden retener la actividad quinasa, aún cuando están unidas a una única molécula del inhibidor, de tal manera que los inhibidores pueden tener un rol adicional, tal como dirigir el complejo a otras moléculas.

Hay evidencias que indican que $p27^{kip1}$ juega un rol crítico en la determinación del tiempo de la transición del punto R [Coats et al., 1996]. Los niveles de p27 declinan constantemente a través de la fase G_1 en respuesta a la estimulación mitogénica, aparentemente por mecanismos post-traduccionales que incluyen degradación proteica [Leone et al., 1997]. Es muy probable, que al bajar los niveles de p27, se liberen los complejos E-CDK2, que se encuentran inhibidos por él, y la célula adquiera así, la habilidad de disparar la transición a través del punto R. Este modelo es atractivo, porque la declinación de p27, representa la consecuencia de la acumulación de la señal del mitógeno, durante un período de tiempo, y coincide con el tipo de mecanismo que es requerido para el disparo de esta transición.

Una vez activado p27, se une e inhibe al complejo ciclina E-CDK, a pesar que la mayor parte de p27, en células en proliferación, se encuentra unido al complejo ciclina D-CDK4/6 [Toyoshima y Hunter, 1994], los cuales podrían ser sus represores lábiles al calor, que a través de la asociación, lo mantienen en forma latente [Peters, 1994]. p27 debe inhibir al complejo ciclina D-CDK4, impidiendo la fosforilación de un residuo de treonina en la CDK4, mediado por CAK [Kato et al., 1994]. Existen varios trabajos donde muestran, que los niveles crecientes de p27, arrestan a la célula en G_1, y a la inversa, que en células proliferando, los niveles de p27 están disminuidos.

El modelo de la regulación del punto R, está apoyado por una variedad de líneas de evidencias. Los mitógenos, que inducen la transición del punto R, favorecen la fosforilación de pRb y aumentan los niveles de ciclina D, que a su vez inicia la fosforilación de pRb. Si se microinyectan anticuerpos anti ciclina D, se detiene el ciclo en la fase G_1, pero esto solo ocurre en células que son pRb positivas [Lukas et al., 1994]. Otras evidencias, que apoyan la relación no sólo de la ciclina D, sino también de la E con el punto R, está dado por el moderado acortamiento de la fase G_1, cuando una u otra ciclina son sobrexpresadas, mientras que la sobrexpresión de ambas acortan significativamente dicha fase [Resnitzky y Reed, 1995]. Esto sugiere, que estos dos tipos de ciclinas, regulan diferentes aspectos de la fase G_1.

Las evidencias en favor del punto R, también provienen de factores que actúan bloqueando la proliferación, como ocurre con el $TGF\beta_1$ en determinados tipos celulares, donde induce la síntesis de $p15^{INK4B}$, inhibidor de CDK4/6, que bloquea la fosforilación inicial de pRb, así como también bloquea la síntesis de CDK4 [Hannon y Beach, 1994].

La irreversibilidad del punto R, se cree que se debe a rutas de retroalimentación positiva, y se han propuesto tres de ellas. La primera propone, que la inactivación de pRb, llevaría a la liberación del factor de transcripción E2F, y posteriormente este factor activaría la expresión del gen de la ciclina E, aumentando los niveles proteicos de dicha ciclina. La segunda propone, que la inactivación de pRb, parecería resultar en el aumento de los niveles proteicos de ciclina E, y se llevaría a cabo, a través de mecanismos post-traduccionales pobremente comprendidos. Y finalmente, la tercera propone, que los complejos activados CDK2-E, podrían inducir la fosforilación de p27, y al mismo tiempo su degradación, combinándose de esta manera con los efectos de la degradación de p27 inducida por mitógeno, que ocurre en la fase G_1 temprana/intermedia, y se completaría de esta manera, la liberación de los complejos CDK2-E, de la inhibición de p27. Las acciones combinadas de esta amplificada ruta de retroalimentación positiva, deben asegurar de forma significativa, que la transición del punto R no solo sea irreversible, sino también ejecutado con extrema rapidez.

Está claro, que hay una convergencia de señales, pero no se sabe si resulta de una sucesión lineal de distintas decisiones en el tiempo, que son ejecutadas una después de otra a través de la fase G_1 temprana/intermedia y culminan eventualmente en la transición del punto R, ó si la señalización de todos estos caminos, es guiada e integrada finalmente en una única decisión en la fase G_1 intermedia/tardía acerca de si completar ó no la transición.

También existen algunas contradicciones con este modelo, principalmente porque ni el pRb, ni las ciclinas tipo D, individualmente, son necesarios para el control de la iniciación de la replicación del ADN. Se ha observado que células sin pRb, son capaces de regular la transición

de G_1 a S correctamente durante la proliferación [Peeper et al., 1997], como así también que ratones Rb -/-, son capaces de desarrollarse hasta el día 13 antes de morir, después de numerosas divisiones celulares, y con una diferenciación sustancial [Jacks et al., 1992]. Más que regular la división celular básica, la falta de pRb parece ser importante para los caminos de diferenciación específica, principalmente en el desarrollo del hígado, hematopoiesis, y en algunas partes del desarrollo neuronal [Lee et al., 1992].

CAMINOS DE SEÑALIZACION INTRACELULAR EN LA PROLIFERACION

La célula de un organismo multicelular, está expuesta a una gran variedad de señales diferentes provenientes de otras células y del ambiente. La respuesta celular es específica y selectiva, adquirida a través de la especialización celular progresiva, durante el desarrollo. Por esta razón, una célula puede ser programada para responder a un grupo de señales diferenciándose, a otro grupo proliferando y a otro grupo llevando a cabo una función especializada.

De todos los estímulos que recibe una célula, los que inducen la proliferación celular son el objeto de este estudio, y sólo se hará incapié en los mecanismos de señalización activados durante la inducción de la división celular.

La interpretación de las señales intercelulares, se realiza a través de una compleja maquinaria en la célula receptora. El estudio de la comunicación celular avanza día a día con el desarrollo y el alcance de nuevas técnicas, poniendo en evidencia el elaborado sistema que poseen las células para responder a los diferentes estímulos. Este sistema de transducción de señales incluye proteínas receptoras de membrana e intracelulares, quinasas, fosfatasas, proteínas que unen GTP y una cantidad de proteínas intracelulares.

Las células de animales superiores se comunican a través de una gran variedad de moléculas señalizantes, llamadas también mediadores intercelulares, que incluyen proteínas, pequeños péptidos, aminoácidos, nucleótidos, esteroides, retinoides, derivados de ácidos grasos, y aún gases disueltos como el óxido nítrico y el monóxido de carbono. Independientemente de la naturaleza de la señal, la célula receptora responde a través de proteínas específicas llamadas receptores. Los receptores unen a la molécula señalizante de forma específica y luego se inicia una respuesta en la célula receptora.

La forma específica en que una célula reacciona al ambiente, va a depender de los receptores que posea, además de la maquinaria intracelular con la cual la célula integra e interpreta la información que recibe. En muchos casos, las moléculas señalizantes se unen a idénticos

receptores acoplados a distintas células, y aún así producen respuestas diferentes, reflejando diferencias en la maquinaria interna de las células, en las cuales están presentes.

Si se clasifican a los receptores, que se encuentran en la superficie celular, en base a las vías señalizantes que activan, se los puede dividir en dos grandes familias: aquellos receptores que están acoplados a una proteína trimérica G (GPCRs), y los que, poseen ó están asociados, a una actividad enzimática, que generalmente es una quinasa (en su mayoría de tirosina (RTK) y/ó de serina/treonina (RS/TK)). Ambos tipos de receptores activan esencialmente una cascada de fosforilaciones mediada por dos tipos principales de quinasas: las quinasas de proteínas en serina/treonina y las quinasas de proteínas en tirosina.

El rol de los GPCRs está bien definido en la regulación del metabolismo intermediario, y solo recientemente estos receptores han sido reconocidos como importantes mediadores del crecimiento y diferenciación celular [Luttrell et al., 1999]. La intervención de los GPCRs se da a través de la cooperación entre las vías de señalización, y existe mucha evidencia de que esto ocurre con las vías activadas por RTK [Schwartz y Baron, 1999].

Los GPCRs son proteínas con siete dominios transmembranas, por esta razón se los suele denominar "serpentinas", y transducen las señales extracelulares activando las proteínas heterotriméricas G (que unen GTP), localizadas en la cara citosólica de la membrana plasmática. Estos receptores pueden activar selectivamente una o más proteínas triméricas G, que están formadas por el ensamblado de tres subunidades. Cada una de estas subunidades son el producto de tres familias de genes diferentes (existen 17 genes para la subunidad α, 5 para la β y 11 para la γ). Los GPCRs actúan a través de la proteína G, para regular la actividad de una proteína blanco separada del receptor, pero unida a la membrana plasmática. Esta proteína blanco puede ser una enzima ó un canal de iones, que una vez activada por la proteína G, actúa a su vez alterando el comportamiento de otras proteínas en la célula.

Las tres cadenas polipeptídicas diferentes, que componen a la proteína trimérica G, α, β, y γ, forman un complejo capaz de unir GTP. De acuerdo a la proteína G que se activa, a través de la subunidad α, que es la que une e hidroliza GTP, se inicia una determinada vía señalizante (figura N°3). La cadena β y la cadena γ forman un complejo fuertemente unido, que mantiene a la proteína G anclada a la membrana plasmática a través de una cadena lipídica (un grupo prenilo), que está covalentemente unida a la subunidad γ. En su forma inactiva, la proteína G existe como trímero, con un GDP unido a la subunidad α. Una vez que el ligando se une al receptor, este último se activa e induce un cambio conformacional en la proteína G, causando la disociación de la subunidad α, y liberando así, el complejo $\beta\gamma$. De esta manera, α puede cambiar el GDP unido,

por GTP. A su vez, la subunidad α posee una actividad GTPasa, que permite inactivarla, y darle el carácter de transitoriedad a la reacción.

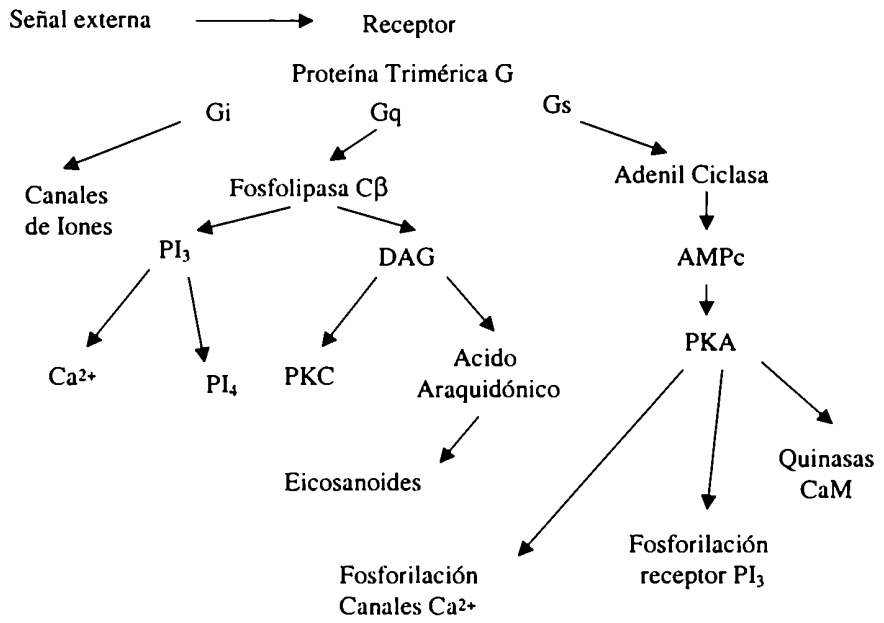


Figura N°3. Receptores Acoplados a Proteína G, Vías Señalizantes.

La proteína Gs estimula la vía de la adenilato ciclasa, aumentando los niveles intracelulares del AMPc, y esto causa a su vez la activación de la quinasa A (PKA, que fosforila en ser/thr). El AMPc altera la conformación de las subunidades regulatorias de la PKA, liberando y activando las subunidades catalíticas. Los sustratos de la PKA dependen del tipo celular, pero un camino de señalización que generalmente activa, es la fosforilación de una proteína (CREB), que se une a zonas promotoras en el ADN, en respuesta a los elevados niveles del AMPc. De esta forma, se activan genes específicos de esta respuesta. Entre los sustratos de la PKA también se pueden nombrar los canales de Ca^{2+}, los receptores del inositol 3 fosfato (IP_3), ubicados en el retículo endoplasmático y las quinasas dependiente de Ca^{2+} y calmodulina (CaM), que fosforilan y activan a la calmodulina.

Existe también una proteína trimérica G inhibitoria, Gi, que inhibe a la proteína trimérica Gs, pero se cree que su rol más importante es estimular los canales de iones.

La proteína Gq activa a la fosfolipasa C, isoforma β (PLCβ), y esta enzima a su vez cliva al fosfatidil inositol 4,5 bifosfato (PIP_2), generando fosfatidil inositol 1,3,4 trisfosfato (IP_3) y

diacilglicerol (DAG). El IP_3 libera Ca^{2+} de los depósitos intracelulares y también genera la molécula mensajera IP_4. El DAG, por un lado sigue clivándose, para dar ácido araquidónico, que actúa como mensajero, y como primer metabolito en el camino de síntesis de los eicosanoides. Por otro lado, el DAG activa la quinasa C (PKC), enzima que fosforila en ser/thr y de la que se detallará más adelante. Cabe aclarar, que la PLCβ, además de ser activada por GPCRs, también puede ser directamente activada por un receptor.

A pesar de las diferencias en los detalles moleculares, todos los sistemas señalizantes, que están disparados por los GPCRs, comparten ciertas características y están gobernados por los mismos principios generales. Muchos de ellos dependen de cascadas complejas, de amplificadores y de mediadores intracelulares. Las cascadas catalíticas de los mediadores intracelulares, proveen numerosas formas de amplificar la respuesta a señales extracelulares. Como el efecto es transiente, existe una serie de rutas que inhiben ciertos pasos anteriores y también existen fosfatasas específicas que desfosforilan los distintos sustratos de los mediadores intracelulares.

Los receptores acoplados a enzimas, son proteínas con una única región transmembrana, a diferencia de las serpentinas de los GPCRs, con el sitio de unión al ligando en la cara extracelular y el sitio catalítico en la cara intracelular. El dominio citosólico de estos receptores, puede tener actividad enzimática, ó estar asociado directamente a una enzima. Estos receptores deben homo ó heterodimerizarse, para ser activados, y así fosforilar un grupo específico de proteínas en la célula blanco.

Existen cinco clases de receptores acoplados a enzimas, conocidos hasta el momento. a) receptor guanilil ciclasa: cataliza la producción de GMPc en el citosol, y como actúa en respuesta a la presión sanguínea; no será desarrollado en detalle. b) receptor quinasa de tirosina: fosforila residuos tirosina en un pequeño grupo de proteínas señalizantes intracelulares. c) receptores asociados a una quinasa de tirosina: que se asocian a una quinasa de tirosina. d) receptor fosfatasa de tirosina: remueve grupos fosfatos de tirosinas en proteínas señalizantes intracelulares específicas. e) receptor quinasa de ser/thr: fosforilan residuos ser/thr en algunas proteínas intracelulares.

Los receptores quinasa de tirosina (RTK) son los más abundantes. El primer receptor descripto, de este tipo, fue el del factor de crecimiento epidermal (EGF). Este receptor tiene un paso por membrana y un dominio intracelular con actividad de quinasa de tirosina (TK), estimulado por la unión del ligando. Fosforila proteínas intracelulares específicas. Otros factores de crecimiento con receptores similares son: el derivado de plaquetas (PDGF), de fibroblastos

(FGFs), de hepatocitos (HGF), de insulina tipo 1 (IGF-I), nervioso (NGF), del endotelio vascular (VEGF), y el factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF).

En cada caso, el receptor se autofosforila para iniciar la cascada de señales. La unión del ligando provoca la homodimerización de receptores y así se fosforilan en forma cruzada (autofosforilación, porque ocurre dentro del dímero del receptor, pero la fosforilación ocurre en *trans*), en varios residuos de tirosinas. Se cree que la dimerización del receptor es un mecanismo general para activar los receptores. Este tipo de mecanismo resultó muy útil para la construcción de las mutantes dominantes negativas (se expresa un receptor mutado y se forman homodímeros con un monómero nulo en su actividad).

La señalización por la actividad quinasa de tirosina, generalmente se inicia por el reclutamiento de proteínas señalizantes, a las tirosinas fosforiladas. Las proteínas reclutadas, contienen un dominio homólogo a la región 2 de la proteína del Sarcoma de Rous (Src, tiene actividad de quinasa de tirosina), ó un dominio de unión a fosfotirosina (PTB). Las cascadas de señales de este tipo de receptores han sido analizadas en gran detalle. En la figura N°4 se detallan las vías señalizantes del EGF y de la insulina (basados en Lutrell et al., 1999, y Czech y Corvera, 1999, respectivamente).

El receptor del EGF forma un homodímero al unirse el ligando, y se activa la TK de su dominio intracitoplasmático, y ocurre la transfosforilación en tirosina. Al fosforilarse el receptor, promueve la asociación de proteínas adaptadoras, que contienen un dominio SH2 (homólogo al de la proteína Src), ó un dominio de unión a fosfotirosina (PTB), como la Shc y la Grb2, y proteínas señalizantes como la c-Src, la fosfolipasa Cγ (PLCγ), la proteína que a activa a Ras-GTPasa (GAP), y la quinasa p85-p110 dependiente de inositol 3 fosfato (PI3K), para formar un complejo asociado a la membrana, que activa a la proteína Ras. El complejo Grb2-Sos, al asociarse al receptor, cataliza el cambio de GTP en Ras. La asociación de Ras a Raf, quinasa que activa a la quinasa de la quinasa MAP (MEK), inicia la cascada de la quinasa MAP.

El camino de señalización de la insulina también activa la cascada de la quinasa MAP, de manera similar al EGF. El receptor se dimeriza, transfosforila en tirosina y se reclutan las proteínas involucradas en el camino de señalización.

La importancia de la proteína Ras en las vías de señalización se ve reflejada en el porcentaje de cánceres humanos que contienen una mutación en este gen (30%). La proteína Ras pertenece a la gran superfamilia Ras, formada por proteínas monoméricas G de bajo peso molecular, que unen GDP/GTP. Esta superfamilia incluye a la proteína de 21 kDa, codificada por los genes H-Ras, K-Ras y N-Ras. También están incluidas otras dos subfamilias: Rho y Rac, involucradas en la

amplificiación de señales desde los receptores al esqueleto de actina; y la familia Rab involucrada en la regulación del tráfico intracelular del transporte de vesículas.[Maruta y Burgess, 1994].

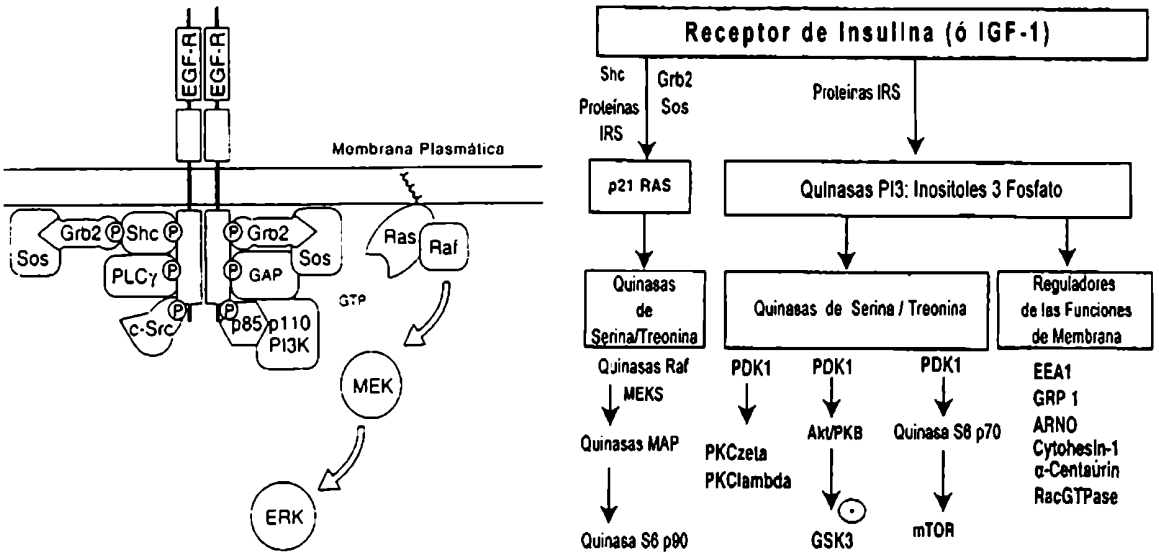


Figura N°4. Caminos de Señalización Activados por EGF e Insulina.
Abreviaturas: *EGF-R*= receptor del EGF, *Sos*= (son of sevenless) proteína que libera nucleósido guanina, *Grb2*= proteína 2 de unión al receptor del factor de crecimiento, *Shc*= proteína con dominio SH2 (de unión a fosfotirosina), *PLCγ*= fosfolipasa C gama, *c-Src*= quinasa de tirosina, protooncogen del Sarcoma de Rous, *p83-p110, PI3K*= quinasa de inositol 3 fosfato, *GAP*= proteína que activa a Ras-GTPasa, *Ras y p21Ras*= proteína G monomérica que intercambia GTP/GDP, *Raf*= quinasa de MEK, *MEK*= quinasa de la quinasa MAP, *quinasa MAP*= quinasa activada por mitógenos, *ERK*=quinasa regulada por señales externas de la familia de las quinasas MAP, *IRS*= sustrato del receptor de insulina, *PDK1*= quinasa dependiente de inositol 3 fosfato, *Akt/PKB*= quinasa de ser/thr homólogo del retrovirus AKT8, también llamada quinasa B, *GSK3*= quinasa 3 de la glucógeno sintetasa, *quinasa S6*= quinasa que fosforila a la proteína ribosomal S6, existen dos familias p70 y p90, *mTOR*= proteína blanco de la rapamicina de mamíferos, *EEA1*= antigeno 1 del endosoma temprano, *GRP1*= receptor 1 de inositol 3 fosfato, *ARNO*= proteína de unión al sitio de apertura del factor de ribosilación de ADP (ARF).

Al igual que casi todas las G monoméricas, las proteínas Ras contienen un grupo prenilo unido covalentemente, que ancla la proteína a la membrana, en su cara citoplasmática. Ras amplifica las señales desde los receptores con actividad quinasa de tirosina hacia el núcleo, para estimular la proliferación ó diferenciación. De forma similar a las otras G monoméricas y las proteína trimérica G, las proteínas Ras funcionan como intercambiadores, ciclando entre dos estados conformacionales diferentes: activo, cuando está unido a GTP, e inactivo, cuando está unido a GDP. Dos clases de proteínas señalizantes regulan la actividad de Ras: las proteínas que

promueven la actividad Ras-GTPasa (GAPs), que aumentan la hidrólisis de GTP por Ras, inactivándola; y las proteínas que promueven la liberación del nucléosido guanina (GNRPs), que promueven el intercambio de nucleósidos unidos, estimulando la pérdida de GDP y la subsiguiente toma de GTP del citosol, activando a Ras. En principio, los RTK pueden activar Ras, activando GNRPs, ó inhibiendo GAPs. La unión entre el receptor y Ras está provista por proteínas intermediarias, de las cuales Grb2, proteína 2 de unión al receptor del factor de crecimiento, es la más conocida. Dichas proteínas activadoras tienen secuencias conservadas, llamadas dominios SH2 y SH3 (por homología con Src), que son sitios de unión para motivos fosfotirosina y ricos en prolina, respectivamente. Las secuencias flanqueando los residuos de fosfotirosina, especifican qué proteínas, que contienen SH2, interaccionan con el receptor. Grb2, no solo une a fosfotirosina, sino que también se une a un factor que intercambia nucléosido guanina, Sos, posiblemente vía su dominio SH3. Luego, Sos interacciona con Ras, unida a la membrana, y la activa. Ras inicia una serie de fosforilaciones en proteínas, comenzando con Raf, una quinasa de la familia de quinasas de ser/thr, iniciando así al camino de la quinasa activada por mitógenos (MAPK). Raf es el primer componente del camino de señalización de MAPK, y pertenece a un grupo de moléculas relacionadas, colectivamente referidas, como quinasas que activan MAPK (MAPKKK)[Garrington y Johnson, 1999].

La cascada de la quinasa activada por mitógenos (MAPK), es uno de los sistemas de transducción de señales más estudiados, e interviene en varios programas celulares que incluyen la diferenciación, el movimiento, la proliferación y la muerte celular. Está conservada en todos los eucariotas y juega un rol clave en la regulación de la expresión génica, así como también en las actividades citoplasmáticas. Está organizada en una estructura típica de tres quinasas que consiste de una quinasa activada por mitógenos (MAPK), una quinasa activadora de la MAPK (MEK ó MAPKK) y una quinasa que activa a MEK (MEKK, ó MAPKKK, ó Raf). La transmisión de señales se lleva a cabo por una fosforilación secuencial y activación de los componentes, que culmina en la fosforilación de factores de transcripción nucleares, y así se regula la expresión génica. Entre los factores de transcripción, se incluye a AP-I, un dímero compuesto por los productos de dos proto-oncogenes, jun y fos, así como también por otros.

En mamíferos existen cinco módulos de MAPK (figura N°5). Estos incluyen la cascada de la quinasa I y 2, reguladas por señales externas (ERK I y 2), que regulan preferencialmente el crecimiento y la diferenciación celular, y las cascadas de la quinasa de c-Jun en el N-terminal (JNK) y p38, que funcionan principalmente en respuesta a estrés como inflamación y apoptosis, entre los más estudiados hasta el momento. Estos dos últimos módulos, también regulan y controlan varios programas de desarrollo en otros eucariotas.

En mamíferos la especificidad del módulo de MAPK que se activa, depende del tipo celular y de los mecanismos de regulación interna. Dentro de cada módulo, las quinasas son bien específicas en cuanto al sustrato que fosforilan. Y como la respuesta es transitoria, existen también un número de fosfatasas específicas, que desfosforilan a los sustratos del camino de la MAPK.

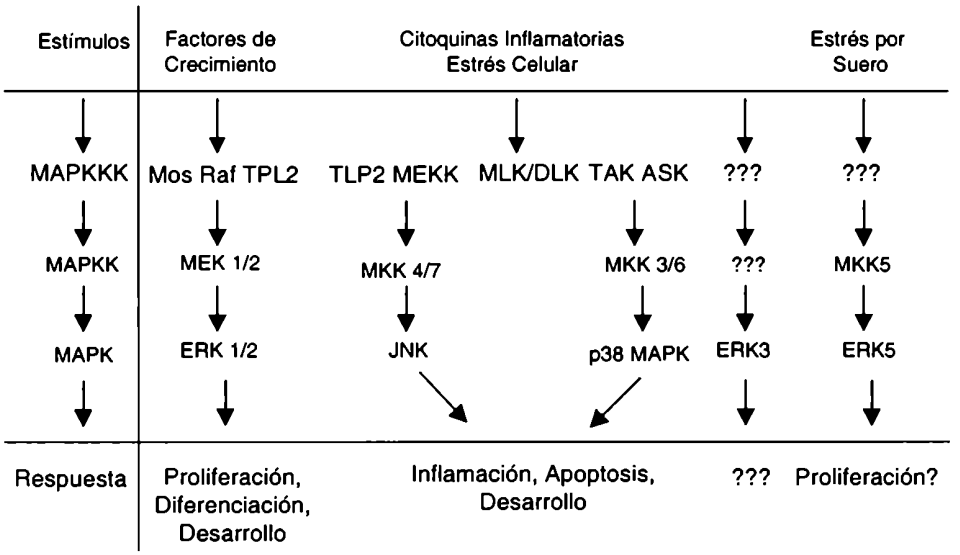


Figura N°5. Módulos de MAPK. (Schaeffer y Weber, 1999).

Una característica inusual de las MAPK es, que para su completa activación, requieren fosforilación en una tirosina (tyr) y en una treonina (thr), que están separadas por un aminoácido en la proteína. MEK es la quinasa que cataliza ambas fosforilaciones. A su vez, esta enzima es activada por fosforilación en ser/thr catalizada por Raf (MAPKKK), que se activa cuando se asocia a Ras.

Dentro de los receptores asociados a enzimas, están aquellos, que utilizan para la transducción de señales, a la familia de quinasas Janus (Jak), y a los miembros de los transductores de señales y activadores de la transcripción (Stat) [Moutoussamy et al., 1998]. Si bien existen varios mitógenos, que poseen este tipo de receptores, como el factor de inhibición de leucemia (LIF), no será desarrollado aquí, ya que no se ha utilizado ningún factor que utilice esta vía. Por la misma razón, tampoco se desarrollará aquí a los receptores unidos a fosfatasas de tirosinas.

Los únicos factores que utilizan receptores con actividad quinasa de ser/thr es la familia del TGFβ y se mencionará más adelante.

Quinasa C (PKC)

La quinasa de proteínas C (PKC), fue una de las primeras quinasas en ser identificada, y en un primer momento, se la definió como una actividad quinasa de histona, en el cerebro de rata. Luego, se descubrió, que se trata de una enzima ubicua, activada por Ca^{2+}, y dependiente de fosfolípidos. Recientemente, el análisis bioquímico y el clonado molecular, han revelado, que esta enzima conforma una familia de quinasas de serina/treonina (ser/thr), con múltiples subespecies, codificadas por 12 genes diferentes (las isoformas PKCβI y βII son variantes de un mismo gen, obtenidas mediante el procesamiento alternativo del ARN mensajero), y poseen estructuras estrechamente relacionadas entre sí, [Mellor y Parker, 1998].

Las PKCs, como cualquier quinasa de ser/thr, catalizan la fosforilación de un grupo serina ó un residuo treonina (este último, menos frecuentemente), en la proteína sustrato, y se ha encontrado que reconocen al menos cinco motivos diferentes [Pearson y Kemp, 1991]. Se han reportado cerca de 110 proteínas, que actuarían como sustratos para PKC [Liu, 1996]. Entre estos, se encuentran, al menos, 7 receptores y 18 proteínas endógenas ó enzimas, que son fosforiladas por PKC purificada, en sistemas *in vitro* libres de células, ó en células intactas, en respuesta a agentes, que se conocen, activan PKC. Dentro de las proteínas más extensamente estudiadas, en los últimos años, están: la neuromodulina, la proteína sustrato de PKC miristoilada y rica en alanina (MARCKS), receptores catecolaminérgicos y acetilcolinérgicos, receptores de factores de crecimiento, la proteína dinamina I de gran peso molecular (que une GTP), y algunos productos de oncongenes. Esta multitud de sustratos celulares están involucrados en varios procesos biológicos, como ser: crecimiento, diferenciación, desarrollo neural, transmisión sináptica, regeneración axonal, contracción y relajación del músculo liso, secreción endócrina y exocrina, promoción de tumores, y envejecimiento [Liu, 1996]. La especificidad, dentro de esta superfamilia, está dada por las distintas señales y pasos regulatorios, dentro de cada tipo celular.

Los isotipos, en mamíferos, han sido agrupados en cuatro pequeñas subfamilias, sobre la base de sus propiedades enzimáticas, de las diferencias estructurales en el dominio regulatorio, y de las diferentes condiciones de activación. Las PKCs convencionales (cPKCs), que comprenden los isotipos α, βI, βII, y γ, son activadas por Ca^{2+}, fosfotidilserina (PS) y diacilglicerol (DAG). Estas son blanco del éster de forbol, 12-O-tetradecanoil forbol-13-acetato (TPA, sinónimo de PMA), que la activa en ausencia de DAG, ya que se unen en el mismo sitio. Las PKC noveles (nPKCs), constituida por los isotipos ε, η, δ, y θ, son insensibles al Ca^{2+}, pero siguen siendo activadas por DAG ó ésteres de forbol, en presencia de PS. La subfamilia correspondiente a las PKCs atípicas (aPKCs), ι y ζ, son insensibles a Ca^{2+}, DAG y TPA. Y por último, una subfamilia donde se incluyen quinasas, que tienen alta homología con el dominio catalíco de la PKC, entre las cuales, se han descubierto recientemente, las quinasas llamadas "relacionadas a PKC" (PRKs), con tres

miembros, PRK1 a 3, que al igual, que las aPKCs, son insensibles a Ca^{2+}, DAG y TPA. También se encuentra, en está subfamilia, a la PKCμ/PKD, que será detallada más adelante [Ron y Kazanietz, 1999].

La estructura de las PKCs se divide básicamente en la región amino terminal, donde se encuentran los sitios regulatorios, y la región carboxi terminal, donde se ubica el sitio catalítico. Dentro de las isoformas, ambas regiones, se dividen a su vez en varios dominios, en cuanto a la secuencia aminoacídica: los conservados (C1-C3) y los variables (V1-V5) (figura N°6). La región regulatoria, posee los motivos involucrados en la unión de fosfolípidos y Ca^{2+}, y participa en las interacciones proteína-proteína, que regulan la actividad y la localización de PKC. La región carboxi terminal, la más altamente conservada entre las isoformas, contiene el dominio quinasa, e incluye los motivos involucrados en la unión del ATP y los sustratos. Las regiones catalíticas y regulatorias están conectadas por una región bisagra, que es altamente sensible al clivado por proteasas celulares.

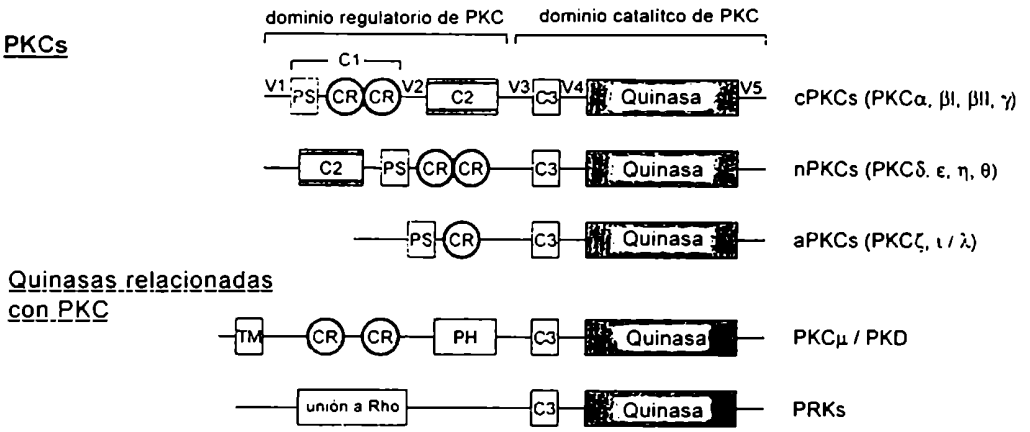


Figura N°6. Isoformas de PKC. [Mellor y Parker, 1998]
Abreviaturas: *V1-V5*= dominios variables, *C1-C3*= dominios conservados, *PS*= pseudosustrato, *CR*= dominio rico en cisteínas, *TM*= dominio transmembrana, *PH*= dominio de unión a lípidos.

El dominio regulatorio C1 está presente en todas las isoenzimas y contiene un motivo con dedos de zinc, siendo estos esenciales para la unión de los activadores, TPA y DAG, compitiendo ambos, por el mismo sitio de unión. En las isoformas c y n de PKC, existen dos copias de este sitio, que es muy rico en cisteínas, mientras que en las aPKCs, está presente solo una copia del mismo. La unión de DAG ó TPA, a este dominio de la PKC, aumenta la hidrofobicidad de la misma y promueve la inserción de este dominio, en la bicapa lipídica.

La PKC contiene un sito autoinhibitorio ó pseudosustrato, que está juxtapuesto al N-terminal del dominio C1 en las PKCs c, n, y a. Esta secuencia de 14-30 residuos, contiene más de seis aminoácidos básicos, y se asemeja al sitio de fosforilación de los sustratos de PKC, pero en el sitio donde se predice la fosforilación de una serina ó treonina, se encuentra un aminoácido no fosforilable (alanina). Algunas mutaciones en esta región, le confieren a la proteína mutante, una actividad independiente del efector. Este pseudosustrato interacciona con el sitio de unión al sustrato, y mantiene a la enzima en un estado inactivo, en ausencia de cofactores y activadores.

El dominio regulatorio C2 contiene el sitio de unión a fosfolípidos, en forma dependiente de Ca^{2+}. Este dominio se encuentra en un gran número de proteínas, que están relacionadas con los mecanismos de transducción de señales y tráfico de membranas. Los átomos de Ca^{2+} y los residuos básicos, contribuyen en la unión electrostática a la membrana, actuando como un ancla. El Ca^{2+} aumenta la afinidad de las cPKCs por los fosfolípidos. La asociación a membrana y la activación de la enzima, están reguladas por distintas concentraciones de Ca^{2+}, siendo menor, la concentración necesaria para la asociación a membrana. Las PKCs n, a y las PRKs, tienen un dominio tipo C2, al cual le falta uno ó más, residuos aspartato para la interacción con el Ca^{2+}, pero es capaz de unir fosfolípidos (demostrado *in vitro*) [Liu, 1996]. Se plantea también la posibilidad, que este dominio tipo C2, tenga una función general de interacción proteína-proteína. Se ha definido una clase de proteínas, que interaccionan con el dominio C2 de las PKCs, en su forma activa, y se las denomina "receptores para PKCs activas" (RACKs). Las RACKs no son sustratos de PKC, pero en cambio, parecen ser importantes en dirigir a las PKCs activas, hacia compartimentos específicos en la membrana.

La región catalítica de PKC incluye los dominios C3 y C4. El dominio C3 posee el sitio de unión a ATP, el dador de fosfato, en la reacción de fosfotransferencia. El dominio C4 tiene el sitio de unión para los sustratos. Este sitio es ocupado por el pseudsustrato, en el estado inactivo de la PKC, bloqueando la unión de los sustratos, en ausencia de activadores.

La región V5 es muy corta para ser considerada un dominio (50 aa aprox.), y juega un rol regulatorio importante de la función quinasa. Se sabe, que juega un rol crítico en la localización, y se cree, que es a través de la interacción proteína-proteína. Tiene sitios de fosforilación y se demostró, que la fosforilación de estos sitios, controlan la tasa de fosforilación de los sitios regulatorios de la PKC, y también influyen en sus desfosforilaciones. Esto se cree, que se debe en parte, a la interacción de la región V5 fosforilada, con el dominio quinasa en sí mismo, induciendo una conformación cerrada y estable de la enzima.

La PKC es una enzima clave en los mecanismos de señalización y se activa a través de los receptores acoplados a la fosfolipasa C, forma β (PLCβ), que hidroliza al PIP_2, provocando una

elevación transiente de los niveles intracelulares del IP_3 y DAG, activador de la PKC. La acumulación de evidencias sugiere, que el DAG también puede ser generado por receptores acoplados a otras enzimas, que hidrolizan la fosfatidilcolina (PC), el fosfatidiletanol (PE) y glicolípidos, que contienen inositol. Estas reacciones son catalizadas por otras formas de la PLC y la fosfolipasa D (PLD), produciendo ácido fosfatídico (PA), que puede ser degradado a DAG. El modelo aceptado propone, que la activación de la PKC por unión del DAG, provoca un aumento de la afinidad de esta enzima por PS, que lleva a un cambio conformacional de la misma, y resulta en la remoción del pseudosustrato, dejando libre el sitio de unión a los sustratos. La asociación a la membrana está reflejada por un cambio en la localización citosólica de la PKC, hacia distintos compartimentos de membrana, proceso que es controlado por interacciones proteína-proteína.

En los últimos años se ha acumulado evidencia, que indica que la fosforilación es esencial en la regulación de PKC. La PKC se autofosforila en ser/thr, y es transfosforilada en tirosina, y en otros sitios ser/thr, por enzimas que se encuentran pasos más arriba, en la cascada de señales. La fosforilación de la enzima es un proceso en pasos, que regula la maduración de la misma, además de su activación e inactivación. La quinasa 1 dependiente de inositol fosfato (PDK1), está involucrada en la regulación de PKC, a través de la fosforilación de esta última. Fosforila a las PKCs c, n y a, en el rulo de activación del dominio quinasa. La fosforilación por PDK1, está seguida por la autofosforilación de dos sitios adicionales, dentro de la secuencia carboxi terminal, necesarios para la localización de las isoenzimas de PKC, y para obtener una conformación catalítica competente. La autofosforilación, también es importante para volver al citoplasma, después de la activación. El rol de la fosforilación en tirosina no se conoce bien hasta el momento, y se identificaron a las quinasas, Src y Lyn, como las responsables de esta fosforilación.

La interacción de la PKC con otras proteínas, juega un rol importante en la localización y función de las isoenzimas. Dentro de las proteínas que interaccionan con PKC, existen algunas que también actúan como sustrato, pero en la interacción proteína-proteína, lo hacen a través de sitios que no son de unión al sustrato. Por ejemplo, en su forma activa, la PKC se une a sus receptores (RACKs), ó a sustratos de la misma, que interaccionan con ella (STICKs), mientras que la PKC en su forma inactiva interacciona con una quinasa A de anclaje (AKAPs) y la proteína eucariota acídica, 14-3-3, altamente conservada. Estas proteínas, que interaccionan con PKC, poseen distintas funciones: localización de las isoenzimas en sitios intracelulares específicos, tanto en sus formas inactivas (AKAPs), como activas (RACKs); dirección a membrana plasmática (RACK1); que sirven como sustratos (STICKs); y las proteínas, que actúan como activadores (syndecan-4, miembro de la matriz de proteoglicanos de unión transmembrana,

y F-actina, entre otros), e inhibidores (14-3-3 y Nef, proteína del virus de inmunodeficiencia humana).

Dentro de las STICKs, se encuentran MARCKs, MacMARCKs, aducinas (α, β y γ), y la proteína clon 72 (Sse CKs). Las aducinas son proteínas del citoesqueleto involucradas en la interacción entre actina y espectrina. La expresión, localización y los estados de fosforilación de α y γ aducinas, han sido correlacionadas con la progresión del tumor renal. La proteína clon 72 está involucrada con la remodelación del citoesqueleto y el crecimiento celular [Ron y Kazanietz, 1999].

Las proteínas de anclaje, son proteínas que reúnen a las proteínas señalizantes, en un mismo lugar, permitiendo un rígido control de los caminos celulares, así como también un cruzamiento entre distintas cascadas. Entre ellas se encuentran la caveolina, AKAPs, e INAD, y se sabe que unen a la PKC en su forma inactiva. La caveolina inactiva la actividad quinasa, y localiza a la PKCα en el microdominio calveolar. Las AKAPs son anclajes para PKA y también para PKC, y ubican a esta última, en las fracciones dendríticas postsinápticas. AKAP79 inhibe la actividad quinasa de PKC, y el DAG , con el Ca^{2+}, liberan a PKC de esta proteína de anclaje. P62/ZIP interacciona con la PKC, y ha sido implicada en la dirección de estas isoenzimas al compartimento lisosomal. La proteína 14-3-3 puede inhibir ó activar PKC, y su rol es muy discutido. PKC se asocia directamente a proteínas del citoesqueleto y parece depender del tipo de isoenzima. La syndecan-4 interacciona con la PKCα y la localiza en los contactos focales en la membrana. Otras proteínas, que se unen a PKC, son aquellas que tienen un dominio PH, de homología a plectrina, que une inositol polifosfato. Ras-GRP (proteína que libera grupo guanosina bifosfato de Ras) estaría activada por ésteres de forbol, uniendo el camino de Ras con los caminos de PKC. [Ron y Kazanietz, 1999].

El rol de las PKCs se ha estudiado a través de activadores, como los ésteres de forbol, aunque solo activan a las c y n. También se las ha estudiado mediante el uso de inhibidores, aunque fallan, en lo que se refiere, a la dilucidación de los roles de cada isoforma en particular. El uso de copias de ADN antisentido ó métodos dominantes/negativos, y la modulación de la expresión genética de las distintas isoformas, han contribuido a la identificación de la función de cada isotipo y se demostró que juegan un rol en el control del crecimiento y diferenciación [Jaken, 1996].

El rol de la PKC, en el ciclo celular, es el punto de mayor interés. En el ciclo celular, se han observado varias líneas de evidencia, que sugieren la participación de la PKC, durante la fase G_1 y la transición de la fase G_2/M [Livneh y Fishman, 1997]. La intervención de PKC en G_1, está demostrada por la activación de miembros específicos de PKC, a través del tratamiento de las

células con factores de crecimiento. Los activadores de PKC, como los ésteres de forbol y los análogos al DAG, permeables a la membrana, mimetizan la acción de ciertos factores de crecimiento, e inducen la expresión de genes tempranos, como c-fos [Hug y Sarre, 1993]. También se sugirió, que las PKCs α y ε, actúan como activadores *in vivo* del camino de MAPK [Cai et al., 1997]. De esta manera, la PKC puede promover fases tempranas de la mitogénesis, pero sus efectos dependen del tipo celular. Por ejemplo, el TPA induce la síntesis de ADN en células Swiss 3T3 y linfocitos, mientras que causa inhibición de la misma, en células 3Y1 de rata y células vasculares del músculo liso [Kaibichu et al., 1985; Rozengurt, 1986; Ohno et al., Huang e Ives, 1987]. Este efecto se cree, que se debe a los isotipos expresados, en cada célula.

Es importante el tiempo en G_1, en el cual se activa la PKC. En la parte temprana de dicha fase, la activación de PKC induce la entrada en el ciclo celular y la progresión del mismo, mientras que, en la parte tardía, inhibe dicho proceso. Esto sugiere de alguna manera, que la PKC actuaría como un coordinador de la transición G_1/S. También está involucrada en la transición G_2/M, asociada al bloqueo de esta transición, y a la ruptura de la envoltura nuclear. Este último efecto, se basa en algunos trabajos, que han encontrado, que la PKC es capaz de fosforilar ciertas lamininas nucleares [Thompson y Fields, 1996]. También parece regular la expresión génica de las ciclinas E y A, durante la transición G_1/S, y actúa sobre los inhibidores del ciclo, por ejemplo modificando a p53 [Livneh et al., 1996; Takenaka et al., 1995; respectivamente]. La PKC sería una quinasa de ser/thr, de las tantas que actúan en G_1 y G_2/M, que actuaría como un unificador molecular, conectando los caminos de señalización con los constituyentes del ciclo celular.

El descubrimiento de la PKC como un receptor de alta afinidad para promotores de tumores, como son los ésteres de forbol, estableció las bases de su intervención en la carcinogénesis, y también proveyó de herramientas farmacológicas poderosas con las cuales manipular la PKC tanto *in vitro*, como en sistemas celulares. El éster de forbol, TPA, posee una estructura molecular similar al DAG, en una porción de la molécula. Este agente puede, por lo tanto, sustituir al DAG y activar la PKC directamente, *in vitro* e *in vivo*. Dado que este compuesto es metabolizado lentamente, persiste en los tejidos por tiempos más prolongados que el DAG, y causa, por lo tanto, una activación más prolongada de la PKC. Además, el TPA induce la inserción irreversible de la PKC, dentro de vesículas fosfolipídicas, que posiblemente causan una perturbación adicional de la membrana celular; en contraste, el DAG es ineficiente en promover este tipo de inserción de la PKC, sugiriendo que la habilidad de los compuestos en promover la inserción de la PKC, puede contribuir a las marcadas diferencias en el comportamiento biológico de los activadores de PKC conocidos. La activación de la PKC por TPA, causa la fosforilación de sustratos diferentes, a aquellos que son fosforilados cuando se la estimula con Ca^{2+} y PS, sugiriendo que los diferentes activadores de PKC, también pueden alterar la especificidad de sustratos [Liu, 1996].

