

Tesis Doctoral

Modificación de la funcionalidad de la eritropoyetina por carbamilación. Mecanismos de acción sobre células eritroides y neuronales

Chamorro, María Eugenia

2014-03-25

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:

Chamorro, María Eugenia. (2014-03-25). Modificación de la funcionalidad de la eritropoyetina por carbamilación. Mecanismos de acción sobre células eritroides y neuronales. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Chamorro, María Eugenia. "Modificación de la funcionalidad de la eritropoyetina por carbamilación. Mecanismos de acción sobre células eritroides y neuronales". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2014-03-25.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Química Biológica

**“Modificación de la funcionalidad de la
eritropoyetina por carbamilación.
Mecanismos de acción sobre células
eritroides y neuronales”**

Tesis a ser presentada para optar por el título de Doctora de la
Universidad de Buenos Aires en el área Química Biológica

Autora: María Eugenia Chamorro

Directora: Dra. Alcira B. Nesse

Directora asistente: Dra. Daniela C. Vittori

Consejera de estudios: Dra. Cecilia Varone

Laboratorio de Fisiología Celular de la Eritropoyetina

Buenos Aires, 2013

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a todas las personas que me acompañaron todos estos años para que llegara este momento, ayudándome y estando a mi lado desde que empecé la carrera.

De mi familia y amigos....

A mi mamá, mi papá y hermanos: Por luchar para que yo siempre continúe en esta carrera, me esfuerce y logre llegar al final de este camino, el doctorado, lo que ellos siempre quisieron, y sin ellos no lo hubiera logrado, los quiero mucho.

A Carlos: Mi vida por acompañarme en esta última etapa del doctorado, por comprenderme, apoyarme infinitamente, por su paciencia y ayudarme a que todo sea más fácil, demostrándome que día a día todo vale la pena con su amor, te amo.

A Dai: Mi amiga del alma, incondicional que iniciamos juntas este camino hace ya 12 años, porque sin su amistad y sin su ayuda todo me hubiera sido mucho más difícil. Gracias amiga por aconsejarme, por estar cada vez que te necesitaba y estar a mi lado todo este tiempo, te quiero mucho.

A Marta, Pepe, Elsa, Toti, Eduardo, Juan Carlos y Loly: Mis tíos que siempre fueron y son como otros padres para mí, y junto con mis primos siempre me apoyaron y acompañaron, los adoro.

A Corrado: Otro padre que es una gran persona y me apoyo, y aunque este lejos siempre fue como si estuviera cerca.

Les agradezco a las personas que he conocido por circunstancias de la vida y hoy aprecio, a Nito y Teresa.

Le doy las gracias a todos ellos por su intención y voluntad de oírme a pesar de no enterner cuando les contaba sobre mi investigación, los quiero.

De mi trabajo....

A Alcira y Daniela: Gracias por permitirme lograr este título, por su dirección, dedicación, por haberme aceptado para ser parte de este laboratorio hace 10 años atrás y ya sea para mí como otra casa, junto con todas las personas que pasaron por este laboratorio y he conocido en este tiempo, por tantos momentos vividos que quedaran siempre en mi recuerdo.

Gracias Alcira no solo por ser mi directora, enseñándome lo que es la investigación, por guiarme y estar siempre dispuesta a enseñarme, sino también, por ayudarme y trabajar junto a mí en cada uno de los logros de esta carrera, incluso a quedarse hasta último momento y no dejarme sola hasta no terminar con cada presentación.

A Mariana, Shir y Gladys: mis compañeras de laboratorio de la cual surgió una gran amistad, gracias por apoyarme siempre y estar cuando las necesitaba, estando o no compartiendo el mismo laboratorio, y fundamentalmente por ser muy buenas amigas, y estar en los malos y buenos momentos, para festejar o consolarme.

A Lau y Vane: mis otras compañeras de laboratorio y amigas, por siempre estar dispuestas a ayudarme, alentarme, apoyarme y estar cuando las necesite, convirtiéndose en grandes amigas de la vida.

A Romi: Porque es hoy la persona que esta todos los días compartiendo el laboratorio conmigo, haciendo que con su amistad sea todo más placentero.

A mis otros compañeros de laboratorio, Dani, Esteban, Mariana, Guillermina, Julia y Vale por compartir la investigación del día a día y buenos momentos.

A las Doctoras Irene, Claudia, Lucía, Ana María, Rosana y Graciela: les agradezco por el afecto y la cordialidad que siempre me han tratado.

GRACIAS A TODOS

LOS LLEVO EN MI CORAZÓN...

MARU

Este trabajo está dedicado a la persona que amo, mi familia y amigos, quienes confiaron en mí y me ayudaron a cumplir con este objetivo, estando siempre a mi lado en cada etapa de mi vida, ofreciéndome su amor.

Los quiero con todo mi corazón!

**Modificación de la funcionalidad de la eritropoyetina por carbamilación.
Mecanismos de acción sobre células eritroides y neuronales**

La eritropoyetina (Epo) es conocida como la hormona que regula la producción de células eritroides. Sin embargo, su rol biológico se expandió a partir del hallazgo de la expresión de receptores específicos en otros tejidos, incluyendo el nervioso. Además, se describió un efecto neuroprotector de la hormona, el cual estaría asociado a inhibición de apoptosis. Debido al interés por expandir el uso farmacológico de la Epo hacia la protección de tejidos no hematopoyéticos, se intensificó la búsqueda de estructuras modificadas de la proteína. La entidad que merece, actualmente, mayor investigación es la Epo carbamilada en los residuos lisina (cEpo). Evidencia derivada de estudios *in vitro* y en animales de experimentación indican que esta forma de Epo mantiene su actividad neuroprotectora mientras que carece de actividad eritropoyética. Esta diferente función evitaría un aumento innecesario de la masa eritroide en el tratamiento de pacientes no anémicos con enfermedades neurodegenerativas.

Con el objeto de profundizar el conocimiento sobre las diferencias observadas en la función de Epo debido a la carbamilación, en el presente trabajo se utilizó un modelo que involucra células fisiológicas y varias líneas celulares para evaluar, en conjunto y comparativamente, los efectos de cEpo y de Epo en ensayos paralelos. Fueron utilizados cultivos de células progenitoras eritroides de médula ósea de ratón, distintas líneas celulares con capacidad de diferenciación eritroide, tales como UT-7, dependiente de Epo para su supervivencia, TF-1, dependiente de GM-CSF y puede proliferar en presencia de Epo por períodos cortos y K562, independiente de factores de crecimiento específicos, así como la línea de origen neuronal SH-SY5Y.

El primer paso consistió en realizar la carbamilación de Epo recombinante, utilizando cianato de potasio, empleando distintos tiempos y concentraciones de cianato apropiadas para asegurar un completo bloqueo de los residuos lisina de la Epo. El éxito de la carbamilación fue verificado mediante electroforesis en gel y *Western blotting*, demostrándose el aumento de la carga neta negativa de cEpo con respecto a la de Epo. La modificación de la estructura de la proteína por carbamilación puede causar alteraciones funcionales, cuyo estudio constituye el objetivo de este trabajo de tesis.

Los cultivos de células UT-7 y TF-1 en presencia de cEpo mostraron una significativa disminución de la viabilidad celular, provocando la muerte celular por apoptosis, mientras que la Epo mantuvo la viabilidad e indujo la proliferación

celular de ambas líneas celulares. La cEpo tampoco pudo estimular el desarrollo de unidades formadoras de colonias eritroides (CFU-E) en cultivos de células de médula ósea de ratón, ni previno la apoptosis inducida por la citoquina proinflamatoria TNF- α en células eritroileucémicas K562.

En cambio, cEpo, al igual que Epo, actuó como factor antiapoptótico frente a la inducción de muerte celular programada inducida por TNF- α o staurosporina en células neuronales SH-SY5Y. Los resultados de ensayos de inhibición de vías de señalización intracelular permiten sugerir que las acciones neuroprotectoras de Epo y cEpo son mediadas por la activación de Jak2/PI3K. Estos resultados confirmaron que las modificaciones moleculares introducidas en la molécula de Epo por el proceso de carbamitación generan la pérdida de su habilidad para mantener la supervivencia de las células con capacidad de diferenciación eritroide pero no afecta su acción neuroprotectora mostrando, en este caso, una actividad similar a la de la Epo nativa.

Mediante ensayos competitivos y de inhibición por anticuerpos, tanto en las células SH-SY5y como en las TF-1, se observó que la Epo puede actuar a través del receptor homodimérico (REpo/REpo) y el heterodimérico formado por una subunidad REpo y una subunidad β *common* (R β c), que es también subunidad del receptor de GM-CSF. En cambio, cEpo necesita de las subunidades REpo y R β c para prevenir la apoptosis de las células neuronales.

A partir de la hipótesis de que la carbamitación de Epo le permite conservar su capacidad neuroprotectora pero le impide inducir la proliferación de células eritroides, el siguiente objetivo fue la investigación de vías de señalización que juegan un papel clave en la proliferación celular inducida por Epo. Si bien en cultivos de células eritroides UT-7 y TF-1 cEpo indujo la fosforilación de Jak2, primer paso de activación celular, demostramos por primera vez la incapacidad de cEpo para mantener la fosforilación de Akt y FOXO3a por el mismo periodo que lo hace Epo. Esto lleva a la translocación de FOXO3a al núcleo promoviendo la expresión de la proteína reguladora del ciclo celular p27^{Kip1} y generando, así, el arresto del ciclo celular por cEpo.

Dado que el efecto diferencial de cEpo y Epo con respecto a la proliferación celular se encontraría asociado al silenciamiento de vías de señalización por aumento de la velocidad de defosforilación analizamos la expresión y actividad de una fosfatasa, la tirosina fosfatasa 1B (PTP1B), involucrada en la desregulación de la señalización por Epo. Comprobamos que la inducción de PTP1B es significativamente mayor en presencia de cEpo, incremento que parece estar asociado al aumento de calcio intracelular inducido por este factor. La

colocalización de PTP1B con el R β c sustenta la conclusión de que la fosfatasa desfosforila la señalización de cEpo, interrumpiendo la vía de supervivencia y, en consecuencia, la proliferación celular, explicando, al menos en parte, la acción diferencial entre Epo y cEpo sobre células eritroides.

Palabras claves: eritropoyetina carbamilada, eritropoyetina, proliferación celular, receptor de eritropoyetina, receptor β *common*, tirosina fosfatasa 1B, eritropoyesis, neuroprotección.

**Functional Modification of erythropoietin due to carbamylation.
Mechanisms of action on erythroid and neuronal cells.**

Erythropoietin (Epo) is known as the hormone regulating the production of erythroid cells. However, its biological role was expanded after the discovery of specific receptors expressed in other tissues, including the nervous tissue. Moreover, a neuroprotective effect that could be associated to apoptosis inhibition was described for the hormone.

Due to the interest in expanding the pharmacological use of Epo over the protection of non-hematopoietic tissues, the search for modified structures of the protein became more intense. The chemical entity currently under investigation is the Epo carbamylated in lysine residues (cEpo). Results from *in vitro* and *in vivo* experiments indicate that this form of Epo retains its neuroprotective ability, while lacking in erythropoietic activity. This different function would prevent an unnecessary increase in erythroid mass in non-anemic patients under treatment for neurodegenerative diseases.

With an aim to further the existing knowledge of the changes observed in Epo after carbamylation, in the present work we used a model involving physiological cells as well as cell lines, to globally and comparatively evaluate the effects of Epo and cEpo in parallel assays. Erythroid progenitor cells from mouse bone marrow were used to study the development of colony-forming units-erythroid (CFU-E). The cell lines capable of erythroid differentiation employed were UT-7, dependent on Epo for survival, TF-1, dependent on GM-CSF and able to proliferate in the presence of Epo for short periods, and K562, independent of any specific growth factor where cell line of neuronal origin was SH-SY5Y.

The first step in the work consisted in the carbamylation of rhuEpo using potassium cyanide. This salt decomposes when dissolved generating an anion which allows it to bind the protein's lysine residues. The carbamylation process was carried out at different times and cyanide concentrations to ensure complete binding, and therefore the blockage of Epo's lysine residues. The carbamylation of Epo was confirmed by gel electrophoresis, electrotransfer and immunodetection, where cEpo showed a decrease in positive charge due to the blockage of lysines, and consequently an increase in its net negative charge in comparison to Epo. In the carbamylation product (cEpo), a carbamyl group is coupled to each lysine residue in the Epo molecule, thus modifying the protein structure and potentially causing functional alterations.

In the presence of cEpo, cultures of UT-7 and TF-1 cells showed a significant decrease in cell viability, leading to cell death by apoptosis, whereas Epo maintained viability and induced proliferation of both cell lines. cEpo did not support the development of colony-forming units-erythroid (CFU-E) in cultures of mouse bone marrow cells, nor did it prevent apoptosis induced by the proinflammatory cytokine TNF- α in erythroleucemic K562 cells differentiated with hemin.

On the other hand, both cEpo and Epo acted as antiapoptotic agents protecting from the induction of programmed cell death by TNF- α or staurosporin in neuronal SH-SY5Y cells. Based on inhibition assays for intracellular signaling pathways, it may be suggested that the antiapoptotic action of cEpo and Epo is mediated by the activation of Jak2/PI3K.

Our results confirmed that the modifications introduced in the Epo molecule after carbamylation produce a loss of its ability to support the survival of cells capable of erythroid differentiation, but it does not affect its neuroprotective action on SH-SY5Y cells, showing an activity similar to that of the native Epo.

By carrying out inhibition and competence assays, we found that Epo can act through both receptors involved in neuronal SH-SY5Y and TF-1 cells: the homodimer (REpo/REpo) and the heterodimer comprising a REpo monomer and a β common subunit (R β c), which is also present in the GM-CSF receptor. We observed that cEpo requires both REpo and the R β c subunit to prevent apoptosis in neuronal cells.

Owing to the fact that after carbamylation Epo maintains its antiapoptotic ability but can no longer induce erythroid cell proliferation, the following objective of this work was to investigate the signaling pathways playing a key role in Epo-induced cell proliferation. Although in cultures of erythroid UT-7 and TF-1 cells cEpo induced Jak2 phosphorylation, which is the first step of cell activation, we demonstrated for the first time that cEpo was unable to maintain Akt and FOXO3a phosphorylated for the same period of time as did Epo. Dephosphorylation of FOXO3a, which promotes its translocation to the nucleus as the transcription factor for the cell cycle regulatory protein p27^{kip1}, was demonstrated through an increase in the expression of the latter in cultures with cEpo.