Existen varios trabajos, donde se ha observado la translocación al núcleo de la PKC (de varias de sus isoformas), una vez que son estimuladas con TPA ó mitógenos [Liu, 1996]. Se observó, que la enzima está asociada a la membrana nuclear, pero se desconoce si la PKC forma parte de las proteínas integrales de la membrana nuclear, si está químicamente acoplada a la membrana ó si es translocada por un receptor de PKC, presente en la envoltura nuclear. Se sabe, que la PKC nuclear, fosforila a las lamininas nucleares (la laminina B por PKCβII, que ha sido implicada en la regulación de la ruptura de la envoltura nuclear durante la mitosis), a la ADN topoisomerasa II (activándola, observado a través del aumento de la hidrólisis de ATP), y finalmente al factor de transcripción específico de músculo, miogenina. La fosforilación de la miogenina, resulta en una inhibición de la interacción de esta con el ADN, y por lo tanto, de la transcripción, a partir de promotores específicos del músculo, y posiblemente de la diferenciación de mioblastos a miofibras. En mioblastos, la translocación al núcleo de la PKCα, es inducida por la estimulación de los mismos, con el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF).

Cuando las células son tratadas con TPA, por períodos prolongados (10-72 hs.), la unión del TPA, la actividad de la PKC, y la inmunoreactividad de la PKC, disminuyen gradualmente a niveles indetectables. Este fenómeno se lo denomina retromodulación ("down regulation"). Por ejemplo, el TPA induce la retromodulación rápida de las isoformas de PKC, α y δ, y lenta de la ε, en células Swiss 3T3 [Oliver y Parker, 1994]. Este fenómeno ocurre solo a nivel proteico, y parece estar relacionado con la compartimentalización selectiva de las isoformas, y sus distintas suceptibilidades a la protéolisis por proteasas endógenas [Kiley et al., 1991]. Por lo tanto, parece que la relativa suceptibilidad de las distintas isoformas a la retromodulación, varía entre los distintos tipos celulares, y es en parte, dependiente de las propiedades de las isoformas.

Los mecanismos de la retromodulación no han sido delineados. La desaparición de la PKC no se debe a una disminución de la biosíntesis de PKC, ya que la cicloheximida no altera la unión de TPA ó la recuperación de estos receptores, a partir de la retromodulación [Collins y Rozengurt, 1984]. La retromodulación por TPA es principalmente debida a un aumento en la degradación de la enzima [Ballester y Rosen, 1985]. Los inhibidores de proteasas son capaces de inhibir la retromodulación de la PKC [Oliver y Parker, 1992]. Se postulan dos proteasa responsables, la calpaina, una tiol proteasa, que requiera Ca^{2+}, y una serina proteasa [Kishimoto et al., 1989; Chida et al., 1986], ambas requieren la asociación a membrana. Se ha propuesto, que la unión de la PKC a la membrana plasmática, induce un cambio conformacional, que expone los sitios de clivaje por proteasas, dejando a la enzima sensible a la protéolisis. La asociación de la PKC a la membrana plasmática es, por lo tanto, un prerequisito para la retromodulación. Más aún, se sugiere, que la autofosforilación de la PKC debe llevar a la retromodulación, por dirigir a la proteína a la degradación proteolítica. La mutación del sitio de unión a ATP de la PKCα, inhibe la actividad

quinasa y la retromodulación. De esta manera, la activación de la PKC, la autofosforilación, la función de la subunidad catalítica, y la retromodulación, son eventos acoplados, y este último, por lo tanto debe ser fisiológicamente significativo en la señalización celular.

Los ésteres de forbol, además de unirse y activar a la PKC, se unen y activan a otros tipos de proteínas, entre ellas está la PKCμ (llamada así en humanos) ó PKD (llamada así en ratón), que se trata de una nueva quinasa de ser/thr, regulada por DAG y ésteres de forbol, identificada por dos grupos simultáneos [Johannes et al., 1994; Valverde et al., 1994, respectivamente]. A pesar, que originalmente se la consideró como un nuevo miembro de la familia de PKC, la PKD difiere de los isotipos de PKC, en su regulación y selectividad de sustratos. No tiene un dominio pseudosustrato, y no cataliza la fosforilación de sustratos de PKC como la histona, la mielina básica ó protamina ó péptidos basados en la secuencia del pseudosustrato. PKCμ/PKD se activa por fosforilación mediada por PKC, lo que haría que actúe más abajo en la cascada de señales. Se postula, que actuaría también, como anclaje de proteínas involucradas en la síntesis de inositoles fosfato. Otros receptores de los ésteres de forbol son las quimerinas, una familia de proteínas, que activan a la GTPasa (GAPs) de la pequeña GTPasa Rac, involucradas en la regulación del citoesqueleto de actina por Rac. También actúa como receptor, la proteína UNC-13, que es específica del sistema neural, y la alteración de esta proteína, lleva a interrupciones severas de la liberación de neurotransmisores. La existencia de estos receptores de TPA sugiere, que los ésteres de forbol tienen sitios potenciales de acción en las células, y algunas fosforilaciones de proteínas, y efectos sobre el camino de la MAPK, pueden ser estimulados por TPA, de forma independiente de PKC. La identificación de proteínas, que no son PKC, y responden a TPA, en las células de mamíferos, despierta la necesidad de precaución en la interpretación de los estudios de la función de la PKC, que solamente se basan en el uso de los ésteres de forbol, como herramienta de investigación. Esto es particularmente pertinente para la quimerina y Unc-13, de la familia de las proteínas Munc, que están involucradas en procesos celulares, que a su vez, están potencialmente regulados por PKCs [Ron y Kazanietz, 1999].

FACTORES DE CRECIMIENTO

Los factores de crecimiento son polipéptidos, que pueden influenciar la proliferacón celular, de manera positiva o negativa. En la actualidad son muchos los factores descriptos; el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y el de crecimiento epidermal (EGF), son algunos de los ejemplos más conocidos [Ross y Vogel, 1978; Cohen, 1962, respectivamente]. Existen otros mitógenos de variada naturaleza química. Podemos mencionar algunos de origen lipídico como las prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos [Jiménez de Asúa *et al.*, 1983, Palmberg *et al.*, 1987].

Los mitógenos liberados por algunas células, se unen a receptores específicos, generalmente presentes en la membrana plasmática de células específicas, de distintos tejidos y órganos, disparando así la compleja cascada de señales, que desencadena la proliferación celular. Esta cascada comprende la transducción de señales a través de la membrana plasmática, con la consecuente generación de segundos mensajeros y las diferentes modificaciones de proteínas citoplasmáticas. Por lo general, cada mitógeno estimula de manera selectiva una determinada señal, que puede activar más de un camino de señalización dentro de la célula. Por lo tanto, para entender los mecanismos específicos de cada mitógeno, es de suma importancia identificar las moléculas señalizantes y su modo operacional, como así también los eventos moleculares, que determinan la progresión de las células a través del ciclo.

PROSTAGLANDINA F 2 ALFA ($PGF_{2\alpha}$).

La prostaglandina F 2 alfa ($PGF_{2\alpha}$), pertenece a la familia de las prostaglandinas. Dicha familia posee una gran variedad de actividades biológicas, de naturaleza hormonal ó reguladora, y actúa localmente, en el ambiente donde es sintetizada. Las prostaglandinas y tromboxanos, forman un subgrupo llamado prostanoides, que junto a los leucotrienos y ácidos grasos hidroxilados forman el grupo de compuestos conocidos como eicosanoides [Smith, 1989]. Este grupo es sintetizado a partir de ácidos grasos de 20 átomos de carbono (de ahí su nombre, *eikosi* en griego significa veinte), que ocurren naturalmente, siendo el ácido araquidónico poliinsaturado, con cuatro dobles ligaduras no conjugadas, el mayor precursor y más abundante en muchos sistemas celulares de mamíferos.

Los prostanoides se forman en tres pasos: a) la liberación de ácido araquidónico, a partir de un precursor glicerofosfolípido, catalizado por varias fosfolipasas; b) oxigenación de ácido araquidónico libre, por la sintetasa ciclooxigenasa prostaglandina endoperoxido (PGG/H), enzima con doble actividad catalítica, ciclooxigenasa y peroxidasa; y c) metabolismo de prostaglandina endo peroxido (PGH_2), a un endoproducto específico biológicamente activo. Los prostanoides no están almacenados en las células, sino que se sintetizan en respuesta a un estímulo específico, que puede ser una hormona ó péptido. Esta síntesis está correlacionada con la liberación y aumento de la concentración del ácido araquidónico, siendo este punto muy importante para el control de producción de los prostanoides.

La $PGF_{2\alpha}$ se forma a partir del ácido araquidónico, a través de una transformación metabólica secuencial, catalizada por fosfolipasas, ciclooxigenasas, y una sintetasa específica de PGF [Smith et al., 1991]. Tiene diversas acciones fisiológicas, que van desde ser un potente agente luteolítico [Horton y Poyser, 1976], hasta causar la contracción del músculo liso en el útero [Senior et al.,

1993], en la vasculatura [Csepli y Csapo, 1975], y en los tractos respiratorios [Barnard et al., 1992] y gastrointestinales [Dong et al., 1986]. La $PGF_{2\alpha}$ induce la síntesis de ADN y la proliferación celular en fibroblastos 3T3 [Jiménez de Asúa et al., 1975]. La $PGF_{2\alpha}$ actúa sobre los astrocitos neuronales, mediando probablemente, la transmisión del dolor [Minami et al., 1992]. Recientemente, se observó, que la $PGF_{2\alpha}$ causa hipertrofia de los miocitos cardíacos y la inducción de genes miofibrilares, independientemente de la contracción muscular, sugiriendo un rol para los eicosanoides durante el desarrollo, en la hipertrofia compensatoria y/ó en la recuperación del corazón a partir de una injuria [Adams et al., 1996].

Se ha descripto un único receptor para la $PGF_{2\alpha}$ y el primero ha sido clonado a partir del tejido miometral [Abramovitz et al., 1994]. Dicho receptor se lo encuentra en varios tejidos, más abundantemente en los tejidos reproductivos y también en el corazón [Sugimoto et al., 1994; Lake et al., 1994]. Es un receptor ubicado en la membrana plasmática, con siete dominios transmembrana y está acoplado a una proteína trimérica Gq. El dominio extracelular está implicado en la unión específica del ligando y el dominio C terminal, ubicado en la cara intracitoplasmática de la membrana, está acoplado a la proteína Gq [Nakao et al., 1993; Sakamoto et al., 1994]. La $PGF_{2\alpha}$, al unirse al receptor, dispara la estimulación de la fosfolipasa C, isoforma beta, específica de inositol fosfato (PI-PLCβ), provocando un aumento del IP_3, DAG, y Ca^{2+} citosólico [Nakao et al, 1993]. Además de activar los caminos señalizantes de la PKC, también activa quinasas de tirosina [Watanabe et al., 1994; Jiménez de Asúa y Goin, 1997] y el camino de la MAPK [Hakeda et al., 1997].En la figura N°7 se muestra un esquema de los caminos de señalización activdos por la $PGF_{2\alpha}$, resumiendo los datos obtenidos hasta el momento, por distintos grupos de investigación.

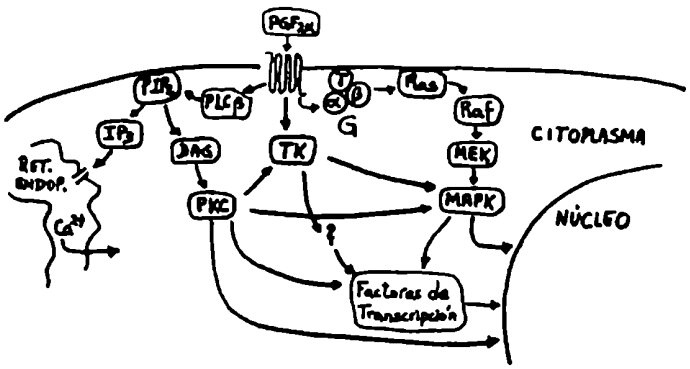


Figura N°7. Caminos de Señalización Activados por $PGF_{2\alpha}$.
Abreviaturas: *$PGF_{2\alpha}$*= prostaglandina F 2 alfa; *G*= proteína trimérica G, con las subunidades alfa, beta y gama; *Ras*= proteína G monomérica que intercambia GTP/GDP; *Raf*= quinasa de MEK, ó MAPKKK; *MEK*= quinasa de la quinasa MAP, ó MAPKK; *MAPK*= quinasa activada por mitógenos; *TK*= quinasa de tirosina; *PLCβ*= fosfolipasa C, isoforma beta; *PIP_2*= fosfatidil inositol 4,5 bifosfato; *IP_3*= inositol trifosfato; *DAG*= diacilglicerol; *Ca^{2+}*= calcio; *RET. ENDOP.*= retículo endoplasmático.

EL FACTOR DE CRECIMIENTO Y TRANSFORMACION BETA ($TGF\beta_1$)

El factor de transformación y crecimiento beta (TGFβ) y los polipéptidos relancionados con él, integran una familia de factores con gran influencia sobre el crecimiento, la diferenciación, la motilidad, la organización y la muerte celular. Algunos de ellos participan en el armado de la estructura básica del cuerpo, durante la etapa temprana de la embriogénesis, en mamíferos, ranas y moscas. Otros, controlan la formación de cartílagos, huesos y órganos sexuales; suprimen el crecimiento de las células epiteliales; promueven la reparación de heridas; ó regulan importantes funciones inmunológicas ó endócrinas [Massagué et al., 1994]. La mayoría de estos polipéptidos fueron aislados originalmente del medio de cultivo de células transformadas [De Larco y Todaro, 1978], pero se sabe también que son producto de células normales [Assoian et al., 1983; Roberts et al., 1983].

La familia del TGFβ está compuesta por polipéptidos diméricos, que son expresados por varios tipos celulares. Hasta el momento, han sido identificadas cinco isoformas, del TGFβ, cada una, producto de un gen separado, aunque estrechamente relacionados entre sí. Son conocidos como $TGF\beta_1$, $TGF\beta_2$, $TGF\beta_3$, $TGF\beta_4$ y $TGF\beta_5$. Los péptidos $TGF\beta_1$, $TGF\beta_2$ y $TGF\beta_3$ fueron encontrados y caracterizados en humano y ratón; el $TG\beta_4$ y el $TGF\beta_5$ en pollo y *Xenopus laevis*, respectivamente. Cabe la posibilidad, que existan otros factores en diversos organismos. Los polipéptidos diméricos del TGFβ son homodímeros ó heterodímeros, de acuerdo a los genes, que se expresen, en cada célula individual. Como ejemplo, puede citarse el caso de los megacariocitos porcinos, cuyas plaquetas contienen $TGF\beta_1$, $TGF\beta_2$ y $TGF\beta_{1\text{-}2}$. El grado de identidad, entre las distintas cadenas, varía del 64 al 82 por ciento. Las distintas funciones de cada isoforma, están siendo estudiadas. El $TGF\beta_1$ es la única isoforma encontrada en plaquetas humanas, siendo la fuente más abundante del mismo, y representa el 75-80% de las isoformas del TGFβ, que se encuentra en huesos [Derynck et al., 1988].

El gen del $TGF\beta_1$ humano mapea en el cromosoma 19q13.1-13.3 y contiene 7 exones. La secuencia de su ADN copia (ADNc) indica, que el monómero, es sintetizado como un péptido carboxilo terminal de 112 aminoácidos, a partir de un péptido precursor ó propéptido, de 390 aminoácidos. La secuencia del $TGF\beta_1$ está altamente conservada y es idéntica en humanos, monos, vacas, chanchos y pollos, mientras que existe una única sustitución aminoacídica, en el péptido del ratón. Ya que muchas células expresan el ARNm para una ó más formas del TGFβ, y virtualmente todas poseen receptores para este factor, la producción y activación del TGFβ debe estar fuertemente regulada. Los mecanismos propuestos incluyen: regulación transcripcional de los genes del $TGF\beta_1$, estabilidad de su ARNm, traducción del ARNm, almacenaje del TGFβ

dentro de los gránulos α de las plaquetas, activación del TGFβ latente, y la inactivación del TGFβ por proteínas circulantes y macromoléculas de la matriz extracelular [Piek et al., 1999].

El gen del TGFβ codifica una molécula precursora, que contiene: un péptido señal, la molécula activa del TGFβ, y un péptido de latencia asociado a este último (LAP). Los precursores son proteolíticamente procesados en el Golgi, y la proteasa involucrada sería la furina. Una vez, que la señal peptídica (aa 1-29) es removida, la furina cliva al producto del gen, entre dos residuos arginina en las posiciones 278 y 279, para producir el $TGF\beta_1$ maduro (residuos 279-390) y LAP (residuos 30-278). Antes de la secreción, los homodímeros del TGFβ unidos por puentes disulfuro, se asocian de forma no covalente con homodímeros de LAP, para producir el pequeño complejo latente de TGFβ, el cual es inactivo. LAP es aparentemente necesario para el correcto plegamiento del $TGF\beta_1$ durante su síntesis. LAP purificado, es capaz de asociarse al TGFβ maduro e inactivarlo, presumiblemente porque el complejo formado sería incapaz de unirse al receptor del TGFβ [Grande,1997].

El complejo latente de TGFβ, aislado de los gránulos α de plaquetas ó de varias líneas celulares en cultivo, consiste de complejos latentes grandes, que contienen el complejo pequeño y una proteína adicional de 125 a 160 kDa, la proteína de unión al TGFβ latente (LTBP). La LTBP contiene múltiples repeticiones del tipo factor de crecimiento epidermal y se une al complejo latente pequeño mediante puentes disulfuro. A pesar que LTBP no es requerida para la latencia, esta proteína adicional puede facilitar la secreción del gran complejo latente.

El TGFβ puede ser liberado de los complejos latentes, y por lo tanto, activado, por acidificación transiente (pH menor de 3,5), alcalinización (pH mayor de 12,5), exposición a 0.02% de sodio dodecil sulfato ú 8 M urea, pero no por exposición a altas concentraciones de NaCl. El TGFβ latente, producido por fibroblastos, puede ser activado por proteasas como la plasmina y la catepsina D. Las estructuras de carbohidratos también juegan un rol en la activación del TGFβ. El TGFβ latente contiene manosa-6-fosfato y puede unirse al receptor para este carbohidrato. El tratamiento con glicosidasa, lleva a la deglicosidación de LAP y activa al TGFβ latente, sin afectar al homodímero $TGF\beta_1$ ó a LTBP.

Una vez activado, el TGFβ es un péptido dimérico de 25 kDa, donde cada monómero tiene 112 aminoácidos, y están unidos por puentes disulfuro, que son necesarios para la actividad biológica [Massague, 1990; Roberts y Sporn, 1990]. Una vez activo, puede unirse a otras proteínas del suero ó matriz extracelular. En el plasma, esencialmente todo el TGFβ está acomplejado con la α2-macroglobulina, que tendría como rol la limpieza de este factor, a través de la unión de este complejo, al receptor de la α2-macroglobulina. También puede asociarse a la fibronectina,

formando un complejo activo, y con el colágeno IV, que podría almacenarlo en la matriz extracelular en su forma activa [Clark y Coker, 1998[.

El TGFβ induce sus respuestas a través de la interacción con un grupo de receptores específicos. Estos son glicoproteinas de transmembrana y hasta ahora han sido identificados tres tipos, denominados I, II y III, cuyos pesos moleculares son 53, 75-85 y 200-400 kDa, respectivamente. El receptor tipo III (TβR-III), también llamado betaglicano, es un proteoglicano transmembrana de 853 aminoácidos, con una región extracelular grande, que contine cadenas de sulfato de condroitina y de heparan, glicosaminoglicanos, y carbohidratos compuestos por mitades disacáridas repetidas. A esta región le sigue la región transmembrana y una corta región citoplasmática (43 aa ricos en serinas y treoninas), pero no tiene una estructura señalizante discernible, típica de receptores con actividad quinasa. Las regiones, transmembrana e intracelular, tienen alta homología con la endoglina, una proteína dimérica de 180 kDa, expresada por células endoteliales y del mesangio del riñón. Mientras que el TβR-III une a todas las isoformas del TGFβ con igual afinidad, la endoglina solo tiene afinidad por el $TGF\beta_1$ y $TGF\beta_3$. La función del TβR-III es actuar como modulador del acceso del ligando, a sus receptores señalizantes. Las células pueden liberar el betaglicano en forma soluble, por lo tanto, el TβR-III puede aumentar ó inhibir la señalización celular del TGFβ. Este receptor no está involucrado directamente en la transducción de señales, dado que varias células, que responden al TGFβ, no expresan este receptor. Y en el mismo sentido, no se han encontrado células, que hayan perdido la respuesta al TGFβ, y a su vez, tengan un defecto en el TβR-III [Piek et al., 1999].

Los receptores tipo I y II (TβR-I, TβR-II), son miembros de una familia de quinasas transmembrana de ser/thr en expansión. Ambos receptores tienen una estructura general similar, una región extracelular rica en cisteínas (llamada "caja de cisteínas"), una única región transmembrana y una región intracelular, que consiste mayormente en el dominio con actividad quinasa de ser/thr. Sin embargo, tienen diferencias importantes; el TβR-II tiene una cola C-terminal rica en serina y treonina, de función todavía desconocida, mientras que, el TβR-I tiene un dominio intracelular juxtapuesto con la membrana plasmática, rico en treoninas y serinas, con una secuencia central SGSGSG, conocido como el dominio GS, el cual juega un rol crucial en la señalización. Para la señalización se requieren ambos receptores. El TβR-II une el ligando con alta afinidad, pero no puede señalizar en ausencia del TβR-I. El TβR-I no puede unir ligando, salvo en presencia del TβR-II, y el complejo, que se forma entre los dos receptores más el ligando, son absolutamente necesarios para la señalización. Los TβR-I y II estarían involucrados en la transducción de la señal, mientras que el TβR-III regularía el acceso del TGF-β a los otros dos receptores. Los tres tipos se hallan presentes en un nivel basal, en la mayoría de las células normales o transformadas [Lin y Lodish, 1993; Massagué et al., 1994; Saltis, 1996].

El TβR-II tiene un dominio con actividad quinasa constitutivamente activa y se autofosforila en serina y treonina, así como también, es blanco de quinasas celulares, que todavía no han sido identificadas. Ni su actividad quinasa, ni sus sitios de fosforilación, están regulados por la unión al ligando. El TβR-II se une al ligando, y este complejo es reconocido luego por el TβR-I. El TβR-I es fosforilado luego por el TβR-II, en las serinas y treoninas del dominio GS, en un proceso independiente del ligando y unidireccional. Se presume, que esta fosforilación induce la actividad quinasa del TβR-I, posibilitando la fosforilación de sustratos celulares, y así propagar la señal hacia abajo. El modelo de activación del receptor propone, por lo tanto, que el rol del ligando es poner juntos a los dos receptores para facilitar la fosforilación y activación de la quinasa del TβR-I. El TβR-I actúa como el transductor de la señal, mientras que el rol del TβR-II es actuar como el receptor primario para el ligando y activador del TβR-I. Este modelo está apoyado por estudios de ingeniería genética, con ambos receptores modificados tanto en sus actividades quinasas, como en sus sitios de fosforilación.

Utilizando los dominios citoplasmáticos de TβR-I y II, se identificaron algunas proteínas, que se unen a los mismos, pero muchas de ellas no tienen una función definida todavía, y en todos los casos, no se ha demostrado una relación directa con la señalización de los receptores [Piek et al., 1999].

El TβR-II, posee secuencias consenso de activación de proteína G [Kataoka et al., 1993], y se cree, que la fosforilación del receptor tipo I mediada por el II, permitiría la interacción de este último receptor con una proteína G, y de esta manera, comenzaría el camino de señalización activado por el $TGF\beta_1$. La proteína G, a su vez, activaría a Ras; en particular, la p21 Ras proto-oncogen es activada por el $TGF\beta_1$, cuando inhibe la proliferación celular [Mulder y Morris, 1992: Abdellatif et al., 1994]. Esta enzima, a su vez, es capaz de activar una serie de fosforilaciones, comenzando por Raf (también conocida como MAPKKK), una familia de quinasas de ser/thr. El complejo Ras-Raf, es el primer componente, que activa el camino de señalización de la MAPK, y se cree, que el $TGF\beta_1$ podría actuar a través de esta vía de señalización, dado que activa la expresión de uno de los genes involucrados en este camino [Yamaguchi et al., 1995]. Este gen codifica para una quinasa, llamada quinasa 1 activada por TGFβ (TAK1), que tiene un dominio quinasa en su extremo N-terminal, con un 30% de similitud al de c-Raf y MEKK, y actúa como una MAPKKK en el camino de Ras/ERK, y de la quinasa activada por estrés/quinasa del N-terminal de c-Jun (SAPK/JNK), respectivamente. TAK1 también muestra el mismo nivel de homología, que la quinasa llamada MUK, capaz de activar también a SAPK/JNK. Se demostró, que el $TGF\beta_1$, estimula la actividad quinasa de TAK1, en forma dependiente de la concentración y tiempo. Existiría un módulo de MAPK involucrado en el camino de señalización del $TGF\beta_1$,

pero aún falta establecer la conexión de TAK1 con los receptores del TGFβ, y el resto de los componentes de la señalización por MAPK.

Experimentos en Drosophila, Caenorhabditis, Xenopus y en células de mamíferos llevaron a la identificación de una familia altamente conservada de moléculas, que son claramente componentes del camino de señalización del TGFβ. El primer miembro de la familia, que se clonó, fue el gen llamado Madre contra decapentaplégico, ó Mad (Mother against decapentaplegic), que originalmente fue identificado, como una mutación, en la búsqueda sistemática de genes, que actúan en el camino de señalización de decapentaplégico, en Drosophila [Raftery et al., 1995]. El rol conservado de MAD en la señalización del TGFβ, fue confirmado por la identificación de proteínas en *C. elegans*, homólogas a las MADs en Drosophila, involucradas también en el camino de señalización del mismo factor [Savage et al., 1996]. En las células de mamíferos, la activación de los receptores de la familia del TGFβ, resulta en la fosforilación de MADs (también llamadas Smad) específicas [Hoodless et al., 1996; Eppert et al., 1996; Zhang, et al., 1996], sugiriendo nuevamente, que diferentes MADs homólogas median las respuestas de diferentes moléculas TGFβ señalizantes. Hasta el presente, existen ocho Smads diferentes en mamíferos y pueden ser subdividas en tres subclases: las Smads activadas por receptores (R-Smads), las Smads socias comunes (Co-Smads), y las Smads inhibidoras (anti-Smads). Las R-Smads y las Co-Smads, son homólogas en sus regiones amino y carboxi terminales, llamados dominios MH1 y MH2, respectivamente. Estos dominios están conectados por una región de unión, rica en prolina. Las R-Smads tienen motivos de fosforilación en su región carboxilo. La especificidad de la propagación de la señal a las moléculas Smads, principales componentes río abajo en la señalización de los receptores quinasas de ser/thr, está determinada por una región altamente conservada en el TβR-I. Se sabe, que distintas serinas y treoninas del TβR-I, afectan diferentes caminos de señalilzación, conduciendo a distintos efectos inducidos por el TGFβ. [Piek et al., 1999]

Las R-Smads se encuentran como monómeros, en el citoplasma, e interaccionan con TβR-I activado, después de la unión del ligando al receptor. Se definió la función de las Smad2 y Smad3, como mediadores en la señalización del TGFβ y activina, a través de estudios con ratones deficientes para una ú otra Smad. El reclutamiento de las R-Smads al receptor, está mediada por la acción de SARA, una proteína, que contiene un dominio con cinco dedos de zinc, que interacciona tanto con el TβR-I, como con las Smad2 y Smad3. Después de ser fosforiladas por el receptor, en el dominio MH2, las Smad 2 y 3 se activan, y se dispara la homo ó heterodimerización con las Co-Smads ú otras R-Smads. Esto lleva a pensar, que los complejos de homo R-Smads, hetero R-Smads y los R-Smads/Co-Smads, deben controlar diferentes respuestas biológicas.

La Smad4 es la Co-Smad en mamíferos y juega un rol crítico en la señalización del TGFβ_1, también demostrado por líneas celulares deficientes en esta Smad, y por líneas celulares tumorigénicas con defectos en la misma. Las Co-Smads no interaccionan con el TβR-I, y no poseen motivos de fosforilación en su extremo carboxilo terminal. Una vez que forman complejos con las R-Smads, son translocadas al núcleo. Las Co-Smads necesitan asociarse con las R-Smad activas, para ser translocadas al núcleo, y se sabe, que el extremo carboxilo terminal es el requerido para el tráfico nuclear. No está claro cuál es el mecanismo que permite la salida de las Smads del núcleo.

Una vez en el núcleo, las R y Co-Smads están involucradas en la regulación transcripcional de genes blanco, actuando como co-activadores de la transcripción. La heterodimerización de las Co-Smads y R-Smads es obligatoria para sus propiedades de activadores de la transcripción. También, interaccionan con factores de transcripción, y esto se ha observado para otros miembros de la superfamilia del TGFβ, como la activina. Pueden unirse directamente al ADN de algunos promotores.

Las Smad6 y Smad7, en mamíferos, han sido caracterizadas como inhibidores de la transducción de la señal del TGFβ. Son homólogas a las R y Co-Smad, en el dominio MH2, pero no poseen sitios de fosforilación, y competirían con las R-Smads, en la unión al TβR-I, y en la unión con las Co-Smad. Son expresadas inmediatamente después de la inducción del TGFβ, proporcionando un mecanismo de autoinhibición en la señalización de este factor. Se propone, que las R y Co-Smads, estarían directamente involucradas en la regulación transcripcional del gen de la Smad7. Smad7 se encuentra en el núcleo, y una vez, que la célula recibe el estímulo por TGFβ_1, se acumula rápidamente en el citoplasma, desconociéndose el mecanismo de transporte nuclear.

Los genes que responden al TGFβ_1 en forma positiva, son el inhibidor 1 del activador del plasminógeno (PAI-1), α2 (I) colágeno, WAF1/Cip1/p21 y el TGFβ_1 en sí mismo; y el único regulado negativamente hasta el momento, es transin. En las zonas promotoras de genes inducidos por TGFβ_1, como el colágeno tipo VII, JunB, y PAI-1, se han identificado elementos únicos, con los cuales interaccionan las Smad3 y Smad4. Los elementos, a los cuales se unen las Smads (SBEs), en estos promotores, están altamente relacionados entre sí, y poseen como sitio de unión para Smad3 y Smad4, una secuencia con el motivo AGAC.

El mapeo de los promotores de dichos genes, sirve para la identificación de factores de transcripción, y se han caracterizado parcialmente algunos de ellos. Se incluyen entre estos a los miembros de la familia Sp1, CTF/NF-1 y miembros de la familia de factores de transcripción AP-

1/ATF. La regulación positiva de de la familia AP-1, se vió afectada por inhibidores de quinasas de ser/thr como H7, pero no con inhibidores de PKC ó inhibidores de la vía de la proteína G. Sólo un factor de transcripción, el CREB-1, perteneciente a la familia ATF, se demostró, que es fosforilado en respuesta al $TGF\beta_1$, a los 15 minutos de estimulación, por una quinasa todavía desconocida, y no es dependiente del AMPc.[Kramer et al., 1991]

En las zonas promotoras de varios genes blancos del TGFβ, se han identificado varias SBEs localizadas junto a otros sitios, correpondientes a otros factores de transcripción. La caracterización de sitios de unión para las Smad, en el promotor de la colagenasa, localizó a estos sitios, en el elemento de respuesta a TPA (TRE), que contiene los sitios de unión para el factor de transcripción AP-1, formado por el dímero entre c-Fos y c-Jun. En experimentos de transfección con plásmidos, se demostró, que las Smads pueden activar la transcripción de genes cuyos promotores tienen elementos TRE, en ausencia de complejos AP-1. Se sabe además, que las Smad pueden interaccionar con JunB y JunD. Esto pondría en evidencia, que existe un cruzamiento entre los caminos de señalización, que involucran a las Smad con los componentes de la MAPK/JNK. Las Smads también interacciónan con el factor de transcripción, p300/CBP, y dicha interacción ocurre a través de la pérdida de la estructura de la cromatina, ó por aumento de la afinidad al ADN de ciertos factores de transcripción, a través de su actividad intrínseca de acetiltransferasa. Además, las Smads actúan como factor puente, entre factores de transcripción y la maquinaria basal de transcripción. Los promotores de los genes de p21 y p15 no tienen sitios SBEs, pero si tienen sitios para Sp1, que es otro factor de transcripción, también regulado por TGFβ.

Como se mencionó antes, se observó que el $TGF\beta_1$ es capaz de activar a la quinasa TAK1, y es capaz de inducir genes bajo el promotor de PAI-1, que contiene sitios de unión para AP-1. Un blanco de la TAK1, más abajo en la cascada de señales, es la quinasa 4 de la quinasa activada por mitógenos (MKK4)/quinasa activada por estrés/quinasa SEK1 regulada por señal extracelular, que está involucrada en el camino de señalización de SAPK/JNK, que conduce finalmente a la activación de c-Jun. En los últimos años, se han acumulado varias evidencias, para postular la intervención de esta vía de señalización, en los caminos del TGFβ. Y el nivel de interacción estaría, entre la Smad3 y c-Jun, ya que se asocian después del estímulo con $TGF\beta_1$, y sinergizan la activación del gen, bajo el promotor con sitios de unión para AP-1. También se han descubierto varias secuencias, en la región de unión de los dominios MH1 y MH2 de las Smads, que serían reconocidas por varias ERK y JNK. Se desconoce bajo qué condiciones, las señales de la ERK, inhibirían las respuestas inducidas por TGFβ vía Smad, ó mediarían caminos independientes de Smad.

Se propone, que el mecanismo de activación de la transcripción mediado por el $TGF\beta_1$, sería a través de la activación de factores de transcripción presentes ya en la célula, dado que se observó que los inhibidores de la síntesis proteica, no impiden la expresión génica.

En muchos tipos celulares, el TGFβ induce la estimulación de la proliferación celular, mientras que en otros tipos, es un potente inhibidor del crecimiento, que bloquea el ciclo celular, generalmente en la fase G_1. En algunas líneas celulares, despliega ambas respuestas biológicas, alternativamente. Las circunstancias, que permiten una u otra respuesta, dependen del tipo celular, de la concentración del TGFβ, de las condiciones de cultivo, de la densidad celular, de la presencia de otras moléculas reguladoras de la proliferación celular, y de la secuencia de la adición de las mismas.

En algunos trabajos realizados, se observó que el $TGF\beta_1$ controla la proliferación celular, a través del mecanismo de la regulación de la transcripción. Como ejemplo, en la situación donde induce el arresto de la progresión del ciclo celular, se observa que regula en forma negativa la expresión de los genes de las CDKs; en forma positiva, la de los CDKi (p15, p21 y p27) [Saltis, 1996]. En el caso de inducir la proliferación, también se observó que aumenta la expresión de c-myc; mientras que si inhibe la proliferación, la expresión de este último, disminuye. En las células del tejido conectivo normal, el $TGF\beta_1$ a bajas concentraciones, induce la producción del factor de crecimiento PDGF-AA, el cual estimula la proliferación celular; a altas concentraciones, el $TGF\beta_1$ retromodula los niveles de ARNm de la subunidad alfa del receptor del PDGF, y por lo tanto no se estimula la proliferación [Grande, 1997]. También, se ha observado, que en el caso de los fibroblastos murinos AKR-2B, el $TGF\beta_1$ es capaz de inducir la proliferación, y se observó, que la toxina de Pertussi (PT), es capaz de inhibir la incorporación de timidina tritiada, lo que sugeriría el uso de la proteína heterotrimérica G en la vía de señalización activada. Se ha observado, que el TβR-II, tiene secuencias semejantes a otras proteínas, que interaccionan con la proteína G. Y se postula, que la fosforilación del TβR-I por el TβR-II, facilitaría de alguna manera, el acceso del TβR-II a la proteína G, así como también, la formación del complejo entre ligando y receptores, generaría motivos requeridos, para la activación de la proteína G [Kolodziejczk y Hall, 1996].

En la figura N°8 se detalla un esquema de las vías señalizantes activadas por TGFβ, diseñada a partir de los resultados obtenidos hasta el momento, por distintos grupos de investigación.

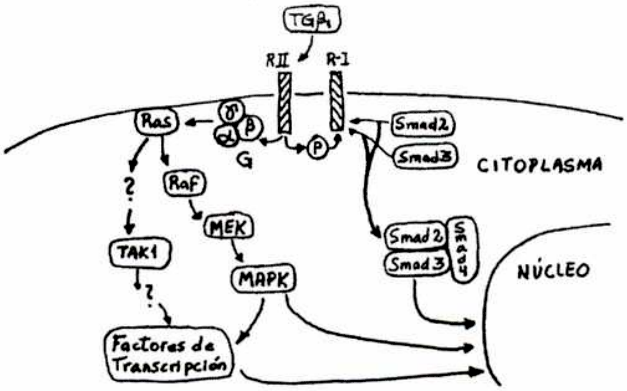


Figura N°8. Caminos de Señalización Activados por $TGF\beta_1$
Abreviaturas: $TGF\beta_1$= factor de crecimiento y transformación beta uno; *R-I y R-II*= receptores tipo I y II del TGFβ; *Smad 2, 3, 4*= moléculas señalizantes 2, 3, y 4, activadas por TGFβ; *G*= proteína trimérica G, con las subunidades alfa, beta y gama; *Ras*= proteína G monomérica que intercambia GTP/GDP; *Raf*= quinasa de MEK, ó MAPKKK; *MEK*= quinasa de la quinasa MAP, ó MAPKK; *MAPK*= quinasa activada por mitógenos; *TAK1*= quinasa activada por $TGF\beta_1$.

MODELO EXPERIMENTAL

En mamíferos, el estudio de la regulación del inicio del ciclo celular, se ha realizado fundamentalmente en cultivo de tejidos celulares, debido a la dificultad de realizarlo *in vivo,* donde son muchos los factores, que interaccionan en la respuesta fisiológica del animal. Esta metodología ha permitido dilucidar nuevos procesos regulatorios, como los mencionados anteriormente. Desde luego, estos sistemas son una aproximación a lo que ocurre *in vivo*, debido a la disrupción de la arquitectura del tejido, y a la ausencia de otros factores presentes en el organismo intacto. Se usan distintos tipos de estrategias para analizar los eventos específicos del ciclo, que incluyen: el uso de inhibidores específicos; cambios en las condiciones fisiológicas; y el uso de factores de crecimiento y de hormonas, técnica de ingeniería genética, entre otros.

Un modelo adecuado para este estudio es la línea celular de fibroblastos de ratón Swiss 3T3 [Todaro y Green, 1963]. Estas células pueden ser cultivadas en condiciones experimentales bien definidas y se arrestan en la fase G_0/G_1 del ciclo celular cuando llegan a confluencia ó cuando se agotan los factores del suero presentes en el medio [Otto y Jiménez de Asúa, 1985; Rozengurt, 1986]. El agregado de suero fresco ó de mitógenos a dichos cultivos determina un nuevo inicio del ciclo celular.

OBJETIVOS

ANTECEDENTES DEL TRABAJO DE TESIS

Uno de los objetivos principales del laboratorio, es desentrañar los caminos de señalización que intervienen en la regulación del ciclo celular. Más precisamente, los caminos señalizantes activados en la primer fase del ciclo celular, G_1. En particular, se han estudiado y descripto algunos de los mecanismos de transducción de señales activados por la $PGF_{2\alpha}$ (300 ng/ml), cuando ésta despierta la respuesta mitogénica en la línea celular Swiss 3T3. En las células Swiss 3T3, la $PGF_{2\alpha}$ activa, como una de las primeras actividades enzimáticas intervinientes en la cascada de señales, a la PKC y varias quinasas de tirosina (TKs), durante la inducción de la síntesis de ADN [Goin et al., 1993; Zachary et al., 1991; Jiménez de Asúa y Goin, 1994; Jiménez de Asúa y Goin, 1997]. Además, la $PGF_{2\alpha}$ aumenta, en forma muy rápida, los niveles intracelulares del inositol trifosfato (IP_3), diacilglicerol (DAG), y la movilización del calcio (Ca^{2+}) [Goin et al., 1993; Jiménez de Asúa y Goin, 1994; Corps et al., 1989].

En el trabajo de Masuni et al. (1991), se observó que el $TGF\beta_1$ es mitogénico en las células Swiss 3T3. De acuerdo a la densidad de células sembradas, las monocapas no llegan a confluencia en el momento de agregado el $TGF\beta_1$. Se han publicado varios trabajos donde se observa, que las respuestas desplegadas por el $TGF\beta_1$, dependen de la densidad celular del cultivo, entre otros. También, se ha demostrado, que los componentes del ciclo celular, varían de acuerdo al grado de confluencia del cultivo. Quedó demostrado por nuestro laboratorio, que en las células Swiss 3T3, cultivadas hasta el estado de monocapas confluentes y aquietadas en la fase G_0/G_1 del ciclo celular, el $TGF\beta_1$ (0,5 - 2 ng/ml) no es mitogénico en sí mismo, ni inhibe la mitogénesis, ya que es capaz de amplificar la señal de inducción de síntesis de ADN ejercida por la $PGF_{2\alpha}$ [Gómez de Alzaga et al., 1994]. Los procesos de señalización del $TGF\beta_1$, en las células Swiss 3T3, difieren de los disparados por la $PGF_{2\alpha}$, ya que éste no estimula el metabolismo de los fosfatidil inositoles, ni tampoco aumenta el flujo del Ca^{2+} [Brown y Holley, 1987]. Sin embargo, el $TGF\beta_1$ despliega una acción concertada con algunos eventos dependientes de la $PGF_{2\alpha}$.

Los resultados obtenidos en nuestro laboratorio muestran que la acción potenciadora del $TGF\beta_1$, sobre la estimulación de la $PGF_{2\alpha}$, se ve a su vez aumentada mediante el agregado de insulina. Por otra parte, el $TGF\beta_1$ (1 ng/ml) y la insulina (100 ng/ml), no son mitogénicos en sí mismos, pero juntos son capaces de estimular la síntesis de ADN. Estos resultados llevaron a postular las diferencias existentes entre la acción del $TGF\beta_1$ y la insulina, las cuales son contrarias a las propuestas por Brown y Holley (1987) [Gómez de Alzaga et al., 1994]. Por otro lado, este efecto entre el $TGF\beta_1$ y la insulina, es la que explica, que en el trabajo de Chatani et al. (1995), el $TGF\beta_1$ sea mitogénico en la línea celular Swiss 3T3. En dicho trabajo, para lograr la quiescencia de las monocapas celulares, incubaron éstas en un medio libre de suero, pero que contenía 1 mg/ml de insulina.

El agregado de la prostaglandina E_1 (100 ng/ml, PGE_1) no potencia la estimulación de síntesis de ADN inducida por $PGF_{2\alpha}$ más $TGF\beta_1$, en cambio la insulina sí es capaz de hacerlo. Esto sugiere que el $TGF\beta_1$ y la PGE_1 podrían estar disparando algunos eventos en común [Gómez de Alzaga et al.,1994]. La acción del $TGF\beta_1$ no involucra la síntesis de PGE_1, ya que la indometacina, que bloquea la formación de esta última, no disminuye la acción potenciadora del $TGF\beta_1$ [Tashjian et al., 1985; Díaz et al., 1989]. Estos resultados sugieren que la insulina, el $TGF\beta_1$ y la PGE_1, amplifican la acción de la $PGF_{2\alpha}$ activando distintos eventos.

El 1-oleil-2-acetil-glicerol (OAG), es un análogo del DAG, permeable a la membrana plasmática, que activa la PKC y TKs, sin que estimule la síntesis de ADN, en las células Swiss 3T3 [Goin et al., 1993]. De los resultados obtenidos en el laboratorio, fue interesante observar que el agregado de OAG más $TGF\beta_1$, estimula la síntesis de ADN [Gómez de Alzaga et al., 1994]. Estos resultados sugerirían que el $TGF\beta_1$ necesitaría combinar sus señales con la activación de la PKC y/o TKs, para despertar la respuesta mitogénica en las Swiss 3T3 [Gómez de Alzaga et al.,1994].

OBJETIVOS DE LA TESIS

A partir de los resultados obtenidos en nuestro laboratorio, se intentó determinar en primer lugar, cuál de las dos primeras actividades enzimáticas inducidas por la $PGF_{2\alpha}$, PKC y/o TKs, era la señal más importante en la sinergia entre esta prostaglandina y el $TGF\beta_1$. Se comenzó el estudio observando el rol de la PKC (de sus isoformas) en la integración de las señales de la $PGF_{2\alpha}$ y el $TGF\beta_1$, y para ello se pretrataron las monocapas, confluentes y aquietadas de células Swiss 3T3, con el éster de forbol, 12-tetradecanoilforbol 13-acetato (TPA; 800 nM), por períodos prolongados. Mediante este tratamiento se elimina la PKC, tanto su actividad como la presencia de varias de las diferentes isoformas (comprobado mediante el empleo de anticuerpos monoclonales y a través de la medición de la actividad de la PKC). Este procedimiento se conoce como "retro-modulación" (en inglés "down-modulation") [Rodriguez-Pena y Rozengurt, 1984; Young et al., 1987, Goin et al., 1993]. Bajo estas condiciones se observó que el $TGF\beta_1$ es capaz de inducir la síntesis de ADN *"per se"*, y esta inducción es dependiente de la concentración del mismo.

Por lo expuesto, resultó de extremo interés dilucidar qué modificaciones moleculares ocurrían en las células Swiss 3T3, durante el pretratamiento con TPA, que permitían al $TGF\beta_1$ inducir la mitogénesis, a diferencia de las células sin pretratar. Los objetivos generales planteados fueron: dilucidar las señales activadas por el $TGF\beta_1$, que inducen la mitogénesis en ausencia de PKC (en

cultivos pretratados con ésteres de forbol), la importancia de la ausencia de la PKC, en la mitogénesis estimulada por el $TGF\beta_1$ en células pretratadas con TPA, y las señales que activa el $TGF\beta_1$ cuando potencia la acción mitogénica de la $PGF_{2\alpha}$, en células sin pretratar y pretratadas con TPA.