Since the differential effect of Epo and cEpo on cell proliferation may be associated to the silencing of transduction pathways by an increase in the dephosphorylation rate, we analyzed the expression and activity of the tyrosine phosphatase 1B (PTP1B), involved in the the desregulation of Epo's signalling. We

found that PTP1B induction is significantly higher with cEpo, an increase which seems to be linked with the rise in intracellular calcium induced by this factor. Co-localization of PTP1B and R β c supports the conclusion that the enzyme dephosphorylates Epo's signalling faster than that of cEpo, thus interrupting pathways of survival, and consequently, of proliferation. This explains, at least in part, the differential effects of Epo and cEpo on erythroid cells.

Keywords: erythropoietin, carbamylated erythropoietin, cell proliferation, erythropoietin receptor, β *common* receptor, tyrosine phosphatase 1B, erythropoiesis, neuroprotection.

Los resultados presentados en esta Tesis Doctoral han dado origen a las siguientes publicaciones:

Artículos publicados en revistas indexadas:

- **Signaling pathways of cell proliferation are involved in the differential effect of erythropoietin and its carbamylated derivative**

Chamorro ME, Wenker S, Vota D, Vittori D, Nesse A.

Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research 1833(8):1960–1968, ISSN: 0167-4889, 2013.

Trabajos presentados en los siguientes congresos internacionales:

- 8th IBRO World congress of Neuroscience, Italia, 2011.
- 15th Congress of the European Hematology Association.
Resumen publicado en Haematologica/the haematology journal 95(s2):301, 2010.

Resúmenes presentados en congresos nacionales y publicados:

Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica: (2008-2013).

- Medicina (Supl III) 73:269, 2013.
- Medicina (Supl II) 72:250, 2012.
- Medicina (Supl III) 71:180, 2011.
- Medicina (Supl II) 70:191, 2010.
- Medicina (Supl I) 69:104, 2009.
- Medicina (Supl II) 68:111, 2008.

cAlb	Albúmina Carbamilada
cEpo	Eritropoyetina Carbamilada
DAF	2,7 diaminofluoreno
DMSO	dimetil sulfóxido
dNTPs	Nucleótidos
Epo_L	Eritropoyetina Lavada
Jak2	<i>Janus</i> quinasa 2
GAPDH	Gliceraldehido-3-fosfato dehidrogenasa
HEPES	<i>(N-(2-hydroxyethyl)piperazine-N'-82-ethanesulfonic acid)</i>
KCNO	Cianato de Potasio
Ly	Ly 294002
MTT	<i>3-(4,5-dimethylthiazol-yl)-2,5diphenyl tetrazoluim bromide</i>
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
PARP	<i>Poly-adenosin ribose polimerase</i>
pb	pares de bases
PI3K	Fosfatidilinositol-3-kinasa
PBS	<i>Buffer</i> fosfato salino
PMSF	<i>phenylmethylylsulfonyl fluoride</i>
PTP1B	Proteína tirosina fosfatasa 1B
Rβc	Receptor <i>beta common</i>
REpo	Receptor de Eritropoyetina
rhuEpo	Eritropoyetina recombinante humana
SDS	<i>dodecylsulfate sodium salt</i>
SFB	Suero fetal bovino
STP	Staurosporina
TBS	<i>Buffer</i> tris salino
TBS-T	<i>Buffer</i> tris salino-Tween 20
TEMED	Tetra metiletildiamina

TNBSA	ácido 2,4,6-trinitrobencenosulfónico
TNF	Factor de necrosis tumoral
TRIS	Tris hidroximetil amino metano
RT-PCR	<i>Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction</i>
STAT	Transductor de señal y activador de la transcripción

INTRODUCCIÓN	1-23
ERITROPOYETINA Y ERITROPOYESIS	1
Origen de la Eritropoyetina y Eritropoyetina recombinante humana	2
Estructura de la eritropoyetina	3
Eritropoyetina: Acción en tejidos no hematopoyéticos	4
ERITROPOYETINA Y SU RECEPTOR	5
MECANISMO DE ACTIVACIÓN CELULAR POR ERITROPOYETINA	6
Rol de p27 ^{kip1} en el control del ciclo celular	9
ERITROPOYETINA Y APOPTOSIS	11
Proceso apoptótico	12
Vías del proceso apoptótico: intrínseca y extrínseca	13
TERMINACIÓN DE LA SEÑALIZACIÓN DE LA ERITROPOYETINA	14
PROTEÍNA TIROSINA FOSFATASA 1B	16
Regulación de PTP1B	17
RELACIÓN ESTRUCTURA PROTEICA-FUNCIÓN DE LA ERITROPOYETINA	18
ERITROPOYETINA CARBAMILADA	19
ERITROPOYETINA CARBAMILADA Y RECEPTORES INVOLUCRADOS	21
Características del receptor β <i>common</i>	21
OBJETIVOS	24-25
MATERIALES Y MÉTODOS	26-50
EQUIPOS	26
REACTIVOS Y ANTICUERPOS	26
Calidad de agua y reactivos	26
Reactivos específicos	27
Esterilización de materiales y soluciones	29
PROTOCOLOS	29
1. CARBAMILACIÓN DE PROTEÍNAS	29
1.1. Procedimiento	30
1.2. Control de la carbamilación	30
1.2.1. Determinación de grupos amino libres	30
1.2.2. Análisis del producto carbamilado por electroforesis	31
1.3. Carbamilación de la eritropoyetina	33
2. CRIOPRESERVACIÓN DE LÍNEAS CELULARES	33
2.1. Congelamiento	33

2.2. Descongelamiento	33
3. CULTIVO CELULAR	34
3.1. Línea celular K562	34
3.2. Línea celular UT-7	34
3.3. Línea celular TF-1	35
3.4. Línea celular SH-SY5Y	35
3.5. Desarrollo de CFU-E	36
3.5.1. Animales	36
3.5.2. Medio de cultivo de las CFU-E	36
3.5.3. Obtención de células de médula ósea	37
3.5.4. Cultivo celular de las CFU-E	37
4. DIFERENCIACIÓN CELULAR	38
4.1. Diferenciación de las células K562, UT-7 y TF-1	38
4.2. Diferenciación de las células SH-SY5Y	38
5. INDUCTORES DE MUERTE CELULAR	39
5.1. Staurosporina	39
5.2. TNF- α	39
6. VIABILIDAD Y PROLIFERACIÓN CELULAR	39
6.1. Ensayo de exclusión del colorante azul Tripán	39
6.2. Microscopía Electrónica de Barrido	40
6.3. Ensayo de MTT	40
7. EVALUACIÓN DE APOPTOSIS	41
7.1. Determinación de núcleos apoptóticos	41
7.2. Clivaje de la proteína PARP	41
7.3. Determinación de exposición de residuos de fosfatidilserina	42
8. ELECTROTRANSFERENCIA E IMMUNOBLOTTING	42
8.1. Lisis celular	42
8.1.1. Lisis celular de UT-7 y TF-1	42
8.1.2. Lisis celular de SH-SY5Y	43
8.2. SDS-PAGE	43
9. EVALUACIÓN DE LOS NIVELES DE ARN MENSAJERO	45
9.1. Extracción de ARN total	45
9.2. Obtención de ADN copia	46
9.3. Amplificación de los fragmentos de ADNc por RT-PCR	46
9.4. Análisis de los productos de amplificación	47
10. EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS FOSFORILADAS POR CITOMETRÍA DE FLUJO	47
11. CICLO CELULAR POR CITOMETRÍA DE FLUJO	48

12. EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA PTP1B POR MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA	48
13. EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA PTP1B Y Rβc POR MICROSCOPIA CONFOCAL	48
14. DETECCIÓN DE LA ACTIVIDAD DE PTP1B	49
14.1. Inmunoprecipitación	49
14.2. Medición de la actividad enzimática	49
15. CUANTIFICACIÓN DEL CONTENIDO INTRACELULAR DE CALCIO POR CITOMETRÍA DE FLUJO	49
16. DESCARTE DEL MATERIAL BIOLÓGICO Y RESIDUOS PELIGROSOS	50
17. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO	50
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	51-130
CAPÍTULO I	51-78
CARACTERIZACIÓN Y FUNCIÓN DE LA ERITROPOYETINA CARBAMILADA	
I.1. EVALUACIÓN DEL PROCESO DE CARBAMILACIÓN	51
I.2. EFECTO DE LA ERITROPOYETINA CARBAMILADA SOBRE EL LINAJE ERITROIDE	52
I.2.1. EFECTO DE ERITROPOYETINA CARBAMILADA SOBRE EL DESARROLLO DE PROGENITORES ERITROIDES	52
I.2.2. EFECTO DE LA ERITROPOYETINA CARBAMILADA SOBRE LA LÍNEA CELULAR UT-7	54
I.2.2.A. Efecto de la eritropoyetina carbamilada sobre la morfología de las células UT-7	54
I.2.2.B. Efecto de la eritropoyetina carbamilada sobre la viabilidad y proliferación de las células UT-7	57
I.2.2.C. Efecto de la eritropoyetina carbamilada sobre células UT-7 en ensayos de apoptosis	58
I.2.3. EFECTO DE ERITROPOYETINA CARBAMILADA SOBRE LA LÍNEA CELULAR TF-1	62
I.2.3.A. Efecto de la eritropoyetina carbamilada sobre la viabilidad y proliferación de las células TF-1	62
I.2.3.B. Efecto de la eritropoyetina carbamilada sobre células TF-1 en ensayos de apoptosis	63

I.2.4. EFECTO DE ERITROPOYETINA CARBAMILADA SOBRE LA LÍNEA CELULAR K562	66
I.2.4.A. Efecto de la eritropoyetina carbamilada sobre la viabilidad y proliferación de las células K562	66
I.2.4.B. Efecto de la eritropoyetina carbamilada sobre células K562 en ensayos de apoptosis	67
I.3. EFECTO DE LA ERITROPOYETINA CARBAMILADA SOBRE CÉLULAS DE ORIGEN NEURONAL	69
I.3.1. Acción de la eritropoyetina carbamilada en células expuestas al agente proapoptótico staurosporina	69
I.3.2. Acción de la eritropoyetina carbamilada en células expuestas a la citoquina proinflamatoria TNF- α	72
CONCLUSIONES CAPÍTULO I	75
DISCUSIÓN CAPÍTULO I	76-78
CAPÍTULO II	79-100
RECEPTORES INVOLUCRADOS EN LA ACCIÓN DE ERITROPOYETINA Y ERITROPOYETINA CARBAMILADA EN LÍNEAS CELULARES ERITROIDES Y NEURONALES	
II.1. EXPRESIÓN DEL REpo Y DEL Rβ <i>common</i> EN CÉLULAS ERITROIDES Y NEURONALES	79
II.2. MODULACIÓN DEL REpo-REpo y DEL REpo-Rβ <i>common</i> EN CÉLULAS ERITROIDES Y NEURONALES	81
II.2.1. Modulación del REpo-REpo y REpo-R β <i>common</i> en células UT-7	81
II.2.2. Modulación del REpo-REpo y REpo-R β <i>common</i> en células TF-1	82
II.2.3. Modulación del REpo-REpo y REpo-R β c en células SH-SY5Y	84
II.3. INTERFERENCIA DE cEpo CON LOS FACTORES DE CRECIMIENTO Epo Y GM-CSF EN CÉLULAS ERITROIDES Y NEURONALES	85
II.3.1. Interferencia de cEpo en el desarrollo de unidades formadoras de colonias (CFU-E) en progenitores eritroides	85
II.3.2. Interferencia de cEpo en la acción de Epo en células UT-7	87
II.3.3. Interferencia de cEpo en la acción de Epo y de GM-CSF en células TF-1	88
II.3.4. Interferencia de GM-CSF con respecto a la función de Epo y cEpo en células SH-SY5Y	91
II.4. INHIBICIÓN DE LOS EFECTOS PROTECTORES DE Epo Y cEpo UTILIZANDO ANTICUERPOS DE LOS RECEPTORES INVOLUCRADOS	94
CONCLUSIONES CAPÍTULO II	95

DISCUSIÓN CAPÍTULO II	96-100
CAPÍTULO III	101-117
VÍAS DE SEÑALIZACIÓN ACTIVADAS POR ERITROPOYETINA Y ERITROPOYETINA CARBAMILADA EN LINEAS CELULARES ERITROIDES Y NEURONALES	
III.1. FOSFORILACIÓN DE JAK 2 EN CÉLULAS SH-SY5Y, TF-1 Y UT-7	101
III.2. VÍA DE SEÑALIZACIÓN PI3K/Akt/FOXO3a/p27^{Kip1}, RELACIONADA CON LA SUPERVIVENCIA Y PROLIFERACIÓN CELULAR	103
III.2.1. FOSFORILACIÓN DE Akt	103
III.2.2. FOSFORILACIÓN DE FOXO3a	104
III.2.2.1. Fosforilación de FOXO3a en células UT-7	104
III.2.2.2. Fosforilación de FOXO3a en células TF-1	106
III.2.3. EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA REGULATORIA DEL CICLO CELULAR p27 ^{Kip1}	107
III.2.4. DETERMINACIÓN DEL CICLO CELULAR	108
III.3. VÍA Ras/ERK1/ERK2 DE PROLIFERACIÓN Y DIFERENCIACIÓN CELULAR. FOSFORILACIÓN DE LA PROTEÍNA ERK1/2	110
III.4. EXPRESIÓN DE FACTORES ANTIAPOPTÓTICOS	111
III.5. ACTIVACIÓN DE JAK2 Y PI3K POR Epo Y POR cEpo EN CÉLULAS SH-SY5Y	112
CONCLUSIONES CAPÍTULO III	114
DISCUSIÓN CAPÍTULO III	115-117
CAPÍTULO IV	118-130
ACCIÓN DE LA FOSFATASA PTP1B EN EL EFECTO DE LA ERITROPOYETINA Y LA ERITROPOYETINA CARBAMILADA EN CÉLULAS ERITROIDES	
IV.1. EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA PTP1B FRENTE A LA ACCIÓN DE ERITROPOYETINA Y ERITROPOYETINA CARBAMILADA	118
IV.1.1. Análisis por <i>Western blotting</i>	119
IV.1.2. Análisis por microscopía de fluorescencia	119
IV.1.3. Análisis mediante citometría de flujo	121
IV.2. ACTIVIDAD DE LA FOSFATASA PTP1B FRENTE A LA ESTIMULACIÓN CELULAR CON ERITROPOYETINA Y ERITROPOYETINA CARBAMILADA	122

IV.3. PROLIFERACIÓN DE CÉLULAS UT-7 EN ENSAYOS DE INHIBICIÓN DE PTP1B	123
IV.4. MODULACIÓN DEL CALCIO INTRACELULAR MEDIADO POR ERITROPOYETINA Y ERITROPOYETINA CARBAMILADA	125
IV.5. RELACIÓN DE LA PROTEÍNA PTP1B CON EL RECEPTOR β COMMON	126
CONCLUSIONES CAPÍTULO IV	128
DISCUSIÓN CAPÍTULO IV	129-130
CONSIDERACIONES FINALES	131-133
REFERENCIAS	134-143

ERITROPOYETINA Y ERITROPOYESIS

La hematopoyesis es el proceso mediante el cual se producen las células sanguíneas en la médula ósea a partir de una única *stem cell* pluripotente. Esta célula, con alta capacidad de autorrenovación durante toda la vida del individuo puede dar origen a todas las líneas celulares, tales como eritrocitos, granulocitos (neutrófilos, eosinófilos y basófilos), monocitos, plaquetas y células del linaje linfoide.