Los objetivos parciales fueron:

- Comprobar que el $TGF\beta_1$ es realmente mitogénico. Si realmente induce un aumento en el número celular, medir otros parámetros como la duración de la fase G_1, y la velocidad de entrada en la fase S, de este factor de crecimiento.
- Determinar si la sinergia existente entre el $TGF\beta_1$ y la $PGF_{2\alpha}$ ocurre en ambas condiciones, y observar si la duración de la fase G_1 y/o la velocidad de entrada de la fase S sufren alguna modificación.
- Dada la importancia de las ciclinas en la regulación de la progresión a través del ciclo celular, es importante determinar si el $TGF\beta_1$ ejerce algún tipo de control sobre la expresión de la ciclina D_1, en células pretratadas con TPA.
- Determinar si la actividad mitogénica del $TGF\beta_1$ es dependiente del TPA y si el efecto mitogénico se debe a la acción del TPA sobre la PKC y/o sobre otros eventos.
- Buscar otros compuestos químicamente diferentes al TPA, con la misma capacidad de retromodular a la PKC.
- Caracterizar a través del uso de inhibidores y activadores de la PKC, si es la ausencia de la misma, la que permiten al $TGF\beta_1$ estimular la proliferación celular en células Swiss 3T3 pretratadas con TPA.
- Estudiar la expresión de los receptores del $TGF\beta_1$, en células sin pretratar y pretratadas con TPA, como así también la actividad de los mismos.
- Estudiar las vías señalizantes como las MAPKs, que convergen en la expresión de las ciclinas.
- Estudiar las sinergias entre el $TGF\beta_1$, insulina y PGE_1, en ambas condiciones.
- Estudiar el camino señalizante específico del $TGF\beta_1$, las Smads, en ambas condiciones.

Los resultados de esta tesis ayudarán a conocer las vías señalizantes utilizadas por el $TGF\beta_1$, en las células Swiss 3T3. Se busca profundizar en el conocimiento de las moléculas señalizantes activadas específicamente por el $TGF\beta_1$, y también aquellas vías activadas por este factor, que son comunes a varios factores de crecimiento. Se intenta descifrar, qué actividades son las modificadas por el $TGF\beta_1$, una vez que entra en contacto con sus receptores, e induce la proliferación celular, en células pretratadas con TPA.

RESULTADOS

Y

CONCLUSIONES

1- Estimulación de la Síntesis de ADN Inducida por el $TGF\beta_1$

El factor de transformación y crecimiento beta uno ($TGF\beta_1$), no es capaz de inhibir o estimular la división celular, cuando es añadido a monocapas celulares confluentes y detenidas en la fase G_0 de la línea celular Swiss 3T3. Agregado en distintas concentraciones, no tiene efecto sobre la síntesis de ADN. Sin embargo, cuando se lo adiciona junto con la prostaglandina F2α ($PGF_{2\alpha}$), es capaz de potenciar el efecto mitogénico de esta última [Gómez de Alzaga et al., 1994]. De los caminos de señalización intracelulares estimulados por la $PGF_{2\alpha}$, el primero estudiado en el laboratorio, fue el camino de transducción de señales que involucra a la quinasa de proteínas C (PKC), a través de la síntesis de diacilglicerol (DAG) y de la activación de esta enzima [Goin y Jiménez de Asúa, 1992; Goin et al., 1993]. Además, la PKC presenta un interés farmacológico como posible blanco anti cancer, por encontrarse en el camino de señalización de varios mitógenos [Watters y Parsons, 1999]. Una de las estrategias utilizadas, para estudiar la influencia de la actividad de la PKC, en la potenciación de la inducción de la síntesis de ADN de la $PGF_{2\alpha}$, por el agregado de $TGF\beta_1$, fue el tratamiento prolongado de las células con el éster de forbol, 12-O-tetradecanoilforbol 13-acetato (TPA, 800 nM), durante 96 horas, con el fin de retro-modular la PKC (fenómeno que en inglés se conoce como "down-modulation") [Rodriguez- Pena y Rozengurt, 1984; Young, S. et al., 1987; Olivier y Parker 1992]. En el laboratorio se demostró que el pretratamiento con TPA (800 nM, 96 hs.), induce la desaparición de la PKC, medida a través de la fosforilación del péptido sustrato 80 MARCKS [Goin et al., 1993].

El $TGF\beta_1$ no indujo la síntesis de ADN después de 28 horas de agregado a células confluentes y aquietadas, sin pretratamiento. Cuando las células fueron pretratadas con TPA (800 nM, 96 hs.), se observó que el $TGF\beta_1$, luego de 28 horas, fue capaz de estimular la iniciación de la síntesis de ADN (figura N°1). A la concentración de 1 ng/ml, el 50 % de las células entra en fase S. La $PGF_{2\alpha}$ indujo la síntesis de ADN después de 28 horas, medida como un 22 % de células en fase S, en células sin pretratar; mientras que en las células pretratadas con TPA, dicha actividad se encontró inhibida. La sinergia entre ambos mitógenos, se reflejó en el porcentaje de células en fase S en ambas condiciones, 83 y 72 % de núcleos marcados en células sin pretratar y pretratadas con TPA, respectivamente.

Con el objeto de determinar que el $TGF\beta_1$, además de inducir la síntesis de ADN, también estimula la proliferación celular, se realizaron las mismas estimulaciones arriba mencionadas y después de 48 hs., se contó el número de células en condiciones sin pretratamiento y en monocapas tratadas previamente durante 96 horas con TPA (800 nM) (ver M y M). Los resultados se muestran en la tabla N°1.

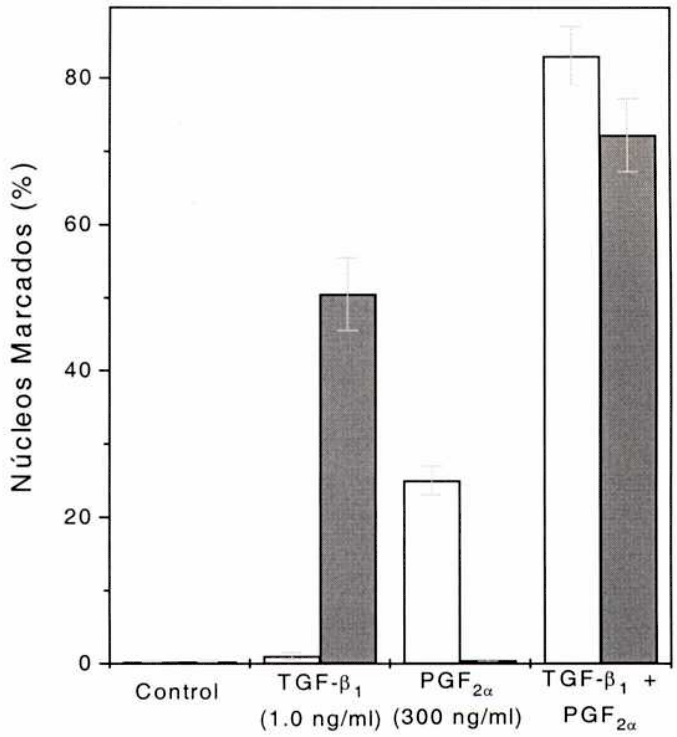


FIGURA N°1. Efecto del TGFβ_1 en la Línea Celular de Ratón Swiss 3T3.
Se cultivaron fibroblastos de ratón Swiss 3T3 como se indica en Materiales y Métodos (M y M). Una parte de los cultivos, fueron pretratados con TPA (800 nM), durante 96 horas. Al llegar a confluencia y arresto de la división celular, las monocapas fueron lavadas y se les agregó medio condicionado junto a los distintos estímulos indicados en la figura. El porcentaje de células en fase S, se determinó 28 horas después de las adiciones de los estímulos, más el agregado de 1 μM de timidina [metil ^{3}H] (3 μCi/ml). Finalmente, los cultivos fueron procesados para la observación de los núcleos marcados, mediante la técnica de autorradiografía (ver M y M). Barras de color blanco: células sin pretratar; barras de color gris: células pretratadas con TPA (800 nM), durante 96 hs. Los resultados corresponden al promedio de duplicados del experimento más representativo, de tres realizados en forma independiente.

Los resultados que se muestran en la tabla N°1, indican una correlación directa entre el porcentaje de células en fase S y el número de células, en todas las condiciones ensayadas. Los resultados obtenidos con el TGFβ_1 (1 ng/ml), muestran que hay un 50 % más de células (10.8 x 10^{-5} células por placa de Petri), en aquellas monocapas pretratadas con TPA, con respecto a las células sin pretratar que no han recibido estimulo alguno (7.2 x 10^{-5}). Es decir, el TGFβ_1 en condiciones de retro-modulación de la PKC, induce la síntesis de ADN y la división celular, al igual que la PGF$_{2\alpha}$ y el suero (la primera en células sin pretratar y el segundo en ambas

condiciones). Este efecto de estimulación de la proliferación celular, también se observa en la sinergia del $TGF\beta_1$ con la $PGF_{2\alpha}$, en ambas condiciones.

TABLA N°1. Acción del $TGF\beta_1$ en la Duplicación del ADN y División Celular, en Monocapas Confluentes y Arrestadas de Células Swiss 3T3.

Adiciones	Sin Pretratar con TPA		Pretratadas con TPA	
	Células en fase S (%)	Número de Células x 10^{-5}	Células en fase S (%)	Número de Células x 10^{-5}
Ninguna	0.5 ± 0.05	5.5 ± 0.6	0.5 ± 0.02	7.2 ± 0.5
$TGF\beta_1$	0.5 ± 0.02	5.6 ± 0.5	50.0 ± 5.00	10.8 ± 1.0
$PGF_{2\alpha}$	22.0 ± 2.00	6.6 ± 0.8	0.5 ± 0.05	7.3 ± 0.5
$TGF\beta_1 + PGF_{2\alpha}$	83.0 ± 4.00	11.0 ± 0.8	75.5 ± 6.00	12.6 ± 1.0
FBS	95.0 ± 8.00	14.3 ± 1.3	95.0 ± 5.00	21.6 ± 1.5

Las células Swiss 3T3 fueron plaqueadas y cultivadas como se indica en M y M. Tres días después, con el cambio de medio algunos cultivos celulares recibieron el agregado de TPA (800 nM). Las adiciones a las células confluentes y aquietadas, fueron como sigue: $TGF\beta_1$ 1.0 ng/ml, $PGF_{2\alpha}$ 300 ng/ml, y Suero Fetal Bovino (FBS) 10% (v/v). Las células fueron expuestas a 1 μM de timidina metil[^{3}H] (3 μCi/ml), durante 28 horas. El porcentaje de células en fase S, fue determinado por autorradiografía como se indica en la figura N°1. El número de células se observó 48 horas después del agregado de los estímulos (ver M y M). Los resultados son el promedio de duplicados de tres ensayos independientes.

De los resultados presentados arriba en la figura N°1 y la tabla N°1, se concluye en primer lugar que el $TGF\beta_1$ se comporta como un mitógeno en las células pretratadas con TPA. En segundo lugar se concluye que la actividad de la PKC no es imprescindible en la potenciación de la síntesis de ADN inducida por el agregado de ambos mitógenos.

La actividad mitógenica del $TGF\beta_1$ únicamente observada en las células pretratadas con TPA, llevó a plantear la posibilidad de que la ausencia de la actividad de la PKC, fuera la condición por la cual el $TGF\beta_1$ se comporte como un mitógeno.

La sinergia en la inducción de la síntesis de ADN mediada por ambos factores, se observó en ambas condiciones, aún cuando alguno de ellos no presentó actividad mitogénica por sí solo, en una u otra condición. Estos resultados sugieren, por un lado, que el pretratamiento de las células con TPA modifica los caminos intracelulares de señalización de tal manera, que ahora el $TGF\beta_1$ puede activar señales para desencadenar la respuesta mitogénica, mientras que la $PGF_{2\alpha}$ se encuentra inhibida de activar esta respuesta. Por otro lado, si bien la $PGF_{2\alpha}$ no logra una respuesta mitogénica en las condiciones de pretratamiento con TPA, es capaz de potenciar el efecto mitogénico del $TGF\beta_1$. Esto implica, que la $PGF_{2\alpha}$ es capaz de activar vías de señalización

en estas condiciones, que convergen con las señales activadas por el $TGF\beta_1$, aumentando de esta manera la respuesta mitogénica en las células, disparada por este último.

Se puede inferir como una posibilidad, que de las señales activadas por la $PGF_{2\alpha}$, la actividad de quinasa de proteínas en tirosina (TK), es la señal presente en ambas condiciones y por lo tanto, actuaría de forma concertada con las señales activadas por el $TGF\beta_1$, entre otras señales activadas y no descriptas hasta el momento [Jiménez de Asúa y Goin, 1997].

Para corroborar si la ausencia de la PKC permite la estimulación de la síntesis de ADN por el $TGF\beta_1$, se buscaron las condiciones del pretratamiento con TPA.

2- Condiciones de Pretratamiento con TPA

Se determinaron las condiciones de concentración y tiempo del pretratamiento con TPA, en las cuales se observa la respuesta mitogénica de las células al $TGF\beta_1$ (fig. N°2).

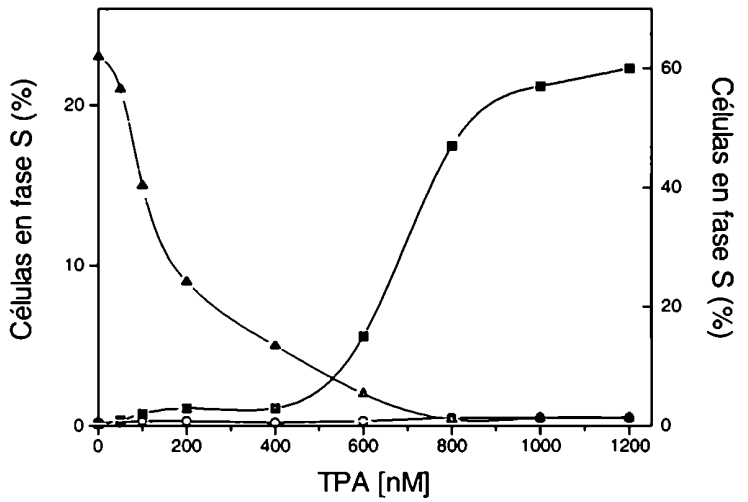


Figura N°2. Pretratamiento de los Fibroblastos de Ratón Swiss 3T3 con distintas concentraciones de TPA.

Las células fueron pretratadas con distintas concentraciones de TPA durante 96 hs (ver M y M). Una vez que las monocapas se aquietaron, fueron lavadas, se les agregó medio condicionado; y finalmente se agregaron los siguientes estímulos: Control (O, escala sobre el margen izquierdo), $TGF\beta_1$ (1 ng/ml, ■, escala sobre el margen derecho), $PGF_{2\alpha}$ (300 ng/ml, ▲, escala sobre el margen izquierdo). Los resultados, fueron obtenidos como se indica en la leyenda de la figura N°1, y corresponde, a duplicados del experimento más representativo de tres realizados en forma independiente.

Como se observa en la figura N°2, la respuesta mitogénica obtenida por el $TGF\beta_1$ está condicionada a la concentración del TPA, así como también la inhibición de la respuesta mitogénica de la $PGF_{2\alpha}$. La proliferación celular estimulada por el $TGF\beta_1$, depende de la concentración del TPA utilizado en el pretratamiento de las monocapas celulares, comienza a partir de los 500 nM de este último, y llega a una meseta a los 800 nM del mismo. Se eligió trabajar con la concentración final de 800 nM de TPA, ya que a concentraciones mayores (1 y 1,2 μM) las monocapas, observadas al microscopio óptico, presentaron varios focos de transformación, identificados por el crecimiento celular en multicapas.

En la figura N°3, se observan los resultados de la determinación del tiempo del pretratamiento de las células con 800 nM de TPA. Una vez que las células han alcanzado el estado de monocapa confluente y arrestada, los cultivos fueron expuestos a TPA (800 nM). Luego de los distintos tiempos de exposición al TPA, las monocapas fueron lavadas, se les agregó medio condicionado junto a las estimulaciones: $PGF_{2\alpha}$ o $TGF\beta_1$, y 28 hs. después se determinó el porcentaje de células en fase S.

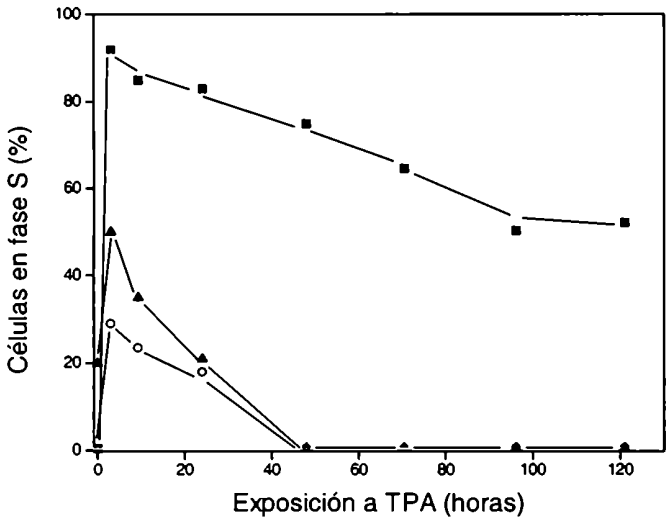


FIGURA N°3. Pretratamiento de la Línea Celular Swiss 3T3 con TPA a distintos tiempos. Se agregó TPA (800 nM) a monocapas de fibroblastos confluentes y arrestadas y se dejó este último a distintos tiempos, luego de los cuales se lavaron las monocapas y se agregó medio condicionado más los siguientes estímulos: Control (sin adiciones, O), $TGF\beta_1$, 1 ng/ml (■), $PGF_{2\alpha}$, 300 ng/ml (▲). El porcentaje de células en fase S fue calculado como se explica en la leyenda de la figura N°1 y corresponden a duplicados del experimento más representativo de dos realizados en forma independiente.

Después del pretratamiento de las células con TPA por 3 horas, se lavaron las monocapas y se les agregó medio condicionado con timidina [metil ^3H] y 28 horas después se contaron las células

que entraron a la fase S, y se obtuvo un 30% de núcleos marcados. El pretratamiento con TPA induce síntesis de ADN, y esta inducción va decayendo hasta que a las 48 horas de pretratamiento, ya no se observan células en fase S. Es decir, que el agregado de TPA estimula la síntesis de ADN, observándose células en fase S hasta unas 48 horas después de agregado el mismo (Figura N°3 (O)).

En células sin pretratar la $PGF_{2\alpha}$ indujo un 22% de células en fase S. En las primeras horas del pretratamiento con TPA, puede observarse que la inducción de la síntesis de ADN por la $PGF_{2\alpha}$ es mayor que en las células sin pretratar (50 a 30 % de células en fase S entre la hora y las 10 horas de pretratamiento). Esto se debe, a la estimulación previa de la síntesis de ADN por el pretratamiento con TPA. Después de las 48 horas de pretratamiento, ya no se observa respuesta mitogénica alguna ni de la $PGF_{2\alpha}$, ni del TPA, debido a que la PKC se encuentra retro-modulada.

En cuanto al $TGF\beta_1$, éste fue capaz de potenciar la respuesta mitogénica activada por el TPA, al igual que la $PGF_{2\alpha}$. Esto se observa en el porcentaje de células en fase S, que desde la hora hasta las 48 horas de pretratamiento, se obtuvo un 94 a 60 %, respecto de las células sin pretratar, donde no se observó inducción de la síntesis de ADN. Después de 48 horas de pretratamiento con TPA, el $TGF\beta_1$ activó la respuesta mitogénica (medido 28 hs. después de agregado este último), cuando el TPA ya no tiene más efecto sobre la síntesis de ADN.

De acuerdo a estos resultados, se eligió un pretratamiento con 800 nM de TPA, durante 96 hs., ya que a este tiempo no varía el porcentaje de núcleos marcados, estimulados por el $TGF\beta_1$, y las monocapas presentan una morfología más parecida a las células aquietadas, con citoplasmas más chicos y redondos, formando una empalizada.

3- La Inducción de la Síntesis de ADN, es dependiente de la Concentración del $TGF\beta_1$

El agregado de $TGF\beta_1$ a distintas concentraciones, estimula un porcentaje creciente de células que inician la síntesis de ADN, y esto solo ocurre en aquellas pretratadas con TPA (800 nM, 96 hs.). Las células en fase S, se observan a partir de los 0.05 ng/ml, y llega a saturación (50% de células en fase S), con 1 ng/ml. Permanece relativamente constante hasta los 2 ng/ml (fig. N°4).

4- Medición de la Fase G_1 y Entrada en la Fase S

La mayoría de los factores de crecimiento, estimulan la síntesis de ADN a través de la regulación de dos parámetros diferentes: i) el largo de la fase G_1 (espacio de tiempo hasta

comenzar la síntesis de ADN), y ii) la velocidad de entrada en la fase S. La velocidad de entrada en la fase S, sigue una cinética aparente de primer orden, a una velocidad constante, determinada por la concentración del factor. Con el fin de evaluar como se modifican estos parámetros cuando el $TGF\beta_1$ induce la síntesis de ADN en células pretratadas con TPA, se midió la duración de la fase G_1, en esta condición. Se midió también la duración de G_1, cuando se agrega $PGF_{2\alpha}$ más $TGF\beta_1$, en ambas condiciones, para estudiar si esta sinergia ocurre debido a un acortamiento de la fase G_1 o a un aumento en la velocidad de entrada en la fase S. Los gráficos obtenidos a partir de los ensayos realizados con células sin pretratar y pretratadas con TPA, pueden observarse en la figura N°5 y N°6.

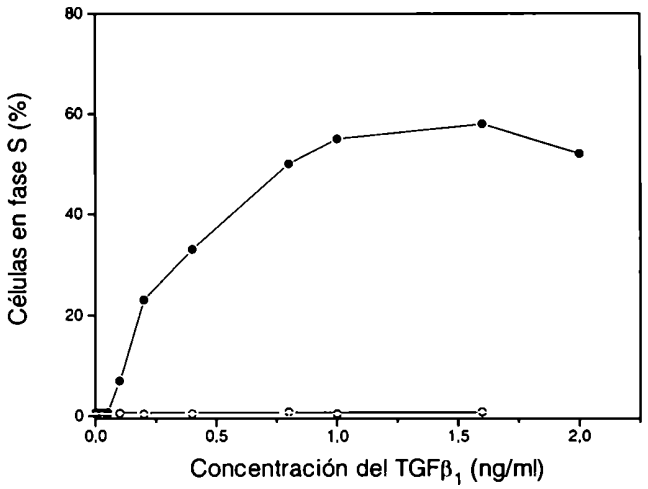


FIGURA N°4. Efecto del $TGF\beta_1$ a Concentraciones Crecientes en Células Swiss 3T3. Se cultivaron fibroblastos de ratón Swiss 3T3 como se indica en M y M. La mitad de los cultivos fueron pretratados con TPA (800 nM, 96 hs.). Cuando los cultivos llegaron a confluencia y arresto de la división celular, se les agregó $TGF\beta_1$ a concentraciones crecientes indicadas en la figura. El porcentaje de células en fase S se determinó 28 hs. después, como se indica en la leyenda de la figura N°1, y corresponden a duplicados del experimento más representativo de tres realizados en forma independiente. Círculos abiertos: células sin pretratar; círculos cerrados: células pretratadas con TPA (800 nM, 96 hs.).

El agregado de $PGF_{2\alpha}$ a células sin pretratar, estimula la iniciación de la síntesis de ADN después de progresar a través de una fase G_1 constante de 15 a 16 horas [resultados similares a Jiménez de Asúa et al., 1977]. Esto también se observa con el agregado de $PGF_{2\alpha}$ más $TGF\beta_1$, por lo tanto el efecto de potenciación, no se refleja en la alteración de la duración de la fase G_1. En forma consistente, el agregado de $TGF\beta_1$ a células sin pretratar, no tuvo efecto sobre la síntesis de ADN.

Por el contrario, en el ensayo con las células pretratadas con TPA, la duración de la fase G_1 fue de 21 a 22 horas, tanto en la estimulación de la síntesis de ADN por el $TGF\beta_1$, como por $TGF\beta_1$ más $PGF_{2\alpha}$ (fig. N°5B). Las células pretratadas con TPA, exhiben un alargamiento de la fase G_1 de unas 6 a 7 horas, comparado con las células sin pretratar. La duración de la fase G_1, es más corta (7 a 8 horas) cuando las células se encuentran ciclando, es decir cuando pasan de la fase M a G_1, sin pasar por la fase G_0. Cuando la célula entra al ciclo celular desde la fase G_0, la duración de la fase G_1 se alarga, debido a que la célula tiene que preparar la maquinaria necesaria para duplicarse. El pretratamiento con TPA, probablemente lleve a las células a una fase G_0, que aparentemente requiere más tiempo que las células sin pretratar, para entrar al ciclo celular, una vez estimuladas.

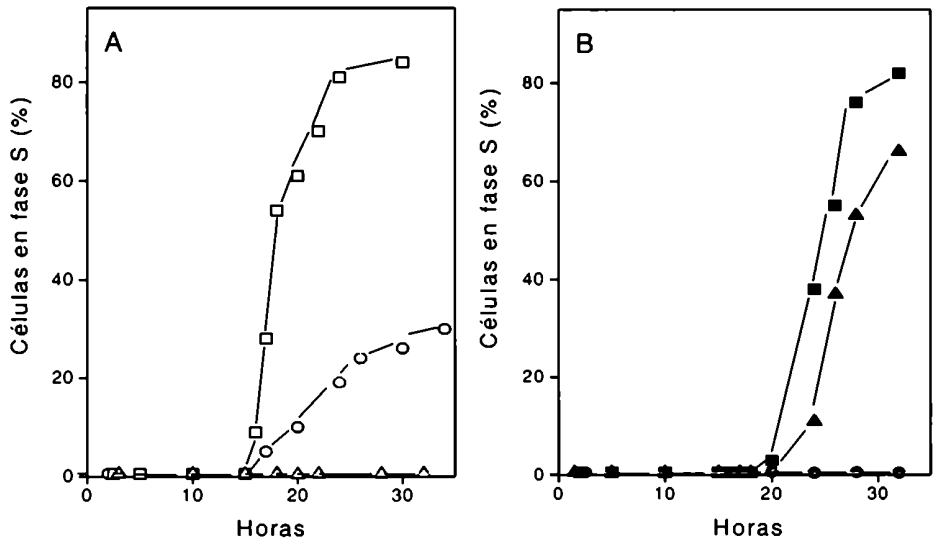


FIGURA N°5. Duración de la Fase G_1.
Células Swiss 3T3 confluentes y arrestadas estuvieron expuestas a timidina (metil[^{3}H]), desde el comienzo del agregado de los estímulos, hasta los tiempos indicados en las figuras. A y B representan la duración de la fase G_1. A= células sin pretratar estimuladas con: $PGF_{2\alpha}$ (300 ng/ml, O); $PGF_{2\alpha}$ + $TGF\beta_1$ (1 ng/ml, □) y $TGF\beta_1$ (Δ). B= células pretratadas con TPA (800 nM, 96 hs), estimulados con: $TGF\beta_1$ (1 ng/ml, ▲); $PGF_{2\alpha}$ (300 ng/ml, ●) y $TGF\beta_1$ + $PGF_{2\alpha}$ (■). En ambas condiciones, los controles sin adiciones, no estimularon la síntesis de ADN en las células (datos no mostrados). El índice de núcleos marcados, se obtuvo como se indica en M y M. Los resultados, corresponden al promedio de duplicados del experimento más representativo de tres realizados en forma independiente.

Cabe señalar que la duración de la fase G_1 en ambas condiciones, no se ve alterada por la potenciación de la síntesis de ADN, cuando se agrega $TGF\beta_1$ más $PGF_{2\alpha}$. De estos resultados se

desprende que la duración de la fase G_1 es constante y no se ve afectada por el agregado de dos mitógenos.

Generalmente, se ha observado que las sinergias en la inducción de la síntesis de ADN que ocurre entre factores, aumentan la velocidad de entrada en la fase S [Jiménez de Asúa et al., 1981]. La figura N°6 muestra la velocidad de entrada en la fase S (obtenidas a partir del logaritmo en base 10 de los núcleos no marcados de los datos de las figuras N°5). La velocidad se cuantifica por una tasa constante k (ver M y M), y sus valores se presentan en la leyenda de la figura N°6.

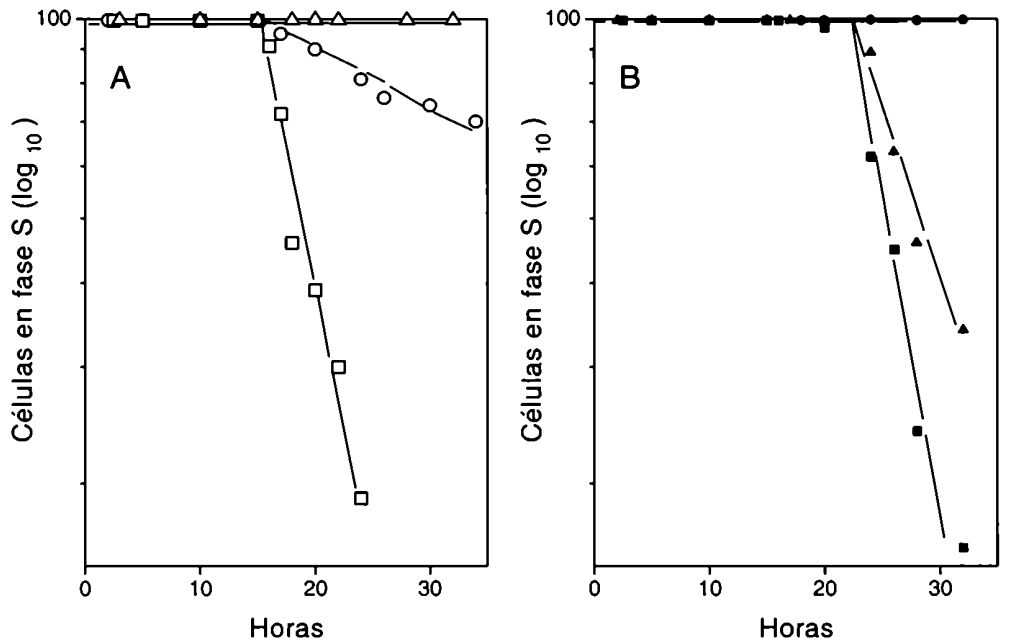


FIGURA N°6. Cinética de Entrada en la Fase S.
Los gráficos A y B de esta figura, se obtuvieron de los datos de los gráficos respectivos de la figura N°5. A y B representan la cinética de entrada en la fase S. A= células sin pretratar estimuladas con: $PGF_{2\alpha}$ (300 ng/ml, O); $TGF\beta_1$ (1 ng/ml, Δ) y $PGF_{2\alpha}$ + $TGF\beta_1$ (1 ng/ml, □). Las constantes k para $PGF_{2\alpha}$ y $PGF_{2\alpha}$ + $TGF\beta_1$, fueron: 2.0 ± 0.4; 8.8 ± 0.7 (10^{-2}, min^{-1}), respectivamente. B= células pretratadas con TPA, estimuladas con: $TGF\beta_1$ (1 ng/ml, ▲); $TGF\beta_1$ + $PGF_{2\alpha}$ (300 ng/ml, ■), y $PGF_{2\alpha}$ (●). Las constantes k para $TGF\beta_1$ y $TGF\beta_1$ + $PGF_{2\alpha}$ fueron: 6.2 ± 0.7, 7.2 ± 0.3 (10^{-2}, min^{-1}), respectivamente. El logaritmo de los núcleos marcados, se obtuvo como se indica en M y M.

Como puede observarse en la figura N°6, la velocidad de entrada en la fase S, aumenta en la sinergia entre la $PGF_{2\alpha}$ con $TGF\beta_1$, en la inducción de la síntesis de ADN tanto en células sin pretratar como en las pretratadas con TPA. El valor de la constante k aumenta su valor absoluto,

por los agregados de otros factores de crecimiento, pero cabe remarcar que la cinética siempre es de primer orden.

De estos resultados podemos concluir, que el tiempo de duración de la fase G_1, en las células pretratadas con TPA es mayor que en las células sin pretratar. Se puede plantear que la estimulación de la síntesis de ADN por el $TGF\beta_1$, necesita más tiempo en la fase G_1 para poder entrar al ciclo celular, y probablemente, se deba a que necesite activar o complementarse con nuevos caminos de señalización, con respecto a los activados en las células sin pretratar.

Uno de los eventos característico de las células que entran al ciclo celular, es la síntesis de la ciclina D_1, ya que es la subunidad regulatoria de las quinasas dependientes de ciclina 4 y 6 (CDK4, CDK6), responsables de la fosforilación del producto del gen del retinoblastoma (pRb), que determina la transición de la fase G_1 a S [Connel-Crowley et al., 1998; Lukas et al., 1996]. Por lo tanto, se decidió estudiar el tiempo de expresión de esta ciclina, en la estimulación de la síntesis de ADN mediada por $PGF_{2\alpha}$ o $TGF\beta_1$, en células sin pretratar y pretratadas con TPA.

5- Inducción de la Síntesis de la Ciclina D_1

Se decidió observar el tiempo de expresión de la ciclina D_1, y ver el mismo en células sin pretratar y pretratadas con TPA. La presencia de la ciclina D_1, se detectó a través de la técnica llamada en inglés "Western blot" (ver M y M). En la figura N°7A se observa, que la banda correspondiente a la ciclina D_1 (34 kDa), aparece en las células sin pretratar, estimuladas con $PGF_{2\alpha}$ durante 10 horas. El estudio de la expresión de la síntesis de ciclina D_1, inducida por la $PGF_{2\alpha}$ en células Swiss 3T3, fue realizado en el laboratorio por la Lic. Moira Sauane [Sauane et al., 2000], y se encontró que la expresión de ciclina D_1, comienza entre las 6-9 hs., después del agregado del mitógeno. Por lo tanto, el resultado obtenido con la estimulación por la $PGF_{2\alpha}$, se utilizó como un control positivo del ensayo.

Al agregar $TGF\beta_1$ a cultivos confluentes y quiescentes, no se observó expresión de la ciclina D_1, en los mismos tiempos examinados: 5 a 14 horas de adición. Esto es consistente, con la falta de inducción de la división celular por este factor, en de las células sin pretratar.

En la figura N°7B, se observa que en las células pretratadas con TPA, el $TGF\beta_1$, que tiene capacidad mitogénica en estas condiciones, es capaz de inducir la expresión de la ciclina D_1. El punto de mayor detección, se encuentra entre las 14 y 20 horas, y comienza a las 10-12 hs., después de la estimulación. Sorprendentemente, se encontró que en estas condiciones, la $PGF_{2\alpha}$, que no es mitogénico en esta condición, indujo la expresión de la ciclina D_1 (figura N°7B,

calle7). Paralelamente a los cultivos utilizados para los ensayos de la estimulación de la expresión de la cilcina D_1, se estimularon cultivos y se midió la estimulación de la síntesis de ADN, obteniéndose los valores correspondientes a cada estimulación, similares a los de la fig. N°1.

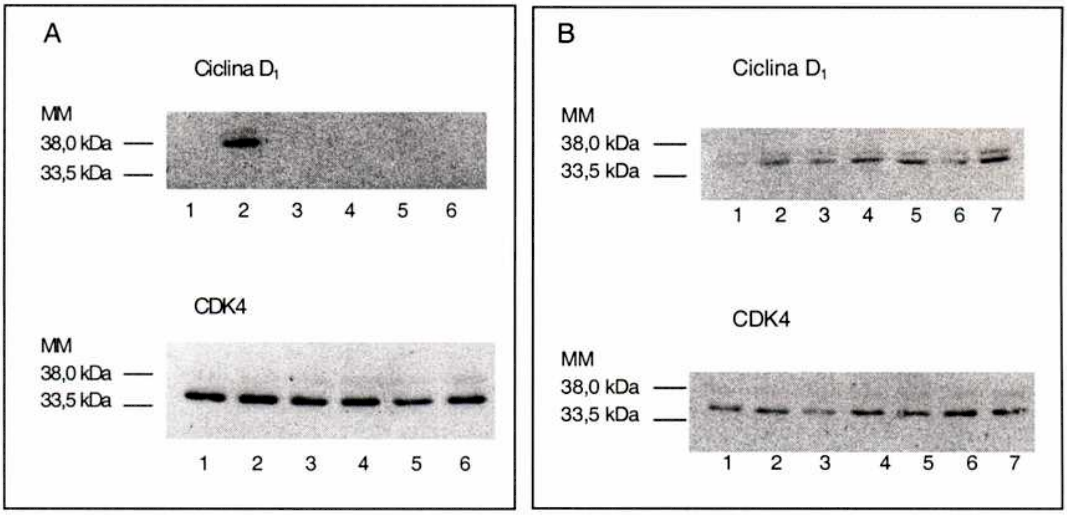


Figura N°7. Detección de la Ciclina D1.

A= células sin pretratar, arrestadas y confluentes. Los estímulos fueron los siguientes: Calle 1, sin estímulos; Calle 2, $PGF_{2\alpha}$ durante 10 horas; Calle 3, 4, 5 y 6 $TGF\beta_1$ durante 5, 10 12 y 14 horas, respectivamente.

B= células pretratadas con TPA (800 nM, 96 horas). Los estímulos fueron los siguientes: Calle 1, sin estímulos; Calle 2, 3, 4, 5 y 6 $TGF\beta_1$ durante 10, 12, 14, 20 y 24 horas, respectivamente; Calle 7, $PGF_{2\alpha}$ durante 14 horas.

Fueron sembrados 100 μg de proteínas totales por calle, en un gel 10% de poliacrilamida. Las concentraciones de $TGF\beta_1$ y $PGF_{2\alpha}$ fueron 1.0 ng/ml y 300 ng/ml, respectivamente. Las membranas fueron reveladas por quimioluminiscencia con el sistema ECL (Amersham), y los anticuerpos (ac) utilizados (Santa Cruz) fueron: ac monoclonal anti Ciclina D_1 y ac policlonal anti CDK4 (ambos en una dilución 1/1000). Este es el resultado más representativo de cuatro realizados en forma independiente.

Este resultado nos indica, que la expresión de la ciclina D_1 no es exclusiva de las células que entran en división. En otras palabras, puede estimularse su expresión, sin que ello signifique que la célula se dividirá. Además indica que la expresión de la ciclina D_1, es independiente de la PKC. Una posibilidad es que se estimule la expresión de esta ciclina, pero que los complejos que forma con las CDK correspondientes, sean inactivos en las células pretratadas con TPA. Por otro lado, se ha descripto que hay complejos ciclinas-CDKs, que tendrían otros roles en procesos como la transcripción y la reparación del ADN, además de su actividad en el ciclo celular [Poon y Hunter, 1995].

De los mismos extractos proteicos se tomaron alícuotas de idéntica cantidad de muestra para preparar membranas al mismo tiempo, que se revelaron con un anticuerpo policlonal anti CDK4 (Santa Cruz, ver M y M). La CDK4 y la ciclina D_1 forman el complejo CDK4/D_1, que actúa en la progresión, a través de la fase G_1 [Sherr, 1994]. En la figura N°7 A y B, se observan las figuras correspondientes a la CDK4 (proteína de 34 kDa, idem a la ciclina D_1), y ésta aparece en ambas condiciones con una misma intensidad, independientemente de los estímulos recibidos por las células (resultados similares a Poon et al., 1995). De esta manera, la CDK4 sirve como control de carga de proteínas, entre muestra y muestra.

La observación más interesante de estos experimentos, es que en células sin pretratar la expresión de la ciclina D_1 posee su punto máximo alrededor de las 12-15 hs. [Sauane et al., 2000], con una duración de la fase G_1 de 15 a 16 horas; mientras que en las células pretratadas con TPA, el punto de máxima expresión de la ciclina D_1 está entre las 14 y 20 horas, y la fase G_1 tiene una duración de 21 a 22 horas. Es decir que en las células pretratadas con TPA existe una correlación entre la extensión de la fase G_1, y el tiempo de síntesis de la ciclina D_1 (que es más tardía), en comparación con las células sin pretratar. Estos resultados sugerirían que el TGFβ_1 necesitaría activar más señales (o complementarse con nuevas señales) para inducir la síntesis de la ciclina D_1, en estas condiciones, que la $PGF_{2\alpha}$ en células sin pretratar.

6- Pretratamiento de la Línea Celular Swiss 3T3 con Briostatina 1

Una vez halladas las condiciones del pretratamiento con TPA y los parámetros del TGFβ_1 como mitógeno, se comenzó a estudiar el rol de la PKC en el efecto mitogénico del mismo. La primer pregunta a responder, fue si el efecto mitogénico inducido por el TGFβ_1, previo tratamiento de las células con TPA, es debido a la ausencia de la PKC y/o a otros efectos dependientes del TPA? Para responder esta pregunta, se buscó otro compuesto que tuviera el mismo efecto sobre la PKC y que fuera químicamente diferente del TPA. Se encontró que la Briostatina 1, una lactona macrocíclica producida naturalmente por el briozoo *Bugula neritina* (invertebrado marino), tiene la misma capacidad de retro-modular a la PKC, y además posee actividad antineoplásica. Al igual que el TPA, la Briostatina 1 activa directamente a la PKC, dado que tiene un componente similar al diacilglicerol (DAG) en su estructura, generando así un número de respuestas celulares diferentes [Smith et al., 1985]. La Briostatina 1, tiene capacidad mitogénica en las células Swiss 3T3, al igual que el TPA, y ésta fue medida a distintas concentraciones de la misma. Los resultados obtenidos se muestran en la figura N°8.

Cultivos de Swiss 3T3 confluentes y detenidos en G_0, sin pretratar con TPA, fueron estimulados con concentraciones crecientes de Briostatina 1 durante 28 horas (fig. N°8). De esta forma, se observó que la Briostatina 1 induce proliferación en esta línea celular y se pudo

observar que a partir la concentración de 50 nM se mantuvo constante, alrededor de 8% de células en fase S, hasta los 800 nM probados. El porcentaje de núcleos marcados, es menor que el del TPA y la $PGF_{2\alpha}$ (35 y 23 % de células en fase S, respectivamente).

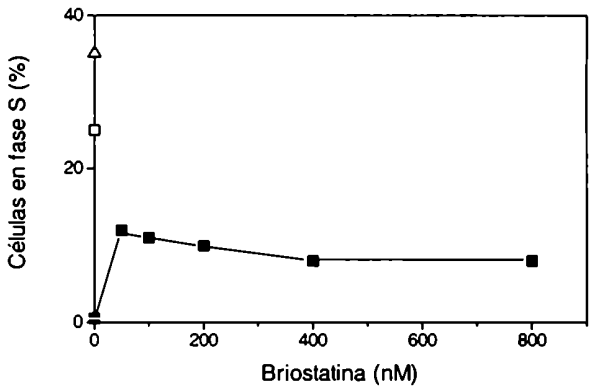


Figura N°8. Estimulación de la Síntesis de ADN por Briostatina 1, en la Línea Celular Swiss 3T3.

Células sin pretratar, arrestadas y confluentes, recibieron los siguientes estímulos: $PGF_{2\alpha}$ 300 ng/ml (□), TPA 200 nM (Δ), y Briostatina 1 (■) en concentraciones crecientes indicadas en la figura. El porcentaje de células en fase S, se obtuvo 28 horas después de la adición de los estímulos, como se indica en M y M. Estos resultados fueron obtenidos, por duplicado de uno de dos experimentos independientes y también se correlacionan con experimentos similares realizados por incorporación de timidina (ver M y M).

En la figura N°9 se observa el pretratamiento de células confluentes y arrestadas con concentraciones crecientes de Briostatina 1, durante 96 hs. (idem al pretratamiento con TPA). Luego del pretratamiento, las monocapas fueron lavadas, y se les agregó medio condicionado junto con los estímulos. Después de las 28 horas de estimulación, la $PGF_{2\alpha}$, que presenta un 25 % de células en fase S en células sin pretratar, se ve inhibida a partir de los 50 nM de Briostatina 1 de pretratamiento, mientras que el $TGF\beta_1$, comienza a esta misma concentración, a inducir la mitogénesis. La inducción de la proliferación por el $TGF\beta_1$ se mantiene entre un 30 a 27 % de células en fase S, desde los 400 hasta los 800 nM de Briostatina 1 ensayados. Si bien el $TGF\beta_1$ presenta actividad mitogénica luego del pretratamiento con Briostatina 1, ésta no alcanza los valores que se obtienen con el pretratamiento con TPA (50 % de células en fase S). Esto quizás, esté relacionado con la capacidad mitogénica de la Briostatina 1 y el TPA, siendo mayor la de este último. Podría plantearse que el TPA al inducir un mayor porcentaje de células que se dividen, hace que al detenerse éstas, acumulen algún componente (o varios), que intervienen en la síntesis de ADN, inducida por el $TGF\beta_1$, después del pretratamiento.

Más allá de la capacidad mitogénica de los compuestos usados en el pretratamiento, es importante destacar que el $TGF\beta_1$ logra inducir la mitogénesis con un compuesto no relacionado químicamente con el TPA, pero al igual que este último, capaz de estimular y retro-modular a la PKC. Estos resultados nos indicarían que la acción del $TGF\beta_1$ no es dependiente del TPA, sino de la acción que el TPA y la Briostatina 1 ejercen sobre la PKC.

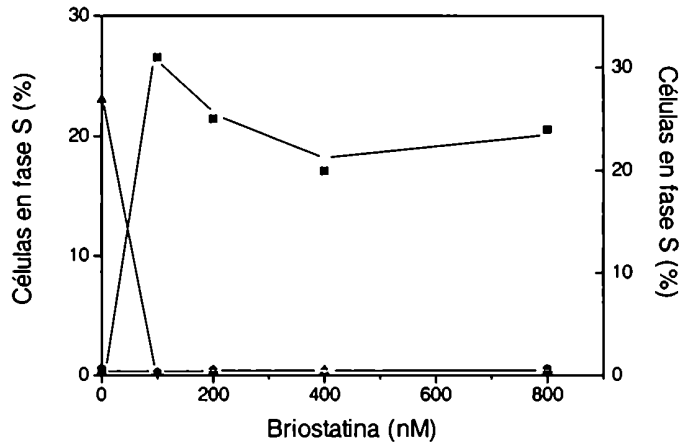


Figura N°9. Efecto del Pretratamiento con Briostatina sobre la mitogénesis inducida por $TGF\beta_1$ y $PGF_{2\alpha}$.

Las células Swiss 3T3 fueron cultivadas como se indica en M y M. El pretratamiento con Briostatina 1 fue de 96 horas, y a concentraciones crecientes como se indica en la figura. Luego del pretratamiento, las monocapas fueron lavadas y se les agregó medio condicionado con los siguientes estímulos: $TGF\beta_1$ 1.0 ng/ml (■), $PGF_{2\alpha}$ 300 ng/ml (▲). Junto a los estímulos, se agregó timidina [metil ^3H] (1 μM, 3 μCi/ml) y las células fueron procesadas luego de 28 horas como se indica en M y M. Estos resultados fueron obtenidos por duplicado de uno de dos experimentos independientes y también se correlacionan con experimentos similares realizados por incorporación de timidina (ver M y M).