El sistema hematopoyético de los vertebrados requiere la presencia de progenitores que aseguren una producción continua de nuevas células, necesarias para reemplazar las células maduras cuya vida media es limitada.

Las *stem cells* son capaces de diferenciarse como respuesta al estímulo inducido por distintas citoquinas, originando células progenitoras, las cuales al dividirse y al diferenciarse pierden su multipotencialidad en forma gradual. Este proceso de diferenciación es irreversible y da lugar a la formación, principalmente, de células unipotenciales y bipotenciales y muy escasamente hacia células multipotenciales.

La eritropoyesis es un complejo proceso multifásico que involucra la diferenciación de células "*stem*" hematopoyéticas a eritrocitos o glóbulos rojos maduros.

La hormona glicoproteica eritropoyetina (Epo) pertenece filogenéticamente a la familia de las citoquinas, entre las que se encuentran también somatotropina, prolactina, interleuquinas 2-7 y los llamados "Factores Estimulantes de Colonias" G-CSF (*granulocyte colony-stimulating factor*), M-CSF (*macrophage colony-stimulating factor*) y GM-CSF (*granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*).

En el cuerpo humano, el 85-90% de la Epo se forma en el riñón, en el endotelio de los capilares situados alrededor de los canales nefríticos, y en un 10-15% en los hepatocitos del hígado (Lacombe *et al*, 1988; Fisher, 2003). Su función reconocida, aunque no la única, es la regulación de la producción de eritrocitos, constituyendo un factor crítico para mantener la supervivencia celular (Koury *et al*, 1988). Esta función tan importante es la que ha dado lugar a un gran desarrollo en la investigación de la fisiología de la eritropoyetina.

Su síntesis es estimulada por los niveles de oxígeno tisular. La hipoxia lleva a la translocación de la subunidad alfa del "Factor Inducido por Hipoxia" (*hypoxia induced factor*, HIF) desde el citoplasma al núcleo de las células productoras de Epo (Lacombe y Mayeux, 1998). Allí, el HIF se enlaza a la subunidad β (HIF- β) acompañante, de donde se origina el heterodímero HIF-1. Este se enlaza otra vez

con el factor de transcripción CREB y con p300 formando un complejo proteico de tres elementos que inician la transcripción del gen de la Epo (Iyer *et al*, 1998).

Una vez sintetizada, la Epo circulante llega hasta la médula ósea donde estimula a las células progenitoras eritroides para lograr su proliferación y maduración hacia la formación de eritrocitos.

La hormona tiene tres efectos sobre sus células *target*. Promueve proliferación y diferenciación de progenitores eritroides mientras previene de muerte celular programada (Koury y Bondurant, 1990). Su acción biológica más importante ocurre a nivel de las células progenitoras eritroides tempranas BFU-E (*burst-forming units-erythroid*) y tardías CFU-E (*colony-forming units-erythroid*) debido a que, en formas eritroides más maduras, va disminuyendo el número de receptores hasta no ser detectable su expresión en eritrocitos.

Origen de la Eritropoyetina y Eritropoyetina recombinante humana

En el año 1906, Carnot y Deflandre, realizaron un ensayo en el cual, luego de haber inducido un sangrado en conejos, se recolectaba plasma de los mismos y se lo inyectaba a conejos no tratados. La observación de un incremento notorio en el número de reticulocitos sugirió la existencia de un elemento humoral al que denominaron “*hemopoietine*”. Dicha hipótesis fue confirmada por estudios posteriores (Reissmann, 1950; Erslev *et al*, 1953). Posteriormente, se denominó “eritropoyetina” a la sustancia que regulaba la síntesis de los glóbulos rojos maduros.

La obtención, purificación y caracterización de la Epo permitió su estudio a nivel fisiológico y terapéutico. Desde ese momento, numerosos trabajos han permitido demostrar la estructura y función, avanzando, así, en el estudio de los mecanismos de acción de esta proteína.

En 1977, Miyake y colaboradores lograron purificar la Epo humana, lo que permitió su secuenciación y subsecuente identificación del gen de Epo.

Investigadores de la Universidad de Columbia desarrollaron el protocolo de síntesis de Epo. Dicha técnica fue patentada y su licencia fue obtenida por la empresa *Amgen* (EUNA). En la década del 80, comenzaron las pruebas clínicas de la Epo (*Epogen*, *Amgen*) presentando resultados positivos para su uso farmacológico (Eschbach *et al*, 1987).

En 1985, Lin y colaboradores aislaron, a partir de una biblioteca genómica, el gen de la eritropoyetina humana. Esto permitió, la expresión del gen de la Epo humana en células, principalmente en células CHO (Davis *et al*, 1987).

En 1987, Eschbach reportó pruebas con rhuEpo en pacientes renales en los cuales la anemia fue corregida (Eschbach *et al*, 1987).

En 1989, la FDA (*Food and Drug Administration*) de los Estados Unidos de Norteamérica aprobó la forma sintética *Epogen*, para el manejo de la anemia en pacientes con insuficiencia renal crónica sometidos o no a diálisis.

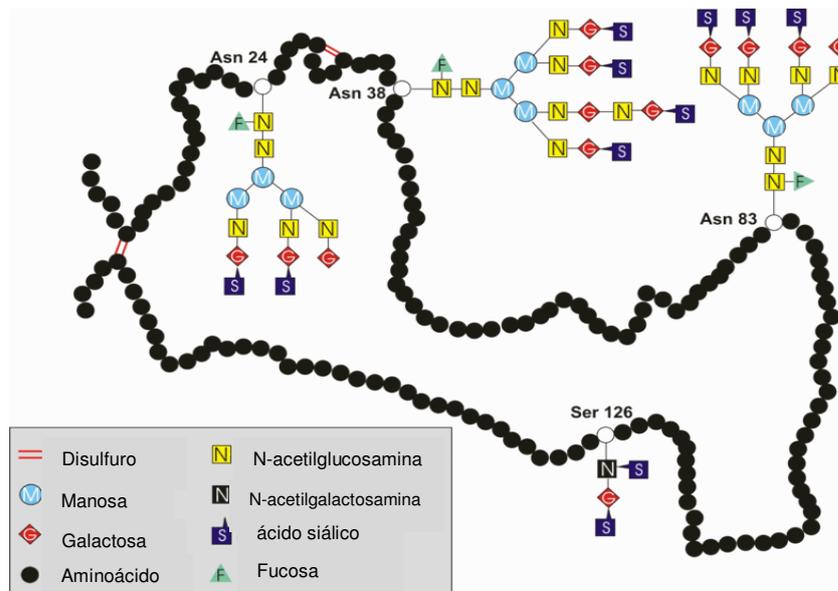
Después de la identificación, aislamiento y clonación (Marsden, 2006) del gen de la Epo humana, varios estudios impulsaron la obtención de esta hormona de forma recombinante mediante ingeniería genética. Este procedimiento ha permitido la provisión de cantidades de Epo adecuadas para el uso clínico terapéutico y para completar estudios químicos y biofarmacéuticos. La rhuEpo ha sido empleada en el tratamiento de la anemia causada por diferentes afecciones como cáncer, SIDA, insuficiencia renal y cirugía y, desde hace una década, se investiga su efecto en la protección de células cerebrales (Marti, 2004).

Estructura de la eritropoyetina

El gen de la Epo se encuentra en el brazo largo del cromosoma 7 en la región q11-q22 y codifica una proteína de 193 aminoácidos. Cuatro cadenas de carbohidratos, tres unidas a N-asparaginas (residuos 24, 38 y 83) y una, unida a O-serina (residuo 126), que constituyen, aproximadamente, 40% de la masa molecular (Wen *et al*, 1994), consisten en un residuo O-glicosídico (Ser 126) y tres N-glicosídicos (Asn 24, Asn 38 y Asn 83). Las cadenas laterales están formadas por los monosacáridos manosa, galactosa, fucosa, N-acetilglucosamina, N-acetilgalactosamina y ácido siálico. A su vez, el grado de glicosilación puede variar de acuerdo a la fuente y al método de obtención de la proteína recombinante. Las cadenas de carbohidratos protegen a la proteína de la degradación por radicales libres. Una modificación post-traduccional genera un corte de los 27 aminoácidos terminales y la acción de una carboxipeptidasa provoca la pérdida de la arginina C-terminal (residuo 166). A partir de estas dos modificaciones se obtiene una proteína de 165 aminoácidos que contiene dos puentes disulfuro, los cuales unen residuos de cisteína en posiciones 7-161 y 29-33 (Wang *et al*, 1985). La hormona activa de 165 aminoácidos tiene una masa molecular de, aproximadamente, 34 kDa si esta glicosilada y 18,4 kDa si se excluyen los carbohidratos (Figura A).

Contrariamente a los aminoácidos constantes de la molécula de Epo, las estructuras de azúcares son variables. En este sentido, se habla de microheterogeneidad de la molécula, la cual se presenta no sólo en la molécula natural sino también en la proteína recombinante humana. Esta heterogeneidad

está dada, por una parte, por secuencias variables de monosacáridos de las cadenas laterales, y por otra parte, por una cantidad variable de N-acetilneuramínico. Este último, también conocido como ácido siálico, es decisivo para la actividad biológica de la glicoproteína, ya que, cuanto mayor es el contenido de ácido siálico, más prolongada es la vida media de la hormona en sangre.



(www.eritropoyetina.com)

Figura A: Estructura de la eritropoyetina.

Eritropoyetina: Acción en tejidos no hematopoyéticos

El hallazgo tanto de la síntesis de Epo como de la expresión de su receptor (REpo) en diversos tejidos sugirió que su rol se extendería más allá de la supervivencia de las células inmaduras eritroides para permitirles cumplir con su programa de diferenciación y proliferación.

La alta eficacia de la Epo observada en modelos de isquemia neuronal, renal y cardíaca (Jelkmann, 2004; Grasso *et al*, 2004; Rossert y Eckardt, 2005) parece estar asociada a la activación de múltiples caminos de protección que incluyen inhibición de apoptosis.

La existencia de la expresión de Epo y de su receptor en el tejido cerebral sugiere su participación en un sistema neuroprotector endógeno en el cerebro de mamíferos (Marti *et al*, 2004). La efectividad de la Epo como neuroprotector ha sido probada en modelos de daño del sistema nervioso en ratón, rata y conejo,

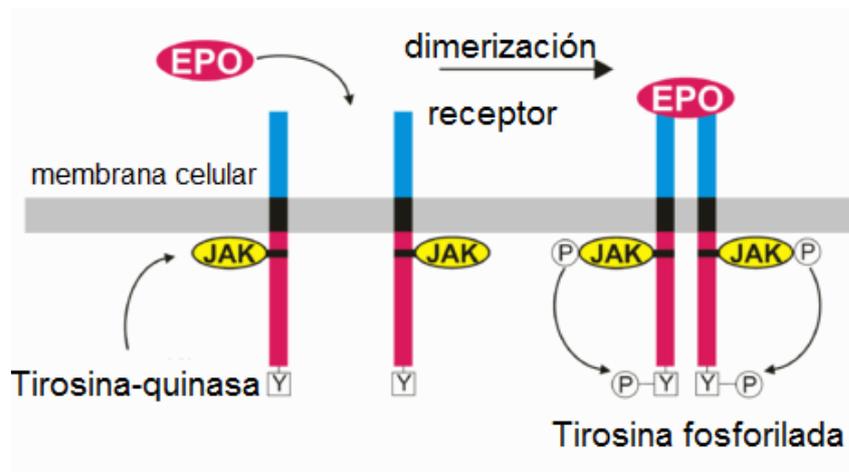
incluyendo isquemia cerebral focal y global, donde se ha visto que reduce la muerte neuronal (Brines *et al*, 2000; Siren *et al*, 2001; Catania *et al*, 2002; Erbayraktar *et al*, 2003). Aunque todavía se investiga el mecanismo neuroprotector de la Epo, se ha planteado que potencia mecanismos antiapoptóticos y antioxidantes, base de su acción neurotrófica, antiinflamatoria, angiogénica y moduladora de la actividad neuronal (Ehrenreich *et al*, 2002). Se ha reportado que la Epo constituye un importante factor de inducción de neurogénesis durante las etapas tempranas del desarrollo embrionario (Genc *et al*, 2004).

El hallazgo de que ambos, la producción de Epo y la expresión de su receptor específico REpo en distintas zonas del cerebro embrionario y fetal, sustenta la hipótesis que le confiere a la Epo una función primordial en ese estadio del desarrollo del sistema nervioso central (Genc *et al*, 2004; Sola *et al*, 2005).

ERITROPOYETINA Y SU RECEPTOR

La activación celular por Epo se inicia por unión de la hormona a su receptor específico REpo, el cual pertenece a la familia de los receptores de citoquinas, cuyas características estructurales comunes consisten en dos o más dominios similares a los de la inmunoglobulina, cuatro residuos de cisteína y la secuencia extra-celular WSXWS (Triptofano-Serina-Aminoácido variable-Triptofano-Serina).

La unión de Epo a su receptor induce un homodímero del receptor, iniciando un proceso que desencadena una cascada de señalización intracelular, la cual conduce a la transcripción de genes *target* (Mulcahy, 2001). Asimismo, la interacción Epo/REpo con tirosina fosfatasa (SHP1, SHP2, PTP1B) establece el balance de la activación celular apagando las señales por defosforilación (Jelkmann *et al*, 2007; Wojchowski *et al*, 2010). Por otra parte, luego de la activación por Epo, el receptor es rápidamente ubiquitinado en la superficie celular. El dominio intracelular del REpo es degradado por proteasomas, removiendo todos los residuos fosforilados de tirosina, lo que previene transducción de señales posteriores. El resto del complejo Epo/REpo es internalizado y degradado en los lisosomas (Meyer *et al*, 2007).