7- Reversibilidad del Pretratamiento con TPA y Briostatina 1

Estudiando aún más el efecto del pretratamiento del TPA y la Briostatina 1, se estudió si el mismo era reversible. Los ensayos se realizaron de la siguiente manera: al cambiarle el medio a las células después de tres días de sembradas, algunas de ellas recibieron TPA (800 nM), otras Briostatina 1 (100 nM), y las controles solo con vehículo (medio). Después que las monocapas tratadas llegaron a confluencia y quiescencia, fueron lavadas y se les agregó medio condicionado. A distintos tiempos después de la adición del medio condicionado, se agregaron los diferentes estímulos. Los resultados de estos experimentos se muestran en las figuras N°10 y 11.

En la figura N°10 se muestran, las estimulaciones adicionadas horas después del agregado de medio condicionado a las monocapas tratadas con TPA (800 nM, 96 hs). Se agregó el factor de crecimiento epidermal (EGF, 20 ng/ml), como control de un factor mitogénico, que no utiliza la vía de la PKC en la inducción de la proliferación [Maruta y Burgess, 1994]. Se puede observar que el EGF y el $TGF\beta_1$ (1.0 ng/ml), son los únicos con capacidad mitogénica, después de treinta minutos de agregado el medio condicionado, pero ambos pierden esta capacidad de forma muy rápida y ninguno la recupera hasta las 96 horas ensayadas. La $PGF_{2\alpha}$ y el TPA ven inhibidas sus acciones mitogénicas, y sólo el TPA recupera algo de esta acción (13 % de células en fase S). Es interesante observar, que la actividad mitogénica de la Briostatina 1 (figura N°10, triángulo abierto hacia abajo) se ve inhibida, por el pretratamiento de la monocapa con TPA.

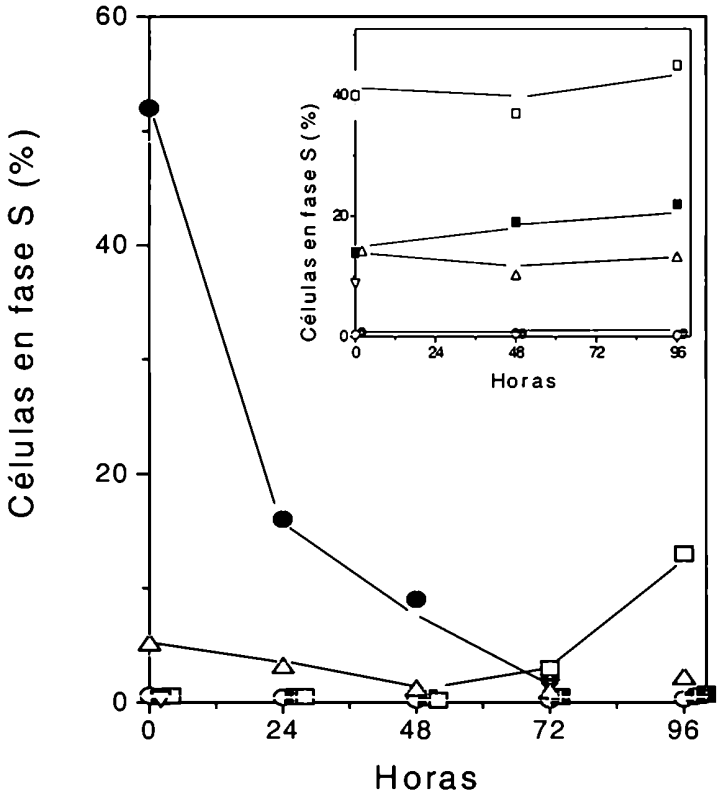


Figura N°10. Estimulación de Factores de Crecimiento Horas Después del Pretratamiento con TPA.

Células arrestadas y confluentes fueron pretratadas con TPA (800 nM, 96 hs.). Luego fueron lavadas y se les agregó medio condicionado. A distintos tiempos se adicionaron los siguientes estímulos: sin adiciones (O), $TGF\beta_1$ 1.0 ng/ml (●), $PGF_{2\alpha}$ 300 ng/ml (■), EGF 20 ng/ml (Δ), TPA 200 nM (□) y Briostatina 200 nM (∇). En el inserto se muestran los mismos estímulos (con los mismos símbolos) agregados a cultivos sin pretratar. Los resultados fueron obtenidos 28 horas después de las adiciones, como se indica en M y M. Estos resultados fueron obtenidos por duplicado de uno de tres experimentos independientes.

En la figura N°11 se muestra el mismo ensayo que el de TPA, pero realizado con Briostatina 1, y se obtienen resultados similares. En este ensayo, también se observó la capacidad del pretratamiento de las monocapas con Briostatina 1 de inhibir la acción mitogénica del TPA, (figura N°11, cuadrado abierto).

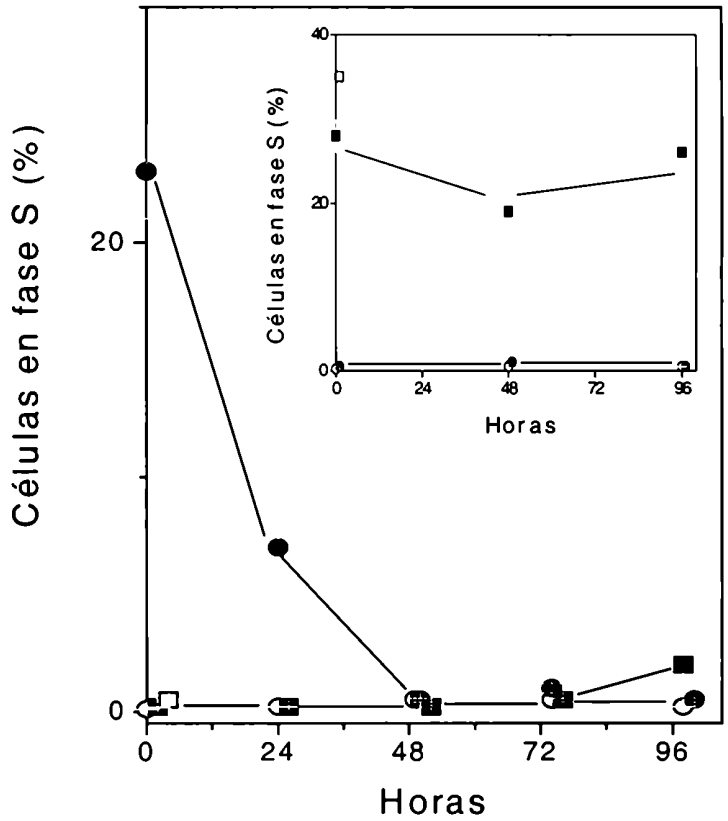


Figura N°11. Síntesis de ADN Mediada por Distintos Factores de Crecimiento, Después del Pretratamiento con Briostatina 1.

Células confluentes y arrestadas fueron pretratadas con Briostatina 1 (100 nM, 96 hs.). Una vez que las células fueron lavadas, a distintos tiempos después del agregado de medio condicionado, se adicionaron los siguientes estímulos: sin adiciones (O), TPA (200 nM, □), $TGF\beta_1$ 1.0 ng/ml (●), $PGF_{2\alpha}$ 300 ng/ml (■). En el inserto se muestran los mismos estímulos agregados a células sin pretratar (se conservaron los mismos símbolos). Los resultados fueron obtenidos 28 horas después de las adiciones como se indica en M y M. Estos resultados fueron obtenidos por duplicado de uno de dos experimentos independientes.

En ambas figuras, los insertos muestran células sin ningún tipo de tratamiento previo, las que recibieron los mismos estímulos que las monocapas pretratadas con TPA o Briostatina 1.

De los resultados podemos observar, una rápida caída en la respuesta al $TGF\beta_1$ en células que han sido pretratadas con TPA o Briostatina 1. El EGF sufre también, una caída en su respuesta mitogénica en células pretratadas con TPA, pero no es tan marcada como la del $TGF\beta_1$. Al mismo tiempo que se observa que no se recupera la respuesta mitogénica cuando se agrega $PGF_{2\alpha}$, en los pretratamientos con TPA o Briostatina 1. La caída de la inducción de la proliferación del $TGF\beta_1$ y EGF, más la falta de recuperación de la respuesta mitogénica de $PGF_{2\alpha}$, llevan a la siguiente suposición: los resultados obtenidos se deben a la re-expresión de la PKC, pero debido a la falta de nutrientes (varios días sin cambio de medio), no puede reflejarse en la estimulación de la proliferación por EGF y $PGF_{2\alpha}$.

A las 96 horas, el TPA y la Briostatina 1, presentan una recuperación de la respuesta mitogéncia, medida como porcentaje de núcleos marcados, pero ésta es muy baja. Esta inducción quizás se deba a una re-expresión de la PKC, que es el receptor celular de ambos compuestos.

El paso siguiente, fue estudiar la expresión de la PKC durante el pretratamiento con TPA.

8- Retromodulación de la PKC

La presencia de la PKC se determinó a través del uso un anticuerpo monoclonal anti PKCα, donado por la Dra. Karen Leach [Leach et. al, 1988]. De todas las isoformas que se expresan en las células Swiss 3T3, se eligió la isoforma α, porque aparenta estar involucrada en la señalización de los mitogénesis, y los experimentos se basaron en los trabajos de Olivier y Parker (1992) y Linder et al. (1991). Los experimentos se realizaron de la siguiente manera: las células fueron pretratadas con 800 nM de TPA y se tomaron muestras a distintas horas del tratamiento, como así también a distintas horas después del agregado de medio condicionado. La PKCα fue detectada a través de la técnica de Western blot, y los resultados se muestran en la figura N°12.

La banda correspondiente a la PKCα (82 kDa), se encuentra en el control de células confluentes y quiescentes sin ningún tipo de tratamiento (calle 1). Hay una mayor expresión de la PKCα en las primeras horas del tratamiento (calle 2, 1 hora). A las 24 hs. después de agregado el TPA, la PKCα desaparece, y esta condición sigue hasta 24 horas después de haber agregado medio condicionado. Comienza a detectarse 48 horas después del agregado de medio condicionado, y alcanza niveles cercanos al control entre las 72 y 96 horas ensayadas. Los resultados son similares a los publicados por Oliver y Parker (1992), con la salvedad, que aquí se ha estudiado el comportamiento de la proteína de la PKCα a tiempos más tardíos y a distintos tiempos después de lavada la monocapa y agregado el medio condicionado. En el trabajo de Linder et al. (1991), llama la atención, la recuperación de la expresión de la PKC a las 72 hs. de

tratamiento con TPA. Esto, muy probablemente se deba, a que la concentración del TPA usada es menos de la mitad que la utilizada en este ensayo (300 nM), sumado a que el anticuerpo utilizado reconoce más de una isoforma de PKC, y que el medio que utilizaron para el tratamiento tiene 10% de suero fetal bovino.

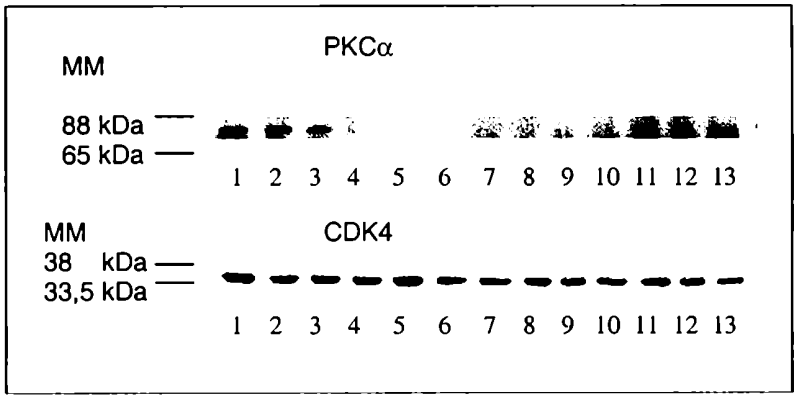


Figura N°12. Efecto del Pretratamiento del TPA sobre la Síntesis de la PKC.
Células arrestadas y confluentes fueron incubadas con TPA (800 nM) durante distintos tiempos: Calle 1, sin tratamiento; Calles 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8, tratadas con TPA durante 1, 3, 7, 24, 48, 72, y 96 horas, respectivamente. Calles 9, 10, 11, 12 y 13, con medio condicionado durante 30 min., 24, 48, 72 y 96 horas, respectivamente. Las muestras fueron procesadas a estos tiempos indicados, como se indica en M y M. Se sembraron 35 μg por calle, en un gel 10 % de poliacrilamida, y se reveló utilizando la quimioluminiscencia del sistema ECL (Amersham), y el ac monoclonal anti PKCα (dil. 1/500). Como control de carga de proteínas en cada calle se reveló la misma membrana con ac policlonal comercial anti CDK4 (dil. 1/1000, Santa Cruz). MM= marcadores de peso molecular. Este es el resultado más representativo de tres realizados en forma independiente.

Si se compara con la figura N°3, el $TGF\beta_1$ comienza a tener actividad mitogénica, a las 48 horas, y esta actividad se mantiene constante entre las 96 y 120 horas de pretratamiento, tiempos en los cuales la PKCα está ausente. Sin embargo, cuando se compara con la figura N°10, el efecto del $TGF\beta_1$, cae abruptamente después de 30 minutos de agregado el medio condicionado, tiempo en el cual la PCKα no ha reaparecido, es decir que no habría una correlación directa entre la caída de la actividad mitogénica del $TGF\beta_1$ y la re-expresión de la PCKα (comparar fig. N°12 con la fig. N°10). En forma consistente, la baja respuesta mitogénica del TPA y la Briostatina 1, a las 96 hs., se debe precisamente a la re-expresión de la PKC. Podría plantearse también que la respuesta mitogénica de la $PGF_{2\alpha}$, no se recupera debido quizás, a que la re-expresión de la PKC no es suficiente.

Con el propósito de observar, si la PKC esta involucrada de una manera más directa sobre la actividad mitogénica del TGFβ_1, se decidió utilizar inhibidores de la actividad de la misma.

9- Inhibidores de la PKC

Numerosos inhibidores de PKC han sido descriptos [Tamaoki y Nakano, 1990; Courage et al., 1995], entre ellos se eligió el GF 109203X dado que inhibe a la PKC, en el sitio catalítico y es uno de los más específicos [Toullec et al., 1991; Courage et al., 1995]. El inhibidor, es agregado una hora antes de los estímulos (también se probaron 15 y 30 minutos antes del agregado de los estímulos obteniéndose resultados similares). Los resultados se observan en la figura N°13.

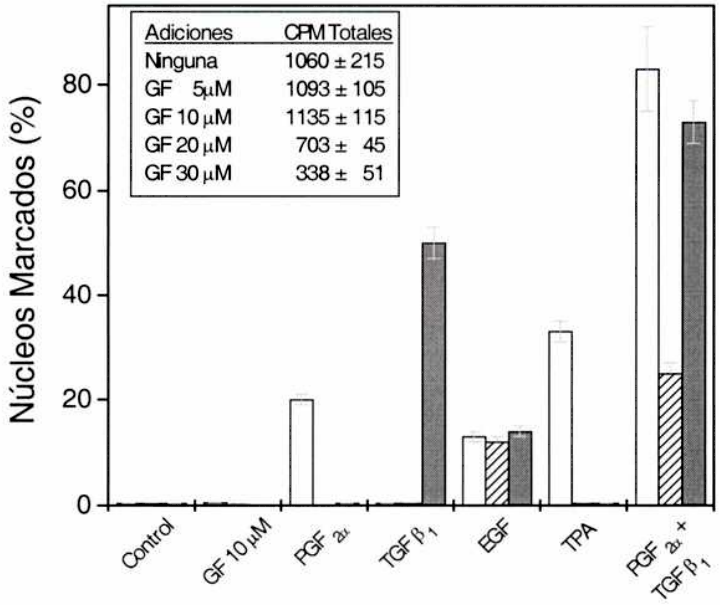


Figura N°13. Efecto del GF 109203X sobre la síntesis de ADN.
Células sin pretratar (barras blancas), arrestadas y confluentes incubadas con GF 109203X 10 μM (GF), una hora antes de recibir los estímulos (barras con líneas diagonales) y células pretratadas con TPA (800 nM, 96 hs, barras grises), recibieron los siguientes estímulos: control= sin adiciones, GF 10 μM= GF 109203X 10 μM, $PGF_{2\alpha}$= 300 ng/ml, TGFβ_1= 1.0 ng/ml, EGF= 20 ng/ml, TPA= 200 nM, y TGFβ_1 + $PGF_{2\alpha}$. Junto a los estímulos, se agregó timidina [metil ^{3}H] (1 μM, 3 μCi/ml) y las células fueron procesadas como se indica en M y M. Estos resultados, fueron obtenidos por duplicado de uno de dos experimentos independientes y también se correlacionan con experimentos similares, realizados por incorporación de timidina (ver M y M). En el inserto, se muestra una tabla obtenida, en el ensayo de incorporación de timidina a concentraciones crecientes de GF 109203X, en células sin pretratar.

El GF 109203X inhibe la actividad mitogénica de la $PGF_{2\alpha}$ y del TPA, pero no promueve la inducción de la mitogénesis por el $TGF\beta_1$. En células sin pretratar, la sinergia entre la $PGF_{2\alpha}$ y el $TGF\beta_1$ fue inhibida más de un 50%, respecto del porcentaje de núcleos marcados obtenidos en ausencia del inhibidor. Estos resultados indicarían, que la PKC estaría involucrada en la potenciación del $TGF\beta_1$ sobre la acción mitogénica de la $PGF_{2\alpha}$, en células sin pretratar, aunque no sería la principal actividad o una actividad importante, ya que no ocurre una inhibición completa. Es decir, que parte de las señales activadas por la $PGF_{2\alpha}$ no se ven inhibidas por el GF y se complementan con las señales activadas por el $TGF\beta_1$, para inducir la división celular. Estos resultados ponen en evidencia también, que en las células pretratadas con TPA, se activan nuevas señales por el $TGF\beta_1$ y/o $PGF_{2\alpha}$, ya que el porcentaje de células en fase S, es similar al de las células sin pretratar (en esta condición la PKC está presente).

De forma consistente, el GF no afecta la respuesta mitogénica del EGF, en células sin pretratar. A diferencia del TPA y la Briostatina 1, el GF 109203X inhibe la actividad de la PKC, sin previa estimulación de la misma. Estos resultados sugieren que el TPA y la Briostatina 1 al activar a la PKC en las primeras horas de estimulación, podrían inducir la expresión de varios genes, y estos últimos estarían involucrados, en el camino de señalización de la proliferación inducida por el $TGF\beta_1$.

De estos resultados se desprendería, que es necesario activar previamente la PKC, y para determinarlo, se llevaron a cabo experimentos similares al del GF 109203X, pero con un activador de la PKC, como el 1-oleil- 2-acetil glicerol (OAG), un análogo del DAG, permeable a la membrana plasmática.

10- Activadores de la PKC

El OAG, análogo permeable del DAG, también es capaz de activar la PKC [Florin-Christensen, 1993; Gilmore y Martin, 1983]. Se midió el efecto del OAG sobre la síntesis de ADN inducida por la $PGF_{2\alpha}$ y/o el $TGF\beta_1$. Los resultados se muestran en la figura N°14.

El OAG no tiene actividad mitogénica, pero es capaz de potenciar el efecto mitogénico de la $PGF_{2\alpha}$ [Goin y Jiménez de Asúa, 1992]. Esta potenciación, es inhibida por GF 109203X. También se observa, que el OAG es capaz de combinarse con el $TGF\beta_1$ para inducir la síntesis de ADN, aún cuando ninguno de los dos compuestos, es capaz de inducir la proliferación *per se* [Gómez de Alzaga et al., 1994]. Dado que esta sinergia se puede inhibir con GF 109203X, podría sugerirse, que la actividad más importante involucrada en ella, es la de la PKC.

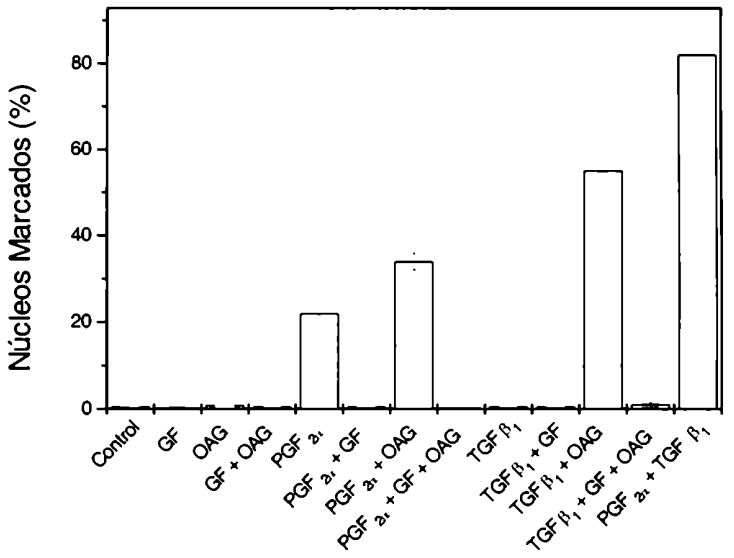


Figura N°14. Efecto del OAG sobre la Inducción de la Proliferación mediada por $PGF_{2\alpha}$ y $TGF\beta_1$.

Células confluentes y arrestadas sin pretratar, fueron estimuladas como se indica en la figura. Las concentraciones fueron: GF 109203X 10 μM (GF), OAG 100 μg/ml, $PGF_{2\alpha}$ 300 ng/ml, $TGF\beta_1$ 1.0 ng/ml. Tanto el GF como el OAG, fueron agregados una hora antes de las demás adiciones. Junto a los estímulos se agregó timidina [metil ^3H] (1 μM, 3 μCi/ml) y las células fueron procesadas como se indica en M y M. Estos resultados, fueron obtenidos por duplicado de uno de dos experimentos independientes y también se correlacionan con experimentos similares, realizados por incorporación de timidina (ver M y M).

Se pretrataron células con OAG (100 μg/ml), durante 72 hs., con el propósito de observar si al igual que el TPA, es capaz de retro-modular la PKC, o mantenerla activa después de largos períodos de incubación, y determinar si en esta condición el $TGF\beta_1$ es mitogénico. De la misma manera, se trataron células con GF 109203X (10 μM) durante 1 hora, después de este tiempo se agregó OAG (100 μg/ml) y ambos permanecieron durante 72 hs. Se incluyeron como controles, células sin ningún tipo de tratamiento y células tratadas con TPA (800 nM, 72 hs.). Los resultados, pueden observarse en la figura N°15A. Después de los pretratamientos correspondientes, se midió el porcentaje de células en fase S (28 horas después de agregados los estímulos) y en paralelo, se llevó a cabo la técnica de "Western blot", para detectar inmunológicamente la PKCα (fig. 15).

El tratamiento prolongado de las monocapas con OAG (fig. N°15A), no fue suficiente para que el $TGF\beta_1$ induzca mitogénesis. De la misma manera, el pretratamiento de las células con

OAG más GF 109203X (agregado 1 hora antes que el OAG) durante 72 horas, tampoco fue suficiente para la inducción de la síntesis de ADN por el $TGF\beta_1$.

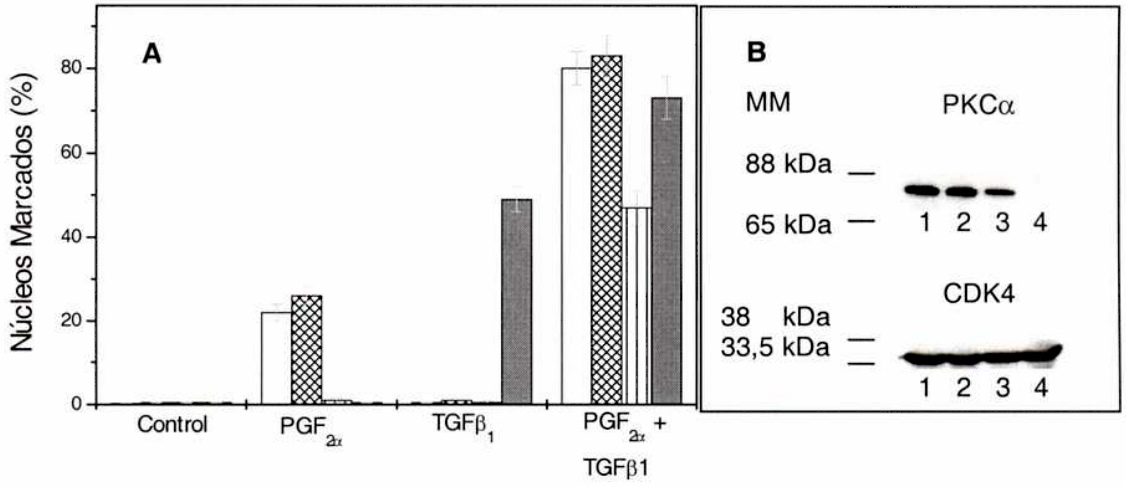


Figura N°15. Efecto de Tratamientos Prolongados sobre la Síntesis de ADN y la PKC.

A= Células arrestadas y confluentes, sin tratamientos (barras blancas), tratadas con OAG 100 μg/ml durante 72 hs (barras con líneas cruzadas); células tratadas con GF 109203X 10 μM, 1 h y luego se adicionó OAG durante 72 hs (barras con líneas verticales); y células tratadas con TPA 800 nM, durante 72 hs (barras grises), luego de lavadas y agregado el medio condicionado, recibieron los siguientes estímulos: control= sin adiciones, $PGF_{2\alpha}$= 300 ng/ml, $TGF\beta_1$= 1.0 ng/ml, y $TGF\beta_1$ + $PGF_{2\alpha}$. Junto a los estímulos, se agregó timidina [metil ^3H] (1 μM, 3 μCi/ml) y las células fueron procesadas como se indica en M y M. Estos resultados fueron obtenidos por duplicado de uno de dos experimentos independientes.

B= Cultivos en paralelo fueron tratados durante 72 hs. con: OAG (100μg/ml, calle 2), otros con GF 109203X 10 μM, 1 h antes del agregado de OAG (calle 3), algunos con TPA (800 nM, calle 4). A los 30 min de agregado el medio condicionado, se extrajeron las proteínas totales de las monocapas (ver M y M), y se realizó la técnica de "western blot", como indica la leyenda de la fig. N°12. Calle 1: células sin tratamiento, MM= marcadores moleculares. Este es el resultado más representativo de dos realizados en forma independiente.

La estimulación de la proliferación inducida por la $PGF_{2\alpha}$, sirvió como control de la acción del OAG y se observó que en las células pretratadas durante 72 horas con OAG, no fue potenciada en la misma proporción, que cuando el OAG fue agregado una hora antes que la $PGF_{2\alpha}$ (comparar con la fig. N°14). Este resultado se debe quizás, a una inactivación del OAG en el medio de cultivo después de varios días. Sin embargo, la estimulación de la síntesis de ADN inducida por la $PGF_{2\alpha}$, fue inhibida en las células pretratadas con OAG más GF (agregado una hora antes que el OAG) durante 72 horas. El GF inhibió a la PKC antes de que el OAG pudiera activarla y esta

inhibición se mantuvo en el tiempo. De forma consistente la estimulación de la síntesis de ADN por la $PGF_{2\alpha}$, se vió inhibida por el pretratamiento con TPA.

La sinergia entre la $PGF_{2\alpha}$ y el $TGF\beta_1$, se ve inhibida alrededor de un 30% en las monocapas pretratadas con GF 109203X más OAG, poniendo en evidencia que la PKC, es una señal involucrada, pero no la más importante en esta potenciación. En el pretratamiento con OAG más GF y en el pretratamiento con TPA, la falta de estimulación de la proliferación por la $PGF_{2\alpha}$, se debe a que la PKC se encuentra inhibida en el primero, mientras que en el segundo está retro-modulada. Únicamente el pretratamiento con TPA (o Briostatina 1), es capaz de promover la actividad mitogénica del $TGF\beta_1$.

Para determinar, que sólo el pretratamiento con TPA es capaz de retro-modular la PKC, se pretrataron las células con los mismos tratamientos mencionados arriba (los mismos que en la figura 15A), y luego de media hora con medio condicionado, se extrajeron las proteínas totales de las mismas. Con ellas se llevó a cabo la técnica de "Western blot" (ver M y M) y se detectó la presencia de la PKCα y CDK4, al igual que en la figura N°12. Los resultados se presentan en la figura N°15B.

La PKC está ausente únicamente en aquellas células pretratadas con TPA. La disminución observada de la banda de 82 kDa, correspondiente a la PKCα, en el pretratamiento con el GF 109203X más el OAG, se debe a que hay menos proteínas totales en esa calle (medida por la CDK4). También se realizó un ensayo con GF durante 72 hs., no se observó actividad mitogénica inducida por $TGF\beta_1$, y fue detectada la banda correspondiente a la PKCα (datos no mostrados).

De estos resultados, se desprende que la inhibición de la PKC durante períodos prolongados, no es suficiente para promover la inducción de la división celular por el $TGF\beta_1$. En cuanto a la activación por tiempos prolongados, habría que utilizar algún activador que no se inactive en el tiempo, como parece ocurrirle al OAG, para determinar si los activadores de la PKC son capaces o no de retro-modularla.

Todos estos resultados, obtenidos a través del estudio de la PKC, tomados en conjunto, sugieren un rol indirecto de esta enzima en el efecto proliferativo del $TGF\beta_1$, en las células donde la misma ha sido retro-modulada. Dado que la activación o inhibición de la PKC, no parece tener efecto directo sobre la proliferación inducida por el $TGF\beta_1$, se decidió observar qué pasaba con las señales que se conocen hasta el momento, activadas por el $TGF\beta_1$, en una y otra condición, comenzando por el estudio de los receptores del mismo. Se estudió que efecto tiene el pretratamiento con TPA, sobre los caminos de señalización activador por el $TGF\beta_1$.

11- Receptores del TGFβ_1

De acuerdo al trabajo de Cui et al. (1995), donde se observa que el receptor tipo II del TGFβ_1 se encuentra modulado por la adición de TPA en la piel de ratones transgénicos para el TGFβ_1, se determinó, qué sucedía con los receptores después el pretratamiento de la línea celular Swiss 3T3 con este mismo forbol éster. La presencia de los receptores del TGFβ_1 se determinó mediante el uso de anticuerpos policlonales, anti los receptores tipo I y II (Santa Cruz), y los resultados se muestran en la figura N°16.

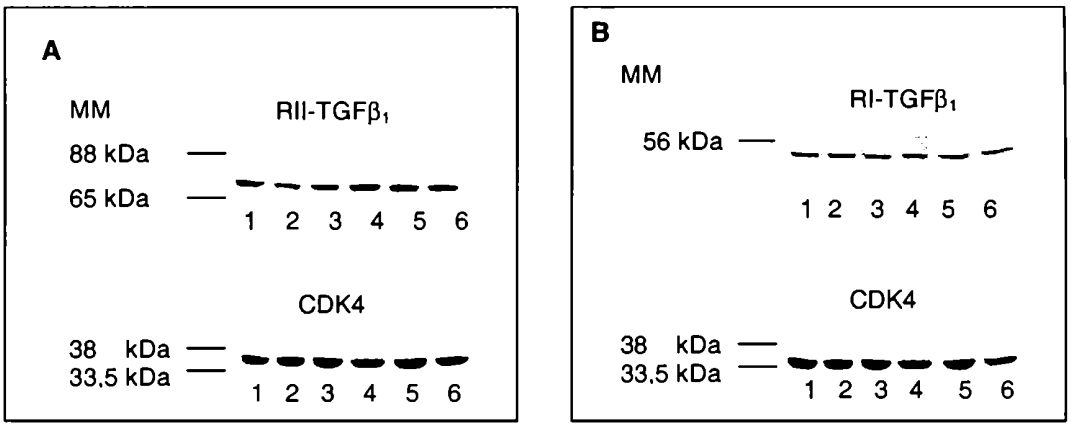


Figura N°16. Detección de los Receptores I y II del TGFβ_1 en Fibroblastos Swiss 3T3. Células confluentes y arrestadas sin tratamiento previo (calles 1, 2, y 3 en todas las fotos) y monocapas pretratadas con TPA (calles 4, 5 y 6, en todas las fotos), fueron estimuladas con TGFβ_1 (1.0 ng/ml). Calles 1 y 4 (en todas las fotos): sin adiciones; calles 2 y 5 (en todas las fotos): TGFβ_1 durante 30 minutos; calles 3 y 6 (en todas las fotos): TGFβ_1 durante 1 hora. Se sembraron 100 µg de proteínas en un gel 7 % de poliacrilamida. Las membranas fueron reveladas usando el sistema ECL (Amersham), y los anticuerpos utilizados fueron todos policlonales anti receptor tipo I (dil. 1/500), anti receptor tipo II (dil. 1/1000), ambos del TGFβ_1 y el anti CDK4 (dil. 1/1000), utilizado como control de carga de proteínas entre muestra y muestra (ver M y M). MM= marcadores de peso molecular. Estos resultados son los más representativos de tres realizados en forma independiente.

Como puede observarse en la figura N°16, en ambas condiciones, no hay cambios significativos en cuanto a la cantidad de los receptores tipo I y II, tanto sin adiciones o en presencia del TGFβ_1 durante 30 minutos y hasta la hora de estímulo ensayada. La inducción de la mitogénesis por el TGFβ_1 en células pretratadas con TPA, no se debería a diferencias en la expresión de los receptores de dicho factor, en esta condición, respecto de células sin pretratar.

Los receptores están presentes en ambas condiciones, pero en las células sin pretratar con TPA, no son capaces de transmitir la(s) señal(es) para inducir la síntesis de ADN. Se sabe que una de las primeras señales que induce el TGFβ_1, es la actividad quinasa en serina/treonina del receptor tipo II. Una forma de estudiar esta actividad quinasa, fue la utilización de un inhibidor de fosfatasas de proteínas fosforiladas en serina/treonina, el ácido Okadaico [Cohen et al., 1990], con el objetivo de ver el efecto sobre la acción del TGFβ_1, en células sin pretratar. En la figura N°17 se muestran los resultados obtenidos.

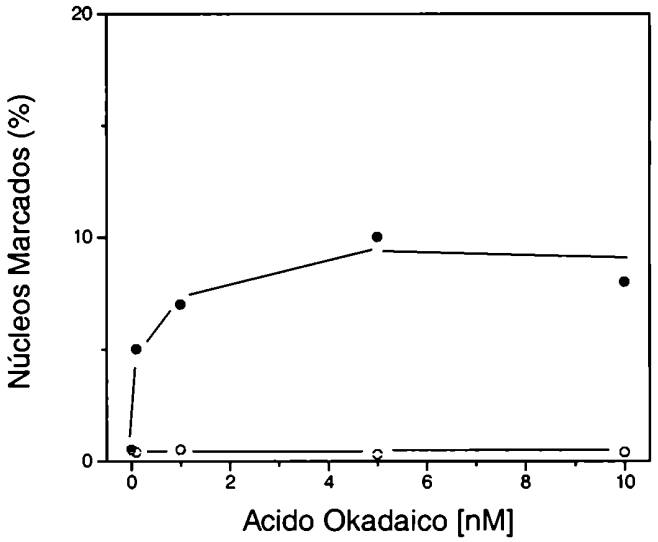


Figura N°17. Efecto del Acido Okadaico sobre el TGFβ_1 en Fibroblastos Swiss 3T3. Cultivos de fibroblastos de ratón Swiss 3T3, confluentes y arrestados, fueron tratados con concentraciones crecientes de ácido Okadaico, como se indica en el gráfico, una hora antes de recibir los siguientes estímulos: sin adiciones (circulo abierto), TGFβ_1 (1.0 ng/ml, circulo negro). El porcentaje de núcleos marcados se determinó como se indica en M y M. Los resultados corresponden a los duplicados de dos experimentos independientes y también corroborados por experimentos con la técnica de incorporación de timidina (ver M yM).

El ácido Okadaico, puede estimular la proliferación celular junto al TGFβ_1, con un bajo porcentaje de núcleos marcados después de 28 horas de estimulación (10 % a una concentración de 5 nM, más allá de los 10 nM, el ácido Okadaico resultó tóxico para las células), aún cuando ninguno de los dos compuestos es mitogénico por sí solo. Podría sugerirse, que el ácido Okadaico estaría inhibiendo fosfatasas en serina/treonina, y de esta manera permitiría que la fosforilación de los receptores del TGFβ_1 se mantenga por más tiempo. Este resultado sugeriría, en el mismo sentido, que el nivel de actividad de las fosfatasas específicas en serina/treonina en las células sin pretratar, es más alta o mantienen por más tiempo sus actividades, y esto impediría, de alguna manera, la acción mitogénica del TGFβ_1.

El nivel de fosfatasas, podría ser una de las causas que impide que el $TGF\beta_1$, sea capaz de inducir la síntesis de ADN, pero no impiden que este factor active otras señales que potencian la acción mitogénica de la $PGF_{2\alpha}$, en células sin pretratar. El porcentaje de células que entran en fase S, que resulta de la estimulación en presencia del $TGF\beta_1$ más el ácido Okadaico, en células sin pretratar, es bajo, comparado con el porcentaje de células en fase S (50%), estimuladas sólo con $TGF\beta_1$, en células pretratadas con TPA. Esto nos indicaría, que la participación de fosfatasas, no es la actividad determinante del efector mitogénico del $TGF\beta_1$.

Se buscó otro proceso estimulado por el $TGF\beta_1$, en células sin pretratar, a través del cual se pueda estudiar la activación de sus receptores. Para esto se procedió, a medir el transporte de glucosa en ambas condiciones.

12- Actividad de los Receptores del $TGF\beta_1$: Transporte de Glucosa

Otra estrategia para abordar el estudio de la actividad de los receptores del $TGF\beta_1$, es a través del evento bioquímico del transporte de glucosa, dado que se sabe que el $TGF\beta_1$ es capaz de inducir este transporte en los fibroblastos de ratón Swiss 3T3 [Inman y Colowick, 1985; Kitagawa et al., 1991]. En la figura N°18, se observa que el $TGF\beta_1$ estimuló el transporte tanto en células sin pretratar, como pretratadas con TPA y en esta última condición, el estímulo es mayor que el primero.

En la figura N°18, se observa que el $TGF\beta_1$, es capaz de inducir el transporte de glucosa en ambas condiciones, y en las células pretratadas con TPA, el efecto se ve aumentado casi dos veces y media. Estos resultados, indican que los receptores del $TGF\beta_1$, son capaces de ser activados en ambas condiciones, y además son capaces de transmitir señales. Dado que el efecto del $TGF\beta_1$ sobre el transporte de glucosa es mayor en el pretratamiento con TPA, éste podría estar afectando de forma positiva, la actividad de los receptores o algún punto del camino de señalización utilizado por los mismos.

Es interesante destacar también, que el transporte de glucosa es inducido en ambas condiciones, tanto por el $TGF\beta_1$, como por la $PGF_{2\alpha}$, aunque el efecto de esta última, se ve inhibida aproximadamente un 30% con el pretratamiento con TPA, lo que estaría indicando la participación de la PKC en este evento. Si bien la estimulación del transporte de 2-deoxiglucosa por la $PGF_{2\alpha}$ se ve disminuida en células pretratadas con TPA, se observa sinergia con el $TGF\beta_1$. Nuevamente podría sugerirse, que algunas señales activadas por la $PGF_{2\alpha}$, permanecen presentes e interaccionan con las señales disparadas por el $TGF\beta_1$. A diferencia de lo que ocurre en la

síntesis de ADN, la sinergia observada en las células pretratadas con TPA, es algo mayor que en las células sin pretratar (comparar con la figura N°1).

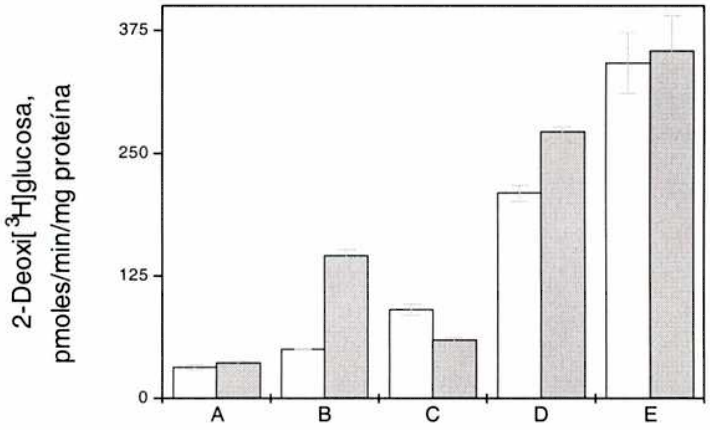


FIGURA N°18. Efecto del TGFβ_1 sobre el Transporte de 2-Deoxiglucosa.
Células Swiss 3T3 arrestadas y confluentes recibieron las estimulaciones durante 6 horas, luego de las cuales fueron marcadas con un pulso de 10 minutos de duración, con 2,5 μCi de 2-[1,2 ^{3}H]deoxiglucosa (50 μM), como se indica en M y M. Las adiciones fueron las siguientes. A= Control, B= TGFβ_1 (1.0 ng/ml), C=PGF$_{2\alpha}$ (300 ng/ml), D= TGFβ_1 + PGF$_{2\alpha}$, E= FBS (10% v/v). Las barras blancas representan cultivos sin pretratamiento; las barras grises representan cultivos pretratados con TPA (800 nM, 96 hs). Los resultados fueron analizados como se indica en M y M, y corresponden a duplicados de tres experimentos realizados en forma independiente.

Si bien no existe una correlación directa, entre los eventos bioquímicos de la síntesis de ADN y el transporte de glucosa, estos estudios pueden aportar datos sobre los caminos de señalización utilizados para activar ambos eventos. Otra forma de abordar la activación de distintos caminos de señalización, es a través del uso de otros factores u hormonas, cuyos caminos están más definidos. Trabajando a concentraciones saturantes del TGFβ_1, al agregar otro factor u hormona, se observa si hay potenciación del efecto mitogénico del primero. La potenciación indicaría que ambos compuestos utilizan vías separadas de señalización, mientras que la falta de potenciación estaría indicando que: o bien las vías activadas por ambos factores serían las mismas o compartirían alguna de ellas; o bien que las vías activadas no se interconectan.

13- Sinergias entre el TGFβ_1 y otros Factores u Hormonas

El trabajo de Jiménez de Asúa et al. (1981), muestra que en las células Swiss 3T3, tanto la insulina, la prostaglandina E1 (PGE$_1$), como la combinación de ambas, potencian la respuesta

mitogénica inducida por la $PGF_{2\alpha}$ (aún cuando se encuentra a concentraciones saturantes), esto indicaría, que no están actuando por los mismos caminos señalizantes, y que los activados por cada uno de ellos, convergerían para potenciar la respuesta mitogénica.

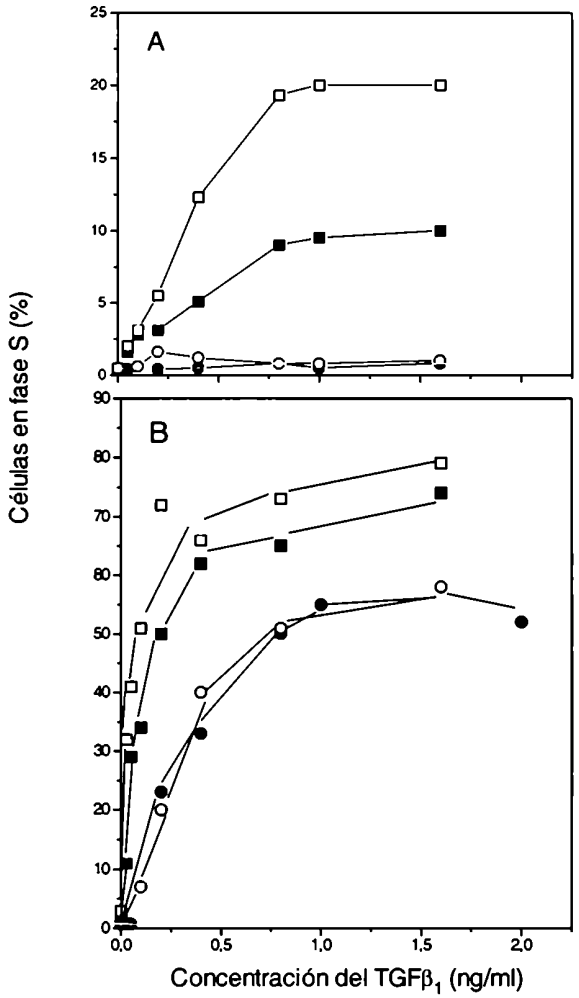


FIGURA N°19. Sinergias del $TGF\beta_1$ con Otros Factores u Hormonas en Fibroblastos de Ratón Swiss 3T3.

Células confluentes y arrestadas recibieron las siguientes adiciones: $TGF\beta_1$ ●; $TGF\beta_1$ + PEG_1 (100 ng/ml,) O; $TGF\beta_1$ + Insulina (100 ng/ml,) ■; $TGF\beta_1$ + PEG_1 + Insulina □. Figura A: células sin pretratar. Figura B: células pretratadas con TPA (800 nM, 96 hs.). La adición de insulina más PEG_1, no estimula la síntesis de ADN en ninguna condición. El porcentaje de células en fase S se determinó como se indica en la leyenda de la fig. N°1. Los resultados corresponden a duplicados de tres experimentos independientes.

En el trabajo de Gómez de Alzaga et al. (1994), se observó el efecto del agregado de la insulina junto al $TGF\beta_1$ en células sin pretratar, y ambos estimularon la proliferación celular.

Basados en este trabajo y con el objetivo de determinar si las acciones de la insulina, PGE_1, junto al $TGF\beta_1$ ocurren por vías similares o separadas, se observó el comportamiento de las mismas en ambas condiciones de crecimiento celular (Figura N°19).

Como puede observarse en la figura N°19A, el $TGF\beta_1$ y la insulina en condiciones sin pretratamiento, combinan sus acciones para inducir mitogénesis, aún cuando ninguno de ellos es capaz de dicha inducción *"per se"* [Gómez de Alzaga et al., 1994]. Aproximadamente a la concentración de 1 ng/ml de $TGF\beta_1$, la adición de 100 ng/ml de insulina lleva la estimulación a un máximo (10 % de células en fase S) y se mantiene hasta los 2 ng/ml de $TGF\beta_1$ ensayados.

En la condición de las células pretratadas con TPA, la insulina (100 ng/ml) también es capaz de potenciar la respuesta mitogénica inducida por el $TGF\beta_1$, aún cuando este último esté presente en concentraciones saturantes. El efecto máximo de síntesis de ADN inducido por ambos compuestos, se alcanza con la concentración de $TGF\beta_1$ 0,6 ng/ml. Es decir que además de potenciar la actividad de este último, reduce la concentración necesaria del factor para despertar la respuesta mitogénica. Ambos resultados sugieren vías de acción separadas para el $TGF\beta_1$ e insulina.

En la interacción entre el $TGF\beta_1$ y PGE_1 no se observa ningún efecto de potenciación, en ambas condiciones. La falta de potenciación cuando se adiciona PGE_1 a concentraciones saturantes de $TGF\beta_1$, sugiere que ambos factores compartirían algunos caminos señalizantes, o bien ninguno. Sin embargo, sus caminos diferirían ya que el $TGF\beta_1$ y la insulina son capaces de inducir la síntesis de ADN en células sin pretratar, mientras que la adición de insulina más PGE_1 no tiene ningún efecto sobre este evento. Y en las células pretratadas con TPA, la insulina potencia el efecto mitogénico del $TGF\beta_1$, mientras que el agregado de insulina más PGE_1, no estimula la proliferación. Se sabe que la acción del $TGF\beta_1$, en células sin pretratar, no involucra la síntesis de PGE_1, dado que la indometacina (inhibidor que bloquea la síntesis de PGE_1) no inhibe la potenciación del $TGF\beta_1$ sobre la respuesta mitogénica inducida por $PGF_{2\alpha}$ [Tashjian et al., 1985; Díaz et al., 1989].

La PGE_1, es capaz de potenciar el efecto mitogénico inducido por la acción de la insulina más el $TGF\beta_1$, en células sin pretratar, mientras que en células pretratadas con TPA, no aumenta aún más la potenciación de la insulina sobre el efecto mitogénico del $TGF\beta_1$ (salvo a bajas concentraciones del $TGF\beta_1$, menores de 0,2 ng/ml). Este resultado indicaría que la potenciación de la PGE_1 sobre la acción mitogénica de la insulina y el $TGF\beta_1$, depende de la PKC, y en las células pretratadas con TPA, esta enzima está retro-modulada; o bien la vía utilizada se encuentra saturada, y por esta razón, sólo se observa a bajas concentraciones del $TGF\beta_1$.

Para determinar que las sinergias no ocurren solamente a nivel de la estimulación de la síntesis de ADN, se realizaron los mismos experimentos y se contó el número de células, confirmando así la división celular resultante de los estímulos adicionados. Los resultados se presentan en la tabla N°2. Se observa que existe una correlación directa entre el porcentaje de células en fase S y el número de células, en las potenciaciones que surgen de la interacción del $TGF\beta_1$ con la insulina y la $PGF_{2\alpha}$, a nivel de la proliferación celular y en ambas condiciones.

TABLA N°2. Efecto del $TGF\beta_1$ en Presencia de Otros Factores y/u Hormonas en la Inducción de la Duplicación del ADN y División en Células Swiss 3T3.

Adiciones	Sin Pretratar con TPA		Pretratadas con TPA	
	Células en fase S (%)	Número de Células x 10^{-5}	Células en fase S (%)	Número de Células x 10^{-5}
Ninguna	0.5 ± 0.05	5.4 ± 0.5	0.5 ± 0.03	7.4 ± 0.6
$TGF\beta_1$	0.5 ± 0.06	5.4 ± 0.5	51.0 ± 5.50	10.7 ± 1.9
$PGF_{2\alpha}$	23.0 ± 1.80	6.5 ± 0.4	0.5 ± 0.03	7.5 ± 0.8
Insulina	0.5 ± 0.04	5.5 ± 0.3	0.5 ± 0.02	7.4 ± 0.5
$TGF\beta_1$ + $PGF_{2\alpha}$	83.0 ± 7.90	11.0 ± 0.9	75.5 ± 6.80	12.6 ± 1.4
$TGF\beta_1$ + Insulina	9.5 ± 0.90	6.1 ± 0.5	73.1 ± 7.10	12.2 ± 0.9
FBS	95.0 ± 8.50	14.3 ± 1.1	95.0 ± 8.70	21.6 ± 1.6

Las células Swiss 3T3 arrestadas y confluentes recibieron las siguientes estimulaciones: $TGF\beta_1$ 1.0 ng /ml, $PGF_{2\alpha}$ 300 ng/ml, Insulina 100 ng/ml, y FBS 10% v/v. Las células fueron marcadas con timidina (metil[^{3}H]) durante 28 horas. El porcentaje de células en fase S fue determinado por autorradiografía como se indica en M y M. El número de células se realizó tripsinisando las células 48 horas después del agregado de los estímulos (ver M y M). Los resultados son el promedio de duplicados de tres experimentos independientes.

14- Mecanismos de Señalización

El camino de señalización utilizado por la insulina, es el del sustrato del receptor de insulina 1 y 2, y la quinasa fosfatidil inositol 3´ (PI3k). La insulina, también activa el camino de la quinasa activada por mitógenos (MAPK) [Czech y Corvera, 1999; Myers et al., 1994]. El receptor de la PGE_1 se encuentra acoplado a la proteína trimérica G estimulatoria (Gs), incrementando los niveles de AMPcíclico y la actividad de la quinasa de proteínas A (PKA) [Petritsch et al., 1995; Goin y Jiménez de Asúa, 1992]. Al no observarse sinergia entre el $TGF\beta_1$ y la PGE_1, se decidió estudiar en primer lugar el rol de la PKA, en el efecto mitogénico del $TGF\beta_1$, además de estudiar, otros caminos de señalización que se sabe están modulados por el $TGF\beta_1$.

A) Inhibidores de la Activación de la Quinasa A

Se estudió la PKA a través del uso de dos inhibidores: H-89 2HCl (H-89) y PKI. El H-89 es un potente inhibidor permeable a la célula, selectivo de la PKA [Geilen et al., 1992], y el PKI es un péptido que inhibe a la PKA, mimetizando al sustrato de la enzima, al unirse a la subunidad catalítica de la misma, desplazando así a la subunidad regulatoria [Knighton et al. 1991]. Los resultados obtenidos pueden observarse en las figuras N°20 y 21.

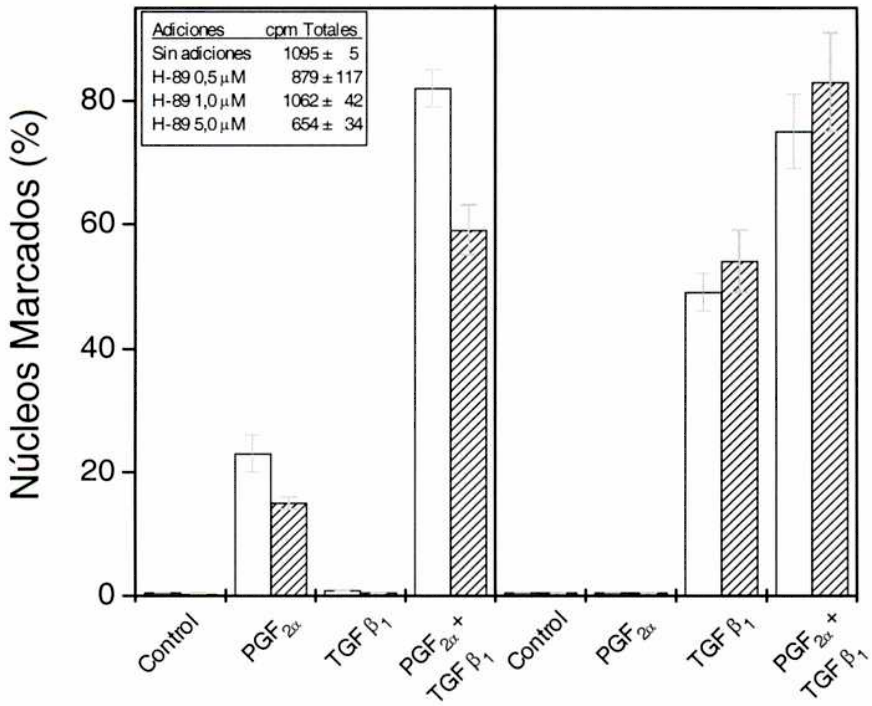


Figura N°20. Efecto del H-89 sobre la Inducción de la Proliferación mediada por $PGF_{2\alpha}$, $TGF\beta_1$ o ambos.

Células sin pretratar (panel derecho), y pretratadas con TPA (panel izquierdo), fueron estimuladas como se indica en la figura. Las concentraciones fueron: H-89 1 μM (barras con líneas diagonales, en ambos paneles), $PGF_{2\alpha}$ 300 ng/ml, $TGF\beta_1$ 1.0 ng/ml. El H-89 fue agregado 15 minutos antes de las demás adiciones. Junto a los estímulos se agregó timidina [metil ^3H] (1 μM, 3 μCi/ml) y las células fueron procesadas como se indica en M y M. Las barras blancas corresponden a los estímulos que se indican en la figura en ausencia del inhibidor. Estos resultados fueron obtenidos por duplicado de uno de dos experimentos independientes y también se correlacionan con experimentos similares realizados por incorporación de timidina (ver M y M). En el inserto se muestra una tabla con los datos del efecto del H-89 (a concentraciones crecientes) sobre la incorporación basal de timidina en células sin pretratar.

En la figura N°20 se muestran los resultados obtenidos con el H-89. El ensayo a través de los núcleos marcados se realizó en presencia de 1 μM de H-89 (barras con líneas diagonales en ambos paneles de la figura N°20), y se puede observar que en células sin pretratar (panel izquierdo de la figura N°20) éste inhibió la acción de la $PGF_{2\alpha}$, en aproximadamente un 35 %, y la sinergia de ésta con el $TGF\beta_1$ también se inhibió en un 28 %, respecto del experimento en ausencia del inhibidor. En las células pretradas con TPA (panel derecho de la figura N°20), el H-89 no inhibió a la proliferación inducida por el $TGF\beta_1$ solo, como tampoco la sinergia de éste con la $PGF_{2\alpha}$, más bien se observó un pequeño aumento (aprox. un 10 %).

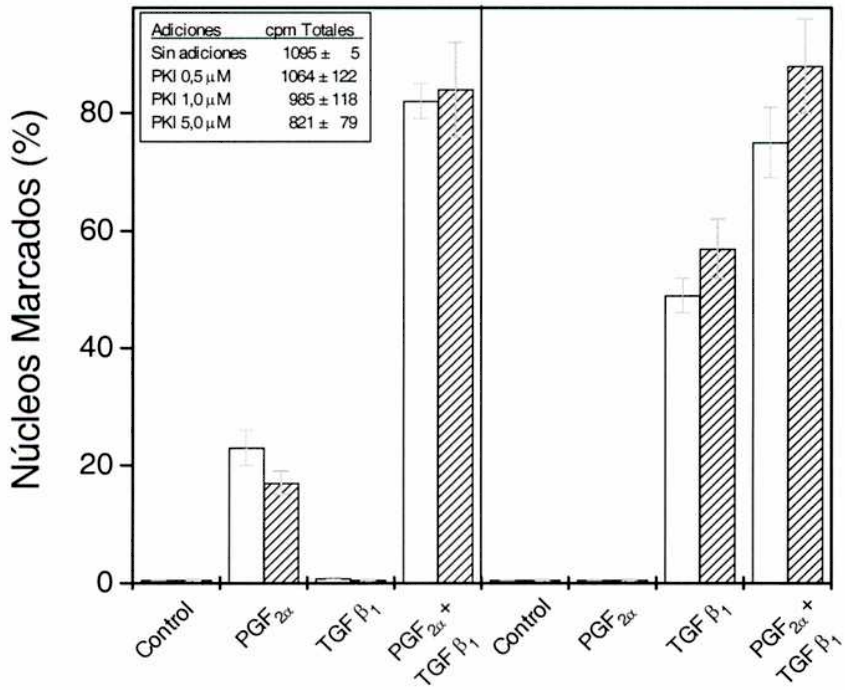


Figura N°21. Síntesis de ADN Inducida por $PGF_{2\alpha}$ y $TGF\beta_1$, en Presencia del PKI.

Células arrestadas y confluentes sin tratamiento previo (panel derecho), y pretratadas con TPA (panel izquierdo), fueron estimuladas como se indica en la figura. Las concentraciones fueron: PKI 1 μM (barras con líneas diagonales), $PGF_{2\alpha}$ 300 ng/ml, $TGF\beta_1$ 1.0 ng/ml. El PKI fue agregado 15 minutos antes de las demás adiciones. Junto a los estímulos se agregó timidina [metil ^3H] (1 μM, 3 μCi/ml) y las células fueron procesadas como se indica en M y M. Las barras blancas corresponden a los estímulos que se indican en la figura en ausencia del inhibidor. Estos resultados fueron obtenidos por duplicado de uno de dos experimentos independientes y también se correlacionan con experimentos similares realizados por incorporación de timidina (ver M y M). En el inserto se observan las cpm obtenidas con concentraciones crecientes de PKI, en la incorporación basal de timidina de células sin pretratar.

El efecto del PKI sobre la síntesis de ADN, se muestra en la figura N°21, donde al igual que con el H-89, se trabajó con 1 μM (barras con líneas diagonales en ambos paneles de la figura N°21), por su efecto tóxico a concentraciones más altas. Si bien el PKI, fue capaz de inhibir la inducción de la proliferación mediada por la $PGF_{2\alpha}$ (un 26 % de inhibición), no afectó a la sinergia de ésta con el $TGF\beta_1$, en células sin pretratar (panel izquierdo de la figura N°21). En el ensayo con las células pretratadas con TPA (panel derecho, fig. N°21), se observa más bien un aumento sobre la proliferación inducida tanto por el $TGF\beta_1$, como en la sinergia con la $PGF_{2\alpha}$ (16 y 17 %, respectivamente), pero éste no es significativo.

De los resultados obtenidos con la utilización de dos inhibidores de la actividad de la PKA, que actúan a distintos niveles, se puede sugerir que la activación del camino de la PKA estaría involucrada en la señalización de la $PGF_{2\alpha}$ en células sin pretratar. Se puede observar también, que la inhibición de la PKA no tiene efecto negativo, sobre la inducción de la proliferación mediada por el $TGF\beta_1$ en células pretratadas con TPA, y muy poco sobre la sinergia entre el $TGF\beta_1$ y la $PGF_{2\alpha}$ en ambas condiciones. Por lo tanto la PKA, no está involucrada en la estimulación de la síntesis de ADN por el $TGF\beta_1$, en células pretratadas con TPA.

B) Inhibición de la Activación de las Quinasas en Tirosina

Se demostró que tanto la $PGF_{2\alpha}$ [Jiménez de Asúa y Goin, 1997; Hakeda et al., 1997], como el $TGF\beta_1$ [Lawler et al. 1997] son capaces de activar quinasas de tirosina. Se realizó el ensayo de la marcación de núcleos con timidina metil [^{3}H], en presencia de un inhibidor de quinasas en tirosina, Genisteina (Gen) [Bershadsky et al., 1996; Leeb-Lundberg y Song, 1991], para estudiar la participación de este tipo de quinasas en las señales activadas por el $TGF\beta_1$ en la inducción de la proliferación de células sin pretratar y pretratadas con TPA.

El ensayo se realizó incubando las células 15 minutos antes del agregado de los estímulos con 10 μM de Genisteina. En la figura N°22 se muestran los resultados obtenidos. Se observa que la Genisteina, inhibió un 10 % a la inducción de la proliferación de la $PGF_{2\alpha}$ y un 20 % a la sinergia de ésta con el $TGF\beta_1$, en células sin pretratar. Dado que la inhibición de la proliferación con $PGF_{2\alpha}$, es menor que la inhibición de la sinergia entre ésta y el $TGF\beta_1$, se podría inferir que se está inhibiendo quinasas en tirosina activadas por el $TGF\beta_1$, que actúan en la potenciación del efecto de la $PGF_{2\alpha}$. En las células pretratadas con TPA, la inhibición del $TGF\beta_1$ y la potenciación por la $PGF_{2\alpha}$, se ven inhibidas en un 20 y 30 % respectivamente. Podría inferirse nuevamente que en esta condición, no sólo se inhibe en parte la señalización del $TGF\beta_1$, sino además las señales vía quinasas de tirosina activadas por la $PGF_{2\alpha}$, poniéndose en evidencia a través de una mayor inhibición en la sinergia entre los dos mitógenos.

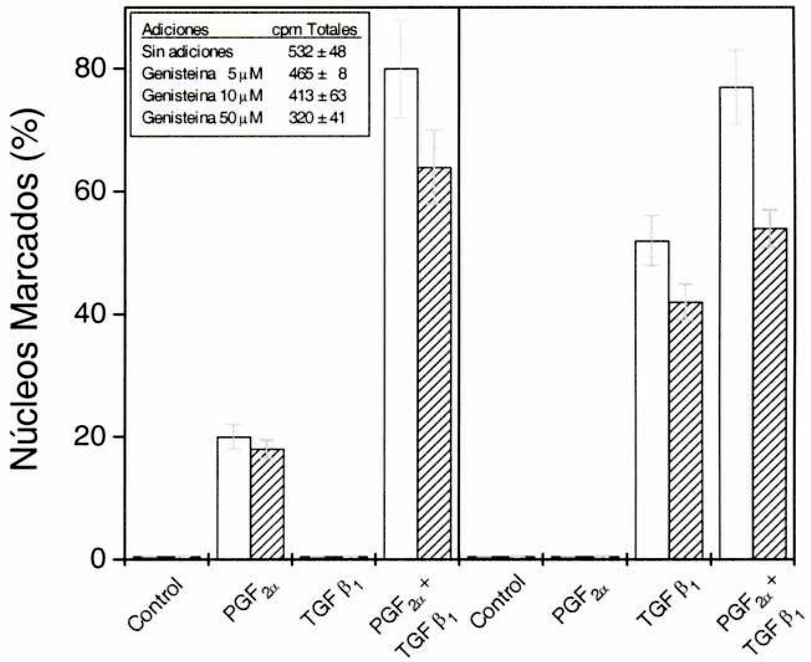


Figura N°22. Proliferación Celular Inducida por $PGF_{2\alpha}$ y $TGF\beta_1$, en Presencia de Genisteina.

Células arrestadas y confluentes sin tratamiento previo (panel derecho), y pretratadas con TPA (panel izquierdo), fueron estimuladas como se indica en la figura. Las concentraciones fueron: Genisteina 10 μM (barras con líneas diagonales), $PGF_{2\alpha}$ 300 ng/ml, $TGF\beta_1$ 1.0 ng/ml. 15 minutos antes del agregado de los estímulos se agregó Genisteina. Junto a los estímulos se agregó timidina [metil ^3H] (1 μM, 3 μCi/ml) y las células fueron procesadas como se indica en M y M. Las barras blancas corresponden a los estímulos que se indican en la figura en ausencia del inhibidor. Estos resultados fueron obtenidos por duplicado de uno de dos experimentos independientes y también se correlacionan con experimentos similares realizados por incorporación de timidina (ver M y M). En el inserto se observa el efecto de las concentraciones crecientes de Genisteina sobre la incorporación de timidina basal de células sin pretratar.

De estos resultados se concluye, que las quinasas de tirosina están involucradas en las vías de señalización tanto del $TGF\beta_1$ como de la $PGF_{2\alpha}$, en ambas condiciones. Se puede inferir que las quinasas de tirosina activadas en las células pretratadas con TPA, son independientes de la PKC.

C) Estudio de la Quinasa Activada por Mitógenos (MAPK).

Hasta el momento, se observó que de los módulos de MAPK que existen en mamíferos, el que comprende a las quinasas reguladas por señales extracelulares 1 y 2 (ERK 1/2), es el preferencialmente activado en los procesos de proliferación celular y diferenciación [Garrington y

Johnson, 1999]. Este camino de señalización, comienza con la activación de la proteína Ras isoprenilada, que a su vez interactúa con la proteína Raf 1, y ésta finalmente fosforila a la quinasas de la MAPK 1 y 2 (MEK 1/2). La MEK 1/2 fosforila a la ERK 1/2 y ésta se traslada al núcleo y actúa, junto a otras proteínas, en la activación de la transcripción de ciertos genes [Schaeffer y Weber, 1999]. Yamaguchi et al. (1995), reportaron que el $TGF\beta_1$ activa un componente de esta vía de señalización, y en base a estos resultados se decidió estudiar la MAPK desde varios ángulos: utilizando dos tipos de inhibidores, a través de la presencia de la enzima activada y también a través de la determinación de la actividad de la misma.

La conversión del 3-hidroxi 3-metilglutaril-coenzima A (HMG-CoA) a mevalonato, es catalizada por la reductasa HMG-CoA (HMGR), la enzima de tasa limitante en la síntesis de esteroles e isoprenoides o terpenos [Goldstein y Brown, 1990]. Las mitades lipídicas derivadas del mevalonato, son esenciales en eventos centrales de la proliferación y diferenciación celular, desde el transporte de electrones hasta la división celular. La maduración de la familia de proteínas Ras, de las proteínas G heterotriméricas (subunidad gama), entre otras, requieren para su actividad, de la unión covalente a isoprenoides derivados del mevalonato, como C_{15} (farnesil) o C_{20} (geranilgeraniol) [Cox et al., 1994]. La lovastatina inhibe a la HMGR, inhibiendo el camino de síntesis del colesterol e isoprenoides. Inhibe en forma general la isoprenilación de las proteínas, y en el y en el camino de activación de la MAPK afecta uno de los primeros pasos, ya que la proteína Ras no dispondría de isoprenilos [Shack et al., 1999]. El mevalonato es el producto de la enzima HMGR, y agregado revierte la acción de la lovastatina. En el trabajo del laboratorio de Ortiz et al. (1995), utilizaron la mevalonolactona (MEV), como análogo del mevalonato, t ka lovastatina, en el estudio de la proliferación celular inducida por $PGF_{2\alpha}$ y EGF en fibroblastos de ratón Swiss 3T3, y en base a este trabajo se utilizaron las concentraciones correspondientes de cada compuesto. Los resultados obtenidos se muestran en la figura N°23.

En células sin pretratar, la lovastatina inhibió la inducción de la proliferación de la $PGF_{2\alpha}$ y también a la sinergia de ésta con el $TGF\beta_1$ (aunque en menor grado). La mevalonolactona, fue capaz de restituir la actividad tanto de la $PGF_{2\alpha}$ como de su sinergia con el $TGF\beta_1$.

En las células pretratadas con TPA la lovastatina, no inhibió la acción del $TGF\beta_1$, pero sí la sinergia de éste con la $PGF_{2\alpha}$. Podría inferirse, que la inhibición en la sinergia se debe a la acción de la lovastatina sobre la $PGF_{2\alpha}$. En forma consistente, la mevalonolactona fue capaz de revertir la inhibición de la lovastatina.

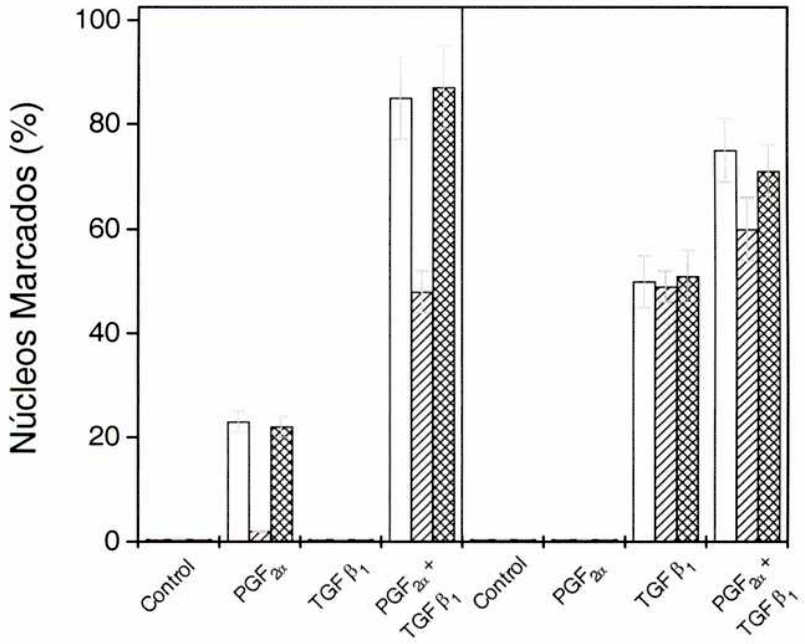


Figura N°23. Efecto de la Lovastatina sobre la Proliferación Celular Inducida por $PGF_{2\alpha}$ y $TGF\beta_1$, y su Reversión por el agregado de Mevalonolactona.

Células arrestadas y confluentes sin tratamiento previo (panel derecho), y pretratadas con TPA (panel izquierdo), fueron estimuladas como se indica en la figura. Las concentraciones fueron: Lovastatina (Lov) 80 μM (barras con líneas diagonales), Mevalonolactona (Mev) 800 μM (barra con líneas cruzadas), $PGF_{2\alpha}$ 300 ng/ml, $TGF\beta_1$ 1.0 ng/ml. El agregado de Lov o Lov más Mev, se realizó 15 minutos antes del agregado de los estímulos. Junto a los estímulos se agregó timidina [metil ^3H] (1 μM, 3 μCi/ml) y las células fueron procesadas como se indica en M y M. Las barras blancas corresponden a los estímulos que se indican en la figura en ausencia de Lov, o Lov más Mev. Estos resultados fueron obtenidos por duplicado de uno de dos experimentos independientes y también se correlacionan con experimentos similares realizados por incorporación de timidina (ver M y M).

Tomando los resultados de ambas condiciones, se puede concluir que la isoprenilación de proteínas, no juega un rol importante en la señalización del $TGF\beta_1$, al menos en forma directa y significativa. Y que la isoprenilación de las proteínas es importante, en la acción mitogénica de la $PGF_{2\alpha}$ e independiente de la actividad de la PKC.

Al usar un inhibidor más específico sobre la acción de la MAPK, como el PD 98059 (PD) [Dudley et al., 1995], que inhibe a la enzima MEK, que a su vez fosforila a MAPK, se observó, que éste fue capaz de inhibir la acción de la $PGF_{2\alpha}$ casi totalmente, pero a diferencia de la lovastatina no inhibió la sinergia de ésta con el $TGF\beta_1$, en células sin pretratar (panel derecho, fig. N°24).

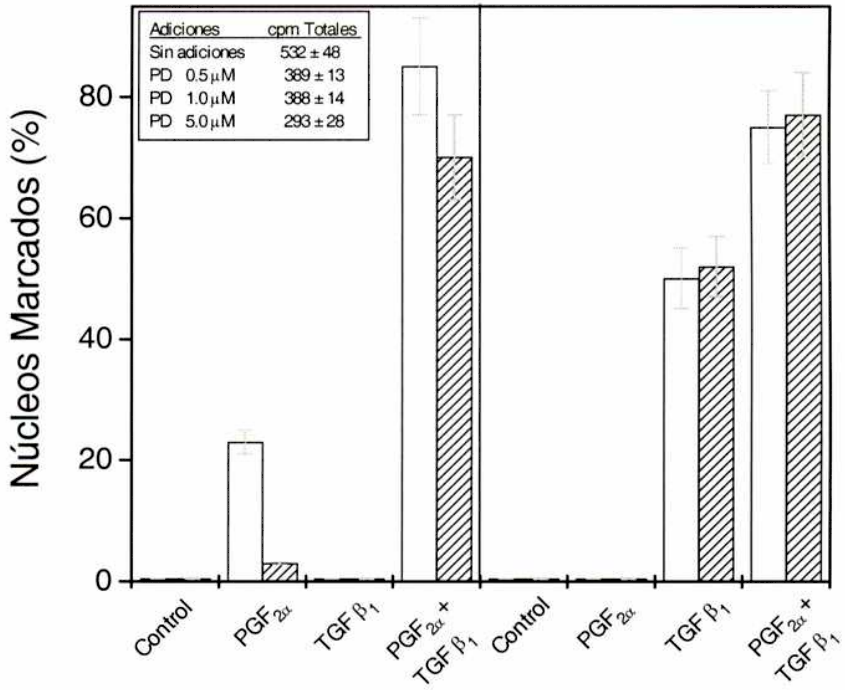


Figura N°24. Efecto del PD 98059 sobre la Proliferación Celular Inducida por $PGF_{2\alpha}$ y $TGF\beta_1$.

Células arrestadas y confluentes sin tratamiento previo (panel derecho), y pretratadas con TPA (panel izquierdo), fueron estimuladas como se indica en la figura. Las concentraciones fueron: PD 98059 1 μM (PD, agregado 15 min. antes de los estímulos, barras con líneas diagonales), $PGF_{2\alpha}$ 300 ng/ml, $TGF\beta_1$ 1.0 ng/ml. Junto a los estímulos se agregó timidina metil [^{3}H] (1 μM, 3 μCi/ml) y las células fueron procesadas como se indica en M y M. Las barras blancas corresponden a los estímulos que se indican en la figura en ausencia del inhibidor. Estos resultados fueron obtenidos por duplicado de uno de dos experimentos independientes y también se correlacionan con experimentos similares realizados por incorporación de timidina (ver M y M). En el inserto se observa el efecto de las concentraciones crecientes de PD, sobre la incorporación basal de timidina de células sin pretratar.

Estos resultados sugieren, que en la potenciación del $TGF\beta_1$ sobre la inducción de síntesis de ADN por $PGF_{2\alpha}$, en células sin pretratar, no interviene en el camino de señalización de la MAPK.

En las células pretratadas con TPA, el PD no fue capaz de inhibir la acción mitogénica del $TGF\beta_1$, ni a la sinergia de éste con la $PGF_{2\alpha}$, es decir que la MAPK no jugaría un rol importante en la señalización del $TGF\beta_1$, ni en la inducción de la proliferación de células pretratadas con TPA.

La actividad de la MAPK fue estudiada por dos métodos. Uno, a través del uso de un anticuerpo monoclonal (New England Biolabs), que reconoce a la forma activada de las enzimas ERK 1/2 (p42/p44), que ocurre cuando éstas están fosforiladas en tirosina (posición 204) y en treonina (posición 202). El otro método, fue realizado en colaboración con el grupo del Dr. Omar Coso, y se realizó a través de la inmunoprecipitación de la MAPK con un anticuerpo policlonal (ERK2, Santa Cruz), y a partir de esta precipitación, se midió luego la fosforilación de la proteína básica de mielina (MBP, ver M y M). En la figura N°25, se presentan los resultados obtenidos por ambos métodos, y como se puede observar, existe una correlación directa entre ambos resultados.

En el panel A de la figura N°25, se observa la membrana con las proteínas obtenidas de extractos de células sin pretratar, que fueron estimuladas con $PGF_{2\alpha}$, $TGF\beta_1$ o ambos, durante 2, 5 y 10 minutos. La $PGF_{2\alpha}$, fue capaz de activar la MAPK a los 2 y a los 5 minutos de incubación, mientras que a los 10 min. ya no se observó la proteína activada (al menos al nivel de detección por anticuerpos). El $TGF\beta_1$ no activó a la MAPK, al menos hasta los 10 min. de incubación ensayados. En la sinergia entre éste y la $PGF_{2\alpha}$, se observó nuevamente la MAPK activada entre los 2 y 5 min.

En el panel B de la figura N°25, se observa el mismo ensayo, que el realizado en el panel A, pero utilizando células pretratadas con TPA. Se observó la doble banda de 42/44 kDa correspondiente a la MAPK activada, únicamente en presencia de la $PGF_{2\alpha}$, y de ésta con el $TGF\beta_1$, pero sólo a los 5 minutos de incubación.

En el ensayo de la actividad de la MAPK, puede observarse que la fosforilación de la MBP ocurre solo en presencia de la $PGF_{2\alpha}$ y de ésta con el $TGF\beta_1$ en ambas condiciones, a diferencia de la inmunodetección de la proteína activada, aquí la activación de la misma está presente a los 10 minutos, siendo menor en la mayoría de los tratamientos donde se induce dicha actividad. Se observa algo de actividad en la incubación con el $TGF\beta_1$ en células pretratadas con TPA, pero está en el rango de intensidad que se observa en las células control, que han sido pretratadas con TPA, pero que no han recibido ningún estímulo.

La primera conclusión que se puede realizar de este conjunto de ensayos es que el $TGF\beta_1$ no activa a la MAPK (por los menos hasta los 10 min. de incubación ensayados), en ninguna condición, es decir que la señalización activada por este factor, no utiliza la vía de la MAPK, para potenciar el efecto mitogénico inducido por $PGF_{2\alpha}$, en células sin pretratar; ni en el efecto mitogénico del mismo en células pretratadas con TPA. Esto indicaría también que el $TGF\beta_1$ es capaz de inducir la síntesis de la ciclina D_1, por una vía alternativa a la de la MAPK. La segunda conclusión, es que la activación de la MAPK por la $PGF_{2\alpha}$ es independiente de la PKC, ya que

ésta ocurre en ambas condiciones. La actividad de la MAPK inducida por la $PGF_{2\alpha}$ y en la sinergia de ésta con el $TGF\beta_1$, se encuentra presente en ambas condiciones, con lo que podría inferirse que sería una de las señales activadas por la $PGF_{2\alpha}$, involucrada en la coordinación de señales de ambos mitógenos, aunque los resultados con el uso de inhibidores indicarían que esta señal no es indispensable para la acción de ambos, ya que la inhibición de la síntesis de ADN no es total.

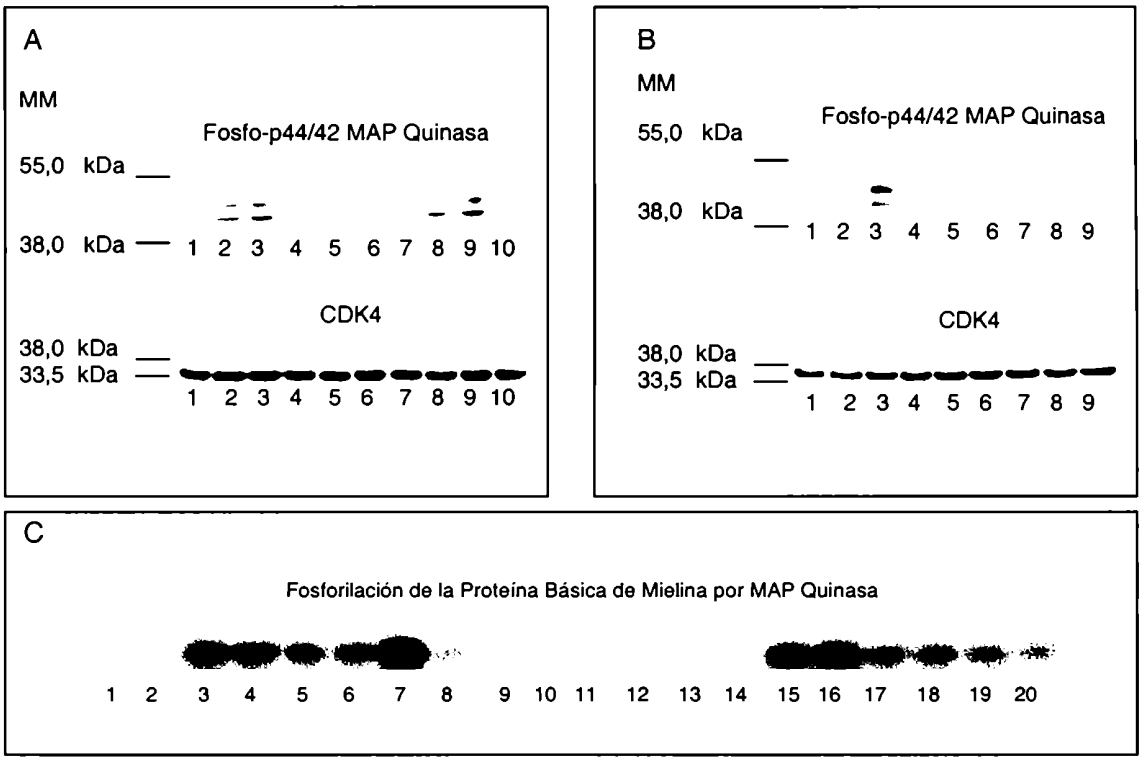


Figura N°25. Actividad de MAP Quinasa.

Panel A= células sin pretratar arrestadas y confluentes. Panel B= células pretratadas con TPA (800 nM, 96 horas), arrestadas y confluentes. En ambos paneles los estímulos fueron los siguientes: Calle 1, sin adiciones; Calle 2, 3 y 4, $PGF_{2\alpha}$, Calle 5, 6 y 7, $TGF\beta_1$, Calle 8, 9 y 10 $PGF_{2\alpha}$ más $TGF\beta_1$. Las incubaciones (en ambos paneles), se realizaron durante 2 (calles 2, 5 y 8), 5 (calles 3, 6 y 9) y 10 min. (calles 4, 7 y 10), respectivamente. Las proteínas fueron obtenidas como se indica en M y M, y se sembraron 80 μg de proteínas totales por calle, en un gel 10% de poliacrilamida. Las concentraciones de $TGF\beta_1$ y $PGF_{2\alpha}$, fueron 1.0 ng/ml y 300 ng/ml, respectivamente. Las membranas fueron reveladas por quimioluminiscencia con el sistema ECL (Amersham), y los anticuerpos utilizados fueron: anticuerpo monoclonal anti fosfo-p44/42 MAP Quinasa (New England Biolabs) y anticuerpo policlonal anti CDK4 (Santa Cruz, Inc), ambos en una dilución 1/1000, (ver M y M). Este es el resultado más representativo de dos realizados en forma independiente.

Panel C= Actividad de MAP Quinasa medida por fosforilación de la proteína básica de mielina, a través de la inmunoprecipitación de la MAP Quinasa (ver M y M).

D) Activación de las Smads.

Por último, se decidió estudiar, la activación de las moléculas señalizantes específicamente activadas por el TGFβ_1, como son las Smads. Se sabe que el TGFβ_1 activa mediante fosforilación en tirosina a la Smad2 y ésta a su vez a la Smad3, y juntas fosforilan a la Smad4 y se translocan como complejo al núcleo, donde junto a otras proteínas activan la transcripción de algunos genes [Souchelnystskgi et al., 1997; Kawataba y Miyazono, 1999]. Los ensayos de inmunofluorescencia, utilizando un anticuerpo monoclonal anti Smad4 comercial (Santa Cruz), y un segundo anticuerpo anti inmunoglobulinas de ratón obtenido en cabra y conjugado con fluoresceina (Sigma, ver M y M), se muestran en las fotografías de las figuras N°26 y N°27.

En la figura N°26, donde se realizó el ensayo con células sin pretratar, se observa que en las células control (sin adiciones), que forman una monocapa confluente y quiescente, la proteína Smad4 se encuentra en el citoplasma, con una distribución que parece acompañar a microtúbulos, y también en el núcleo, donde se localiza de forma más homogénea (foto A, fig. N°26). La translocación de la Smad4 al núcleo, se observa cuando el mismo aparece con los bordes más definidos y la fluorescencia dentro de él es más intensa, al mismo tiempo que la cantidad de fluorescencia en el citoplasma disminuye. El comienzo de la translocación, se observó a los 15 minutos de incubación con el TGFβ_1 (foto B, fig. N°26). La mayor definición de los núcleos, se observó a los 45 minutos de incubación con TGFβ_1, casi sin fluorescencia en el citoplasma (foto C, fig. N°26). A la hora de incubación con el factor, comenzó a aumentar la fluorescencia en el citoplasma, y fue mayor a la hora y cuarto, pero sin una disminución marcada de la fluorescencia en el núcleo (fotos D y E respectivamente, fig. N°26).

En células pretratadas con TPA, se observó mayor fluorescencia en el citoplasma y los núcleos están menos definidos que en las células sin pretratar, tanto en las células que no han estado en contacto con el TGFβ_1, como las que estuvieron con el factor durante 15 min. (fotos A y B respectivamente, fig. N°27). Nuevamente se observó, a los 45 min. de incubación con TGFβ_1, que la fluorescencia fue mayor en los núcleos y casi imperceptible en el citoplasma (foto C, fig. N°27). A la hora y hora y cuarto, la fluorescencia en el citoplasma comenzó a aumentar (fotos D y E respectivamente, fig. N°27).

De estos resultados, se puede concluir que el TGFβ_1, es capaz de activar el camino de señalización específico de este factor, en ambas condiciones. La activación del camino de las Smad, se detecta a través de la translocación al núcleo de la Smad4, y esto ocurre en ambas condiciones, lo que indicaría que este camino es independiente de la PKC. Estos resultados, también son una evidencia más, de la actividad de los receptores del TGFβ_1 en ambas condiciones, y a un mismo tiempo. Dado que la activación de esta vía ocurre en ambas condiciones, no sería

este camino el que le otorga al TGFβ_1 la capacidad de inducir la proliferación en las células pretratadas con TPA.

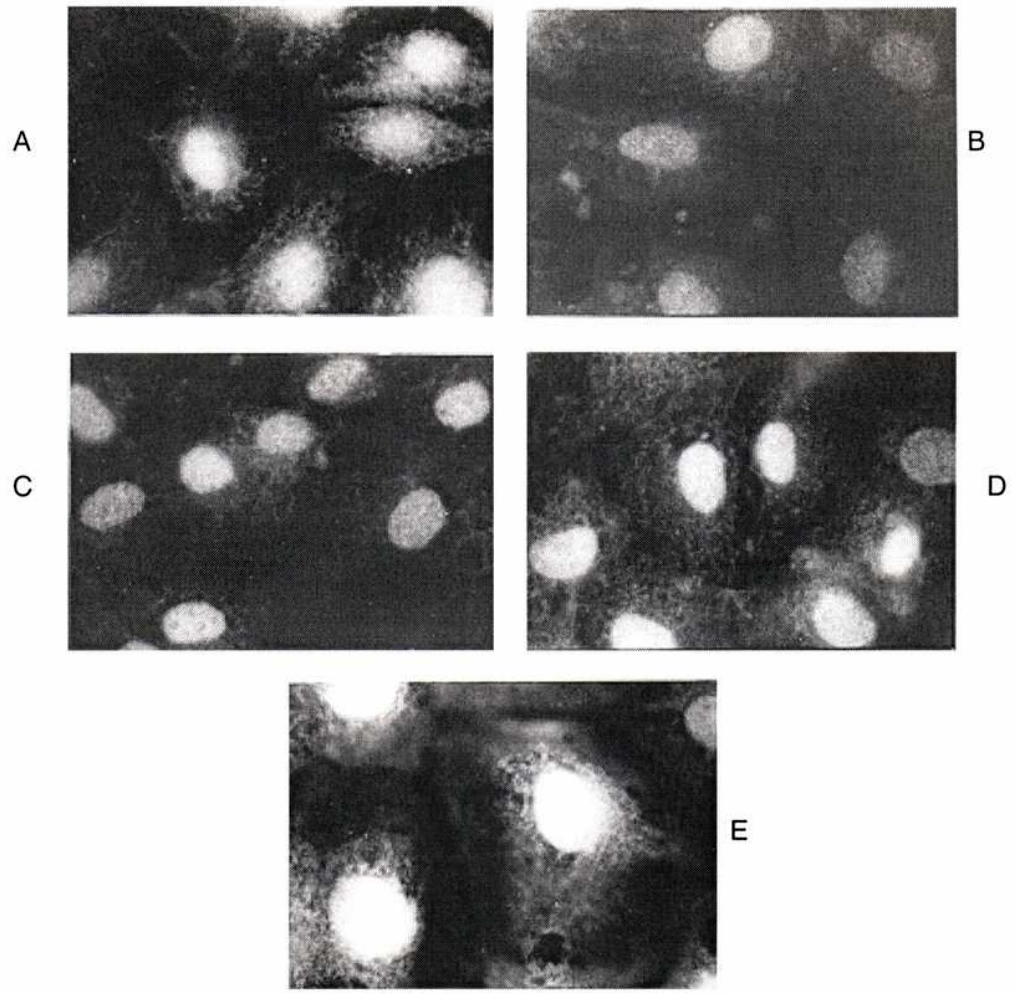


Figura N°26. Translocación al núcleo de la Smad4.

En todas las fotos (1000X) se muestran células sin ningún tipo de tratamiento, estimuladas de la siguiente manera. Foto A: sin adiciones. Fotos B, C, D y E: TGFβ_1 (1.0 ng/ml), durante 15 min., 45 min., 1 h. y 1 h. con 15 min., respectivamente. A los distintos tiempos indicados, las células fueron fijadas y procesadas para inmunofluorescencia como se indica en M y M. Las diluciones de los anticuerpos fueron: 1/10 monoclonal anti Smad4 (Santa Cruz), 1/50 conjugado con isotiocianato de fluoresceina anti inmunoglobulinas murinas de cabra (Sigma). Este es el resultado más representativo de dos realizados en forma independiente.

En las figuras N° 28 y 29, se muestran los resultados obtenidos del ensayo de la translocación de la Smad4 al núcleo en células arrestadas y confluentes sin pretratar o pretratadas con TPA. Las

monocapas fueron incubadas con $PGF_{2\alpha}$ (300 ng/ml), $TGF\beta_1$ (1 ng/ml), o ambas, durante 45 minutos.

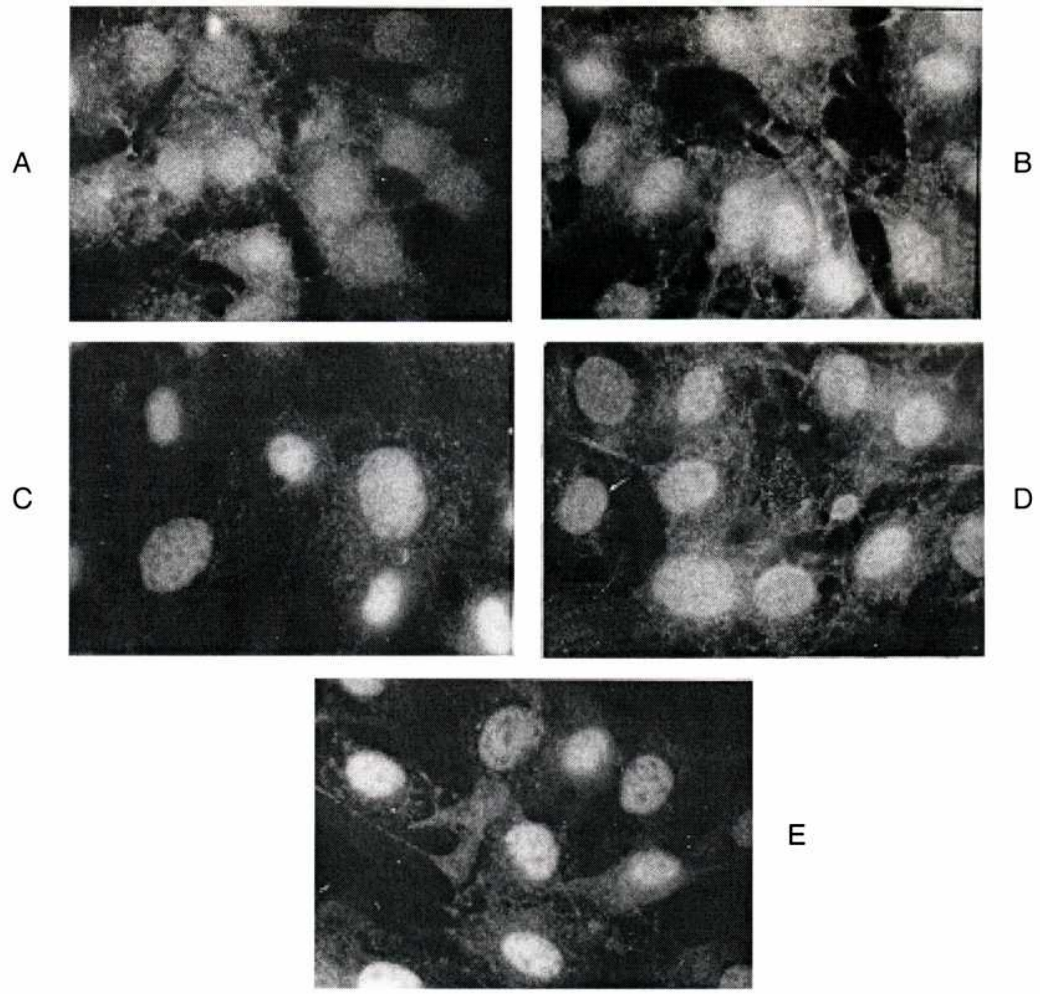


Figura N°27. Detección por inmunofluorescencia de la Smad4.
En todas las fotos (1000X) se muestran células pretratadas con TPA.. Foto A: sin adiciones. Fotos B, C, D y E: $TGF\beta_1$ (1.0 ng/ml), durante 15 min., 45 min., 1 h. y 1 h. con 15 min., respectivamente. Las células fueron procesadas como se indica en M y M. Las diluciones de los anticuerpos fueron las mismas que se indican en la leyenda de la figura N°26. Este es el resultado más representativo de dos realizados en forma independiente.