(Adaptación de www.eritropoyetina.com)

Figura B: Homodimerización del receptor de eritropoyetina.

MECANISMO DE ACTIVACIÓN CELULAR POR ERITROPOYETINA

Como fue mencionado anteriormente, al interaccionar con Epo el receptor conforma un homodímero con dos subunidades idénticas, el cual activa una quinasa acoplada al REpo, vía transfosforilación. Además, distintos residuos de tirosina enlazados al REpo se fosforilan y sirven como estación de acoplamiento para varias proteínas, las que a su vez, activan diferentes cascadas de señalización (Figura B).

El mecanismo de señalización de Epo/REpo depende, principalmente, de la activación de dos familias de proteínas intracelulares, las Janus quinasa (Jaks) y las STATs (*signal transducers and activators of transcription*). A esta vía de señalización se la conoce, habitualmente, como la vía Jak-STAT.

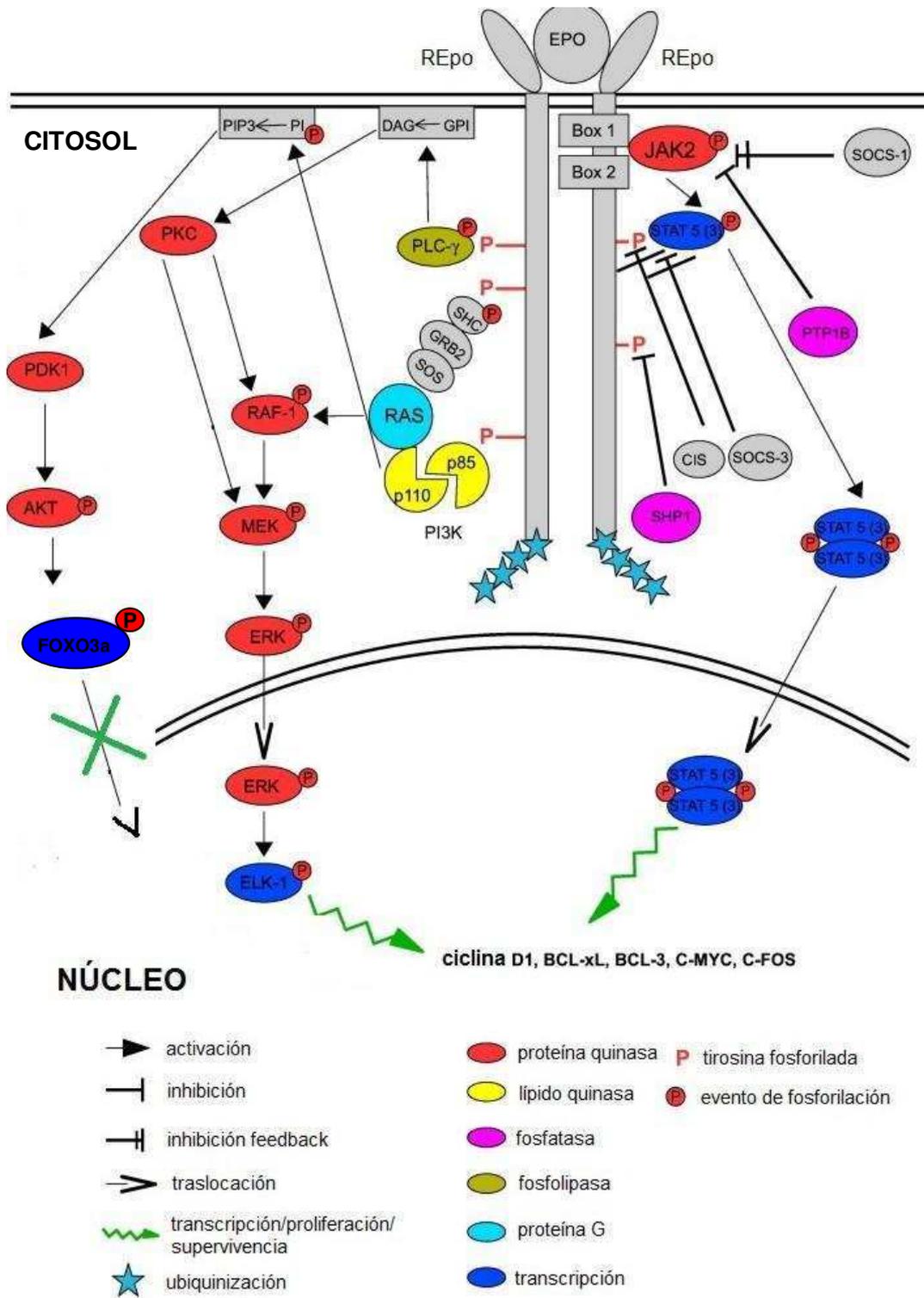
La Jak2 activa, asociada constitutivamente al REpo, fosforila los ocho residuos de tirosina que se encuentran en el dominio distal citoplasmático del REpo. A su vez, estos residuos de fosfotirosina proveen sitios de anclaje para proteínas de señalización intracelular que contienen dominios con homología Src (SH2), tales como SHP1, SHP2, fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K), proteína mitógeno activadas (MAP) y el transductor de señales y activador de la transcripción STAT5. Esta activación celular da lugar a la modulación de la expresión de diversos genes.

La Epo regula la producción de glóbulos rojos principalmente por prevención de la apoptosis de los progenitores eritroides y dicho proceso es mediado por la activación de PI3K (Zhande y Karsan, 2007), la cual emerge como un importante

constituyente de caminos de señalización críticos. Tras su activación por factores de crecimiento peptídicos o por hormonas (en este caso, por Epo), la vía de señalización de PI3K media gran cantidad de respuestas celulares, incluyendo las que se desarrollan en neuronas. La activación de PI3K conduce a la producción, en pocos segundos, de fosfatidilinositol (3,4,5)-trifosfato (PIP3), molécula a la que pueden unirse quinasas que poseen dominio PH (*pleckstrin homology*). Estos dominios se encuentran en varias proteínas, tales como PDK1 (3'-*phosphoinositide-dependent kinase 1*) y Akt/PKB (*protein kinase B*), ambas con un rol central en los efectos de transformación derivados de la actividad de PI3K. Varios efectos biológicos de PI3K son mediados por la fosforilación de Akt; en particular, esta vía se ha visto comprometida en acciones antiapoptóticas.

A nivel del sistema nervioso, se ha demostrado que Epo activa las vías PI3K/Akt y RAS/ERK1/2, ambas involucradas en los efectos tróficos, de supervivencia, de proliferación y antiapoptóticos de Epo. En este tejido, la hormona modula también los niveles de calcio intracelular y activa los factores de transcripción STAT y NF- κ B. Mientras que este último factor de transcripción media la acción antiapoptótica de la Epo en neuronas así como también la acción trófica de *neural stem cells*, la acción de STAT todavía se encuentra en estudio. En este contexto, se ha sugerido que STAT5 es necesario para activar mecanismos tróficos de Epo (Byts *et al*, 2008).

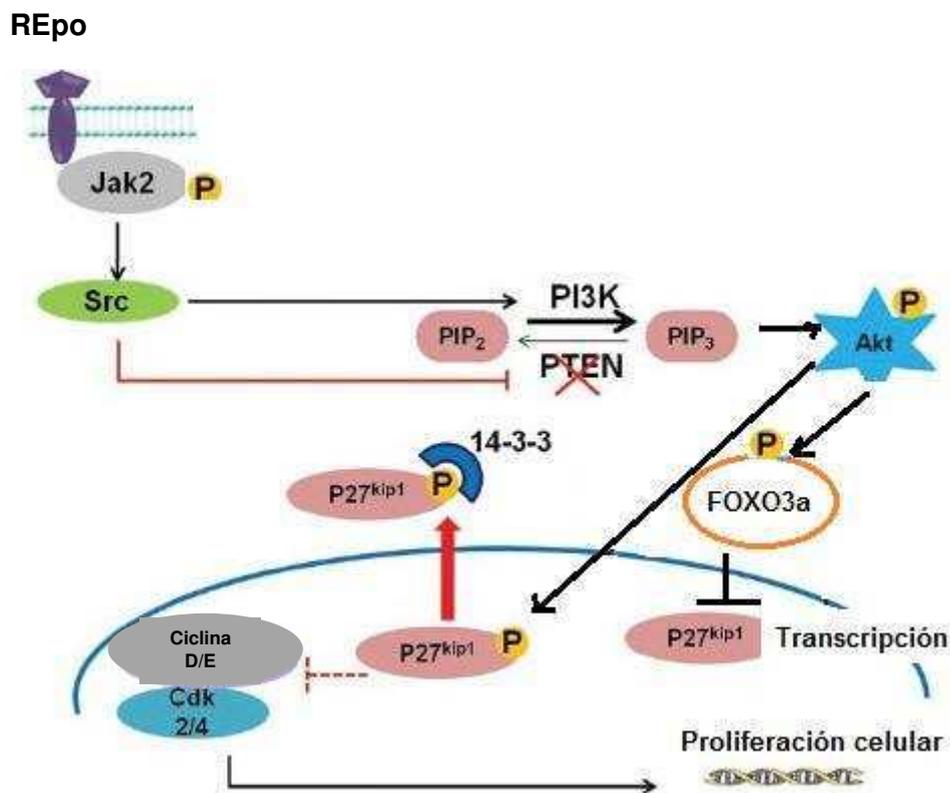
La vía de señalización PI3K/Akt es esencial para el crecimiento celular y la supervivencia. La interrupción de la esta vía o su regulación ha sido relacionada con una variedad de enfermedades tumorales y coronarias. Las proteínas FOXO en mamíferos (FOXO1, FOXO3, FOXO4), un subgrupo de factores de transcripción Forkhead, es uno de los principales blancos caracterizados de la vía de señalización de PI3K/Akt (Szenajch *et al*, 2010) (Figura C).



(Adaptación de Szenajch *et al*, 2010)

Figura C: Vías de señalización activadas por eritropoyetina.

Uno de los sustratos de Akt es FOXO3a. Akt regula negativamente la fosforilación de FOXO3a, factor de transcripción que regula la expresión del factor inhibitorio de la proliferación $p27^{kip1}$, el cual es a su vez regulado también negativamente por Akt. La fosforilación de FOXO3a genera su acumulación citoplasmática al ser retenido a través de su unión a proteínas 14-3-3, y en consecuencia es incapaz de estimular la expresión de $p27^{kip1}$. También es translocada y retenida en citoplasma por las proteínas 14-3-3, la proteína $p27^{kip1}$ que se encontraba fosforilada en el núcleo, permitiendo la progresión del ciclo celular y, en consecuencia, la proliferación celular (Nakao *et al*, 2008) (Figura D).



(Adaptación de www.carcinogenesis.com)

Figura D: Vía de proliferación celular de la eritropoyetina.

Rol de $p27^{kip1}$ en el control del ciclo celular

La regulación del ciclo celular, proceso por el cual una célula se duplica y da lugar a dos células hijas, es un aspecto esencial durante todas las fases de

desarrollo de los animales, desde el estadio de cigoto hasta el desarrollo postnatal. El ciclo celular se ha dividido arbitrariamente en 5 fases:

- **G1**: fase inicial del ciclo durante la cual la célula se prepara para duplicarse.
- **S**: fase de replicación (síntesis) del ADN.
- **G2**: fase en la que se comprueba que la duplicación del material genético ha sido correcta antes de pasar a la fase siguiente. Si hay errores importantes que no pueden corregirse, la célula inicia el proceso de muerte celular por apoptosis.
- **M**: fase de mitosis que da lugar a las dos células hijas.
- **G0**: fase adicional del ciclo celular en la que la célula se encuentra en un estado de reposo. Si no ha iniciado la replicación del ADN, la célula puede “detenerse” en G1 y permanecer en estado de reposo durante días, semanas o incluso años si no recibe estímulos mitogénicos.

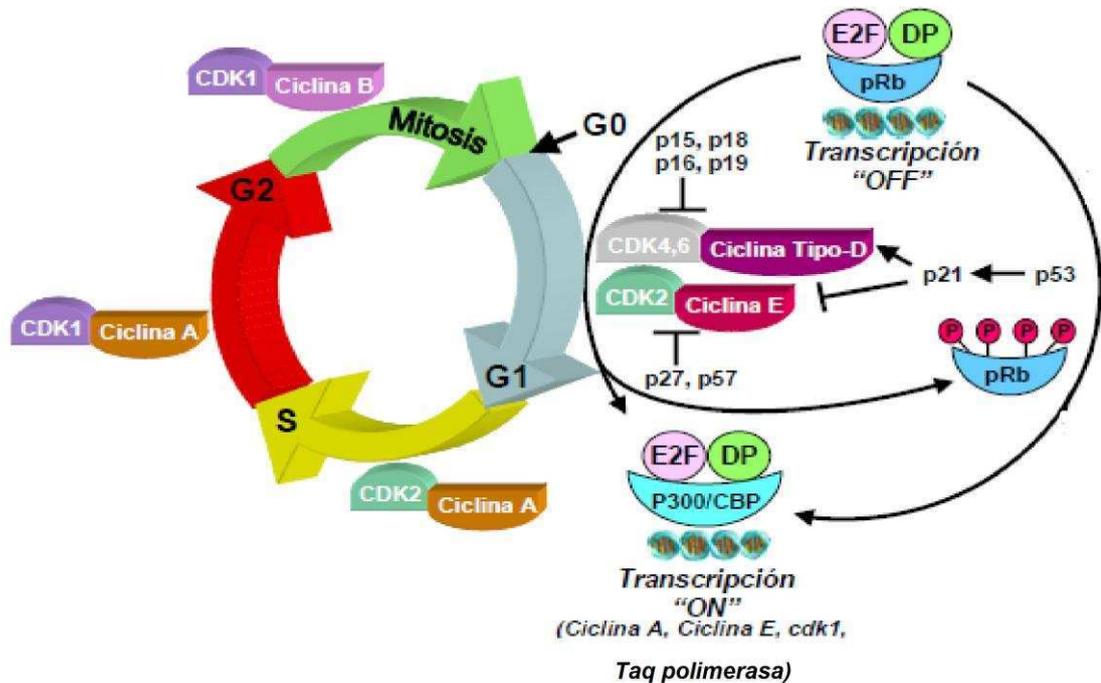
Los niveles de p27^{kip1} se encuentran normalmente elevados durante la fase G0/G1 y disminuyen rápidamente por acción de mitógenos, permitiendo que las células entren en la fase S. Entre los factores mitogénicos se destacan ciertas hormonas y factores de crecimiento. Por el contrario, existen señales fisiopatológicas que provocan la quiescencia celular aumentando los niveles de p27^{kip1}.