En ambas figuras, puede observarse que el $TGF\beta_1$ es el único que induce la translocación al núcleo de la Smad4, y que la presencia de la $PGF_{2\alpha}$, no tiene un efecto significativo sobre esta translocación adicionada junto al $TGF\beta_1$, al menos, no se observa una mayor fluorescencia en los núcleos de las células incubadas con ambos factores.

En la figura N°29, se puede observar que la fluorescencia en las monocapas controles (sin adiciones), y en las incubadas en presencia del $PGF_{2\alpha}$, se encuetran distribuida de forma más homogénea por todo el citoplasma y los núcleos son menos definidos, que en las células que no han sido pretratadas con TPA.

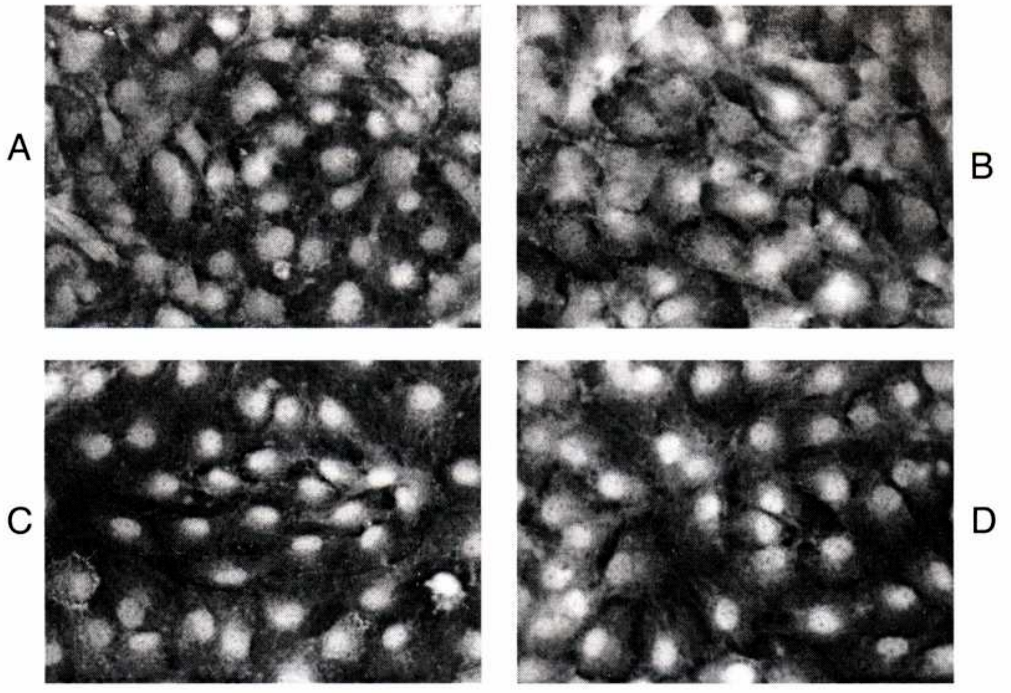


Figura N°28. Trasnlocación al núcleo de la Smad4.

En todas las fotos (400X) se muestran células sin pretratar, estimuladas durante 45 minutos con las siguientes adiciones. Foto A: sin adiciones. Foto B: $PGF_{2\alpha}$ (300 ng/ml). Foto C: $TGF\beta_1$ (1 ng/ml). Foto D: $TGF\beta_1$ más $PGF_{2\alpha}$. Las células fueron procesadas como se indica en M y M. Los anticuerpos utilizados y sus diluciones fueron los mismos que se indican en la leyenda de la figura N°26. Este es el resultado más representativo de dos realizados en forma independiente.

De todos los resultados obtenidos, se puede concluir que el $TGF\beta_1$ es capaz de inducir la proliferación de las monocapas pretratadas con TPA, y de alguna manera indirecta está involucrada la PKC, que sus receptores y su vía de señalización específica, se encuentran activas y no se ven mayormente afectadas por el pretratamiento. De estos resultados se desprende, que las monocapas pretratadas con TPA deben tener algunos caminos de señalización activados, diferentes de las células sin pretratar y estos son capaces de complementarse con las señales activadas por el $TGF\beta_1$, y de esta manera inducir la proliferación celular.

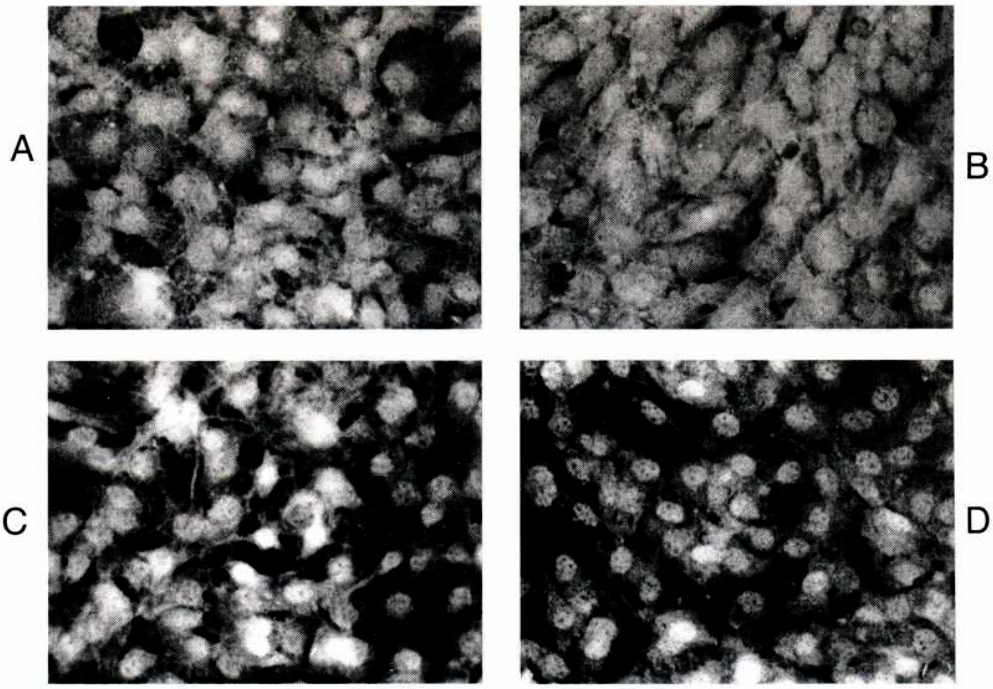


Figura N°29. Translocación al núcleo de la Smad4.
En todas las fotos (400X) se muestran células pretratadas con TPA, estimuladas durante 45 minutos con las siguientes adiciones. Foto A: sin adiciones. Foto B: $PGF_{2\alpha}$ (300 ng/ml). Foto C: $TGF\beta_1$ (1 ng/ml). Foto D: $TGF\beta_1$ más $PGF_{2\alpha}$ Las células fueron procesadas como se indica en M y M. Los anticuerpos utilizados y las diluciones de los mismos fueron los indicados en la leyenda de la figura N°26. Este es el resultado más representativo de dos realizados en forma independiente.

SINTESIS

Y

DISCUSION

Síntesis y Discusión

Se demostró que el $TGF\beta_1$ induce la proliferación de células Swiss 3T3, cuya PKC ha sido retro-modulada, es decir, primero activada y luego degradada, mediante la acción prolongada de dos compuestos diferentes: el TPA y la Briostatina 1. El porcentaje de células que entran en fase S, después de 28 horas de estimulación con $TGF\beta_1$, depende tanto de la concentración de este último, como de la concentración de los compuestos que retro-modulan la PKC.

Las células pretratadas con TPA, tienen una fase G_1 más extensa (6 a 7 horas más), que las células sin pretratar, y esta fase se mantiene constante aún con el agregado de compuestos que potencian la respuesta mitogénica del $TGF\beta_1$ (1 ng/ml). Podría plantearse si la extensión de la fase G_1 se debe al pretratamiento con TPA, o bien se debe a la acción del $TGF\beta_1$. Con el propósito de ahondar en este punto, se llevaron a cabo una serie de experimentos preliminares, donde se pretrataron células con TPA (800 nM, 96 hs.), y luego se agregó $PGF_{2\alpha}$ (300 ng/ml) más insulina (100 ng/ml). Se utilizaron estos dos compuestos porque se observó que ambos son capaces de estimular la proliferación celular (10 % de células en fase S), en esta condición, y la duración de la fase G_1, en este caso, fue también de 21-22 horas (datos no mostrados). Con estos resultados se puede concluir, que la extensión de la fase G_1, se debe al pretratamiento con TPA. Es probable que este pretratamiento lleve a las células a una fase G_0, diferente de la fase G_0 en la que se encuentran las células confluentes y aquietadas, sin pretratar. Las células pretratadas con TPA, una vez estimuladas a proliferar, necesitan sintetizar y/o modificar más compuestos, y esta acción, se traduce en más tiempo para progresar por la fase G_1, antes de entrar en la fase S, con respecto a las células sin pretratar. La potenciación de la síntesis de ADN entre factores, o factores y hormonas, en células pretratadas con TPA, se traduce en un aumento de la velocidad de entrada de las células en la fase S, al igual que en las células sin pretratar.

La ciclina D_1, subunidad regulatoria de las CDKs 4 y 6, está considerada como una molécula marcadora del inicio del ciclo celular, ya que su síntesis comienza en la parte temprana de la fase G_1, y está involucrada en la fosforilación del pRb, que determina la entrada en la fase S [Motokura et al., 1991 y 1992; Withers et al., 1991; Xiong et al., 1991; Lukas et al., 1996]. En la inducción de la síntesis de ADN, mediada por el $TGF\beta_1$ en células pretratadas con TPA, se observó una estrecha correlación entre el aumento en la duración de la fase G_1 y el tiempo de síntesis de la ciclina D_1, que ocurre horas más tarde después la estimulación, comparado con células sin pretratar, que han sido inducidas a proliferar con $PGF_{2\alpha}$ (300 ng/ml). Esto nos permite inferir, que el $TGF\beta_1$ durante este aumento de la duración de la fase G_1, estaría activando señales en las células pretratadas con TPA, o complementando sus señales con nuevas señales, surgidas debido al pretratamiento, para que las células puedan progresar a través de la fase G_1, y así completar el ciclo celular.

Se demostró que la expresión de la ciclina D_1 no necesariamente conduce a la división celular, y que tampoco es dependiente de la PKC. La $PGF_{2\alpha}$, que no es capaz de inducir la proliferación en células pretratadas con TPA, induce la expresión de la ciclina D_1. La falta de estimulación de la proliferación por parte de la $PGF_{2\alpha}$, aún cuando induce la síntesis de la ciclina D_1, y se encuentra también presente la CDK4, en células pretratadas con TPA, sugiere que ésta podría estar a nivel del balance de activadores e inhibidores del complejo CDK4/D_1, entre otras posibilidades. La $PGF_{2\alpha}$ no sería capaz de inducir a los activadores del complejo y/o disminuir, los inhibidores del mismo.

El efecto más importante en el pretratamiento tanto con TPA como Briostatina 1, es la retro-modulación de la PKC. Se observó que la participación de esta enzima sobre la acción mitogénica del $TGF\beta_1$, no ocurre de forma directa, ya que la inhibición específica de la enzima mediante el uso del GF 109203X (10 μM), en células sin pretratar, no llevó al $TGF\beta_1$ a inducir la síntesis de ADN. Por el contrario, el agregado de OAG (100μg/ml), activador de la PKC, más $TGF\beta_1$, induce la síntesis de ADN, en células sin pretratar. Al igual que la $PGF_{2\alpha}$, el OAG activa la PKC y quinasas de tirosinas (TKs), pero no induce la síntesis de ADN [Goin et al., 1993]. En células sin pretratar, el $TGF\beta_1$ es capaz de complementar sus señales con la activación de las enzimas PKC y TKs, mediada por el OAG, y de esta manera ambos compuestos inducen la síntesis de ADN. El agregado de GF, en células sin pretratar, inhibe la estimulación mediada tanto por el agregado de $TGF\beta_1$ más OAG, como de $TGF\beta_1$ más $PGF_{2\alpha}$. En este último caso, la inhibición no fue total, lo que sugiere que la actividad de la PKC, en células sin pretratar, es necesaria, pero no suficiente, para que el $TGF\beta_1$ pueda inducir un aumento en la estimulación de la proliferación celular por otros mitógenos, pero si es muy importante en la inducción de esta última, agregado con otros compuestos no mitogénicos.

Con el uso del anticuerpo monoclonal anti PKCα, se observó que la enzima está ausente en células pretratadas con TPA, en el momento en que el $TGF\beta_1$ estimula la proliferación celular. Cuando se realizó un pretratamiento prolongado con GF, se observó que la PKC no desaparecía, y que el $TGF\beta_1$ no inducía la síntesis de ADN. Como control de este experimento, se observó que la estimulación mediada por $PGF_{2\alpha}$, en células pretratadas con GF, tampoco indujo la síntesis de ADN en esta condición, reflejando que la acción del GF continúa después de varias horas de incubación, y en este caso también fue observada la PKCα, con el uso del anticuerpo monoclonal. Dado que el OAG activa la PKC, también se realizó un tratamiento prolongado con este activador y se observó que no retro-modula la PKC. El $TGF\beta_1$ no estimuló la síntesis de ADN, en células pretratadas con OAG, mientras que la $PGF_{2\alpha}$ sí la estimuló, pero su acción no se potenció de manera significativa, comparada con células sin pretratar, que recibieron OAG una hora antes del agregado de la $PGF_{2\alpha}$. Este resultado estaría indicando que el OAG se inactiva o es

metabolizado por las células, con lo que no permite analizar si es capaz o no de retro-modular la PKC. De todas formas, se podría concluir que la ausencia de la PKC es la que permite la acción mitogénica del $TGF\beta_1$, pero la observación de la rápida caída de inducción de la proliferación por el $TGF\beta_1$, horas después del tratamiento con TPA, y la re-expresión de la PKCα, horas más tarde después del pretratamiento, nos indican que la sola ausencia de la PKC no es el efecto más importante, que permite al $TGF\beta_1$ estimular la síntesis de ADN, en células Swiss 3T3, pretratadas con TPA.

De todas las isoformas de PKC las únicas expresadas en las células Swiss 3T3 son la α, δ, ε y ζ [Olivier y Parker, 1992]. La retro-modulación de las isoformas α y δ ocurre a igual tiempo de tratamiento con TPA, mientras que la isoforma ε desaparece con un tiempo tres veces menor que la α y δ. La isoforma ζ es insensible a la retro-modulación debido al tratamiento con TPA, aunque no se puede descartar que sufra otro tipo de modulación, entre otras, como ser estabilizada. Se observó que el pretratamiento de las células con Briostatina 1, también posibilita la acción proliferativa del $TGF\beta_1$. Basados en los trabajos de Uberall et al. (1994) y Jalava et al. (1993), donde se observó que la Briostatina 1, en células epiteliales de mama de ratón y en células de neouroblastoma humano, es capaz de retro-modular selectivamente la PKCα, proponemos que esta isoforma sería la activada en las primeras horas del pretratamiento, tanto con TPA como con Briostatina 1, posibilitando luego, que el $TGF\beta_1$ estimule la proliferación celular.

Unicamente aquellos compuestos capaces de retro-modular la PKC, permiten que el $TGF\beta_1$ induzca la proliferación celular. La activación de la PKC en las primeras horas del tratamiento, tanto con TPA como con Briostatina 1, permitiría la activación de distintos caminos de señalización, que culminan en la activación a su vez, de factores de transcripción, y finalmente en la expresión de determinados genes. Esto no ocurre con el GF 109203X, ya que inhibe directamente a la PKC. Sin activación previa de esta enzima, el $TGF\beta_1$ no estimula la proliferación, en células sin pretratar con GF (tanto en períodos cortos o largos de tratamiento).

Recientemente se ha descubierto que el TPA se une a otros compuestos intracelulares además de la PKC, entre ellos las quimerinas. Por lo tanto, es posible que la activación de genes inducidos por el TPA, no sea únicamente a través de la PKC [Ron y Kazanietz, 1999]. La activación de estos genes, sería el evento que se complementaría con las señales activadas por el $TGF\beta_1$, para estimular la división celular. En experimentos preliminares, se trataron las células con GF 109203X (10 μM). Después de una hora de incubación con GF, las células recibieron TPA (800 nM) durante 96 horas. Se observó que la acción mitogénica del $TGF\beta_1$ disminuía un 30%, respecto de las células pretratadas con TPA y en ausencia del inhibidor, sugiriendo que las señales activadas por el pretratamiento con TPA, no ocurren únicamente vía PKC (datos no

mostrados). El pretratamiento con Briostatina 1, también permite que el TGFβ_1 estimule la proliferación celular, y hasta donde se sabe, no interacciona con las quimerinas, con lo cual reforzaría el rol, aún cuando sea indirecto, de la PKC. También se puede plantear la existencia de otros compuestos, no descubiertos hasta el momento, que interaccionen tanto con la Brisotatina 1, como con el TPA, para permitir que el TGFβ_1 sea mitogénico en células previamente tratadas con ellos.

Se determinó el efecto del pretratamiento con TPA sobre los caminos de señalización activados por el TGFβ_1. En primer lugar se estudiaron los receptores del TGFβ_1, y se observó que la cantidad de los mismos no varía en células pretradas con TPA, respecto de las células sin pretratar. También se estudió la actividad de los receptores, medida a través de la inducción del transporte de glucosa, y se observó que éste aumenta con el pretratamiento con TPA. Estos resultados estarían indicando posiblemente, que el pretratamiento con TPA modula de forma positiva a los receptores, o las señales activadas que se encuentran más abajo de estos, en el camino de señalización activado por el TGFβ_1.

El agregado de ácido okadaico, inhibidor de fosfatasas de serina/treonina, más el TGFβ_1 a células sin pretratar, es capaz de inducir la entrada de las células en fase S. De todas formas, el porcentaje de células que entran en fase S es mucho menor que el porcentaje de células, que entran en dicha fase, cuando éstas son pretratadas con TPA y estimuladas únicamente con TGFβ_1. Este resultado lleva a plantear que las fosfatasas están involucradas, pero no son las actividades más importantes, que impedirían la acción mitogénica del TGFβ_1 en células sin pretratar. De estos resultados, se desprendería también, que el nivel de fosfatasas de serina/treonina es alto en las células aquietadas y confluentes sin pretratar, o bien que el ácido okadaico sería capaz de mantener la actividad de las quinasas de serina/treonina, activadas más abajo en el camino de señalización, durante un tiempo más prolongado, permitiendo así que el TGFβ_1 induzca la proliferación celular. Recientemente, se observó que el ácido okadaico aumenta la transcripción de genes cuyos promotores contienen sitios TRE (elementos de respuesta al TPA), como así también activa a la MAPK y JNK. Es probable que estas actividades enzimáticas, más los productos de los genes activados, se complementen con las señales activadas por el TGFβ_1, y así ambos compuestos pueden inducir la proliferación en células sin pretratar [Rosenberger et al., 1999].

Las interacciones entre el TGFβ_1, insulina (100 ng/ml) y la PGE$_1$ (100 ng/ml), en la estimulación de la síntesis de ADN, mostraron que la PGE$_1$ potencia la sinergia entre el TGFβ_1 y la insulina, en células sin pretratar, mientras que en células pretratadas con TPA, solo se observa una potenciación cuando el TGFβ_1 se encuentra a bajas concentraciones. Al aumentar la

concentración del $TGF\beta_1$, en células pretratadas con TPA, y además en presencia de insulina, el agregado de PGE_1, ya no aumenta la sinergia de estos compuestos, y quizás se debe a la ausencia de PKC. Es decir, la PKC parece jugar un rol importante en la acción de la PGE_1, sobre la sinergia entre el $TGF\beta_1$ y la insulina, en la inducción de la síntesis de ADN.

Por otro lado, se observó que en células sin pretratar, el $TGF\beta_1$ y la PGE_1 no son capaces de estimular la síntesis de ADN. De la misma manera, en células pretratadas con TPA, la PGE_1 no potencia la división celular estimulada por el $TGF\beta_1$. La falta de sinergia entre estos dos factores, puede deberse a que ambos factores activen las mismas señales o bien que las señales activadas por ambos no interaccionen entre sí. La PGE_1 activa la PKA y se procedió a estudiar el efecto de la inhibición de esta enzima, sobre la proliferación inducida por el $TGF\beta_1$. Se demostró que la inhibición de la PKA no tiene efecto negativo sobre la acción del $TGF\beta_1$, descartándose esta enzima, como actividad importante en el camino de señalización del $TGF\beta_1$.

Siguiendo con el estudio de caminos de señalización que podrían estar involucrados en la estimulación de la proliferación inducida por el $TGF\beta_1$, en células pretratadas con TPA, se estudió la acción de las quinasas de tirosina. Se utilizó a la genisteina (10 μM), como un inhibidor de TKs, y se observó su efecto sobre la acción del $TGF\beta_1$. Los resultados sugieren que posiblemente estén involucradas TKs en su camino de señalización. Dado que la inhibición no es total, podría sugerirse que esta actividad no es determinante en la estimulación de la síntesis de ADN por el $TGF\beta_1$. Se sabe que esta actividad está presente en el receptor tipo II de este factor [Lawler et al., 1997], y no se puede descartar que también existan este tipo de enzimas más abajo en la cascada de señales.

El camino de la MAPK, módulo ERK 1/2, no se encuentra activado por el $TGF\beta_1$, en ninguna condición en estas células, como quedó demostrado a través del uso de inhibidores generales y específicos, como así también con el uso de anticuerpos monoclonales específicos de ERK 1/2 en sus formas activadas, y la medición de la actividad de ERK2. Caso contrario sucede con la $PGF_{2\alpha}$, que activa la MAPK en ambas condiciones, independientemente de su capacidad mitogénica y también de la presencia de la PKC. Se ha postulado que la activación de la MAPK induce la expresión de la ciclina D_1. Dado que el $TGF\beta_1$ es capaz de inducir la expresión de la ciclina D_1 y no activa a ERK 1/2, se infiere que el $TGF\beta_1$ induce la expresión de la ciclina D_1 por una vía distinta a la MAPK. Una posibilidad, es que el $TGF\beta_1$ active la expresión de la ciclina D_1, a través de otro módulo de la familia de la MAPK, ya que Smith et al. (1997), encontraron que el módulo de la quinasa c-Jun N-terminal (JNK), se activa durante la inducción de la proliferación, módulo que hasta el momento sólo había sido observado activo en procesos de diferenciación o apoptosis.

Recientemente se han identificado algunos de los componentes del camino de señalización del TGFβ, una serie de péptidos llamados "Smad", en mamíferos [Derynck y Zhang, 1996], y la señalización puede culminar en inhibición o estimulación de la proliferación. Se sabe que una vez estimuladas, las Smads se acumulan en el núcleo, llevando a cabo una función nuclear, uniéndose a factores de transcripción o siendo ellas mismas una nueva familia de factores de transcripción [Hoodless et al., 1996; Liu et al., 1996; Baker y Harland, 1996; Piek et al., 1999]. Se demostró aquí, que el $TGF\beta_1$ es capaz de inducir la translocación al núcleo de la Smad4, en ambas condiciones, siendo el tiempo de mayor acumulación nuclear 45 minutos, después del agregado del factor. El pretratamiento de las células con TPA indica que la translocación nuclear de la Smad4, inducida por el $TGF\beta_1$, es independiente de la PKC.

En cuanto a la sinergia entre el $TGF\beta_1$ y la $PGF_{2\alpha}$, en la inducción de la síntesis de ADN, se demostró que la retro-modulación de la PKC no afecta a la potenciación de dicha síntesis, pero un inhibidor de la PKC, como el GF 109203X, es capaz de inhibir la sinergia entre estos dos factores, aunque no totalmente, en células que no han recibido ningún tipo de tratamiento. De estos resultados se concluye que en células pretratadas con TPA, existen vías alternativas a la PKC, o bien quedan compuestos activados por la PKC antes de su retro-modulación, que permiten la potenciación de ambos factores. Resultados similares se observaron también, en el transporte de glucosa (datos no mostrados).

En la sinergia entre el $TGF\beta_1$ y la $PGF_{2\alpha}$ también quedó demostrado que no interviene la actividad de la PKA, ni de la MAPK, ni tampoco se ve alterada la translocación al núcleo de la Smad4. La única actividad que se encontró involucrada en la potenciación de estos dos factores, en ambas condiciones, es la de las TKs. En el ensayo con lovastatina y ácido mevalónico, se observó que en la potenciación de ambos factores, es importante la isoprenilación de proteínas. En células sin pretratar, la PKC es otra actividad involucrada, pero no es la más importante, ya que el GF 109203X, no inhibe totalmente la sinergia entre estos factores, en esta condición. En conclusión, las actividades involucradas en la sinergia entre ambos factores, en ambas condiciones estudiadas hasta el momento, son la isoprenilación de proteínas y las TKs.

El hecho de que el $TGF\beta_1$ sea capaz de estimular la proliferación en las células que han sido pretratadas con TPA, sugiere que el pretratamiento debe inducir la síntesis de nuevos compuestos en dichas células, que se complementan con las señales activadas por el factor. En el ensayo horas después del agregado de medio condicionado, se observó una rápida caída en la acción del $TGF\beta_1$. Esto sugiere que existen ciertos compuestos, necesarios para la estimulación de la proliferación celular por el $TGF\beta_1$, que se degradan rápidamente al remover el TPA.

El TPA tiene la propiedad de activar la transcripción de genes, cuyos promotores contienen el elemento de respuesta al TPA (TRE). Los sitios TRE son reconocidos por una proteína celular común, el factor de transcripción AP-1 (proteína 1 activadora de la unión al ADN), que se trata de dos familias de proteínas, que forman dímeros. Estas familias son Fos y Jun, conocidas como oncoproteínas. Los genes de Fos y Jun, a su vez, contienen sitios TRE en sus zonas promotoras. En la activación de la transcripción, a partir de sitios TRE, inducidos por TPA, está involucrada la PKC [Hata et al., 1989; Tseng et al., 1994], pero no sería la única enzima capaz de activar la unión de AP-1 a sitios TRE [Auwerx y Sassone-Corsi, 1992]. En la expresión de c-jun, mediada por TPA, estaría involucrada la PKC [Hata et al., 1993], mientras que en la activación de la expresión de c-fos, parece estar involucrada la PKA [Huang et al., 1999]. Es probable que el pretratamiento con TPA, al inactivar la PKC, no se active la expresión de c-jun, y esta sería una de las razones por las que impediría, que tanto la $PGF_{2\alpha}$, como el TPA, induzcan la proliferación celular en esta condición. Por otro lado, se conoce que el $TGF\beta_1$ también puede estimular la transcripción a partir de sitios TRE, y que las Smad pueden interaccionar con c-fos y c-jun, combinándose de distinta manera: Smad 3 y 4, con jun y fos. También se observó que las Smad 3 y 4, pueden estimular la expresión de genes a partir de sitios TRE, sin interaccionar con fos o jun [Zhang et al., 1998]. Se sugiere, por lo tanto, que en células pretratadas con TPA, donde el $TGF\beta_1$ es capaz de inducir la proliferación, la complementación de señales estaría a nivel de factores de transcripción, necesarios para activar los genes involucrados en la proliferación celular. Se propone que el complejo de Smads, activados por el $TGF\beta_1$, se traslada al núcleo, y allí se encuentra con factores de transcripción formados por el pretratamiento de las células con TPA, y esto permitiría la activación de determinados genes que intervienen en la estimulación de la proliferación por el $TGF\beta_1$, en dichas células.

El $TGF\beta_1$ activa a las Smads en ambas condiciones, en un mismo período de tiempo y esta vía de señalización no se ve modificada por la potenciación con otro mitógeno. También se observó que el $TGF\beta_1$ no activa, ni modifica los caminos de señalización más utilizados en la proliferación como la MAPK. Todos estos resultados sugieren que en las células pretratadas con TPA, las Smads, además de otras señales activadas por el $TGF\beta_1$ y no conocidas hasta el momento, se complementarían con los compuestos inducidos por el pretratamiento y esta interacción permitiría la expresión de genes necesarios para la proliferación celular. De esta manera, se podría explicar también la duración de la fase G_1 y el tiempo más tardío de expresión de la ciclina D_1, ya que se necesitaría más tiempo, para que las señales se complementen y disparen la proliferación, comparado con las células sin pretratar. Dado que las Smads se trasladan al núcleo y activan la expresión de genes, se puede postular que varios de los compuestos inducidos por el pretratamiento con TPA, serían factores de transcripción y/o compuestos que afecten la transcripición de genes. Así, estos compuestos interactuarían con las Smads activando los genes necesarios para el programa de la proliferación.

La PKC es una actividad enzimática, que se encuentra en el camino de señalización de varios mitógenos, por este motivo se la consideró como un buen blanco para terapias anticancer. Hoy en día se sabe que la PKC es capaz de interaccionar con otras vías de señalización, que interaccionan en otros procesos celulares. Hemos visto aquí, que la enzima puede ser eliminada por retro-modulación con el uso de compuestos como el TPA y la Briostatina 1. La retro-modulación impide la proliferación celular estimulada por factores, que normalmente inducen esta última, utilizando a la PKC, en sus vías de señalización. Sin embargo, esta misma condición hace sensibles a las células a la estimulación de la proliferación, por otros factores, en situaciones normales, no son capaces de inducirla. Es por esta razón, que al diseñar estrategias, que eliminan o modifican, ciertas enzimas, involucradas en las vías de señalización de varios compuestos, se incluyan controles con factores, que no son mitogénicos, para corroborar, que realmente se eliminan las pasos necesarios para la proliferación. Además, proponemos la búsqueda de vías de señalización que sean realmente específicas de un mitógeno en particular, y que además solo intervengan en la proliferación celular.

En la página siguiente se muestra una tabla con el resumen de las actividades estudiadas en la estimulación de la proliferación celular en las células Swiss 3T3, en esta tesis.

Tabla con el Resumen de las Actividades Estudiadas en la Inducción de la Proliferación Celular en Células Swiss 3T3

TGFβ_1 en células sin pretratar

- No induce la proliferación celular
- Induce la proliferación celular en presencia de OAG, inhibida totalmente por GF109203X
- No induce la ciclina D_1
- Los receptores están presentes
- Induce el transporte de glucosa
- Está presente la CDK4
- Está presente la PKCα
- No induce la proliferación celular, en presencia de GF 109203X
- Induce la translocación de la Smad4
- Induce la proliferación en presencia de Ac. Okadaico
- Induce la proliferación en presencia de insulina
- La PGE1 aumenta la sinergia entre el TGFβ_1 y la insulina
- No induce la proliferación en presencia de PGE1
- No activa la MAPK

TGFβ_1 en células pretratadas con TPA

- Induce la proliferación celular
- Induce la ciclina D_1
- Los receptores están presentes
- Induce el transporte de glucosa
- Está presente la CDK4
- Está ausente la PKCα
- Induce la translocación de la Smad4
- La insulina potencia la proliferación del TGFβ_1
- La PGE1 no sinergiza con TGFβ_1
- La PGE1 no aumenta la sinergia entre el TGFβ_1 y la insulina
- La PKA no está involucrada
- No activa la MAPK
- No está involucrada la isoprenilación de proteínas
- Intervienen algunas TKs

TGFβ_1 + PGF$_{2\alpha}$ en células sin pretratar

- Aumenta la proliferación estimulada por la PGF$_{2\alpha}$
- Sinergia en el transporte de glucosa
- Está presente la PKCα
- Está presente la CDK4
- Interviene la PKC, aunque no es inhibida totalmente por GF 109203X.
- No está involucrada la PKA
- Intervienen TKs
- Está involucrada la isoprenilación de proteínas
- No aumenta la cantidad de MAPK activada
- La translocación de la Smad4, ocurre igual que en presencia de TGFβ_1 solo.

TGFβ_1 + PGF$_{2\alpha}$ en células pretratadas con TPA

- Aumenta la proliferación celular estimulada por TGFβ_1
- Sinergia en el transporte de glucosa
- Está ausente la PKCα
- Está presente la CDK4
- No está involucrada la PKA
- Están involucradas las TKs
- Está involucrada la isoprenilación de proteínas
- No aumenta la actividad de la MAPK
- La translocación de la Smad4, ocurre de la misma manera que en presencia de TGFβ_1 solo.

Registro de firmas:

Lic. María Belén Cadenas

Dr. Luis Jiménez de Asúa

MATERIALES

Y

METODOS

A.1. Medios y Soluciones

i) **Medio de cultivo para las células de partida:** el medio utilizado para mantener las células de partida, fue el medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, SIGMA, Dulbecco y Freeman, 1959), con un 10% (v/v) de suero fetal bovino (FBS, GIBCO). Esta mezcla se prepara en condiciones de esterilidad, en el momento de uso y se la calienta previamente a 37°C. El DMEM se prepara, según instrucciones del fabricante y se le adiciona 3,7 gr/l de bicarbonato de sodio ($NaHCO_3$, GIBCO), 60 mg/l de penicilina (GIBCO), y 100 mg/l de sulfato de estreptomicina (GIBCO). Se lo gasea con dióxido de carbono (CO_2), para obtener un pH 7,2, y se lo esteriliza por filtración a través de membranas con poros de 0,22 μm de diámetro (Millipore). Se lo mantiene en heladera durante 40 a 45 días.

ii) **Medio de cultivo para las células destinadas a los ensayos:** para los ensayos (salvo que se indique lo contrario) se preparó el siguiente medio que contenía 1% (v/v) de suero de ternero recién nacido (NBS, GIBCO), 6% (v/v) de FBS, 1/3 de medio Waymouth (WAY, SIGMA), y 2/3 de DMEM. Esta mezcla se prepara en condiciones de esterilidad, en el momento de uso y se la calienta previamente a 37°C. El medio Waymouth, se prepara según instrucciones del fabricante y se le adiciona 2,4 gr/l de $NaHCO_3$ (GIBCO), 60 mg/l de penicilina (GIBCO), y 100 mg/l de sulfato de estreptomicina (GIBCO). Se lleva a pH 7,2 con CO_2 y se esteriliza con el mismo procedimiento que el DMEM (ver punto A.1 i, arriba, en esta misma sección). Se mantiene en heladera durante 40 a 45 días.

iii) **Medio condicionado:** este medio se utiliza, en aquellos ensayos donde es necesario cambiar el medio, por uno libre de factores de crecimiento. Para obtener este, medio se hacen crecer las células hasta agotar los factores de crecimiento del mismo. Esto ocurre, cuando no se observan figuras mitóticas y las células se aquietan, en lo que se refiere a división celular ("quiescentes"). Si este medio es adicionado a un cultivo confluente y quiescente, no induce proliferación celular. Se toma el medio, en condiciones de esterilidad, de varias placas de cultivos ya quiescentes y se lo mantiene a 37°C. Este procedimiento, se realiza horas antes de usar el medio condicionado en el ensayo.

iv) **Medio de Criopreservación:** la línea celular Swiss 3T3 se conserva en nitrógeno líquido en el medio de congelación que lleva 10% (v/v) de dimetilsulfóxido (DMSO, SIGMA) y 20-25% (v/v) de FBS en medio DMEM. Se prepara en condiciones de esterilidad, en el momento de uso y se deja en hielo.

v) **Medio sin glucosa:** este medio, se utiliza en los ensayos de transporte de glucosa, y es DMEM sin glucosa (GIBCO) al cual se le agrega $NaHCO_3$ 3,7 gr/l, fosfato de sodio monobásico ($NaH_2PO_4.H_2O$, SIGMA), 60 mg/l de penicilina (GIBCO), y 100 mg/l de sulfato de estreptomicina (GIBCO). Se lleva a pH 7,2 con CO_2 y se esteriliza con el mismo procedimiento

que el DMEM (ver punto A.1 i de esta misma sección). Se mantiene en heladera por 40 a 45 días. En el momento de uso se lo calienta a 37°C.

vi) **Buffer fosfato salino de Dulbecco-EDTA (DPBS-EDTA):** se usa el buffer fosfato salino de Dulbecco (DPBS, GIBCO), el cual se prepara siguiendo las instrucciones del fabricante y se le agrega 2 gr/l de ácido etilene diamino tetra acético (EDTA, MERCK). Se lleva a pH 7,2 con hidróxido de sodio (NaOH), se esteriliza por autoclave, y se lo mantiene en heladera por varios meses.

vii) **Solución de Tripsina:** La tripsina liofilizada (25 gr, GIBCO) se rehidrata en 20 ml de agua estéril deionizada, obteniéndose una concentración final de 10X. Se diluye 1/10 con buffer DPBS-EDTA estéril, se separa en varios frascos, en menor volúmen y se guarda en el freezer a -20°C y se mantiene por varios meses.

viii) **Solución de 12-O-tetradecanoil 13-forbol acetato (TPA, SIGMA):** Con el TPA ó PMA (forbol 12-miristato, 13-acetato, potente promotor tumoral en la piel de ratón), se prepara una solución de partida con una concentración final de 100 mM, en DMSO. Se mantiene en freezer a -20°C, por varios meses. De esta solución, se hacen diluciones en etanol absoluto (1 mM), y las diluciones finales, a hacer agregadas en los cultivos, se realizan en DMEM, en el momento de uso.

ix) **Solución de Briostatina 1 (ICN):** Se prepara una solución de partida con una concentración final de 1 mM, en DMSO. Se mantiene en freezer a -20°C, por varios meses. De esta solución, se hacen diluciones en etanol absoluto, y las diluciones finales, a hacer agregadas en los cultivos, se realizan en DMEM, en el momento de uso.

x) **Solución de Prostaglandina F2α (PGF2α, Upjohn):** Es la principal prostaglandina luteolítica del útero, su forma hidrofílica está compuesta con trometamina (1:1), siendo su fórmula: ácido (5Z,9a,11a,13E,15S)-9,11,15-trihidroxiprosta-5,13-dien-1-oico compuesto con 2-amino-2-(hidroximetil)-1,3-propanedoil. Se prepara una solución de partida en agua bidestilada estéril, con una concentración final 10 mg/ml. Se mantiene en heladera por varios meses. Las diluciones finales a hacer agregadas en los cultivos, se preparan en el momento de uso, en DMEM.

xi) **Solución del Factor de Transformación y Crecimiento beta uno (TGFβ1, R & D Systems):** Con este factor de crecimiento de naturaleza polipéptidica, se prepara una solución de partida con una concetración final de 10 μg/ml, en una solución 10 mM de detergente zwitteriónico, 3-[(3-colamidopropil) dimetilamonio]-1-propano sulfonato (CHAPS, SIGMA), esterilizada por filtración. Se mantiene en heladera por varios meses. Las diluciones finales en el momento de agregarlas en los cultivos se preparan en DMEM.

xii) **Solución del Factor de Crecimiento Epidermal (EGF, SIGMA):** Este factor de crecimiento es un polipéptido de simple cadena que contiene 54 aminoácidos (aa). Se prepara una

solución de partida en solución fisiológica estéril, con una concentración final de 100 µg/ml. Se mantiene en heladera por varios meses. Las diluciones finales, que se agregan a los cultivos, se hacen en el momento de uso en DMEM.

xiii) Solución de GF 109203X (GF, Glaxo): El GF 109203X es una bisindolilmaleimida 1, inhibidor permeable a la célula y altamente selectivo de la quinasa de proteínas C (PKC), que actúa como un inhibidor competitivo de la adenosina trifosfato (ATP), por el sitio de unión a la PKC. Estructuralmente similar a la estaurosporina, su fórmula es 2-[1-(3-dimetilaminopropil)-1H-indol-3-il]-3-(1H-indol-3-il)-maleimida. Se prepara una solución de partida en DMSO, con una concentración final de 50 mM. Se mantiene en freezer de -20°C, por varios meses. Se hacen diluciones, que se agregan a los cultivos en el momento de uso, en etanol absoluto y se agrega en un volumen tal que no supere el 0,25% (v/v) del volúmen final del medio de ensayo.

xiv) Solución de 1-oleil-2-acetil glicerol (OAG, SIGMA): el 1-oleil-2-acetil-sn-glicerol (C18:1,[cis]-9/C2:0), es un análogo permeable del diacilglicerol (DAG), activador eficiente de la PKC dependiente de Ca^{2+} y fosfolípidos. Se disuelve en etanol con una concentración final de 200 mg/ml. Se mantiene en freezer de -20°C, por varios meses. Se hacen diluciones a hacer agregadas en los cultivos en el momento de uso, en etanol absoluto y se agrega en un volumen tal que no supere el 0,25% (v/v) del volúmen final del medio de ensayo.

xv) Solución de Acido Okadaico (Ac. Ok., Cell Biology Products): Es un polieter derivado de un ácido graso de C_{38} y similar a un ionóforo; es un potente inhibidor de las fosfatasas 1 y 2A, no afecta la actividad de las fosfatasas ácida, alcalina y de tirosina (Tyr). Provista por el fabricante en una solución con 10% (v/v) de DMSO, con una concentración final de 0,5 mM. Se mantiene en freezer de -20°C, por varios meses. Se hacen diluciones, a hacer agregadas en los cultivos en el momento de uso, en etanol absoluto y se agrega en un volumen tal que no supere el 0,25% (v/v) del volúmen final del medio de ensayo.

xvi) Solución de Insulina (Ins, Calbiochem): Con esta hormona de naturaleza polipéptidica, se prepara una solución de partida en solución fisiológica ácida ésteril (12 mN HCl), a una concentración final de 10 mg/ml. Se mantiene en heladera, por varios meses. Las dilulciones finales, que se agregan a los cultivos, se preparan en el momento de uso, en DMEM.

xvii) Solución de Prostaglandina E1 (PGE_1, Upjohn): Esta prostaglandina es capaz de activar la adenilato ciclasa vía un receptor de acoplado a proteína G. Su fórmula es ácido (11a,13E,15S)-11,15-dihidroxi-9-oxoprost-13-en-1-oico, y se prepara una solución de partida en etanol absoluto, con una concentración final de 10 mg/ml. Se mantiene en freezer a -20°C, por varios meses. Las diluciones finales que se agregan a los cultivos se preparan en el momento de uso en DMEM.

xviii) Solución de H-89 2HCl, (H-89, Calbiochem): N-[2-((p-Bromocinamil)amino)etil] -5-isoquinolinesulfonamida, HCl. Es un potente inhibidor, permeable a la célula, selectivo de quinasa A (quinasa dependiente de AMPcíclico, PKA). Se prepara una solución de partida en DMSO, con una concentración final de 5 mM. Se mantiene en freezer de -20°C, por varios meses. Se hacen diluciones, que se agregan a los cultivos en el momento de uso, en etanol absoluto y se agrega en un volumen tal que no supere el 0,25% (v/v) del volúmen final del medio de ensayo.

xix) Solución de PKI (PKI, Biomol): es un péptido (5-24) (Thr-Thr-Tyr-Ala-Asp-Phe-Ile-Ala-Ser-Gly-Arg-Thr-Gly-Arg-Arg-Asn-Ala-Ile-His-Asp), termo estable obtenido de músculo esquelético, que inhibe a la PKA. Se une al sitio catalíco de la enzima, desplazando a la subunidad regulatoria. Se prepara una solución de partida en agua estéril, con una concentración final de 500 μM. Se mantiene en el freezer de -20°C, por varios meses. Las diluciones finales a hacer agregadas en los cultivos, se hacen en DMEM, en el momento de uso.

xx) Solución de Genisteina (Gen, SIGMA): Su fórmula es (4´, 5, 7-trihidroxisoflavona), y es un inhibidor de quinasas de proteínas en Tyr, compite con el ATP en el sitio catalíco. Se prepara una solución de partida en DMSO, con una concentración final de 50 mM. Se mantiene en freezer de -20°C, por varios meses. Se hacen diluciones, que se agregan a los cultivos en el momento de uso, en etanol absoluto y se agrega en un volumen tal que no supere el 0,25% (v/v) del volúmen final del medio de ensayo.

xxi) Solución de Lovastatina (LOV, Merck, Sharp and Dome): Ácido [1S-[1α(R*), 3α, 7β, 8β(2S*, 4S*), 8αβ]]-2 metilbutanóico 1,2,3,7,8,8a-hexahidro-3,7-dimetil-8-[2-(tetrahidro-4-hidroxi-6-oxo-2H-piran-2-il) etil-1 naftalenil ester. Potente inhibidor de la β-hidroxi-β-metilglutaril-CoA (HMG-CoA) reductasa, la enzima limitante en la biosíntesis del colesterol. Y subsiguientemente, inhibe la isoprenilación de proteínas. La lovastatina fue convertida de su forma prodroga lactona inactiva, a su forma de ácido dihidroxi abierto activo, disolviendo 52 mg del compuesto en 1,04 ml de etanol 95% (v/v), al cual se le añadió 813 μl de NaOH 1N. La solución resultante fue neutralizada con HCl 1N, llevando el pH a 7,2 y el volúmen final de la solución a 13 ml con agua bidestilada. La solución tiene una concentración de 10 mM, se esteriliza por filtración y se fracciona en pequeños volúmenes para conservala a –20°C. Las diluciones finales a hacer agregadas en los cultivos, se hacen en DMEM, en el momento de uso.

xxii) Solución de Mevalonolactona (MEV, SIGMA): DL-β-hidroxi-β-metil-δ-valero-lactona. Precursor en la biosíntesis del colesterol. Esta solución se prepara en agua bidestilada estéril, a una concentración final de 10 mM. Se guarda en heladera por varios meses. Las diluciones finales a hacer agregadas en los cultivos, se hacen en DMEM, en el momento de uso.

xxiii) Solución de PD 98059 (PD, Calbiochem). 2'-amino-3'-metoxilflavona. Es un inhibidor selectivo y permeable de la quinasa que activa a la quinasa MAP (MEK), que actúa inhibiendo la activación de la misma, y las subsiguientes fosforilaciones de los sustratos de esta misma. Este compuesto se disuelve en DMSO, a una concentración final de 10 mM. Se mantiene en freezer de -20°C, por varios meses. Se hacen diluciones a hacer agregadas en los cultivos en el momento de uso, en etanol absoluto y se agrega en un volumen tal que no supere el 0,25% (v/v) del volúmen final del medio de ensayo.

xxiv) Solución de 2-deoxi-D-glucosa [1,2 ^{3}H] (2DOC ^{3}H, ARC): se prepara una solución de partida, en agua bidestilada estéril, con una concentración final de 1,5 mM de 2-deoxi-D-glucosa, con una actividad específica de 75 mCi/µl. La concentración final en el ensayo es de 50 µM de 2-deoxi-D-glucosa, con una actividad específica de 2,5 µCi/ml. Esta solución se prepara en el momento de uso.

xxv) Solución de timidina [metil ^{3}H] (NEN) para los ensayos de autorradiografía: se prepara una solución de partida, en agua bidestilada estéril, con una concentración final de 100 µM de timidina, con una actividad específica de 300 µCi/ml. La concentración final en el ensayo es de 1 µM de timidina, con una actividad específica de 3 µCi/ml. Esta solución se prepara en el momento de uso.

xxvi) Solución de timidina [metil ^{3}H] (NEN) para los ensayos de incorporación: se prepara una solución de partida, en agua bidestilada estéril, con una concentración final de 300 µM de timidina, con una actividad de 300 µCi/ml. La concentración final en el ensayo es de 3 µM de timidina, con una actividad específica de 3 µCi/ml. Se prepara en el momento de uso.

xxvii) Solución de Centelleo Líquido: la composición de esta solución es 70% (v/v) de tolueno (MERCK), 30 % (v/v) de Tritón X-100 (TX-100, ROHM & HAAS), 3,4 gr/l de 2,5-difeniloxazol (PPO, MERCK) y 40 mg/l de 1,4-bis[5-fenil-2-oxazolil]benceno;2,2-p-fenilene-bis[-5-feniloxazol] (POPOP, MERCK).

xxviii) Solución Mordiente: se prepara con 1 gr de gelatina (SIGMA), y 0,1 gr de sulfato de cromo alúmina ($KCr(SO_4)_2.12H_2O$, MERCK), en 100 ml de agua bidestilada estéril. Se disuelve la gelatina en aproximadamente 50 ml agua, con calor y agitación. Por separado y a temperatura ambiente, se disuelve $KCr(SO_4)_2.12H_2O$ en aproximadamente 50 ml de agua. Cuando la solución de gelatina está completamente disuelta, se deja enfriar hasta que alcance la temp. amb. Luego se mezclan ambas soluciones y se lleva a 100 ml con agua bidestilada estéril. Se filtra a través de filtro común y se agregan unas gotas de formaldheído para evitar que se contamine, finalmente se guarda en heladera a 4°C, por varios meses. Antes de usarla se calienta a unos 40°C para que alcance el estado líquido, y se la enfría hasta que alcance la temp. amb. antes de usarla.

xxix) Solución para revelado y fijación de films utilizados en las autorradiografías: para las placas de rayos X, KODAK X-OMAT, XAR-5, usadas en las técnicas de Western blot y actividad de la MAPK, se usa el siguiente revelador y fijador:

Revelador: 2,2 gr de metol (MERCK), 8,8 gr de hidroquinona (MERCK), 70 gr de sulfito de sodio (Na_2SO_3, MERCK), 48 gr de carbonato de sodio (Na_2CO_3, MERCK), 4 gr de bromuro de potasio (KBr, MERCK). Todo se disuelve en el orden mencionado en agua bidestilada y se lleva a un volúmen final de 1 litro.