La abundancia de p27^{kip1} está controlada por múltiples mecanismos: a) inactivación por interacción con otras proteínas (Sherr y Roberts, 1999), b) mecanismos transcripcionales (Servant *et al*, 2000), c) mecanismos traduccionales (Hengst y Reed, 1996; Millard *et al*, 1997; Miskimins *et al*, 2001) y d) proteólisis. Se ha demostrado que inhibidores de la quinasa activada por mitógeno (MEK) y de PI3K, inducen la expresión de p27^{kip1} en la fase G1. Por otra parte, inhibidores de la actividad de la proteína quinasa B (Akt) inducen la acumulación de p27^{kip1} en la fase S. Estas observaciones proporcionan una conexión molecular entre vías de transducción de señales y el control de ciclo celular mediado por p27^{kip1}.

El control del ciclo celular está regulado por la acción de al menos tres familias de proteínas altamente especializadas: las ciclinas, las proteínas quinasas dependientes de ciclinas (CDKs, de *cyclin-dependent protein kinases*), y las CKIs, proteínas que actúan como inhibidores de CDKs. Las ciclinas, llamadas así porque sufren un ciclo de síntesis y degradación en el transcurso de cada división celular (Evans *et al*, 1983; Pines, 1995), se unen a las CDKs y controlan su capacidad para fosforilar las proteínas dianas. Las CKIs son proteínas que se unen a las CDKs regulando negativamente su actividad.

Las CKIs se clasifican en dos familias: a) La familia INK (p15Ink4b, p16Ink4a, p18Ink4c y p19Ink4d), caracterizada por inhibir específicamente las quinasas

CDK4 y CDK6; y b) La familia CIP/KIP (p21^{Cip1}, p27^{Kip1} y p57^{Kip2}), caracterizada por tener un amplio espectro de inhibición, aunque son más activas contra la quinasa CKD2 que contra las quinasas CDK4 y CDK1(Figura E).



(Adaptada de Sanz González, 2006)

Figura E: Proteínas implicadas en el control del ciclo celular en mamíferos, Progresión del ciclo celular.

ERITROPOYETINA Y APOPTOSIS

Actualmente, se considera que la Epo no sólo es responsable del compromiso del linaje eritroide. Existe cada vez más evidencia que apoya la hipótesis de que la Epo actúa, fundamentalmente, en el mantenimiento de la viabilidad celular mediada por la activación del REpo a partir de lo cual se desencadena la transducción de señales antiapoptóticas.

En distintos modelos en los que se investigó la acción de Epo frente a formas variadas de daño celular capaz de inducir muerte programada de células de distintos tejidos se ha observado la activación de factores antiapoptóticos. El efecto neuroprotector atribuido a la Epo implicaría la activación de distintas vías,

a través de las cuales, dependiendo del origen del daño, se produciría la reversión de la muerte celular mediada por inhibidores de la apoptosis.

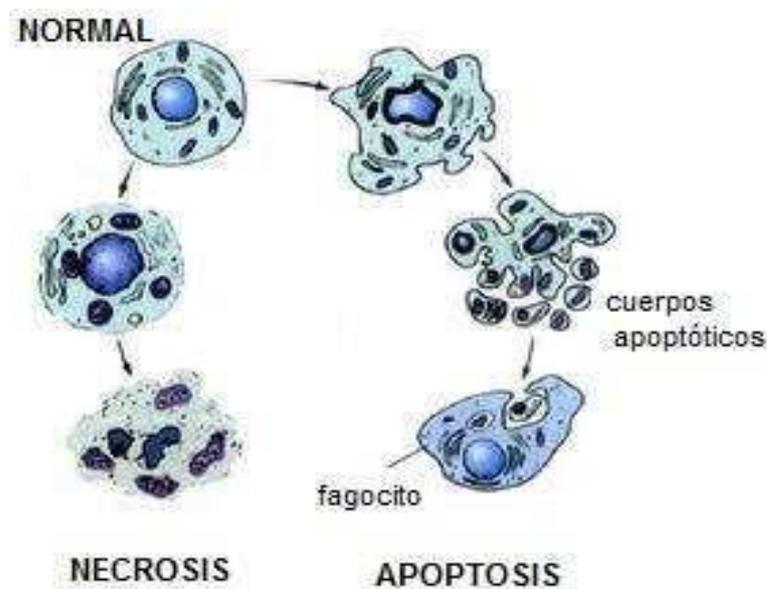
La notable actividad de la Epo en la protección tisular ha sido demostrada en modelos de isquemia neuronal, renal y cardíaca (Sirén *et al*, 2001; Jelkmann, 2004; van der Kooij *et al*, 2008). La alta eficacia de la Epo, observada en estos modelos, depende de la activación de múltiples caminos de protección que incluyen inhibición de muerte por apoptosis, restauración de la autoregulación vascular e incremento de funciones reconstituyentes (Grasso *et al*, 2004). En ensayos *in vitro* de nuestro laboratorio demostramos mecanismos de efectos neuroprotectores de Epo sobre células de origen neuronal, ante la exposición a staurosporina, a TNF- α o a medios condicionados de microglía activada (Pregi *et al*, 2006; Pregi *et al*, 2009; Wenker *et al*, 2013). Además, células eritroides, sensibles a la acción proapoptótica de TNF- α , fueron protegidas por pretratamiento con Epo. Un hallazgo novedoso fue la participación de Epo en la prevención de la regulación negativa de c-FLIP (FLICE-inhibitory protein), impidiendo, de esa forma, la acción perjudicial de la citoquina proinflamatoria (Vittori *et al*, 2010). Por otra parte, también se detectó un efecto de protección directa de Epo sobre eritrocitos maduros sometidos a estrés oxidativo. El efecto antioxidante de Epo podría explicarse por una acción como *scavenger* de radicales libres, protegiendo así las membranas de los glóbulos rojos de la peroxidación lipídica (Vota *et al*, 2013).

Proceso apoptótico

La muerte celular programada o apoptosis es un mecanismo genéticamente programado y energéticamente dependiente. A nivel fisiológico, este proceso es fundamental durante el desarrollo y mantenimiento tisular (Budd *et al*, 2000; Paschos *et al*, 2008). La célula posee todos los componentes necesarios para la regulación de la muerte celular programada y tanto la prevención como la inducción de la apoptosis son el resultado de un balance entre señales anti y proapoptóticas intrínsecas de la célula, las cuales se encuentran controladas por factores externos (Kumar y Cakouros, 2004). La naturaleza de dichos factores es variada. Por un lado se encuentran aquellos elementos que favorecen la supervivencia celular, como los factores de crecimiento y algunas hormonas, mientras que por otro lado citoquinas proinflamatorias, estrés oxidativo, efectores citotóxicos y daños irreversibles en el material genético constituyen factores proapoptóticos (Benn y Woolf, 2004). La inducción inadecuada de este tipo de

muerte celular a raíz de un desbalance bioquímico durante condiciones patológicas, tales como síndrome autoinmune, daño isquémico o enfermedades neurodegenerativas, resulta en una disfunción tisular (Elmore *et al*, 2007; Paschos *et al*, 2008).

Las células apoptóticas pueden ser reconocidas por cambios morfológicos típicos: contracción celular y aumento de la densidad intracelular por salida de líquido e iones intracelulares, así como cambios en la composición de la membrana plasmática que llevan a la formación de “cuerpos apoptóticos”. Además, las células sufren alteración del citosol, agregación de mitocondrias y ribosomas, condensación y fragmentación de la cromatina (Dean, 2008). Los cuerpos apoptóticos son captados por los macrófagos y, de esta forma, son removidos del tejido sin inducir una respuesta inflamatoria (Figura F).



(www.10.uniovi.es)

Figura F: Cambios morfológicos en el proceso de apoptosis.

Vías del proceso apoptótico: intrínseca y extrínseca

El proceso de activación de muerte celular programada se puede desarrollar por dos vías, extrínseca e intrínseca.

La vía extrínseca es mediada por la activación de receptores de muerte, los cuales se caracterizan por presentar un dominio de muerte (DD, *death domain*). La activación de este tipo de receptores inicia el reclutamiento y activación de

caspasas iniciadoras de la eventual muerte celular (Donovan *et al*, 2004; Benn *et al*, 2004; Dean, 2008).

La vía mitocondrial o intrínseca es mediada por daños a nivel de la mitocondria. Las causas que pueden provocar dicho evento son de naturaleza variada, destacándose el estrés oxidativo, radiaciones ionizantes y alteración de la homeostasis del calcio, entre otras (Benn *et al*, 2004; Donovan *et al*, 2004). La vía intrínseca de activación se caracteriza por una disminución en el potencial de la membrana mitocondrial, acompañada por la liberación de proteínas (citocromo c, SMAC/DIABLO, *apoptosis-inducing factor*-AIF) desde dicha organela hacia el citosol, las cuales generan la activación de una cascada proteolítica, mediada, generalmente, por caspasas (Benn *et al*, 2004; Dean, 2008).

Una vez activado el proceso apoptótico, la interacción entre los diferentes integrantes de cada vía, extrínseca e intrínseca, logra incrementar el efecto letal (Johnson *et al*, 2000).

La decisión de morir por parte de la célula, depende de la localización subcelular de los miembros de la familia Bcl2 (*B-cell leukaemia/lymphoma-2*) (Benn *et al*, 2004).

Entre los factores antiapoptóticos se encuentran Bcl2, BclX, BclX_L, BclX_S, Bcl_w y BAG, mientras que entre los agentes proapoptóticos se destacan Bcl10, Bax, Bak, Bid, Bad, Bim, Bik y Blk (Elmore *et al*, 2007). Estas proteínas cumplen un rol importante, dado que pueden determinar la supervivencia o la muerte de la célula.

TERMINACIÓN DE LA SEÑALIZACIÓN DE LA ERITROPOYETINA

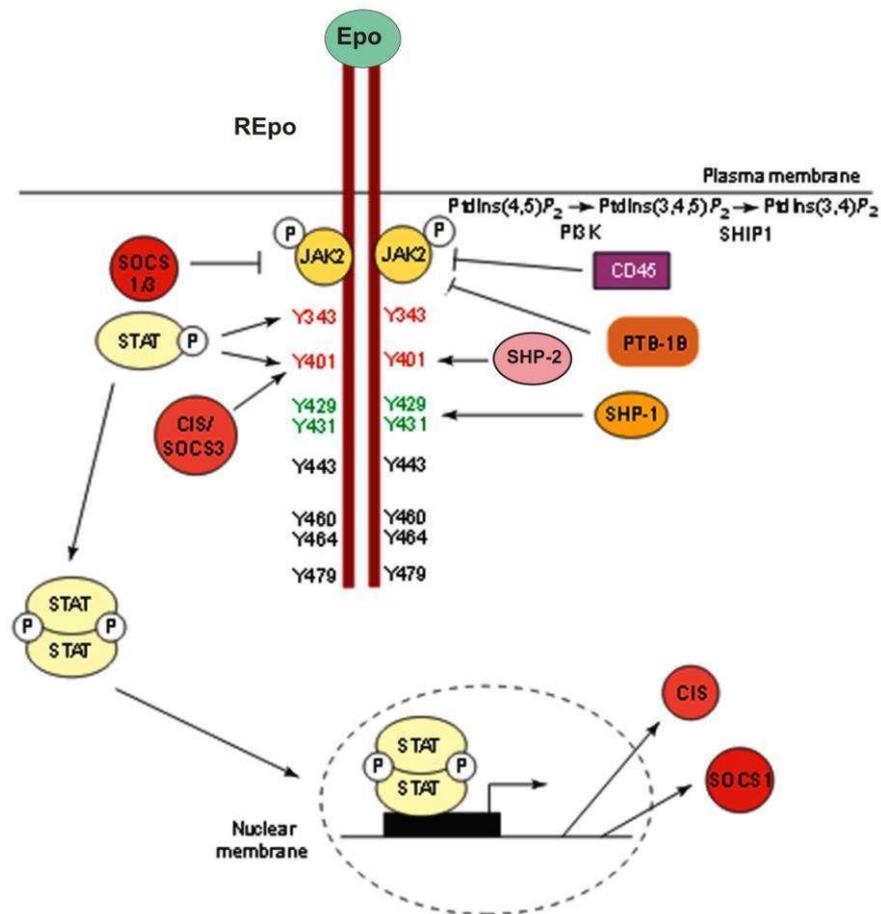
Distintos mecanismos, tales como internalización y degradación del REpo mediada por proteasoma, así como la finalización de señales intracelulares por la activación de fosfatasa contribuyen a modular la respuesta de la Epo (Figura G).

Estudios realizados por Walrafen y colaboradores (2005) han sugerido que el REpo activado sería rápidamente degradado luego de su ubiquitinización por dos sistemas proteolíticos que actúan secuencialmente: el proteasoma removería parte del dominio intracelular y los lisosomas degradarían la parte remanente del complejo hormona-receptor.

Dado que los procesos de fosforilación son mecanismos post-traduccionales fundamentales para un vasto espectro de procesos celulares, la activación de fosfatasa constituye un evento crucial para mantener en balance la homeostasis celular.

La familia de las proteínas CIS/SOCS (proteínas con dominio SH2 inducibles por citoquinas/supresores de señalización de citoquinas), juegan un papel importante en la regulación negativa de la vía de señalización del REpo. Los genes que codifican para las proteínas SOCS son regulados al inicio de la vía de señalización de Epo. Las proteínas SOCS se unen al residuo de tirosina Y401 del REpo compitiendo por el sitio de unión de STAT5. Las proteínas SOCS también participan en la ubiquitinización de los sustratos a los cuales se unen (Sasaki *et al*, 2000; Ketteler *et al*, 2003). SOCS-1/3 se une al dominio de activación de Jak2 (Ungureanu *et al*, 2002), y recluta la maquinaria de ubiquitinización e induce la propia degradación de Jak2.

Las proteínas tirosina-fosfatasa (PTPs) son enzimas que catalizan la defosforilación de residuos tirosina. En la regulación de la activación por Epo han sido implicadas cuatro fosfatasa: las fosfatasa con dominios SH2, SHP1 y SHP2, las fosfatasa CD45 y la proteínas tirosina fosfatasa 1B (PTP1B). SHP1 se asocia a los residuos de tirosina Y429 y Y431 de REpo (Klingmuller *et al*, 1995). La tirosina fosfatasa SHP2, un regulador negativo crucial, se une al residuo Y401 del REpo (Tauchi *et al*, 1996). CD45 es una fosfatasa que actúa sobre Jak2 (Irie-Sasaki *et al*, 2001), así como la fosfatasa PTP1B que también defosforila a Jak2 (Myers *et al*, 2001).



(Adaptación de Richmond *et al*, 2005)

Figura G: Regulación negativa de la señalización mediada por el REpo.

PROTEÍNA TIROSINA FOSFATASA 1B

La PTP1B es un miembro prototipo de la familia de Proteínas Tirosina Fosfatasa (PTPs). Esta fosfatasa, está localizada tanto en el citosol como en la membrana del retículo endoplasmático. Inicialmente fue aislada como una proteína de 37 kDa (Tonks *et al*, 1988). Sin embargo, el secuenciamiento de su ADNc reveló una isoforma de 50 kDa que incluía una extensión de 114 residuos contiguos al extremo C-terminal del sitio catalítico (Guan *et al*, 1990). Como su dominio catalítico apunta al citosol, la PTP1B puede defosforilar su sustrato a través de la extensa y ramificada red ocupada por el retículo endoplasmático (RE). Recientes estudios bioquímicos y físico-químico por FRET (*fluorescence resonance energy transfer*) y BRET (*bioluminescence resonance energy transfer*) han demostrado la existencia de una interacción directa entre la PTP1B asociada al RE y su

sustrato inmerso en la membrana plasmática. Esto puede ocurrir durante su ruta biosintética hacia la membrana plasmática después de ser endocitada (Haj *et al*, 2002; Cohen *et al*, 2004). Existen tres modelos que pueden explicar el encuentro entre la PTP1B y su sustrato unido a la membrana:

- a) La PTP1B es liberada del RE por remoción catalítica de su secuencia de anclaje (Frangioni *et al*, 1992).
- b) Los sustratos de PTP1B son entregados desde la membrana al RE por medio de vesículas intracelulares (Haj *et al*, 2002).
- c) La unión local de membrana del RE con la membrana plasmática podría permitir una interacción directa de las proteínas inmersas en el área en contacto (Hernández *et al*, 2006).

Regulación de PTP1B

A nivel post-traducciona, la evidencia indica que la PTP1B sufre cambios en la fosforilación de residuos de serina dependientes del ciclo celular (Schiviella *et al*, 1993). En células mitóticas se encuentra ampliamente fosforilada, hecho que se revierte al finalizar este proceso. Schifrin y colaboradores (1997) demostraron que los mismos residuos de serina fosforilados durante la mitosis también sufren esta modificación luego de un *shock* osmótico o de la utilización de inhibidores de fosfatasa o de síntesis de proteínas. Además se ha reportado que la presencia de residuos de tirosina fosforilados (Liu y Chernoff, 1997) correlaciona con un aumento significativo de la actividad de la fosfatasa.

Por otra parte, la PTP1B es sensible a la ruptura proteolítica por calpaína (proteína dependiente de calcio) generando una isoforma soluble de 42 kDa que carece de, aproximadamente, 75 residuos del extremo C-terminal y que tiene mayor actividad respecto de la isoforma de 50 kDa, sugiriendo un rol de dicho extremo en la supresión de la actividad de la enzima (Frangioni *et al*, 1993; Kuchay *et al*, 2007).

La PTP1B se relaciona con la regulación de vías de señalización que involucran la fosforilación de tirosina inducida por factores de crecimiento, citoquinas y hormonas y, en la última década ha sido objeto de intensivos estudios de interés farmacológico debido a su rol en los metabolismos de insulina y leptina. Esto le confiere una participación importante en disfunciones orgánicas, tales como diabetes y obesidad y, más recientemente, el conocimiento de su participación en enfermedades neoplásicas humanas (Feldhammer *et al*, 2013).

Se ha demostrado, también, la intervención de la PTP1B en la terminación de la señalización inducida por Epo. En estudios realizados con mutantes de PTP1B, Cohen y colaboradores (2004) observaron que esta fosfatasa modula la vía de señalización iniciada por Epo mediante la defosforilación de su receptor o de las proteínas que participan en dichas vías tales como Jak2 y STAT5.

En trabajos previos de nuestro laboratorio se demostró que no sólo la PTP1B regula la vía de señalización Epo/REpo, sino que la expresión de la fosfatasa es, a su vez, regulada recíprocamente por Epo. Dicha regulación resultó ser específica de cada línea celular –UT-7 y TF-1– y dependiente del estadio de diferenciación eritroide. La regulación observada involucra algunas proteínas intermediarias de la vía de señalización del REpo, tales como Jak2 y PI3K, así como la participación de calcio, un mensajero molecular universal (Callero *et al*, 2007, Callero *et al*, 2011).

RELACIÓN ESTRUCTURA PROTEICA-FUNCIÓN DE LA ERITROPOYETINA

En la actualidad, el tratamiento con rhuEpo tiene reconocida eficacia para el manejo de la anemia y sus síntomas en pacientes renales, hematológicos y oncológicos. No obstante, hay que considerar algunos aspectos que impiden lograr los resultados esperados, tales como propensión a trombosis, aumento de la presión sanguínea sistémica o modificación del flujo sanguíneo zonal, entre otras, pueden constituir todavía factores de riesgo (Coleman *et al*, 2006; Sirén *et al*, 2009). Aunque aún no existe suficiente información para asegurar una relación entre la administración de rhuEpo y los efectos secundarios adversos, resultados de ensayos clínicos sugieren que la mayor asociación se establece en tratamientos con dosis elevadas de Epo, modalidad incorporada, últimamente, para reducir la frecuencia de administración y para intentar revertir la anemia refractaria. Este hecho transforma al tratamiento en totalmente inaceptable para su uso como agente protector de tejidos no hematopoyéticos, ya que la citoprotección de algunos tejidos, como el sistema nervioso central, requiere dosis mucho más elevadas que las empleadas en el tratamiento de la anemia (Brines y Cerami, 2005).

Además, en estos casos, el estímulo de la eritropoyesis resulta contraproducente, ya que induce un aumento innecesario y perjudicial de la masa eritrocitaria (Erbayraktar *et al*, 2003). A ello hay que agregar el porcentaje de tratamientos ineficaces, debido a resistencia a la rhuEpo, especialmente, en pacientes cuyas patologías de base son acompañadas por procesos inflamatorios.

Con el objeto de evitar estos efectos secundarios y/o de modificar la actividad de la Epo, se han obtenido proteínas derivadas modificadas en su molécula y péptidos sintéticos con variada actividad biológica (Fisher, 2003; Leist *et al*, 2004).

El elevado contenido de hidratos de carbono de la Epo constituye un complemento estructural importante desde el punto de vista farmacológico. El agregado de dos cadenas de oligosacáridos (Darbepoetin- α , ARANESP, Amgen, EUNA) le confiere a la proteína una elevada vida media mientras que mantiene una actividad similar a la de la Epo nativa (Leist *et al*, 2004). Por el contrario, la proteína a la que se le ha removido totalmente el contenido de ácido siálico (asialoEPO, Chugai Pharmaceutical Co., Japón) parece retener su actividad neuroprotectora disminuyendo su habilidad para modificar el hematocrito pero tiene una vida media extremadamente corta. Más que la modificación molecular, lo que dificultaría la activación de los precursores eritroides en la médula ósea sería la dificultad de la asialoEpo para interaccionar con las células *target*, debido al corto tiempo de supervivencia (Erbayraktar *et al*, 2003; Leist *et al*, 2004).

Las modificaciones químicas de la Epo, como guanidación o carbamilación de residuos de lisina, altera no sólo la conformación molecular sino también su actividad biológica (Mun y Golper, 2000). Entre estas proteínas modificadas, la eritropoyetina carbamylada es la entidad que ha sido motivo de mayor investigación.

ERITROPOYETINA CARBAMILADA

En el proceso conocido como carbamilación, el anión cianato reacciona irreversiblemente con los grupos amino de aminoácidos, péptidos y proteínas.

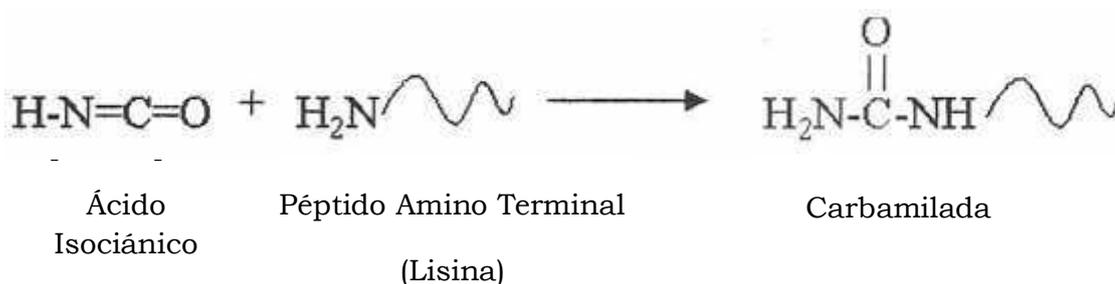
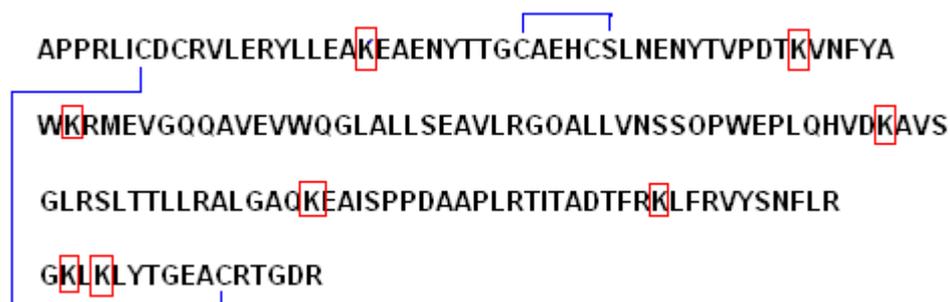


Figura H: Reacción de carbamilación proteica.

La carbamilación de la Epo consiste en el agregado de grupos cianato a los 8 residuos de lisina de la proteína (“K” en la figura I), generando la neutralización de cargas positivas.



(**Biotecnología Aplicada 2003;20:214-219**)

Figura I: Grupos lisinas que contiene la eritropoyetina.

El tratamiento de ratas con Epo carbamilada (cEpo) resultó ineficaz para modificar los parámetros hematológicos, sugiriendo estos resultados la pérdida de actividad biológica debido a la transformación de la molécula por carbamilación (Park *et al*, 2004). En ensayos experimentales se demostró la incapacidad de cEpo para inducir el desarrollo de colonias hematopoyéticas a partir de células CD34+ de médula ósea (Coleman *et al*, 2006). Leist y colaboradores (2004) reportaron que la cEpo no presenta actividad hematopoyética aunque mantiene una acción antiapoptótica sobre células neuronales de la línea P-19. También han sido reportados resultados de experiencias *in vivo* en las que se observó un efecto neuroprotector de la cEpo en modelos de daño tisular por hemisección de médula espinal (King *et al*, 2007), por exposición a hipoxia (Fantacci *et al*, 2006), encefalomiелitis experimental autoinmune (Brines *et al*, 2000) o isquemia focal cerebral (Wang *et al*, 2007), abriendo de esta manera, un camino promisorio para la aplicación farmacológica de la nueva molécula. Esta actividad anti-apoptótica no-eritropoyética fue evaluada en numerosos ensayos *in vitro* y en animales de experimentación (Brines *et al*, 2004; Coleman *et al*, 2006; Fantacci *et al*, 2006; Wang *et al*, 2007; Xu *et al*, 2009).

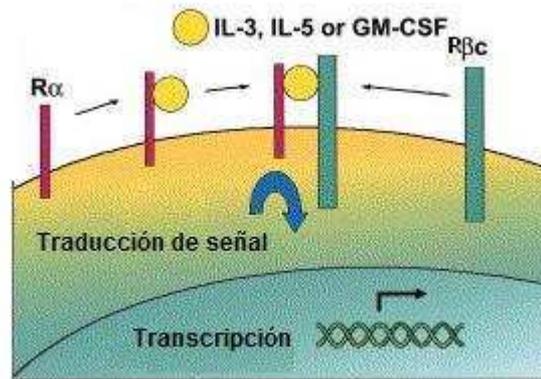
ERITROPOYETINA CARBAMILADA **Y RECEPTORES INVOLUCRADOS**

Algunos autores proponen que la acción eritropoyética de la Epo depende del receptor homodimérico (REpo)₂, mientras que la acción antiapoptótica en distintos tejidos estaría mediada por un receptor heterodimérico (Brines *et al*, 2004), un complejo formado entre una subunidad de REpo y el receptor β *common* (R β c), subunidad de los receptores utilizados por el factor de crecimiento GM-CSF y las citoquinas IL-3 e IL-5 (Jubinsky *et al*, 1997). Este concepto se basa en la evidencia proveniente de diversos resultados. La afinidad de la Epo por receptores localizados en neuronas es sustancialmente menor que la de Epo por el homodímero (REpo)₂ de los progenitores eritroides (Livnah *et al*, 1999). Además, Epo protegió a cardiomiocitos de la apoptosis inducida por staurosporina en ratones *wild-type* pero, en contraste, el efecto citoprotector no se manifestó en ratones *knockout* para R β c (Brines *et al*, 2004). Estos mismos autores sostienen también la hipótesis de que cEpo tiene actividad antiapoptótica asociada a su unión a la entidad heterodimérica REpo/R β c. Anteriormente, la diferente actividad entre Epo y cEpo en tejidos hematopoyético y no-hematopoyéticos había sido adjudicada a acciones mediadas por distintos receptores (Masuda *et al*, 1993). Sin embargo, aunque los ensayos experimentales identifican a REpo y R β c como componentes del receptor que media la protección tisular, quedan todavía muchos aspectos por aclarar, en particular, acerca de la interacción de la Epo y sus variantes con el receptor y sobre los caminos de señalización.