Fijador: para 1 litro de agua bidestilada, se toman 158 gr de tiosulfito de sodio anhidro($Na_2S_2O_3$, MERCK), y se disuelven en 500 ml de agua. Disolver en 100 ml de agua hirviendo 10 gr de Na_2SO_3. Cuando esta solución se enfría, agregar 15 ml de acético glacial (AcOH, MERCK). Y finalmente agregarlo a los 500 ml de la solución de $Na_2S_2O_3$ y llevar esta solución a un volumen final de 1 litro.

Para el film de grano fino sobre placa AR10 (KODAK) y para la emulsión tipo NTB2 (KODAK), ambos usados para autorradiografías en placas de cultivo con las células ya fijadas, cuyos núcleos han incorporado timidina [metil ^3H], se usa el revelador D19 (KODAK), y el fijador arriba mencionado, preparados según instrucciones de sus fabricantes.

xxx) Solución de Colorante Giemsa: se prepara una solución de partida con 3 gr de Giemsa (MERCK), en 198 ml de glicerol. Se calienta 90-120 min. a 56°C. Al enfriarse se agregan 198 ml. de metanol, se mezcla y después de 7 días se filtra. Para la tinción de células se hace una dilución 1/10 en agua bidestilada de la solución de partida. Ambas soluciones se mantienen a temp. amb. en frasco de color caramelo para protegerlas de la luz.

xxxi) Emulsión para Autorradiografías Tipo NTB2 (KODAK): se prepara según instrucciones del fabricante. Se disuelven 9 ml. de agua bidestilada con 180 µl de glicerol a 45°C, y se agregan 9 ml. de la emulsión, disuelta previamente a 45°C. Esta mezcla disuelta a 45°C, es la que finalmente se agrega a cada placa. Se conserva en un recipiente herméticamente sellado, que impida el paso de la luz, en heladera. Todo la operación se realiza en cuarto oscuro, únicamente en presencia de una luz de seguridad.

A.2 Línea Celular

A.2.1 Línea Celular: la línea celular utilizada, fue la línea de fibroblastos de ratón Swiss 3T3, establecida por Todaro y Green (1963). El establecimiento de esta línea celular, se realizó a partir de embriones de ratón Swiss de 17 y 19 días de gestación, con un régimen de transferencia cada 3 días, y con una densidad del inóculo de siembra de 3×10^5 células por placa de Petri, de 50 mm de díametro, con 4 ml de medio. De aquí su denominación Swiss 3T3. El número modal de cromosomas es 74, cae en el rango de subtetraploide ó hipotetraploide, como se encuentra invariablemente en las líneas celulares establecidas de

ratón (son marcadamente heteroploides). La morfología es virtualmente indistinguible de fibroblastos normales. El diámetro celular es de 16,8 μm, en células tripsinizadas y suspendidas en medio de cultivo. Cuando están separadas, son considerablemente planas y aparecen finamente granuladas. Una vez que llegan a confluencia, se forma una fina capa tipo sincicio, donde los bordes son difíciles de observar, sin tendencia a la multicapa. El tiempo de duplicación es cercano a las 24 horas, con una tasa de crecimiento constante, y una vez que alcanzan el estado de monocapa confluente, son incapaces de seguir creciendo. Son extremadamente sensibles a la inhibición por contacto homóloga y cesa completamente su crecimiento a medida que el cultivo alcanza la confluencia. Es decir, que conservan la propiedad de inhibición por contacto de las células normales, propiedad que se pierde en algún grado en las células malignas y en muchas líneas celulares establecidas. Cabe aclarar que, la inhibición por contacto se da en ausencia de factores de crecimiento, ya que si se agregan estos, se promueve al menos un ciclo de división celular.

i) **Mantenimiento de la línea celular Swiss 3T3:** las células se conservan en nitrógeno líquido, en medio de criopreservación [DMEM + 20% (v/v) FBS + 10% (v/v) DMSO]. Cada vial se descongela en medio para células de partida [DMEM + 10% (v/v) FBS], y se cultivan en estufa a 37°C, con atm. húmeda que contiene 10% de P_{CO_2}. La transferencia se realiza por tripsinización (previo lavado de la monocapa con el buffer DPBS-EDTA), con un inóculo de siembra de 1.10^5 células cada 10 ml de medio para células de partida, en placas de Petri de plástico de 100 mm de díametro. A los 3 días se les cambia el medio, y a los 4 días se las vuelve a transferir. De esta manera, se las mantiene con este régimen de transferencia hasta que comienzan a aparecer en forma espontánea, pequeños grupos de células creciendo en multicapas (focos de transformación) y también la diferenciación espontánea de estas células a adipocitos. Esto comienza a observarse durante la doceava semana, aproximadamente, del régimen de transferencia, una vez que se han descongelado. En este momento, se procede a descongelar un nuevo vial de células. La contaminación por micoplasmas, se determina por autorradiografía de la incorporación de timidina [metil ^3H] ó tinción con orceína, y en todos los casos las células estuvieron libres de micoplasmas.

ii) **Congelamiento de Células:** cada vez que se descongela un criotubo de células, una parte del cultivo se propaga, para obtener más células a ser conservadas en nitrógeno líquido. Se tripsinizan 3 placas de partida y se levantan las células en medio DMEM con 6% (v/v) de FBS. Se centrifuga 10 min. a temp. amb., 2000 xg (centrífuga de mesa, SORVALL), para sedimentar las células en el fondo del tubo. Una vez sedimentadas, se retira el sobrenadante y este se descarta. Las células son resuspendidas en medio de criopreservación (ver parte A.1 iv). Permanecen 24-48 hs. en freezer a -80°C, y finalmente se las conserva en el tanque con nitrógeno líquido.

iii) Descongelamiento de Células: el vial de células es descongelado a 37°C, y se coloca en una placa de 100 mm de díametro con 9 ml de medio para células de partida [DMEM + 10% (v/v) FBS]. Se deja unos 30 a 40 min. en estufa a 37°C, 10% de P_{CO_2}. Cuando se observa que las células se han pegado al fondo de la placa, se le cambia nuevamente el medio por otro nuevo. De esta manera se diluye el DMSO, que es tóxico para las células. Se las vuelve a colocar en estufa hasta que formen una monocapa casi confluente (esto ocurre en 3 ó 4 días), momento en el cual se las transfiere, como se explica en el mantenimiento de las células de partida (ver A.2.1 i).

A.2.2 Condiciones de cultivo para los ensayos experimentales:

i) Condiciones Generales: se siembran $1{,}5.10^5$ células, por tripsinización de las células de partida, en 2 ml de medio para ensayos [1% (v/v) NBS + 6% (v/v) FBS + 1/3 WAY + 2/3 DMEM], en placas de Petri de 35 mm de diámetro. A los tres días se les cambia el medio por otro igual. Al cabo de 5 a 6 días, las células llegan a confluencia y se aquietan, es decir que no se observan figuras mitóticas, están más aplanadas, no se distinguen los bordes celulares, y los núcleos están más redondos y dispuestos como en una calle empedrada. Es en este momento, cuando se les agrega los distintos estímulos para estudiar sus respuestas. En las placas de 60, 100 y 150 mm de díametro, la densidad de los inóculos de siembra son $0.5.10^5$, 1.10^6 y $1{,}5.10^6$, y los volúmenes del medio de cultivo son de 5, 10 y 40 ml, respectivamente. En los multipocillos de 24, la densidad de siembra es de $3{,}6 \times 10^4$, y el volúmen de medio de cultivos es de 0,5 ml.

ii) Cultivos tratados con TPA: estos cultivos son tratados con TPA durante 96 hs. para retromodular la quinasa de proteínas C (PKC) y se procede de dos maneras. La primera es: al tercer día de transferidas las células, en el momento de cambiar el medio de cultivo [1% (v/v) NBS + 6% (v/v) FBS + 1/3 WAY + 2/3 DMEM], se agrega a éste último TPA con una concentración final de 800 nM. Cuando el cultivo está confluente y aquietado en cuanto a mitosis, se lavan las placas 3 veces con DMEM (calentado a 37°C), luego se agrega medio condicionado (ver sección A1 iii), se deja en estufa a 37°C, 10% P_{CO_2}, 30 min. para que se estabilice bien el medio y luego de este tiempo, se agregan los estímulos. La segunda forma de proceder, es esperar que los cultivos estén aquietados y confluentes, luego se agrega TPA (800 nM), y se espera unas 96 hs, hasta que las células se vuelven a aquietar y finalmente se agregan los estímulos (previo lavado de las placas como en la forma anterior). En ambos casos, el agregado de TPA induce división celular, con lo cual estos cultivos tienen entre un 30 a 35% más de células que los cultivos normales.

iii) Cultivos tratados con OAG: cultivos confluentes y quiescentes son pretratados con OAG (100 μg/ml) durante 72 hs. Al igual que en los cultivos pretratados con TPA, luego de las 72 hs, las monocapas se lavan las placas 3 veces con DMEM (calentado a 37°C), luego se

agrega medio condicionado (ver sección A1 iii), se deja en estufa a 37°C, 10% P_{CO_2}, 30 min. para que se estabilice bien el medio y luego de este tiempo, se agregan los estímulos.

iv) **Cultivos tratados con GF y OAG:** cultivos confluentes y arrestados son pretratados una hora con GF (10 μM), y luego se agrega OAG (100 μg/ml), y ambos quedan durante 72 hs. Al igual que en los cultivos pretratados con TPA, luego de las 72 hs, las monocapas se lavan las placas 3 veces con DMEM (calentado a 37°C), luego se agrega medio condicionado (ver sección A1 iii), se deja en estufa a 37°C, 10% P_{CO_2}, 30 min., para que se estabilice bien el medio y luego de este tiempo, se agregan los estímulos.

A.3. Medición de la Proliferación Celular: Síntesis de ADN y Número de Células.

A.3.1 Núcleos Marcados. Método Autorradiográfico.

Basado en el trabajo de Dulbecco y Stoker (1970) con algunas modificaciones. Se agrega a las células confluentes y quiescentes, junto con los estímulos, timidina [metil ^3H] (18Ci/mmol), obteniéndose una concentración final de 1μM de timidina, con una actividad específica de 3 μ Ci/ml. A las 28 hs (salvo que se indiquen diferentes tiempos de incubación) se detiene la reacción de la siguiente manera: se aspira el medio y se realizan dos lavados con solución fisiológica fría, seguido por una fijación con ácido tricloro acético (TCA) al 5% (v/v) frío durante 5 min, un lavado con TCA al 5% (v/v), deshidratación con EtOH absoluto frío durante 5 min., y un último lavado con este último. Una vez seco, se coloca la solución mordiente y una vez que esta se seca, se coloca un film ó emulsión sensible a ^3H (film de grano fino AR-5 ó emulsión tipo NTB2, Kodak) y las placas permanecen en oscuridad con atm. seca (silica gel) durante 4 días. Después del revelado (4 min.) y fijado (4 min., previo lavado con agua deionizada, 2 min.), las placas se tiñen con colorante Giemsa (10% (v/v) de la solución de partida, previo lavado del fijador con agua deionizada). Después de 5 min de tinción, las placas se lavan y se dejan secar a tem. amb. Finalmente se evalúa con el uso del microscopio óptico (100X) la cantidad de núcleos marcados. Todos los núcleos son teñidos de azul por el colorante Giemsa, y aquellos que incorporaron timidina [metil ^3H], se obervan negros debido a que la radioactividad incorporada impregnó la plata del film, por lo tanto se los denomina núcleos marcados. Se contaron como mínimo 3 campos al azar por placa, cada uno de ellos con alrededor de 700 células, en condiciones normales, y 1000 células en las monocapas tratadas con TPA.

Determinación de la constante k: la entrada en fase S, es igual a la velocidad de iniciación de la síntesis de ADN, la cual se trata de un evento al azar, que ocurre con una probabilidad característica. Los gráficos de la figura N°5, se refieren a un índice acumulativo de marcación y por lo tanto, son una medida de la iniciación de la síntesis de ADN. A diferencia de un experimento realizado con marcación por pulsos, las células permanecen en contacto con la marca desde el comienzo de la estimulación, lo cual significa que es también, una medida de la

proporción de células que aún no han entrado en la fase S (en otras palabras, 100% células totales, menos el porcentaje de células en fase S, nos da la cantidad de núcleos que no han entrado en fase S). Este último proceso, es cuantificado por una tasa constante k, que se define como: el porcentaje de las células no marcadas (y), en un tiempo dado (t), se grafica como logaritmo en base 10 de y versus t en horas. Las líneas rectas dadas por $\log_{10} y = a - b.t$, se calculan para tiempos mayores de 15 horas, en el caso de células no tratadas y 22 horas para las células pretratadas con TPA. Las constantes k de primer orden, fueron calculadas por métodos geométricos a partir de la tangente de la recta, dado que $k = \ln 10\ b$. Los valores máximos y mínimos de k varían dentro de un 10-15%.

A.3.2 Incorporación de Timidina [metil ^{3}H]. Medición de material precipitado por ácido.

Los cultivos confluentes y quiescentes son marcados radioactivamente mediante la exposición de los mismos a timidina [metil ^{3}H] (18Ci/mmol), a una concetración final de 3 μM de timidina, con una actividad específica de 1 μCi/ml, junto a los estímulos, durante 28 hs (salvo que se indiquen otros tiempos). Los cultivos realizados por duplicados, se procesan como se describe para la autorradiografía, salvo que al final se realiza un único lavado con EtOH absoluto. Luego se lisan las células con 1 ml de una solución 1% (v/v) sodio dodecil sulfato (SDS) y 0.2N de NaOH (preparada en el momento de uso, previo calentamiento de la misma a 37- 45°C) y se deja unos 5 min. Se toma una alícuota de 500 μl a la que se añaden 100 μl de una solución de TCA 100% (p/v), para neutralizar el NaOH, y 3 ml de líquido de centelleo Tolueno-TX-100. La radioactividad fue medida en cuentas por minuto (cpm), en un contador para emisores beta (LKB Rack Beta, PHARMACIA) con el programa provisto por el fabricante para ^{3}H.

A.3.3 Número de Células.

La cantidad de células por cultivo fue analizada después de 48 hs. de agregados los estímulos a cultivos confluentes y quiescentes, después de la ronda de división celular. Las monocapas celulares cultivadas en placas de 60 mm. de díametro, fueron tripsinizadas y contadas a través del uso de la cámara de Neubauer, como del uso del Coulter Counter, obteniéndose resultados similares.

A.4. Transporte de Glucosa.

Cultivos confluentes y quiescentes de Swiss 3T3, en placas de 35 mm de díametro, fueron estimuladas durante 6 hs, con los estímulos indicados en cada caso. Luego, las monocapas fueron lavadas dos veces con medio DMEM sin glucosa, finalmente se dejaron en este medio. Después del cambio de medio se vuelven a agregar los estímulos correspondientes, junto a una solución de

2-deoxi-D-glucosa [^{3}H] (30 Ci/mmol), siendo la concentración final de la misma 50 µM de 2-deoxi-D-glucosa, con una actividad específica de 2,5 µCi/ml. Luego de 10 min. de incubación a 37°C y 10% de P_{CO_2}, se realizaron dos lavados con solución fisiológica fría. Se agregó 1 ml/placa de TCA 5% (v/v) y se incubaron durante 30 min. a 4°C. Se tomaron 0,5 ml de muestra y se les agregó líquido de centelleo y se contaron las cpm en un contador para emisores beta (LKB Rack Beta, PHARMACIA) con el programa provisto por el fabricante para ^{3}H.

A.5. Extracción de Proteínas.

A.5.1. Método de la Precipitación por Acido.

Este método, se utiliza generalmente para cuantificar las proteínas totales de los cultivos celulares. Se aspira el medio de cultivo de las monocapas. Se lava una vez con solución fisiológica. Se lisan las células con el agregado de 1 ml/placa de la solución 1% (v/v) SDS, 0.2 N NaOH (preparado en el momento de uso, ver sección A.3.2.). Se toman por duplicado una alícuota de cada placa y se precipita con TCA 100% (p/v), llevando su concentración final a un 10 % (v/v), y se deja 10 min. en frío. Se centrifuga durante 15 min. en una centrífuga clínica a 4000 rpm (Sorvall GLC-4). Se realiza un lavado del precipitado con una solución de TCA al 5% (v/v), a temp. amb. Se realiza una segunda centrifugación igual a la primera. Se resuspende el precipitado en 1 ml de agua y se le agrega 1 ml de la solución A del método de Peterson (una modificación del método de Lowry, ver sección A.6.) y se continúa con el protocolo de cuantificación de proteínas.

A.5.2. Extracción con Buffer RIPA.

Este método, fue utilizado para extraer proteínas a ser utilizadas en la técnica de "western blot", para inmunodetectar la ciclina D_1 (cyc D_1), CDK4 y los receptores del TGF-β_1. Se aspira el medio de cultivo de la monocapa celular y se lava dos veces con PBS. Se agrega 1 ml/placa de PBS y la monocapa se despega por acción mecánica, raspando la placa con una goma. Se junta la muestra con pipeta automática y se la pasa a un microtubo de 1,5 ml. Se centrifuga en una microcentrífuga refrigerada a 4°C (Eppendorf), a 4000 rpm, durante 5 min., para bajar las células. Se descarta el sobrenadante y el precipitado se resuspende en 60 µl de buffer RIPA: 150 mM NaCl, 1% Nonidet P-40 (NP-40), 5% de deoxicolato (DOC), 0.1% de SDS, y 50 mM Tris-HCl, pH 8. En el momento de uso se adicionan al buffer RIPA ortovanadato de sodio (100 µM, Na_3VO_4), para metil sulfonil fluorido (2 mM, PMSF), leupeptina (10 µg/ml, Leu), y aprotinina (20 µg/ml, Apro). Se deja en hielo durante 20 min. Se congelan a –80°C durante 20 min. Se pasan nuevamente a hielo, durante 20 min. Se agitan vigorosamente (agitador mecánico Vortex), durante 10 segundos. Se realiza una centrifugación a 15.000 xg (microcentrífuga refrigerada Eppendorf), a

4°C, durante 10 min. Se guarda el sobrenadante a –80°C. Se cuantifican las proteínas por el método de Peterson (ver sección A.6.).

A.5.3. Extracción con Buffer de Craqueo ó Laemmli.

Se aspira el medio de las monocapas celulares y se lavan dos veces con PBS. Se lisan las células con el agregado de 100 μl de buffer de craqueo ó de Laemmli, para las muestras de proteínas que van a ser separadas por electroforesis, concentrado 2X [1X= 125 mM Tris-HCl pH 6.8, 2% (p/v) SDS, 5% (v/v) glicerol, 0.003% (p/v) azul de bromofenol, y 1% (v/v) de β-mercaptoetanol], calentado previamente a 95°C durante 5 min. Las células son despegadas mecánicamente por arrastre de la placa con una goma. Se junta la muestra con pipeta automática y se pasa a un microtubo de 1,5 ml. Se hierven a 95°C durante 5 min. Se enfrían y para reducir la viscosidad de la muestra se la hace pasar varias veces por jeringa con aguja de 26 gauge (ó bien puede ser sonicada). Se centrifuga a 14.000 rpm en microcentrifuga refrigerada (Eppendorf) a 4°C, durante 5 min., para remover el material insoluble. Se recupera el sobrenadante y las muestras son cuantificadas con el método de Peterson, previa purificación de las sustancias que interfieren con la medición. Las muestras son guardadas a –80°C. Este método, fue utilizado para extraer proteínas a ser utilizadas en la técnica de "western blot" para inmunodetectar la PKCα, MAPK , CDK4 y los receptores del TGF-β_1.

A.5.4. Extracción de proteínas para realizar la medición de actividad de la MAPK.

Se aspira el medio de las monocapas celulares, después de los estímulos, y se lavan dos veces con PBS. Se lisan las células con el agregado de 400 μl de buffer de lisis: 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 100 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1 mM DTT, 40 mM $Na_2P_4O_7$, 200 μM Na_3VO_4, 1% (v/v) TX-100, 1,8 mg/ml PMSF, 75 μg/ml leu, 40 μg/ml apro. Se deja el buffer de lisis, en contacto con la monocapa sobre hielo durante 20 min. Las células son despegadas mecánicamente por arrastre de la placa con una goma. Se junta la muestra con pipeta automática y se pasa a un microtubo de 1,5 ml. Para reducir la viscosidad de la muestra, se pasa esta varias veces por jeringa con aguja de 26 gauge (ó bien puede ser sonicada). Se centrifuga a 14.000 rpm en microcentrifuga refrigerada (Eppendorf) a 4°C, durante 5 min., para remover el material insoluble. Se recupera el sobrenadante y se procede a medir la actividad de la MAPK (ó bien son guardadas a –80°C, hasta el momento de la medición de la actividad, ver sección A.9).

A.6. Cuantificación de Proteínas.

Basado en el método de Peterson (1983, modificación del método de Lowry). Reactivo A: 1 volúmen de CTC [0.1% (p/v) de sulfato de cobre, 0.2% (p/v) de tartrato de sodio y 10% (p/v) de carbonato de sodio], 2 vol. de agua y 1 vol de 0.8N NaOH. Reactivo B: 5 vol. de agua y 1 vol. del

reactivo de Folin-Ciocalteau. A 1 ml. de muestra se le agregan 1 ml. de reactivo A, se dejan 10 min. a temp. amb. Luego se agregan 0.5 ml. del reactivo B y se dejan 30 min. a temp. amb. Se lee la absorbancia a 750 nm. (espectrofotómetro GILFORD). En el caso de que haya sustancias que interfieran con la medición se procede de la siguiente manera: la muestra se la lleva a un volúmen final de 1 ml. y se agregan 0.1 ml. de una solución de DOC de 0.15% (p/v), y se lo deja unos 15 min. Se agregan 0.1 ml. de una solución de TCA de 72% (v/v). Se centrifuga durante 15 min. en centrífuga de mesa (Sorvall GLC-4). Se descarta el sobrenadante y se resuspende el precipitado en 1 ml. de agua y se sigue con el protocolo como se indica arriba.

A.7. Electroforesis de Proteínas y Transferencia a Membrana de Nitrocelulosa (Técnica de "Western Blot").

El protocolo que se usa, está descripto en el libro de técnicas de Sambrook et al. (1995). La mezcla de acrilamida y bisacrilamida usada es de 30%, como indica el libro. El buffer de electroforésis se compone de la siguiente manera: Tris (3.03 gr/l), glicina (14.4 gr/l) y SDS (1 gr/l), pH 8,3. El buffer de siembra de las muestras de proteínas: 125 mM Tris-HCl pH6.8, 2% (p/v) SDS, 5% (v/v) glicerol, 0.003% (p/v) azul de bromofenol, y 1% (v/v) de β-mercaptoetanol. Los geles, salvo que se indique lo contrario, se realizan en las minicubas de Hoeffer. Cada gel se somete a un corriente constante de 20 miliamperes. El porcentaje del gel se indica para cada caso en particular y está descripto en la leyenda de la figura correspondiente. Una vez finalizada la electroforésis, las proteínas son transferidas a membranas de nitrocelulosa (con poros de 45 μm, Whatman) en la cuba de transferencia de Bio-Rad. El buffer de transferencia utilizado es: Tris (3.03 gr/l), glicina (14,4 gr/l), metanol (200 ml/l). Las transferencias en general, se realizan a voltaje constante de 100 volts durante una hora, salvo que se indique lo contrario. Las proteínas son visualizadas, tiñendo la membrana con una solución de rojo Ponceau: una dilución 1/10 (v/v) en 1% (v/v) ácido acético de una solución de partida de rojo Ponceau 2 % (p/v) en 30 % de TCA (p/v).

A.8. Inmunodetección de Proteínas Transferidas a Membranas de Nitrocelulosa.

La inmunodetección de proteínas, se realiza utilizando el sistema de quimioluminiscencia ECL (Amersham). La membrana de nitrocelulosa con las proteínas transferidas se bloquea durante una hora en buffer PBS que contiene 0.1% (v/v) Tween-20 (T-20) y 10% (p/v) leche descremada. La incubación con el primer anticuerpo, se lleva a cabo toda la noche a 4°C en PBS con 0.1 % (v/v) de T-20 y 5% (p/v) de leche descremada (salvo que se indique lo contrario). Las diluciones del primer anticuerpo, se indican en la leyenda de la figura correspondiente. La incubación con el segundo anticuerpo anti inmunoglobulinas de ratón ó conejo ó cabra conjugados con peroxidasa (SIGMA, DAKO), se llevan a cabo durante una hora a temp. amb. Las diluciones son en general

1/5000 (v/v), salvo que se indique lo contrario, en PBS con 0.1 % (v/v) de T-20 y 5% (p/v) de leche descremada. La detección de la quimioluminiscencia, se realiza según indicaciones del fabricante. La película utilizada es KODAK X-OMAT, XAR-5, revelada con los reactivos descriptos en la sección A.1.xxvi.

A.9. Ensayo de Actividad de MAPK.

Se toma la muestra extraída como se explica en el paso A.5.4, y se le agrega 1 µl de anticuerpo policlonal anti MAPK (también llamado anti ERK2, Santa Cruz). Se deja incubando dos horas en hielo, con agitación ocasional. Se añaden 25 µl de proteína A-Sepharose (resina de Pharmarcia) y se agita constantemente durante 10-15 min. a 4°C. Luego se realiza la siguiente serie de lavados: 3 X de PBS, 1% (v/v) NP-40, 2 mM Na_3VO_4; 1 X de 100 mM Tris-HCl pH 7.5, 0,5 M LiCl; y 1 X del buffer de reacción para quinasa (12,5 mM MOPS pH 7.5, 12,5 mM β-glicerofosfato, 7,5 mM $MgCl_2$, 0,5 mM EGTA, 0,5 mM NaF, 0,5 mM Na_3VO_4). Finalmente, se resuspenden las esferas de la resina proteína A-Sepharose en buffer de reacción para la quinasa que contiene 3,3 µM DTT, 1 µCi ATP[$P^{32}\gamma$, 3000 Ci/mmol], 20 µM de ATP, 1,5 mg/ml de proteína básica de mielina (MBP, SIGMA). Después de 30 min. a 30°C, la reacción se frena, con el agregado de 10 µl de 5X del buffer de craqueo ó Laemmli. Las muestras se calientan a 95°C, durante 5 minutos y las muestras son sometidas a electroforésis en un gel 12% de acrilamida-bisacrilamida, a 40 volts toda la noche. Luego el gel se seca y por último se coloca una placa de rayos X para detectar la marca radioactivo que hay en el mismo.

De la muestra se separa una alícuota de 30 ó 50 µl que y las proteínas totales se someten a una electroforesis en un gel 10 % de acrilamida-bisacrilamida. Luego se transfiere a una membrana de nitrocelulosa y se realiza un western blot, utilizando como primer anticuerpo el policlonal anti ERK2 (Santa Cruz), y como segundo anticuerpo, un policlonal anti conejo conjugado con peroxidasa (Sigma). El resultado se obtiene a través de la quimioluminiscencia revelada por el sistema ECL (Amersham). Esto da una idea de la cantidad de proteínas específica por muestra.

A.10. Detección por Inmunofluorescencia de Smad4.

Luego de los estímulos, las células (que fueron crecidas sobre cubreobjetos N°2 de espesor, de 18 mm. de diámetro) se lavan dos veces con PBS (previamente calentado a 37°C). Se fijan las células con una solución 10 % (v/v) de formaldehido, durante 10 min. a temp. amb. Se realizan tres lavados, de 5 min. cada uno, con PBS a temp. amb. Se permeabilizan las células con una solución Metanol-Acetona (1:1), durante 2 min. a temp. amb. Se realiza un lavado de 5 min. a temp. amb., con PBS, 0,1 % (v/v) T-20. Se preincuban las células con una dilución 1/10 de suero

inactivado de cabra en PBS (según el anticuerpo conjugado con el fluorocromo a ser utilizado), durante 30 min. a temp. amb. Se incuban las células con el anticuerpo monoclonal anti Smad4 (200 mg/ml, Santa Cruz, Inc.), con una dilución 1/10 en PBS, toda la noche a 4ºC. Las células se lavan tres veces (5 min. cada lavado) con PBS. Se incuba una hora a temp. amb. y en oscuridad, con el segundo anticuerpo un policlonal anti inmunoglobulinas de ratón obtenido en cabra, conjugado con fluoresceína (SIGMA), en una dilución 1/50 en PBS. Finalmente, las células se lavan tres veces con PBS (5 min. cada lavado), y se montan los cubreobjetos sobre portaobjetos con una solución PBS-Glicerol (1:1). Se observan los preparados en un microscopio con fluorescencia para luz azul. Las fotos obtenidas se realizan con un rollo para fotos de 400 ASA, blanco y negro (AGFA). El objetivo utilizado se indica en cada foto.

APENDICE

ABREVIATURAS

α	Alfa
β	Beta
δ	Delta
ε	Epsilon
γ	Gamma
η	Eta
ι	Iota
μ	Mi
θ	Zeta
ζ	Dseta
β-glicerofosfato	Glicerol 2-fosfato
μCi	Micro Curie
μCi/ml	Micro Curie por mililitro
μg	Microgramo
μg/ml	Microgramo por mililitro
μl	Microlitro
μm	Micrón
μM	Micromolar
°C	Grados centígrados
2DOC ^{3}H	2-deoxi-d-glucosa [1,2 ^{3}H]
^{3}H	Tritio
3T3	Esquema de transferencia celular, $3x10^{-3}$,cada tres días.
aa	Aminoácidos
Ac. Ok	Acido okadaico
Ac	Anticuerpo
AcOH	Acido acético
ADN	Acido desoxirribonúcleico
ADNc	Acido desoxirribonúcleico copia
AKAPs	Quinasa A de anclaje
ala	Alanina
AMP	Adenosina monofosfato
AMPc	Adenosina monofosfato cíclica
anti-Smad	Smad que inhibe a las R y Co-Smads
AP-1	Factor de transcripción, formado por el dímero entre fos y jun
Apro	Aprotinina
arg	Arginina
ARN	Acido ribonúcleico
ARNm	Acido ribonúcleico mensajero
Asn	Asparagina
Asp	Acido aspártico
Atm	Atmósfera
ATP	Adenosina trifosfato
c,n,aPKC	PKC clásica, novel o atípica
C	Punto de Compromiso

C_{38}..... Acido graso con 38 átomos de carbono
Ca^{2+}..... Calcio
CAK..... Quinasa que activa al complejo ciclina-CDK
CaM..... Dependiente de calcio y calmodulina
CDK(Número)..... Quinasa (número) dependiente de ciclina
CDKi..... Inhibidores de CDK
CDKs..... Quinasas dependientes de ciclina
CHAPS..... 3-[(3-colamidopropil)dimetilamonio]-1-propano sulfonato
Ci..... Curie
Ci/mmol..... Curie por milimol
CO_2..... Dióxido de Carbono
CoA..... Coenzima A
Co-Smad..... Smad socias de las R-Smad
Cpm..... cuentas por minuto
CREB..... Proteína de unión al ADN, en respuesta al AMPc
CTC..... Citrato de sodio, tartatro de sodio y carbonato de sodio
CTF/NF-1..... Familia de factores de transcripción
Cyc D_1 ..... Ciclina D_1
DAG..... Diacilglicerol
Dil..... Dilución
DMEM..... Medio de Eagle modificado por Dulbecco
DMSO..... Dimetilsulfóxido
DOC..... Deoxicolato
DPBS..... Buffer fosfato salino de Dulbecco
DPBS-EDTA..... Buffer fosfato salino de Dulbecco con ácido etilene diamino tetra acético
dpp..... Decapentaplégico
DTT..... Ditiotreitol
E2F..... Factor de transcripción
EDTA..... Acido etilene diamino tetra acético
EGF..... Factor de Crecimiento Epidermal
EGF-R..... Receptor del EGF
EGTA..... Acido etileno glicol-bis(β-aminoetileter) N,N,N',N',-tetra acético
ERK 1/2..... Quinasas de proteínas activadas por señales extracelulares 1 y 2
EtOH..... Etanol
FBS o FCS..... Suero Fetal Bovino
FGFs..... Factores de crecimiento de fibroblastos
fig..... Figura
Fos..... Monómero del factor de transcripción AP-1
G..... Proteína trimérica que intercambia GTP-GDP
G_0..... Fase de quiescencia celular
G_1..... Fase del ciclo celular
G_2..... Fase del ciclo celular
GAP..... Proteína que activa a Ras-GTPasa
GDP..... Guanosina bifosfato
GEN..... Genisteina
GF..... GF 109203X

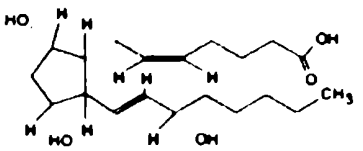
Gi..... Proteína trimérica G, que activa canales de iones
Gly..... Glicina
GMPc..... Guanosina monofosfato cíclico
GNRPs..... Proteínas que promueven la liberación de GDP
GPCRs..... Receptores acoplados a la proteína trimérica G
Gq..... Proteína trimérica G que activa a la PLCβ
Gr..... Gramo
Gr/l..... Gramo por litro
Grb2..... Proteína 2 de unión al receptor del factor de crecimiento
Gs..... Proteína trimérica G, estimuladora de la vía de la adenilato ciclasa
GTP..... Guanosina trifosfato
GTPasa..... Fosforilasa de GTP
H-89..... H-89 2HCl; inhibidor de la PKA
HCl..... Acido Clorhídrico
HGF..... Factor de crecimiento de hepatocitos
His..... Histidina
HMG-CoA..... β-hidrioxi-βmetilglutaril-CoA
HMGR..... Reductasa de HMG-CoA
Hs..... Horas
Ile..... Isoleucina
INK4..... Familia de inhibidores del complejo ciclina D-CDK
Ins..... Insulina
IP_3..... Inostiol 1,3,4 trifosfato
IP_4..... Inositol con cuatro grupos fosfato
JAK..... Quinasa Janus
JNK..... Quinasa de c-Jun en el N-terminal
Jun..... Monómero del factor de transcripción AP-1
KBr..... Bromuro de potasio
$KCr(SO_4)_2.12H_2O$.... Sulfato de cromo alúmina
kDa..... kilo Dalton
LAP..... Proteína de latencia del TGFβ
Leu..... Leupeptina
LiCl..... Cloruro de litio
LIF..... Factor de inhibición de leucemia
LOV..... Lovastatina
LTBP..... Proteína de unión al complejo TGFβ-LAP
M y M..... Materiales y Métodos
M..... Fase del ciclo celular
MAD..... Madre contra decapentaplégico
MAPK..... Quinasa de proteínas activada por mitógenos
MARCKs..... Sustrato de PKC miristoilado y rico en alanina
MBP..... Proteína Básica de Mielina
M-CSF..... Factor de crecimiento estimulante de colonias de macrófagos
MEK..... Quinasa de la quinasa MAP, o MAPKK
MEV..... Mevalonolactona
mg..... Miligramo

mg/l	Miligramo por litro
mg/ml	Miligramo por mililitro
$MgCl_2$	Cloruro de magnesio
Min	Minutos
ml	Mililitro
ml/placa	Mililitro por placa de cultivo
mM	Milimolar
mm	Milimetro
MM	Marcadores de peso molecular
MOPS	Acido 3-[N-morfolino]propanosulfónico
N	Normal
N°	Número
Na_2CO_3	Carbonato de sodio
$Na_2S_2O_3$	Tiosulfito de sodio anhidro
Na_2SO_3	Sulfito de sodio
Na_3VO_4	Ortovanadato de sodio
NaCl	Cloruro de sodio
NaF	Fluoruro de sodio
$NaH_2PO_4.H_2O$	Fosfato de sodio monobásico
$NaHCO_3$	Bicarbonato de sodio
NaOH	Hidróxido de Sodio
NBS	Suero de Ternero Recién Nacido
nCi	Nano Curie
nCi/µl	Nano Curie por microlitro
ng/ml	Nanogramo por mililitro
NGF	Factor de crecimiento nervioso
nM	Nanomolar
nm	Nanometro
NP-40	Nonidet P-40
OAG	1-oleil-2-acetil-sn-glicerol (C18:1, [cis]-9/C2:0)
P/v	peso en volumen
p107	Proteína de la familia del retinoblastoma
p15, p16, p18 ,p19	Inhibidores de la familia INK4
p21, p27, p57	Inhibidores de los complejos ciclina-CDK
p300/CBP	Factor de transcripción
P^{32}	Fósforo 32
p38	Quinasa de la familia de las MAPK
p85-p110	Subunidades de PI3K
PA	Acido fosfatídico
PAI-I	Inhibidor 1 del activador del plasminógeno
PBS	Buffer Fosfato Salino
PC	Fosfatidil colina
P_{CO_2}	Presión de dióxido de carbono
PD	PD 98059, inhibidor específico de MEK
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PDK1	Quinasa 1 dependiente de inositol fosfato

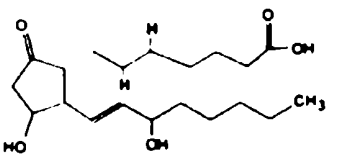
PE..... Fosfatidil etanol
PGE_1..... Prostaglandina E uno
PGF..... Prostaglandina
$PGF_{2\alpha}$..... Prostaglandina F 2 alfa
PGG/H..... Sintetasa ciclooxigenasa prostaglandina endoperóxido
PGH2..... Prostaglandina endoperóxido
PH..... Dominio con homología a plectrina
phe..... Fenilalanina
PI3K..... Quinasa dependiente de inositol 3 fosfato
PIP_2..... Fosfatidil inositol 4,5 bifosfato
PI-PLCβ..... Fosfolipasa C, isoforma beta, específica de inositol fosfato
PKA..... Quinasa de proteínas A
PKC..... Quinasa de proteínas C, isoformas α, βI, βII, δ, ε, γ, η, ι, μ, θ, ζ
PKD..... Quinasa de proteínas D
PKG..... Quinasa de proteínas G
PKI..... Péptido inhibidor de la PKA
PLCβ..... Fosfolipasa C, isoforma beta
PLCγ..... Fosfolipasa C, isoforma gama
PLD..... Fosfolipasa D
PMA..... Forbol 12-miristato,13-acetato
PMSF..... Para metil sulfonil fluorido
POPOP..... 1,4-bis[5-fenil-2-oxazolil]benceno;2,2-p-fenilene-bis[-5-fenilioxazol]
PPO..... 2,5-difeniloxazol
pRB..... Proteína del retinoblastoma
PRKs..... Quinasas relacionadas a PKC
PS..... Fosfatidil serina
PT..... Toxina de Pertussi
PTB..... Dominio de unión a fosfotirosina
R..... Punto de restricción
Rab..... Subfamilia de Ras, regulación del tráfico de vesículas
Rac..... Subfamilia de Ras, señalización en el esqueleto de actina
RACKs..... Receptores para PKC activa
Raf..... Quinasa de MEK, o MAPKKK
Ras..... Familia de proteínas G monoméricas, intercambiadoras de GDP/GTP
Rho..... Subfamilia de Ras, señalización en el esqueleto de actina
Rpm..... Revoluciones por minuto
RS/TK..... Receptores que poseen o están asociados a una quinasa de serina/treonina
R-Smad..... Smad activada por receptores
RTK..... Receptores que poseen o están asociados a una quinasa de tirosina
S..... Fase del ciclo celular
SAPK..... Quinasa activada por estrés
SBEs..... Sitios de unión para Smads
SDS..... Sodio dodecil sulfato
ser..... Serina
ser/thr..... Serina o treonina
SH2..... Dominio análogo a la Src

SH3..... Dominios de unión a motivos ricos en prolina
Shc..... Proteína con dominio SH2
Smad..... Polipéptidos en mamíferos activados por TGFβ_1.
Sos..... Proteína que libera GDP
Sp1..... Familia de factores de transcripción
Src..... Proteína del Sarcoma de Roux
STAT..... Transductores de señales y activadores de la transcripción
STICKs..... Sustratos de PKC, con interacción proteína-proteína
TβRI..... Receptor tipo I del TGFβ
TβRII..... Receptor tipo II del TGFβ
TβRIII..... Receptor tipo III del TGFβ
T-20..... Tween-20
TAK1..... Quinasa 1 activada por TGFβ
TCA..... Acido tricloro acético
temp. amb..... Temperatura ambiente
TFIIH..... Complejo mayor que actúa como factor de transcripción
TGFβ1..... Factor de Transformación y Crecimiento Beta Uno
TGF..... Factor de Transformación y Crecimiento
thr..... Treonina
TK..... Quinasa de tirosina
TPA..... 12-O-tetradecanoil 13-forbol acetato
TRE..... Elementos de respuesta al TPA
TX-100..... Tritón X-100
tyr..... Tirosina
v/v..... Volumen en volumen
VEGF..... Factor de crecimiento del endotelio vascular
vol..... Volumen
WAY..... Medio de Waymouth

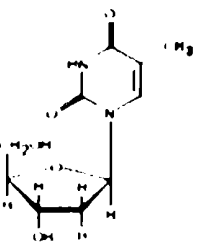
FORMULAS



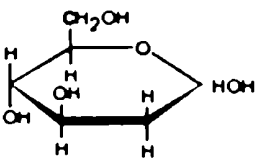
Prostaglandina $F_{2\alpha}$



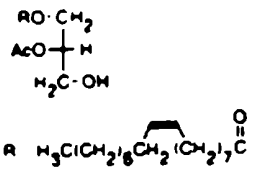
Prostaglandina E_1



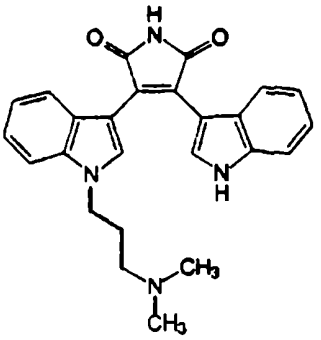
Timidina



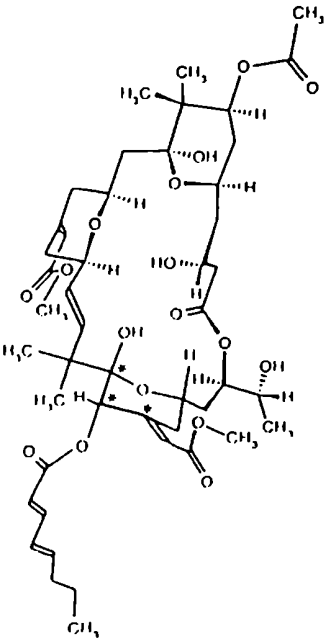
2 Deoxiglucosa



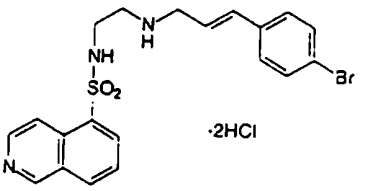
OAG



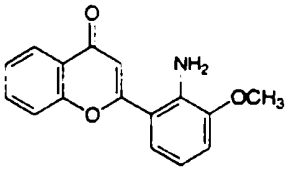
GF 109203X



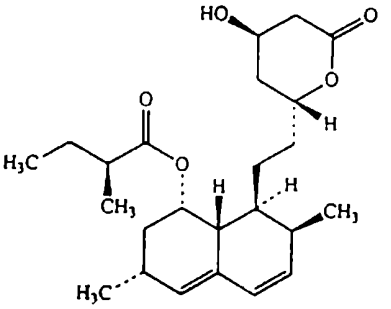
Briostatina I.
Los asteriscos indican la similitud con el DAG



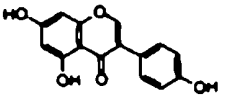
H-89



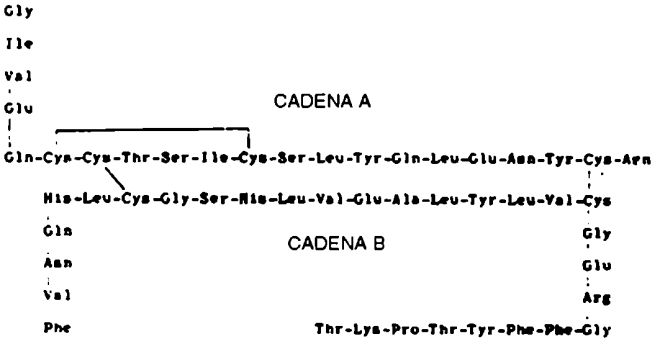
PD 98059



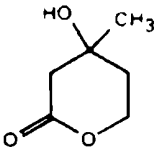
Lovastatina



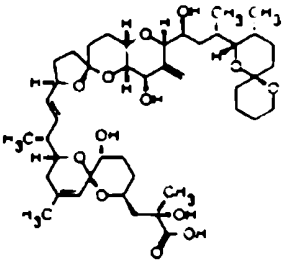
Genisteina



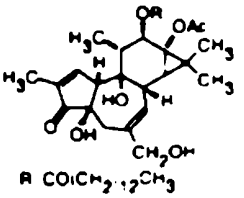
Insulina



Mevalonolactona



Acido Okadaico



TPA

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Presentadas por orden alfabético:

Abdellatif M., MacLellan W.R. y Schneider M.D. (1994). $p21^{ras}$ as a governor of global gene expression. *J. Biol. Chem.* **269**, 15423-15426.

Abramovitz M., Boie Y., Nguyen T., Rushmore T.H., Bayne M.A., Metters K.H., Slipetz D.M. y Grygorczyk R. (1994). Cloning and expression of a cDNA for the human prostanoid FP receptor. *J. Biol. Chem.* **269**, 2632-2636.

Adams J.W., Migita D.S., Yu M.K., Young R., Hellickson M.S., Castro-Vargus F.E., Domingo J.D., Lee P.H., Buij S. y Henderson S.A. (1996). Prostaglandin F2 alpha stimulates hypertrophic growth of cultured neonatal rat ventricular myocytes. *J. Biol. Chem.* **271**, 1179-1186.

Almendral J.M., Sommer D., Macdonald-Bravo H., Burckhardt J., Perera J. y Bravo R. (1988). Complexity of the early genetic response to growth factors in mouse fibroblasts. *Mol Cell Biol.* **8** (5), 2140-28.

Assoian R.K.(1997). Achorage-dependent cell cycle progression. *J. Cell Biol.* **136**, 1-4.

Assoian R.K., Komoriya A., Meyers L.A., Miller C.A. y Sporn M.B. (1983). Transforming growth factor-beta in human platelets. Identification of a major storage site, purification, and characterization. *J. Biol. Chem.* **258**, 7155-7160.

Auwerx J. y Sassone-Corsi P. (1992). AP-1 (Fos-Jun) regulation by IP-1: effect of signal transduction pathways and cell growth. *Oncogene* **7**, 2271-2280.

Baker J. y Harland R. (1996). A novel mesoderm inducer, Madr2, functions in the activin signal transduction pathway. *Genes Dev.* **10**, 1880-1889.

Ballester R. y Rosen O.M. (1985). Fate of immunoprecipitable protein kinase C in GH3 cells treated with phorbol 12-myristate 13-acetate. *J. Biol. Chem.* **260**, 15194-15199.

Barnard J.W., Ward R.A. y Taylor A.E. (1992). Evaluation of prostaglandin F2 alpha and prostacyclin interactions in the isolated perfused rat lung. *J. Appl. Physiol.* **72**, 2469-2474.

Baserga SJ, Linnenbach AJ, Malcolm S, Ghosh P, Malcolm AD, Takeshita K, Forget BG, Benz EJ Jr. (1985). Polyadenylation of a human mitochondrial ribosomal RNA transcript detected by molecular cloning. *Gene* **35** (3), 305-312.

Bershadsky A., Chausovsky A., Lyubinova A. y Geiger B. (1996). Involvement of microtubules in the control of adhesion-dependent signal transduction. *Curr. Biol.* **6** (10), 1279-1289.

Bravo R., Burckhardt J., Curran T. y Muller R. (1986). Expression of c-fos in NIH3T3 cells is very low but inducible throughout the cell cycle. *EMBO J.* **5** (4), 695-700

Bravo R. (1990). Growth factor-responsive genes in fibroblasts. *Cell Growth Diff.* **1**, 305-309.

Brown K.D. y Holley R.W. (1987). Insulin-like synergistic stimulation of DNA synthesis in Swiss 3T3 cells by BSC-1 cell-derived growth inhibitor related to transforming growth factor type beta. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 3743-3747.

Cai H., Smola U., Wixler V., Eisenmann-Tappe I., Diaz-Meco M.T., Moscat J., Rapp V. y Cooper G.M. (1997). Role of diacylglicerol-regulated protein kinase C isotypes in growth factor activation of the Raf-1 protein kinase. *Mol. Cell Biol.* **17**, 732-741.

Chida K., Kato N. y Kuroki T. (1986). Down regulation of phorbol diester receptors by proteolytic degradation of protein kinase C in a cultured cell line of fetal rat skin keratinocytes. *J. Biol. Chem.* **261**, 13013-13018.

Clark D.A. y Coker R. (1998). Transforming growth factor-beta (TGFβ). *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **30**, 293-298.

Coats S., Flanagan W.M., Nourse J. y Roberts J.M. (1996). Requirement of $p27^{Kip1}$ of restriction point control of the fibroblast cell cycle. *Science* **272**, 877-880.

Cohen S. (1962). Isolation of a mouse submaxillary gland protein accelerating incisor eruption and eyelid opening in the new-born animal. *J. Biol. Chem.* **237**, 1555-1562.

Cohen P., Holmes C.F.B. y Tsukitami Y. (1990). Okadaic acid: a new probe for the study of cellular regulation. *Trends Biochem. Sci.* **15** (3), 98-102.

Collins M.K. y Rozengurt E. (1984). Homologous and heterologous mitogenic desensitization of Swiss 3T3 cells to phorbol esters and vasopressin: role of receptor and postreceptor steps. *J. Cell Physiol.* **118**, 133-142.

Connell-Crowley L., Elledge S.J. y Hrper J.W. (1997). G_1 cyclin-dependent kinases are sufficient to initiate DNA synthesis in quiescent human fibroblasts. *Curr. Biol.* **8**, 65-68.

Courage C., Budworth J. y Gescher A. (1995). Comparison of ability of protein kinase C inhibitors to arrest cell growth and to alter cellular protein kinase C localisation. *Br J Cancer.* **71** (4), 697-704.

Cross F., Roberts J. Y Weintraub H. (1989). Simple and complex cell cycles. *Annu. Rev. Cell. Biol.* **5**, 341-396.

Csepli J. y Csapo A.S. (1975). The effect of the prostaglandin F2alpha analogue ICI 81008 on uterine small arteries and on blood pressure. *Prostaglandins* **10**, 689-697.

Cui W., Fowlis D.J., Cousins F.M., Duffie E., Bryson S., Balmain A. y Akhurst R.J. (1995). Concerted action of TGF-β_1 and its type II receptor in control of epidermal homeostasis in transgenic mice. *Genes & Dev.* **9**, 945-955.

Czech M.P. y Corvera S. (1999). Signalling mechanisms that regulate glucose transport. *J. Biol. Chem.* **274** (4), 1865-1868.

De Gregori J., Kowalik T. y Nevis J.R. (1995). Cellular targets for activation by the E2F1 transcription factor include DNA synthesis –and G_1/S- regulatory genes. *Mol. Cell Biol.* **15**, 4215-4224.

De Larco J.E. y Todaro G.J. (1978). Growth factors from murine sarcoma virus-transformed cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75**, 4001-4005.

Denhardt D.T., Edwards D.R. y Parfett C.L. (1986). Gene expression during the mammalian cell cycle. *Biochim Biophys Acta.* **865** (2), 83-125.

Derynck R. y Zhang Y. (1996). Intracellular signalling. The MAD way to do it. *Curr. Biol.* **63**, 1226-1229.

Derynck R., Lindquist P.B., Lee A., Wen D., Tamm J., Graycar J.L., Rhee L., Mason A.J., Miller D.A., Coffey R.J., Moses H.L. y Chen E.Y. (1988). A new type of transforming growth factor-beta, TGF-beta 3. *EMBO J.* **7** (12), 3737-3743.

Díaz A., Varga J. y Jiménez S.A. (1989). Transforming growth factor-beta stimulation of lung fibroblast prostaglandin E2 production. *J.Biol. Chem.* **264**, 11554-11557.

Dong Y.J., Jones R.L. y Wilson N.H. (1986). Prostaglandin E receptor subtypes in smooth muscle: agonist activities of stable prostacyclin analogues. *Br. J. Pharmacol.* **87**, 97-107.

Dowdy S.F., Hinds P.W., Louie K., Reed S.I., Arnold A. y Weinberg R.A. (1993). Physical interaction of the retinoblastoma protein with human D cyclins. *Cell* **73**, 499-511.

Dudley D.T., Pang L., Decker S.J., Bridges A.J. y Saltiel A.R. (1995). A synthetic inhibitor of the mitogen-activated protein kinase cascade. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92** (17), 7686-7689.

Dulbecco R. y Freeman A.E. (1959). Plaque formation by the polyoma virus. *Virology* **8**, 396-397.

Dulbecco R. y Stocker M.G.P. (1970). Conditions Determining Initiation of DNA Synthesis in 3T3 Cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **66**, 204-210.

Eppert K., Scherer S.W., Ozcelik H., Pirone R., Hoodless P., Kim H, Tsui L.-C., Bapat B. Gallinger S., Andrulis I.L., Thomsen G.H., Wrana J.L. y Attisano L. (1996). MADR2 maps to 18q21 and encodes a TGFbeta-regulated MAD-related protein that is functionally mutated in colorectal carcinoma. *Cell* **86**, 543-552.

Evans T., Rosenthal E.T., Yougblom J., Distel D., y Hunt T. (1983). Cyclin: a protein specified by maternal mRNA in sea urchin eggs that is destroyed at each cleavage division. *Cell* **33**, 389-396.

Feaver W.J., Svejstrup J.Q., Henry, N.L. y Kornberg R.D. (1994). Relationship of CDK-activating kinase and RNA polymerase II CTD kinase TFIIH/TFIIK. *Cell* **79**, 1103-1109.

Florin-Christensen J. (1993). New patterns of diacylglycerol metabolism in intact cells. *Biochem. J.* **289** (Pt3), 783-788.

Garrington T.P. y Johnson G.L. (1999). Organization and regulation of mitogen-activated protein kinase signalling pathways. *Curr. Opin. Cell Biol.* **11**(2), 211-218.

Geilen C.C., Wieprecht M., Wieder T. y Reutter W. (1992). A selective inhibitor of cyclic AMP-dependent protein kinase, N-[2-bromocinnamyl (amino) ethyl]-5-isoquinolinesulfonamide (H-89), inhibits phosphotidylcholine biosynthesis in HeLa cells. *FEBS Lett.* **309**, 381-384.

Gilmore T. y Martin G.S. (1983). Phorbol esters and diacylglycerol induce protein phosphorylation at tirosine. *Nature* **306** (5942), 487-490.

Goin M.M. y Jiménez de Asúa L. (1992). Stimulation of protein kinase C (PKC) activity in resting Swiss 3T3 cells by prostaglandin F2 alpha. *FEBS Lett.* **297** (1-2), 175-178.

Goin M., Pignataro O. y Jiménez de Asúa L. (1993).Early cell cycle diacylglicerol (DAG) content and protein kinase C (PKC) activity enhancement potentiates prostaglandin F2 alpha ($PGF_{2\alpha}$) induced mitogenesis in Swiss 3T3 cells. *FEBS Lett.* **316**, 68-72.

Goldstein J.L. y Brown M.S.(1990). Regulation of the mevalonate pathway. *Nature* **343** (6257), 425-430.

Gómez de Alzaga M., Goin M., Ortiz M. y Jiménez de Asúa L. (1994). Transforming growth factor beta 1, insulin and prostaglandin E1 enhance prostaglandin F2 alpha mitogenic action in Swiss 3T3 cells via separate events. *FEBS Lett.* **356**, 21-24.

Grande J.P. (1997). Role of transforming growth factor-beta in tissue injury and repair. *Proc Soc Exp Biol Med.* **214,** 27-40.

Hakeda Y., Shiokawa M., Mano H., Kameda T., Raisz L.G. y Kumegawa M. (1997). Prostaglandin F2 alpha ($PGF_{2\alpha}$) stimulates tyrosine phosphorylation and mitogen-activated protein kinase in osteoblastic MC3T3-E1 cells via protein kinase C activation. *Endocrinology* **138** (5), 1821-1828.

Hannon G.J. y Beach D. (1994). $p15^{INK4B}$ is a potential effector of TGF-β-induced cell cycle arrest. *Nature* **371**, 257-261.

Hann S.R., Thompson C.B. y Eisenman R.N. (1985). c-myc oncogene protein synthesis is independent of the cell cycle in human and avian cells. *Nature* **314**, 366-369.

Hartwell L.H. y Kastan M.B. (1994). Cell cycle control and cancer. *Science* **266**, 1821-1828.

Hartwell L.H. y Weinert T.A. (1989).Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events. *Science* **246**, 629-634.

Hata A., Akita Y., Konno Y., Suzuki K. y Ohno S. (1989). Direct evidence that the kinase activity of protein kinase C is involved in transcriptional activation through a TPA-responsive element. *FEBS Lett.* **252**, 144-146.

Hata A., Akita Y., Suzuki K. y Ohno S. (1993). Functional divergence of protein kinase C (PKC) family members. PKC gamma differs from PKC alpha and –beta II and nPKC epsilon in its

competence to mediate-12-O-tetradecanoyl phorbol-13-acetate (TPA)-responsive transcriptional activation through a TPA-response element. *J. Biol. Chem.* **268**, 9122-9129.

Hatakeyama M, Brill J.A., Fink G.R. y Weinberg R.A. (1994). Collaboration of G_1 cyclins in the functional inactivation of the retinoblastoma protein. *Genes Dev.* **8**, 1759-1771.

Hoodless P.A., Haerry T., Abdollah S., Stapleton M., O'Connor M.B., Attisano L. y Wrana J.L. (1996). MADR1, a MAD-related protein that functions in BMP2 signaling pathways. *Cell* **85**, 489-500.

Horton E.W. y Poyser N.L. (1976). Uterine luteolytic hormone: a physiological role for prostaglandin F2alpha. *Physiol. Rev.* **56**, 595-651.

Horton L.E., Qian Y. y Templeton D.J. (1995). G_1 cyclins control the retinoblastoma gene product growth regulation activity via upstream mechanisms. *Cell Growth Differ.* **6**, 395-407.

Huang C.L. e Ives H.E. (1987). Growth inhibition by protein kinase C late in mitogenesis. *Nature* **327**, 849-850.

Huang Y.T., Lin J.K. y Lee M.T. (1999). Inhibition of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate induction of c-fos mRNA by the protein kinase A inhibitor N-[2-(p-bromocinnamylamino)ethyl]-5-isoquinoline sulfonamide. *Biochem. Pharmacol.* **58**, 1636-1647.

Hug H. y Sarre T. (1993). Protein kinase C isoenzymes: divergence in signal transduction? *Biochem. J.* **291**, 329-343.

Hunt T. (1991). Cyclins and their partners: from a simple idea to complicated reality. *Sem. Cell Biol.* **2**, 213-222.

Inman, W.H. y Colowick, S.P. (1985). Stimulation of glucose uptake by transforming growth factor beta: evidence for the requirement of Epidermal growth factor-receptor activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 1346-1349.

Jacks T., Fazeli A., Schmitt E.M., Bronson R.T. Goodell M.A. y Weinberg R.A. (1992). Effects of an Rb mutation in the mouse. *Nature* **359**, 295-300.

Jaken S. (1996). Protein kinase C isoenzymes and substrates. *Curr. Opin. Cell Biol.* **8**, 168-173.

Jalava A., Lintunen M. y Heikkila J. (1993). Protein kinase C-alpha but not kinase C-epsilon is differentially down-regulated by briostatin 1 and tetradecanoyl phorbol 13-acetate in SH-SY5Y human neuroblastoma cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **191**, 472-478.

Jiménez de Asúa L., Otto A.M., Lindgren J.A. y Hammarström S. (1983). The stimulation of the initiation of DNA synthesis and cell division in Swiss mouse 3T3 cells by prostaglandin F2 alpha requires specific functional groups in the molecule. *J. Biol. Chem.* **258**, 8774-8780.

Jiménez de Asúa L., Clingman D. y Rudland P.S. (1975). Initiation of cell proliferation in cultured mouse fibroblasts by prostaglandin F2alpha. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **72**, 2724-2718.

Jiménez de Asúa L. y Goin M. (1997). Prostaglandin F2 alpha ($PGF_{2\alpha}$) triggers protein kinase C (PKC) and tyrosine kinase activity in cultured mammalian cells. *Adv. Exp. Med. Biol.* **400A**, 531-538.

Jiménez de Asúa L., O'Farrell M.K., Clingan D. y Rudland P.S. (1977). Temporal sequence of hormonal interactions during the prereplicative phase of quiescent cultured 3T3 fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 3845-3849.

Jiménez de Asúa L., Richmond K.M.V., O'Farrell M.K., Otto A.M., Kubler A.-M. y Rudland P.S. (1979). Growth factors and hormones interact in a series of temporal steps to regulate the rate of initiation of DNA synthesis in Mouse Fibroblast. En Hormones and Cell Culture, Eds.: Sato G.H. y Ross R. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, **6**, 403-424.

Jiménez de Asúa L., Richmond K.M.V. y Otto A.M. (1981). Two growth factors and two hormones regulate initiation of DNA synthesis in cultured mouse cells through different pathways of events. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**, 1004-1008.

Johannes F.J., Prestle J., Eis S., Oberhagemann P. y Pfizenmaier K. (1994). PKCμ is a novel atypical member of the protein kinase C family. *J. Biol. Chem.* **269**, 6140-6148.

Kaibuchi K., Takai Y. y Nishizuka Y. (1985). Protein kinase C and calcium ion mitogenic response of macrophage-dependent human peripheral lymphocytes. *J. Biol. Chem.* **260**, 1366-1369.

Kataoka R., Sherlock J. y Lanier S.M. (1993). Signalling events initiated by transforming growth factor-β1 that require G_1. J. Biol. Chem. **268**, 19851-19857.

Kato J.-Y., Matsouka M., Strom D.K. y Sherr C.J. (1994). Regulation of cyclin D-dependent kinase 4 (cdk4) by cdk-activating enzyme. *Mol. Cell. Biol.* **14**, 2713-2721.

Kato J., Matsushime H., Hiebert J.W., Ewen M.E. y Sherr C.J. (1993). Direct binding of cyclin D to the retinoblastoma gene product (pRb) and pRb phosphorylation by the cyclin D-dependent kinase CDK4. *Genes Dev.* **7**, 331-342.

Kawabata M. y Miyazono K. (1999). Signal transduction of the TGF-β superfamily by Smad proteins. *J. Biochem.* **125**, 9-16.

Kiley S.C., Parker P.J., Fabbro D. y Jaken S. (1991). Differential regulation of protein kinase C isozymes by thyrotropin-releasing hormone in GH4C1 cells. *J. Biol. Chem.* **266**, 23761-23768.

Kiley S.C., Parker P.J., Fabbro D. y Jaken S. (1992). Selective redistribution of protein kinase C isoenzyme by thapsigargin and staurosporine. *Carcinogenesis* **13**, 1997-2001.

Kishimoto A., Mikawa K., Hashimoto K., Yasuda I., Tanaka S., Tominaga M., Kuroda T. y Nishizuka Y. (1989). Limited proteolysis of protein kinase C subspecies by calcium-dependent neutral protease (calpain). *J. Biol. Chem.* **264**, 4088-4092.

Kitagawa T., Masumi A. y Akamatsu Y. (1991). Transforming growth factor-beta 1 stimulates glucose uptake and the expression of glucose transporter mRNA in quiescent Swiss mouse 3T3 cells. *J. Biol. Chem.* **266**, 18066-18071.

Knighton D.R., Zheng J.H., Ten Eyck L.F., Xuong N.H., Taylor S.S. y Sowadski J.M. (1991). Structure of a peptide inhibitor bound to the catalytic subunit of cyclic adenosine monophosphate-dependent protein kinase. *Science* **253** (5018), 414-420.

Koff A., Giordano A., Desai D., Yamashite K., Harper J.W., Elledge S., Nishimoto T., Morgan D.O., Franza B.R. y Roberts J.M. (1992). Formation and activation of a cyclin E-CDK2 complex during G_1 phase of the human cell cycle. *Science* **257**, 1689-1694.

Kolodziejczyk S.M. y Hall B.K. (1996). Signal transduction and TGF-beta superfamily receptors. *Biochem Cell Biol.* **74,** 299-314.

Kouzarides T. (1995). Transcriptional control by the retinoblastoma protein. *Semin. Cancer Biol.* **6**, 91-98.

Kramer I.M., Koornneef I., de Laat S.W. y van den Eijnden-van Raaij A.J. (1991). TGF-beta 1 induces phosphorylation of the cyclic AMP responsive element binding protein in ML-CCl64 cells. *EMBO J.* **10** (5), 1083-1089.

Lake S., Gullberg H., Wahlqvist J., Sjogren A.M., Kinhult A., Lind P., Hellstrom-Lindahl E. y Stjernschantz J. (1994). Cloning of the rat and human prostaglandin F2 alpha receptors and the expression of the rat prostaglandin F2 alpha receptor. *FEB Lett.* **355**, 317-325.

Lawler S. Feng X.-H., Chen R.-H., Maruoka E.M., Turck C.W., Griswold-Prenner I. y Derynck R. (1997). The type II transforming growth factor-β receptor autophosphorylates not only on serine and threonine but also on tyrosine residues. *J. Biol. Chem.* **272** (23), 14850-14859.

Leach K.L., Powers E.A., McGuire J.C., Dong L., Kiley S.C. y Jaken S. (1988). Monoclonal antibodies specific for type 3 protein kinase C recognize distintic domains of protein kinase C and inhibits in vitro functional activity. *J. Biol. Chem.* **263** (26), 13223-132230.

Lee E.Y., Chang C.Y., Hu N., Wang Y.C. Lai C.C., Herrup K., Lee W.H. y Bradley A. (1992). Mice deficient for Rb are nonviable and show defects in neurogenesis and hematopoiesis. *Nature* **359**, 288-294.

Leeb-Lundberg L.M. y Song X.H. (1991). Bradykinin and bombesin rapidly stimulates tyrosine phosphorylation of a 120 kDa group of proteins in Swiss 3T3 cells. *J. Biol. Chem.* **266** (12), 7746-7749.

Leone G., De Gregoris J., Sears R., Jakoi L. y Nevins J.R. (1997). Myc and Ras collaborate in inducing accumulation of active cyclin E-CDK2 and E2F. *Nature* **387**, 422-425.

Lin H.Y. y Lodish H.F. (1993). Receptors for the TGF-β superfamily: multiple polypeptides and serine/threonine kinases. *Trends Cell Biol.* **3**, 14-19.

Linder D., Gschwendt M. y Marks F. (1991). Down-regulation of protein kinase C in Swiss 3T3 fibroblasts is independent of its phosphorylating activity. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **176** (3), 1227-1231.

Liu F., Hata A., Baker J., Doody J., Cárcamo J., Harland R.M., y Massagué J. (1996). A human Mad protein acting as a BMP-regulated transcriptional activator. *Nature* **381**, 620-623.

Liu J.-P. (1996). Protein kinase C and its substrates. *Mol. Cell. Endocrinol.* **116**, 1-29.

Livneh E., Shimon T., Bechor E., Doki Y., Schieren I. y Weinstein I.B. (1996). Linking protein kinase C to the cell cycle: ectopic expression of PKCη in NIH-3T3 cells alters the expression of cyclins and Cdk inhibitors and induces adipogenesis. *Oncogene* **12**, 1545-1555.

Livneh E. y Fishman D.A. (1997). Linking protein kinase C to cell-cycle control. *Eur. J. Biochem.* **248**, 1-9.

Lukas J., Bartkova J. y Bartek J. (1996). Convergence of mitogenis signalling cascades from diverse classes of receptors at the cyclin D-cyclin-dependent kinase-pRb-controlled G_1 checkpoint. *Mol. Cell. Biol.* **16** (12), 6917-6925.

Lukas J., Pagano M., Staskova Z., Draetta G. y Bartek J. (1994). Cyclin D_1 protein oscillates and is essential for cell cycle progression in human tumor cell lines. *Oncogene* **9**, 707-718.

Luttrell L.M., Daaka Y. y Lefkowitz R.J. (1999). Regulation of tyrosine kinase cascades by G-protein-coupled receptors. *Curr Opin. Cell Biol.* **11**, 177-183.

Maruta H. y Burgess A.W. (1994). Regulation of the Ras signalling network. *Bioesssays* **16** (7), 489-496.

Massagué J. (1990). The transforming growth factor-beta family. *Annu. Rev. Biol.* **6**, 597-641.

Massagué J., Attisano L. y Wrana J.L. (1994). The TGF-β family and its composite receptors. *Trends Cell Biol.* **4**, 172-178.

Matsushime H., Ewen M.E., Strom D.K., Kato J., Hanks S.K., Roussell M.F. y Sherr C.J. (1992). Identification and properties of an atypical catalytic subunit ($p34^{PSK-J3/CDK4}$) for mammalian D-type G_1 cyclins. *Cell* **7**, 323-334.

Mellor H. y Parker P.J. (1998). The extended protein kinase C superfamily. *Biochem. J.* **332**, 281-292.

Meyerson M., Faha B., Su L.K., Harlow E. y Tsai L.H. (1991). The cyclin-dependent kinase family. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **56**, 177-186.

Minami T., Uda R., Horiguchi S., Ito S., Hyodo M. y Hayashi O. (1992). Allodynia evoked by intrathecal administration of prostaglandin F2 alpha to conscious mice. *Pain* **50**, 223-229.

Morgan D.O. (1995). Principles of CDK regulation. *Nature* **374**, 131-134.

Motokura T., Bloom T., Kim H.G., Jüppner H., Ruderman J.V., Kronenberg H.M. y Arnold A. (1991). A novel cyclin encoded by a bcl-linked candidate oncogene. *Nature* **350**, 512-515.

Motokura T., Keyomarsi K., Kronenberg H.M. y Arnold A. (1992). Cloning and characterization of human cyclin D_3, a cDNA closely related in sequence to the PRAD1/cyclin D_1 proto-oncogene. *J. Biol. Chem.* **267**, 20412-20415.

Mudler K.M. y Morris S.L. (1992). Activation of $p21^{ras}$ by transforming growth factor β in epithelial cells. *J. Biol. Chem.* **267**, 5029-5031.

Murray A.W. y Kirschner M.W. (1989). Dominoes and clocks: the union of two views of the cell cycle. *Science* **246**, 614-621.

Murray A. y Hunt T. (1993). The cell cycle:an introduction. Freeman W.H. y Co., Oxford University Press, NY, Oxford, 251 pp.

Moutoussamy S., Kelly P.A. y Finidori J. (1998). Growth-hormone-receptor and cytokine-receptor-family signalling. *Eur. J. Biochem.* **255**, 1-11.

Myers M.G.Jr., Sun X.J. y White M.F. (1994). The IRS-I Signalling System. *Trends Biochem. Sci.* **19** (7), 289-293.

Nakao A., Watanabe T., Taniguchi S., Nakamura M., Honda Z., Schimizu T. y Kurokawa K. (1993). Characterization of prostaglandin F2 alpha receptor of mouse 3T3 fibroblasts and its functional expression in *Xenopus laevis* oocytes. *J. Cell. Physiol.* **155**, 257-264.

Nathans D. (1992). The cell cycle. Cold Spring Harbor Laboratories, Cold Spring Harbor, NY.

Nobori T., Miura K., Wu D.J., Lois A., TakabayashiK. y Carson D.A. (1994). Deletions of the cyclin-depedent kinase 4-inhibitor gene in multiple human cancers. *Nature* **368**, 753-756.

Ohno S., Mizuno K., Adachi Y., Hata A., Akita Y., Akimoto K., Osada S., Hirai S. y Suzuki K. (1994). Activation of a novel protein kinase C-δ and ε upon mitogenic stimulation of quiescent rat 3Y1 fibroblasts. *J. Biol. Chem.* **269**, 17495-17501.

Ohtsubo M. y Roberts J.M. (1993). Cyclin-dependent regulation of G_1 in mammalian fibroblasts. *Science* **259**, 1908-1912.

Olivier A.R. y Parker P.J. (1994). Bombesin, platelet-derived growth factor, and diacylglycerol induce selective membrane association and down-regulation of protein kinase C isotypes in Swiss 3T3 cells. *J. Biol. Chem.* **269**, 2758-2763.

Olivier A.R. y Parker P.J. (1992). Identification of multiple PKC isoforms in Swiss 3T3, differential down-regulation by phorbol ester. *J. Cell. Physiol.* **152**, 240-244.

Ortiz M.B., Goin M., Gomez de Alzaga M.B., Hammarstrom S. y Jiménez de Asúa L. (1995). Mevalonate dependency of the early cell cycle mitogenic response to epidermal growth factor and prostaglandin F2α in Swiss mouse 3T3. *J. Cell. Physiol.* **162**:139-146.

Otto A.M. y Jiménez de Asúa L. (1985). en: Peptide Hormones as Mediators in Inmunology and Oncology. Hesch, R.D. eds, Raven Press, págs. 33-63.

Palmberg L., Claesson H.E. y Thyberg J. (1987). Leukotrienes stimulate initiation of DNA synthesis in cultured arterial smooth muscle cells. *J Cell Sci.* **88**, 151-9.

Pardee A.B. (1989). G_1 events and regulation of proliferation. *Science* **246**, 603-608.

Pearson R.B. y Kemp BE. (1991). Protein kinase phosphorylation site sequences and consensus specificity motifs: tabulations. *Methods Enzymol.* **200,** 62-81.

Peeper D.S., Upton T.M., Ladha M.H., Neuman E., Zalvide J., Bernards R., De Caprio J.A. y Ewen M.E. (1997). Ras signalling linked to the cell-cycle machinery by the retinoblastoma protein. *Nature* **386**, 177-181.

Peters G. (1994). Cell cycle. Stifled by inhibitors. *Nature* **371**, 204-205.

Peterson G.L. (1983). Determination of total protein. *Methods Enzymol.* **91**, 95-119.

Petritsch C., Woscholski R., Edelman H.M.L. y Ballou L.M. (1995). Activation of p70 S6 kinase and erk-encoded mitogen-activated protein kinases is resistant to high cyclic nucleotides levels in Swiss 3T3 fibroblasts. *J. Biol. Chem.* **270** (44), 26619-26625.

Piek E., Heldin C.H. y Ten Dijke P. (1999). Specificity, diversity, and regulation in TGF-beta superfamily signaling. *FASEB J.* **13,** 2105-24.

Pines J. (1995). Cyclins and cyclin-dependent kinases: a biochemical view. *Biochem. J.* **308**, 697-711.

Pines J. y Hunter T. (1991). Cyclin-dependent kinases: a new cell cycle motif? *Trends Cell. Biol.* **1**, 117-121.

Pines J. y Hunter T. (1995). Cyclin-dependent kinases: and embarrassment of riches? In Cell cycle control (ed. Hutchinson y Glover), p.144. IRL Press, Oxford.

Planas-Silva M.D. y Weinberg R.A. (1997). The restriction point and control of cell proliferation. *Curr. Opin. Cell Biol.* **9**, 768-772.

Poon R.Y.C. y Hunter T. (1995). Innocent bystanders or chosen collaborators?. *Curr. Biol.* **5**, 1243-1247.

Poon R.Y.C., Toyoshima H. y Hunter T. (1995). Redistribution of the CDK inhibitor p27 between different cycin-CDK complexes in the mouse fibroblast cell cycle and in cells arrested with lovastatin or ultraviolet irradiation. *Mol. Biol. Cell* **6**, 1197-1213.

Polymenis M. y Schmidt E.V. (1999). Coordination of cell growth with cell division. *Curr. Opin. Gen. & Develop.* **9**, 76-80.

Quelle D.E., Ashmun R.A., Shurtleff S.A., Kato J.Y., Bar-Sagi D. Roussel M.F. y Sherr C.J. (1993). Overexpression of mouse D-type cyclins accelerates G_1 phase in rodent fibroblasts. *Genes Dev.* **7**, 1559-1571.

Raftery L.A., Twombly V., Wharton K. y Gelbart W.M. (1995). Genetic screens to identify elements of the decapentaplegic signaling pathway in Drosophila. *Genetics* **139**, 241-254.

Resnitzky D. y Reed S.I. (1995). Different roles for cyclins D1 and E in regulation of the G1-to-S transition. *Mol. Cell. Biol.* **15**, 3463-3469.

Resnitzky D., Gosen M., Bujard H. y Reed S.I. (1994). Acceleration of the G1/S phase transition by expression of cyclins D1 and E with an inducible system. *Mol. Cell. Biol.* **14**, 1669-1679.

Roberts A.B., Anzano M.A., Meyers L.A., Wideman J., Blacher R., Pan Y-C.E., Stain S., Lehrman R., Smith J.M., Lamb L.C. y Sporn M.B. (1983). Purification and properties of a type beta transforming growth factor from bovine kidney. *Biochemistry* **22**, 5692-5698.

Roberts A.B. y Sporn M.B. (1990). En : Peptide Growth Factors and Their Receptors. Sporn M.B. y Roberts, A.B. eds., Springer-Verlag, págs. 421-472.

Rodriguez-Peña A. y Rozengurt E. (1984). Disappearance of Ca2+-sensitive, phospholip-dependent protein kinase activity in phorbol ester-treated 3T3. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **120**, 1053-1059.

Ron D. y Kazanietz M. (1999). New insights into the regulation of protein kinase C and novel phorbol ester receptors. *FASEB J.* **13** (13), 1658-1676.

Rosenberger S.F.,Gupta A. y Bowden G.T.(1999). Inhibition of p38 MAP kinase increases okadaic acid mediated AP-1 expression and DNA binding but has no effect on TRE dependent transcription. *Oncogene* **18**, 3626-3632.

Ross R. y Vogel A. (1978). The platelet-derived growth factor. *Cell* **14**, 203-210.

Rossow P.W., Riddle V.G. y Pardee A.B. (1979). Synthesis of labile serum-dependent protein in early G1 controls animal cell growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 4446-4450.

Roy R., Adamczewski J.P., Seroz T., Vermeulen W., Tassan J.-P., Schaeffer L. Nigg E.A., Hoeijmakers I.H.J. y Egly J.M. (1994). The MO15 cell cycle kinase is associated with the TFIIH transcription-DNA repair factor. *Cell* **79**, 1093-1101.

Rozengurt E. (1986). Early signals in mitogenic response. *Science* **234**, 161-166.

Sakamoto K., Ezashi T., Miwa K., Okuda-Ashitaka E., Houtani T., Sugimoto T., Ito S. y Hayashi O. (1994). Molecular cloning and expression of a cDNA of the bovine prostaglandin F2 alpha receptor. *J.Biol. Chem.* **269**, 3881-3886.

Saltis J. (1996). TGF-beta: receptors and cell cycle arrest. *Mol Cell Endocrinol.* **116,** 227-232.

Sambrook J., Fritsch E.F. y Maniatis T. (1989). Molecular cloning. Segunda edición. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Savage C., Das P., Finelli A.L., Towsend S.R., Sun C.-Y., Baird S.E. y Padgett R.W. (1996). Caenorhabditis elegans genes smad-2, smad-3 and smad-4 define a conserved family of transforming growth factor β pathway components. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **93**, 790-794.

Sauane M., Correa L., Rogers F., Krasnapolski M., Barraclough R., Rudland P.S., Jiménez de Asua L.J. (2000). Prostaglandin F(2alpha) (PGF(2alpha)) induces cyclin D1 expression and DNA synthesis via early signaling mechanisms in Swiss mouse 3T3 cells. *Biochem Biophys Res Commun.* **270** (1), 11-16.

Schaeffer H.J. y Weber M.J. (1999). Mitogen-activated protein kinases: specific messages from ubiquitous messengers. *Mol. Cell Biol.* **19** (4), 2435-2444.

Schneider C., King R. y Philipson L. (1988). Genes specifically expressed at growth arrest of mammalian cells. *Cell* **54**, 787-793.

Schwartz M.A. y Baron V. (1999). Interactions between mitogenic stimuli, or, a thousand and one connections. *Curr. Opin. Cell Biol.* **11**, 197-202.

Shack S., Gorospe M., Fawcett T.W., Hudgins W.R. y Holbrook N.J. (1999). Activation of the cholesterol pathway and Ras maturation in response to stress. *Oncogene* **18** (44), 6021-6028.

Sherr C.J. (1994). G1 phase progression: cycling on cue. *Cell* **79**, 551-555.

Sherr C.J. y Roberts J.M. (1995). Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases. *Genes Develop.* **9**, 1149-1163.

Senior J., Marshal K., Sansha R. y Clayton J.K. (1993). In vitro characterization of prostanoid receptors on human myometrium at term pregnancy. *Br J. Pharmacol.* **108**, 501-506.

Smith A., Ramos-Morales F., Ashworth A. y Collins M. (1997). A role for JNK/SAPK in proliferation, but not apoptosis, of IL-3-dependent cells. *Curr. Biol.* **7**, 893-896.

Smith J.B., Smith L. y Petit G.R. (1985). Bryostatins: potent, new mitogens that mimic phorbol ester tumor promoters. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **132** (3), 939-945.

Smith W.L. (1989). The eicosanoids and their biochemical mechanisms of action. *Biochem. J.* **259**, 315-324.

Smith W.L., Marnett L.J. y De Witt D.L. (1991). Prostaglandin and thromboxane biosynthesis. *Pharmacol. Ther.* **49**, 153-179.

Solomon M.J., Lee T. y Kirschner M.W. (1992). Role of phosphorylation in p34 cdc2 activation: identification of an activating kinase. Mol. Biol. *Cell* **3**, 13-27.

Souchelnytskyi S., Tamaki K., Engstrom U., Wernstedt C., ten Dijke P. y Heldin C.H. (1997). Phosphorylation of Ser465 and Ser467 in the C terminus of Smad2 mediates interaction with

Smad4 and is required for transforming growth factor-beta signaling. *J Biol Chem.* **272** (44), 28107-28115.

Spruck III C.H., Gonzalez-Zuleta M., Shibata A., Simoneau A.R., Lin M.-F, Gonzales F., Tsai Y.C. y Jones P.A. (1994). p16 gene in uncultured tumors. *Nature* **370**, 183-184.

Sugimoto Y., Hasumoto K., Namba T., Irie A., Katsuyama M., Negishi M., Kakizuka A., Narumiya S. y Ichikawa A. (1994). Cloning and expression of a cDNA for mouse prostaglandin F receptor. *J. Biol. Chem.* **269**, 1356-1360.

Takenaka I., Morin F., Seizinger B.R. y Kley N. (1995). Regulation of the sequence-specific DNA-binding function of p53 by protein kinase C and protein phosphatases. *J. Biol. Chem.* **270**, 5405-5411.

Tamaoki T. y Nakano H. (1990). Potent and specific inhibitors of protein kinase C of microbial origin. *Biotechnology* (N Y) **8** (8), 732-735.

Tashjian A.H.Jr., Voelkel E.F., Lazzaro M., Singer F.R., Roberts A.B., Derynck R., Winkler M.E. y Levine L. (1985). Alpha and beta human transforming factors stimulate prostaglandin production and bone resorption in cultured mouse calvaria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 4535-4538.

TodaroG.J. y Green H. (1963). Quantitative studies of the growth of mouse embryo cells in culture and their development into established lines. *J. Cell. Biol.* **17**, 299-313.

Thompson L.J. y Fields A.P. (1996). β II protein kinase C is required for the G2/M phase transition of cell cycle. *J. Biol. Chem.* **271**, 15045-15053.

Toullec D., Pianetti P., Coste H., Bellevergue P., Grand-Perret T., Ajakane M., Baudet V., Boissini P., Boursier E., Loriolle F., Duhame L., Charon D. y Kirilovsky J. (1991). The bisindolilmaleimide GF 109203X is a potent and selective inhibitor of protein kinase C. *J. Biol. Chem.* **266** (4), 15771-15781.

Toyoshima H. y Hunter T. (1994). p27, a novel inhibitor of G1 cyclin-CDK protein kinase activity is related to p21. *Cell* **78**, 67-74.

Tseng C.P., Kim Y.J., Kumar R. y Verma A.K. (1994). Involvement of protein kinase C in the transcriptional regulation of 12-O-. *Carcinogenesis* **15**, 707-711.

Uberall F., Kampfer S., Schubert C., Doppler W. y Grunicke H.H. (1994). Role of protein kinase C in ras-mediated fos expression. *Adv. Enzyme Regul.* **34**, 257-268.

Verma R., Iida H. y Pardee A.B. (1988). Modulation of expression of the stress-inducible p118 of Saccharomyces cerevisiae by cAMP. II. A study of p118 expression in mutants of the cAMP cascade. *J. Biol. Chem.* **263**, 8576-8582.

Valverde A.M., Sinnett-Smith J., Van Lint J. Y Rozengurt E. (1994). Molecular cloning and characterization of protein kinase D: a target for diacylglycerol and phorbol esters with a distinctive catalytic domain. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **91**, 8572-8576.

Watanabe T., Nakao A., Emerling D., Hashimoto Y., Tsukamoto K., Horie Y., Kinoshita M. y Kurokawa K. (1994). Prostaglandin F2α enhances tyrosine phosphorilation and DNA synthesis through phospholipase C-couple receptor via Ca2+-dependent intracellular pathway in NIH-3T3 cells. *J. Biol. Chem.* **269**, 17619-17625.

Watters D.J. y Parsons P.G. (1999). Critical targets of protein kinase C in differentiation of tumour cells. *Biochem. Pharmacol.* **58** (3), 383-388.

Withers D.A., Harvey R.C., Faust J.B., Melnyk O., Carey K. y Meeker T.C. (1991). Characterization of a candidate bcl-gene. *Mol. Cell. Biol.* **11**, 4846-4853.

Xiong Y., Connolly T., Futcher B. y Beach D. (1991). Human D-type cyclin. *Cell* **65**, 691-699.

Xiong Y., Xhang H. y Beach D. (1992). D types cyclins associate with multiple protein kinases and the DNA replication and repair factor PCNA. *Cell* **71**, 505-514.

Yamaguchi K., Shirakabe K., Shibuya H., Irie K., Oishi I., Ueno N., Taniguchi T., Nishida E. y Matsumoto K. (1995). Identification of a member of the MAPKKK family as a potential mediator of tgf-β signal transduction. *Science* **270**, 2008-2011.

Young S., Parker P.J., Ullrich A. y Stabel S. (1987). Down-regulation of protein kinase C is due to an increased rate of degradation. *Biochem. J.* **244**, 775-779.

Zhang Y., Feng X.-H., Wu R.-Y. y Derynck R. (1996). Receptor-associated Mad homologues synergize as effectors of the TGF-beta response. *Nature* **383**, 168-172.

Zhang Y., Feng X.H. y Derynck R. (1998). Smad3 and Smad4 cooperate with c-Jun/c-Fos to mediate TGF-beta-induced transcription. *Nature* **394**, 909-913. Errores de publicación en *Nature* (1998) **396**, 491.

AGRADECIMIENTOS

Agradecimientos

A la Comisión Directiva de la Fundación Campomar por haberme permitido realizar la tesis en sus instalaciones, y su apoyo financiero entre beca y beca (los famosos espacios muertos).

Al Dr. Luis Jiménez de Asúa, por haberme dado la posibilidad de trabajar en su laboratorio, introducirme en el fascinante mundo del ciclo celular, realizar una pasantía en el exterior y llevar a cabo un doctorado.

Al Ministerio de Salud y Acción Social que con la beca de residencia me permitió comenzar con la tesis.

Al Centro de Investigaciones Químicas y Farmacológicas (CEDIQUIFA) por la beca otorgada para continuar la tesis.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnologicas (CONICET), por haberme otorgado la beca de perfeccionamiento para finalizar la tesis.

A los Dres.: Omar Coso, por haber colaborado con la MAPK; Marcela Barrios, por haberme ayudado con la técnica de inmunofluorescencia, Karen Leach, por la donación del anticuerpo monoclonal anti PKCα.

A las compañias que donaron distintos tipos de materiales: Beckton and Dickinson, Whirpool, IBM, Millipore.

A los distintos organismos que también otorgaron subsidios para la investigación: Welcome Trust, Agencia de Promoción Científica y Tecnológica, CONICET.

A la Dra. Mercedes Goin, quien con su gran calidez me ayudó mucho con el desarrollo de la tesis, tanto con su constante discusión, como con la transferencia del conocimiento de la mesada, empezando por el cultivo celular. Y por sobretodo, a la amiga por las charlas mantenidas compartiendo alegrías, tristezas y frustraciones diarias, que hizo más llevadero el día a día de los años compartidos.

A la ya casi doctora Moira Sauane, compañera de laboratorio, por su increíble paciencia, por su apoyo, sus discusiones, por su ayuda en llevar a delante las tareas rutinarias, y por sus infinitas charlas compartiendo la vida diaria.

A la Lic. María Gómez de Alzaga, por todo su aporte con su trabajo previo, para poder iniciar esta tesis.

A todos los que pasaron por el laboratorio haciendo postgrados, seminarios de licenciatura ó simplemente aprendiendo a hacer ciencia, con quienes compartí y aprendí algo nuevo todos los días, a todo nivel: Jimena Vedoya, Carolina Schere, Inés Fernández Avedaño, Florencia Rogers, Martín Krasnapolsky, Laura Correa y la Dra. Gabriela Balough.

Al Dr. Juan L. Iovanna, por haberme introducido en la ciencia, desde el trabajo en la mesada hasta la preparación de un trabajo escrito, y por siempre estar a mano (cibernéticamente) para escuchar y discutir.

Al Dr. Luis Quesada-Allúe, por haberme introducido en el campo de la embriogénesis vegetal y el análisis de los glicoconjugados.

A los Dres. Horacio G. Pontis y Graciela L. Salerno, por haberme introducido en el campo de la bioquímica y biología molecular vegetal.

A los Dres. Philip Rudland y Roger Barraclough, y a la gente del laboratorio, en la Universidad de Liverpool, por todo el apoyo brindado durante la pasantía.

A toda la gente que trabaja en la Fundación Campomar en sus distintas áreas, administración, biblioteca, droguero, relaciones institucionales, ciencia y técnica, mantenimiento y limpieza.

A los compañeros/as del Instituto Campomar, a los del grupo de Biología Molecular en la facultad de Medicina, a los de FIBA, y a los del Hospital de Pediatría "Prof. J.P. Garrahan" .

Y por último a mi familia, cariñosamente "la Fundación Cadenas Madariaga- L'Huillier", por haberme bancado no sólo financiaramente los años de becas flacas (ó no becas), sino también mis terribles cambios de humor, y por el apoyo moral recibido todos estos años.