Características del receptor β *common*

La subunidad β *common* es compartida por los receptores de IL-3, IL-5 y GM-CSF (Bazan 1990; Nicola, 1994; Rozwarski *et al*, 1994; Murphy y Young, 2006). Sin embargo, β c es sólo una subunidad del receptor heterodimérico completo para estas citoquinas y por sí sola no es capaz de unirse a sus ligandos (Hayashida *et al*, 1990; Tavernier *et al*, 1991; Kitamura *et al*, 1991); cada uno tiene, además, una subunidad del receptor α única (R α IL-3, R α IL-5R, o R α GM-CSF, respectivamente) que sólo se une a su ligando específico. La subunidad α es esencial para la activación celular y crítica para permitir que β c atraiga a la citoquina, proporcionando de este modo la proximidad física y conformacional

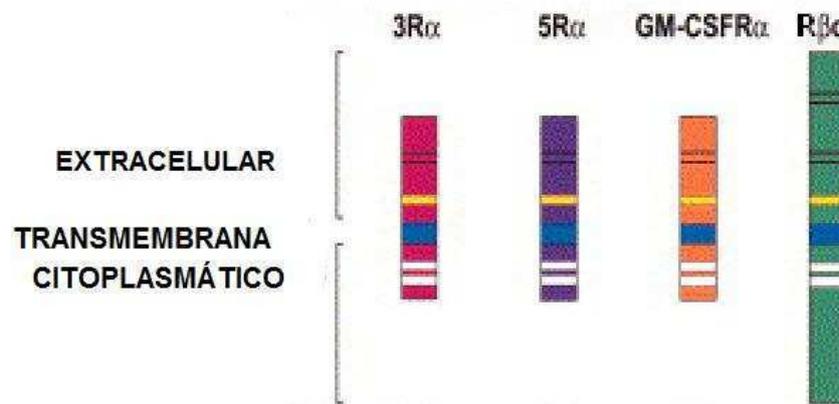
necesaria de $R\alpha/\beta_c$ para iniciar la señalización intracelular y generar un efecto fisiológico (Figura J).



(Martinez-Moczygemba y Huston, 2003)

Figura J: Heteroreceptores formados por la subunidad β *common* para IL-3, IL-5 y GM-CSF.

Tanto las subunidades α de IL-3, IL-5 y GM-CSF como el $R\beta_c$ se caracterizan por un módulo de homología extracelular de 200 aminoácidos que contiene dominios con secuencias conservadas. Estas características conservadas incluyen un motivo WSXWS (amarillo de la figura K) próximo a la membrana, el cual, como se mencionó anteriormente, también se encuentra en la zona extracelular del REpo, próximo a la membrana plasmática.



(Adaptado de Martinez-Moczygemba y Huston, 2003)

Figura K: Estructura de R α IL-3, R α IL-5, R α GM-CSF y R β c.

Datos actuales indican que el complejo GM-CSF α / β c preformado sería análogo a los dímeros preformados de receptores de hormona de crecimiento o de eritropoyetina y seguiría un modelo de activación del receptor semejante al de los mencionados (Murphy y Young, 2006). No obstante, las investigaciones para comprender la activación de R β c humano siguen progresando.

Existen evidencias que sugieren que, cuando todos los residuos de lisina de la eritropoyetina (Epo) son transformados en homocitrulina por carbamilación, el producto resultante eritropoyetina carbamilada (cEpo) pierde su actividad como factor de crecimiento de células del linaje eritroide. Sin embargo, a pesar de su modificación estructural, la proteína mantendría su actividad neuroprotectora, abriendo un camino promisorio para la aplicación farmacológica de la nueva molécula. Debido a la descripción relativamente reciente de cEpo, son numerosos los interrogantes acerca de su verdadera función, su similitud o diferencias con la función de la Epo. Más controversia existe en lo que se refiere a los receptores de membrana a través de los cuales la Epo y sus derivados ejercen su acción en distintos tejidos, así como los mecanismos de señalización involucrados.

OBJETIVO GENERAL

Profundizar el conocimiento de los mecanismos celulares y moleculares que median las acciones antiapoptótica y hematopoyética de la eritropoyetina y de uno de sus compuestos derivados, la eritropoyetina carbamilada, con el objetivo de incidir en el futuro sobre estrategias terapéuticas en las que puedan encontrarse involucradas.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Con el fin de explicar la funcionalidad diferencial de Epo y cEpo en tejidos hematopoyético y no hematopoyéticos, es interesante conocer la vía de activación celular de ambos factores.

- 1) Comparación, mediante ensayos simultáneos, de los efectos mediados por Epo y por cEpo en la proliferación y la acción preventiva de muerte programada en distintas líneas celulares. Se emplearán, como modelo de linaje eritroide, unidades formadoras de colonias eritroides fisiológicas murinas y líneas celulares humanas con capacidad de diferenciación eritroide (UT-7, TF-1, K562). Como modelo de tejido no hematopoyético, se empleó la línea de origen neuronal (SH-SY5Y).
- 2) Evaluación de la expresión de los receptores postulados como candidatos para explicar la función diferencial entre Epo y cEpo (homodimérico, (REpo)₂ y heterodimérico, (REpo-Rβc). Modulación de la expresión de los receptores

por ambas eritropoyetinas y evaluación de la participación en la unión ligando/receptor.

- 3) Investigación de la vía de señalización involucrada en la proliferación celular.
- 4) En base a los resultados, evaluar posibles causas responsables de la acción diferencial entre cEpo y Epo.

Se define la siguiente hipótesis que fundamenta el presente trabajo:

Epo y cEpo se diferencian por su función sobre distintos tipos celulares. Este comportamiento diferencial sería debido a distintos receptores involucrados y a alteraciones en los caminos de señalización.

En el marco de esta hipótesis, el impacto derivado de los resultados obtenidos sería:

El conocimiento generado en este trabajo acerca de la actividad biológica de las proteínas modificadas permitirá, en el futuro, implementar estudios de caracterización estructural e interacción proteína-proteína, o bien ser empleado en el desarrollo farmacológico de formas modificadas químicamente en base a estudios de estructura-función.

Esta línea de investigación podría tener, a largo plazo, un impacto beneficioso sobre la numerosa y creciente población de pacientes pasibles de recibir tratamiento con rhuEpo.

EQUIPOS

- Centrífuga refrigerada Hermle Z323K.
- Citómetro de flujo FACS AREA (BD) (Servicio de Citometría, FCEN, UBA).
- Cuba electroforética Liberty 2 (Biokey American Instruments, Inc. USA) para fragmentos de PCR.
- Cuba electroforética (Miniprotean III, Bio-Rad) para SDS-PAGE y electrotransferencia.
- Dark Box II (FujiFilm Intelligent) Departamento de Química Biológica, FCEN), acoplado a cámara digital.
- Equipo para la obtención de agua ultra-pura Millipore Simplicity 185.
- Espectrofotómetro (Beckman DB).
- Estufa de cultivo (Revco RMI 3000S-7VBA).
- Flujo Laminar Cámara de bioseguridad de clase II (Nuair).
- Fuente de poder (EPS 600, Pharmacia).
- Lector de microplacas (BioRad Modelo 680).
- Microscopio Nikon XS100.
- Microscopio de fluorescencia invertido (Zeiss Axiovert 135), con cámara digital acoplada (Kodak).
- Microscopio Electrónico (Servicio de CITEFA, Centro de Investigación de las Fuerzas Armadas).
- Microscopio Confocal (Alympus FV300/Bv61) (Servicio de Confocal, FCEN, UBA).
- Termociclador Eppendorf (Mastercycler gradient) para RT-PCR.
- Transiluminador (Hofer Macro Vue UV-20).

REACTIVOS Y ANTICUERPOS

Calidad de agua y reactivos

Las soluciones, reactivos y medios de cultivo fueron preparados con agua deionizada de calidad ultrapura, con resistividad específica de 18 MΩ.

Todas las sales, ácidos y solventes utilizados fueron de calidad analítica (Merck, Mallinckrodt, Sigma-Aldrich o similar).

H₂O-DEPC: Agua conteniendo dietil pirocarbonato (DEPC, compuesto que destruye ARNasas) 0,1% (v/v).

Reactivos específicos➤ **Amersham - GE:**

- Ready To Go T-Primed First-Strand Kit
- dNTPs
- Dietilpirocarbonato (DEPC)
- ECL, Kit para revelado por quimioluminiscencia
- Anti IgG de ratón conjugado con peroxidasa (HRP)
- Anti IgG de conejo conjugado con peroxidasa (HRP)

➤ **BD Biosciences:**

- Anexina-FITC
- Proteína A agarosa
- Reactivo *Cytofix/Cytoperm*
- Reactivo *Perm/Wash*
- Proteína recombinante humana TNF- α
- Anti p27^{kip1} de ratón monoclonal
- Anti PARP de ratón monoclonal

➤ **Biodynamics S.R.L:**

- Agarosa
- Marcador de número de pares de base

➤ **Bioser, GENSA:**

- Suero Fetal Bovino (SFB)
- Penicilina
- Estreptomina

➤ **Calbiochem:**

- Inhibidor de Jak2, AG490
- Inhibidor de PI3K, Ly 294002

➤ **Fermentas:**

- Dual color protein *buffer*
- Marcador de peso molecular preteñido para geles de SDS-poliacrilamida

➤ **GIBCO BRL:**

- Medio MEM

- Medio Ham F12
- Medio IMDM
- Trizol

➤ **Invitrogen-Life Technologies:**

- Bromuro de etidio
- Dimetilsulfóxido (DMSO).
- Primers
- Taq polimerasa
- Anti IgG de conejo conjugado con Alexa-Fluor 488
- Anti IgG de ratón conjugado con Alexa-Fluor 488
- Anti IgG de ratón conjugado con Alexa-Fluor 590

➤ **Sigma Chemical Co.:**

- Medio RPMI 1640
- 2,7 diaminofluoreno (DAF)
- Staurosporina (STP)
- ácido trans-retinoico (*All-trans-retinoic-acid*)
- EDTA
- fenilmetilsulfonil fluoride (PMSF)
- aprotinina
- leupeptina
- pepstatina A
- colorante Hoechst 33258 (Trihidroclorhidrato de (2'-[4-Hidroxifenil]-5-[4-metil-1-pipetrazinil]-2,5'-bi-1H benzimidazol)
- dimetilsulfoxido (DMSO)
- 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT)
- azul Tripán

➤ **ICN Biomedicals:**

- Paraformaldehido

➤ **Wiener:**

- Kit ALP 405 AA líquida

➤ **ZELLTEK S.A.**

- Eritropoyetina recombinante humana purificada (rhEpo)

➤ **Santa Cruz Biotechnology Inc:**

- Anti REpo de conejo policlonal (M-20)
- Anti Jak2 de conejo policlonal (C-20)
- Anti β *common* de raton monoclonal (1C1)
- Anti PTP1B de conejo policlonal (H-135)
- Anti ERK1/2 de conejo policlonal
- Anti pERK1/2 de ratón monoclonal
- Anti β actina de raton monoclonal (C4)

➤ **Cell Signaling**

- Anti pFOXO3a de conejo (S253)
- Anti FOXO3a de conejo (7508)
- Anti pJak2 de conejo monoclonal (C80C3)
- Anti Akt de conejo monoclonal (C67E7)
- Anti pAkt de conejo monoclonal (D7F10)

Chemicon Internacional

- Anti Bcl2 de conejo policlonal
- Anti BclX_L de ratón monoclonal

Esterilización de materiales y soluciones

El material fue esterilizado por calor seco (160-170 °C, 90 min), por calor húmedo (121 °C, 1 atm, 30 min) o por radiación gamma, según las características del mismo.

Las soluciones termolábiles fueron esterilizadas por pasaje a través de membrana de acetato de celulosa, con poros de 0,22 μ m (Millipore), utilizando presión positiva de nitrógeno.

PROTOCOLOS

1. CARBAMILACIÓN DE PROTEÍNAS

Es un proceso por el cual se carbamilan, mediante urea o cianato los grupos amino de las proteínas, convirtiendo a los mismos en grupos carbamilaminos.

1.1. Procedimiento

Con el fin de estandarizar la técnica de carbamilación, se incubó a 37 °C una mezcla de 0,5 mL de albúmina bovina (Alb) 1 mg/mL con 0,5 ml de *buffer* borato de sodio 1 M pH 8,8 y 0,5 mL de cianato de potasio (KCNO) 3 M. Luego de la incubación, el KCNO residual fue eliminado mediante varios lavados con H₂O deionizada en tubos Centricón (YM-10, Amicon), portadores de membranas con poro selectivo con *cut-off* 10 kDa. Se efectuaron entre 5 y 6 lavados por centrifugación a 2000 *g* durante 45-60 min cada uno.

Se realizaron curvas para determinar la dependencia de la reacción con la dosis de KCNO y con el tiempo de incubación.

Paralelamente, se realizó un control de una muestra de albúmina sometida a todos los pasos del proceso, sin el agregado de cianato de potasio (Albúmina Lavada: Alb_L), para determinar si el proceso de carbamilación y posterior lavado exhaustivo para eliminar restos de cianato libre, podía modificar la proteína.

1.2. Control de la carbamilación

1.2.1. Determinación de grupos amino libres

En el proceso de carbamilación, el cianato reacciona con los grupos lisina de la proteína. Para determinar la eficiencia del procedimiento se determinó la desaparición de residuos amino libres en la albúmina carbamilada según el método de Habeeb (1965). Los grupos amino libres reaccionan con ácido 2,4,6-trinitrobencenosulfónico (TNBSA) en un medio de pH regulado, dando el producto TNP-proteína (N-trinitrofenil proteína), cuya concentración es evaluada por espectrofotometría.

Reacción: A 1 mL de una solución de BSA (0,5 mg/mL) se agregó 1 mL de *buffer* borato 0,1 M pH 10 y 1 mL de TNBSA 0,1%. La solución fue incubada a 40 °C durante 2 h. Luego, se agregó SDS 10% (p/v) para solubilizar la proteína e impedir su precipitación al adicionar 0,5 mL de HCl 1 N. Se midió el espectro de absorción entre las λ de 250 y 480 nm.

Se evaluó la disminución de los grupos amino libres, antes y después del bloqueo por carbamilación.

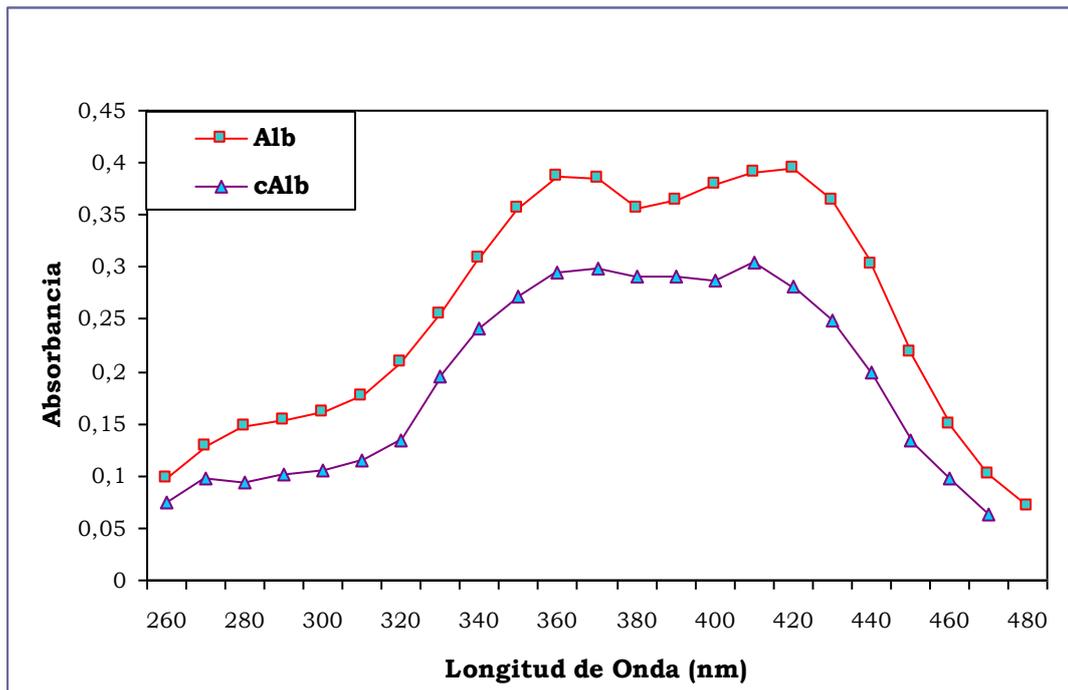


Figura I: Control de la reacción de carbamitación. Los espectros de absorción de los productos coloreados formados por la reacción entre TNBS y residuos lisina libre en las moléculas de albúmina (Alb) o albúmina carbamilada (cAlb), muestran la disminución de grupos lisina libres en esta última. La figura es representativa de 3 ensayos independientes.

La proteína, a través de los grupos amino libres, reacciona con TNBSA en un medio de pH regulado, dando el producto coloreado N-trinitrofenil proteína (TNP-proteína). El espectro de absorción del producto de la reacción muestra dos picos máximos (360 nm y 420 nm) (Cayot y Tainturier, 1997). Los residuos carbamilisina no reaccionan con TNBSA, y por lo tanto, disminuye la concentración del producto coloreado formado por reacción con la proteína carbamilada, como se observa en la Figura I.

1.2.2. Análisis del producto carbamilado por electroforesis

Con el objeto de determinar si el tratamiento realizado permitía la total carbamitación de la proteína, se procedió al análisis del producto carbamilado por electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones nativas y desnaturizantes. Los resultados obtenidos se pueden observar en la Figura II:

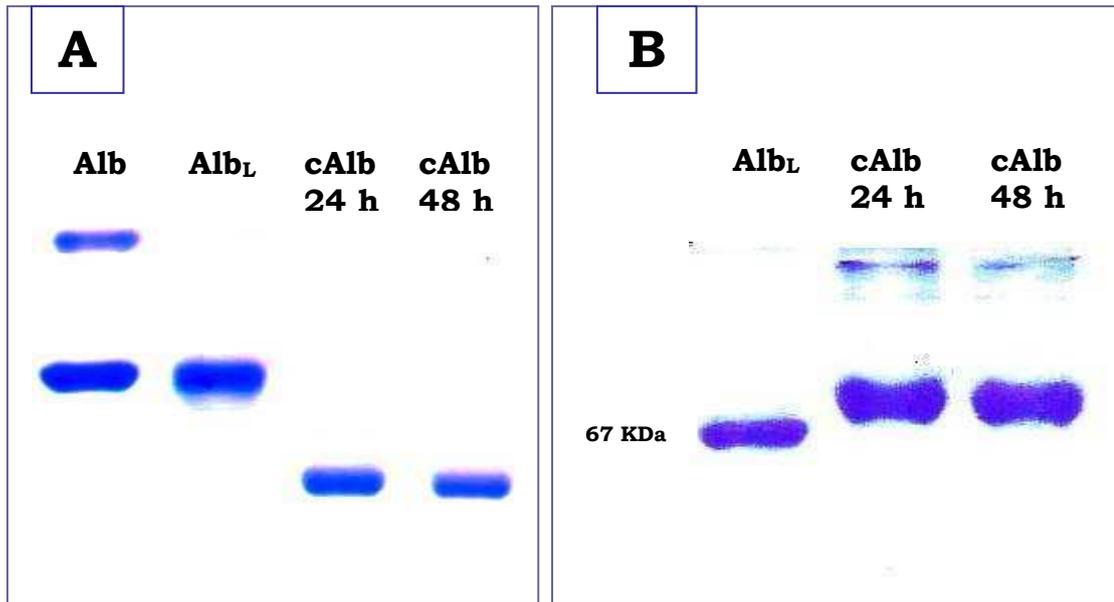


Figura II: Control del proceso de carbamitación de albúmina por electroforesis en gel de poliacrilamida. Luego de incubar las proteínas en ausencia (Alb) o presencia de cianato de potasio durante 24 h (cAlb 24 h) ó 48 h (cAlb 48 h), se realizaron desarrollos electroforéticos en condiciones nativas (A) y desnaturalizantes (B), sembrando 15 μ g de muestra en cada calle. Una muestra de albúmina fue sometida al proceso sin utilizar cianato de potasio (Alb_L). Los perfiles electroforéticos, que muestran la diferencia de migración electroforética entre cAlb y Alb_L, son representativos de 3 ensayos independientes.

Al carbamilar la albúmina con cianato de potasio, los residuos lisina son convertidos a grupos carbamilaminos neutros. Al neutralizarse estos grupos, la proteína aumenta su carga neta negativa, y en consecuencia en condiciones nativas también aumenta su movilidad electroforética, ya que ésta depende de la relación carga/masa. Como el desarrollo electroforético se realiza a pH 8,8, la proteína carbamitada migra a mayor velocidad hacia el ánodo en comparación con la proteína sin carbamilar.

En condiciones desnaturalizantes (SDS y agente reductor), se genera una densidad uniforme de cargas negativas anulando la carga propia de cada proteína. En este sistema (PAGE-SDS), utilizando geles de poro restrictivo, pueden separarse las proteínas de acuerdo con su tamaño molecular. La presencia de cianato genera un aumento de tamaño, por lo que, como puede observarse en la figura II, la albúmina carbamitada migra menos que la albúmina sin carbamilar.

En cuanto a los dos periodos de incubación utilizados, no se observaron diferencias entre los perfiles electroforéticos de la cAlb. Para los ensayos posteriores se decidió realizar la carbamitación durante 48 h.

Como se observa en la Figura II, los lavados no modificaron a la albúmina en cuanto a sus propiedades electroforéticas Alb_L vs. Alb.

1.3. Carbamilación de la eritropoyetina

Después de determinar las condiciones para realizar el procedimiento, se procedió a la obtención de eritropoyetina carbamilada (cEpo). Para ello, se carbamiló durante 48 h una solución que contenía 0,5 mg/ml de Epo. Se empleó el mismo procedimiento que el utilizado para carbamilar albúmina.

2. CRIOPRESERVACIÓN DE LÍNEAS CELULARES

2.1. Congelamiento

Para preservar las células por un período prolongado se requieren temperaturas extremadamente bajas. Estas temperaturas hacen que el metabolismo celular disminuya significativamente. El principal problema que presenta el congelamiento celular es la formación de cristales en el citoplasma, los que tienden a romper la membrana celular. Para evitar este inconveniente, se utilizó, dimetil sulfóxido (DMSO), que permite un descenso gradual de la temperatura intracelular.

La suspensión celular a ser congelada (10^6 - 10^7 cél/mL) fue centrifugada a 350 *g* durante 10 min. La mezcla congelante (medio de cultivo: SFB:DMSO; 45:45:10; v/v/v) fue agregada al *pellet*. La suspensión celular fue rápidamente homogeneizada y trasvasada a un criotubo que fue colocado en un contenedor para frisar (“*Mr Frosty*”, Nalgene). Este recipiente colocado a -70 °C permite que la temperatura disminuya aproximadamente 1-2 °C por min. Cuando el sistema alcanzó dicha temperatura, los criotubos fueron almacenados en un tanque con nitrógeno líquido a -174 °C (Hay, 1992).

2.2. Descongelamiento

Para descongelar las células, el criotubo fue rápidamente sumergido en baño a 37 °C. Una vez descongelada, la suspensión fue trasvasada a un tubo de centrífuga al que se agregó la mezcla apropiada de medio de cultivo, SFB y antibióticos. Por último, después de centrifugar 10 min a 200 *g*, se removió el sobrenadante y se agregó medio fresco.

3. CULTIVO CELULAR

3.1. Línea celular K562

Las células fueron adquiridas en American Type Culture Collection (ATCC). Esta línea fue establecida por Lozzio y Lozzio (1975) a partir de la pleura de una paciente con leucemia mieloide crónica en crisis blástica terminal. A través del estudio de las proteínas de membrana se demostraron características eritroleucémicas de estas células. Expresan receptor de eritropoyetina (REpo) en membrana (Fraser *et al*, 1988; Anagnostou *et al*, 1994), y poseen capacidad de sintetizar hemoglobina por estímulo de distintos inductores (Pérez *et al*, 1999).

Crecen en suspensión.

Medio de cultivo de las células K562: Las células fueron cultivadas en medio RPMI 1640 10% (v/v) conteniendo L-glutamina 2 mM, HEPES 25 mM, adicionado con NaHCO₃ 26,8 mM, SFB 10%, penicilina 100 U/mL y estreptomycinina 100 µg/mL.

Los factores del complemento del SFB fueron inactivados por incubación en baño de agua a 56 °C durante 30 min.

Cultivo celular de K562: Los cultivos fueron mantenidos a una densidad de 1,5x10⁵ cél/mL en estufa a 37 °C en atmósfera saturada con vapor de agua y 5% de CO₂ (Vittori *et al*, 2005). El medio fue renovado cada 72-96 h. Para ello, las células fueron sedimentadas por centrifugación a 630 g durante 10 min a 25 °C y resuspendidas en medio de cultivo.

3.2. Línea celular UT-7

La línea celular UT-7 fue gentilmente cedida por el Dr. Patrick Mayeux (Cochin Hospital, Paris, Francia). Las células derivan de una muestra de médula ósea de un hombre que padecía leucemia megaloblástica aguda (Komatsu *et al*, 1991). Esta línea que expresa elevado número de REpo en membrana (Komatsu *et al*, 1991), requiere del suplemento de Epo para su proliferación y supervivencia.

Crecen en suspensión.

Medio de cultivo de las células UT-7: Las células fueron cultivadas en medio IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium) 10% (v/v) conteniendo L-glutamina 2 mM, HEPES 25 mM suplementado con NaHCO₃ 36 mM. , SFB 10%, penicilina 100 U/mL y estreptomycinina 100 µg/mL.

Los factores del complemento del SFB fueron inactivados por incubación en baño de agua a 56 °C durante 30 min.

Cultivo celular de UT-7: Las células fueron cultivadas en medio IMDM-SFB-PE, suplementado con 2 U/mL de eritropoyetina recombinante humana (rhuEpo), a 37 °C en estufa con atmósfera controlada con 5% de CO₂ y 100% de humedad.

El medio de cultivo fue renovado cada 72-96 h. Para ello, las células fueron sedimentadas por centrifugación a 630 *g* durante 10 min a 25 °C y resuspendidas, ajustando la concentración a 1,5x10⁵ células/mL de medio IMDM-SFB-PE.

3.3. Línea celular TF-1

La línea celular TF-1 fue adquirida a American Type Culture Collection (ATCC, cat n° CCL-243). Las células fueron inicialmente aisladas a partir de la médula ósea de un paciente con eritroleucemia (Kitamura, 1989). Esta línea requiere del suplemento de factores de crecimiento, tales como IL-3, factor estimulante de colonias granulocito-macrófago (GM-CSF) o Epo, para su proliferación y supervivencia. Tanto la IL-3 como el GM estimulan un crecimiento indefinido de las células TF-1 mientras que la Epo sólo permite el crecimiento por períodos cortos de hasta 8 días de cultivo.

Crecen en suspensión.

Medio de cultivo de las células TF-1: Las células fueron cultivadas en medio RPMI 1640 10% (v/v) conteniendo L-glutamina 2 mM, HEPES 25 mM suplementado con NaHCO₃ 36 mM. , SFB 10%, penicilina 100 U/mL y estreptomina 100 µg/mL.

Los factores del complemento del SFB fueron inactivados por incubación en baño de agua a 56 °C durante 30 min.

Cultivo celular de TF-1: Las células TF-1 fueron cultivadas en medio RPMI-SFB-PE, suplementado con 4 ng/mL de GM-CSF, a 37 °C, en estufa con atmósfera controlada con 5% de CO₂ y 100% de humedad.

El medio de cultivo fue renovado cada 72-96 h. Para ello, las células fueron sedimentadas por centrifugación a 630 *g* durante 10 min a 25 °C y resuspendidas, ajustando la concentración a 5x10⁴ células/ml de medio RPMI-SFB-PE.

3.4. Línea celular SH-SY5Y

Se empleó la línea celular SH-SY5Y (CRL-2266), obtenida de la American Type Culture Collection (ATCC). Es un clon de neuroblastoma humano proveniente de

la sublínea celular SK-N-SH, la cual fue obtenida de un neuroblastoma metastásico humano de la cresta neural del sistema nervioso simpático (Raguenez *et al*, 1999). Presenta morfología de tipo epitelial y crecimiento adherente.

Medio de cultivo de las células SH-SY5Y: Las células crecen con medio MEM (*Minimum Essential Medium*) Suplementado con NaHCO_3 2,2 g/L, y Ham-F12 suplementado con NaHCO_3 1,176 g/L, conteniendo L-glutamina 2 mM, SFB 10%, penicilina 100 U/mL y estreptomicina 100 $\mu\text{g/mL}$.

Los factores del complemento del SFB fueron inactivados por incubación en baño de agua a 56 °C durante 30 min.

Cultivo celular de las SH-SY5Y: Las células fueron mantenidas en medio MEM:HAM-F12:SFB en proporción 44:44:10 (v/v/v), a 37 °C, en estufa con atmósfera controlada con 5% de CO_2 y 100% de humedad (Pregi *et al*, 2006).

El medio de cultivo fue renovado cada 48 h. Las células fueron sedimentadas por centrifugación a 630 *g* durante 10 min a 25 °C y resuspendidas, ajustando la concentración a $1,5 \times 10^5$ células/mL de medio MEM-HAM-F12-SFB-PE.

3.5. Desarrollo de CFU-E

CFU-E: UNIDADES FORMADORAS DE COLONIA

Una unidad formadora de colonias eritroides, CFU-E, es la célula progenitora de la serie roja que da origen a una colonia conformada por un grupo de 8 a 65 células, parcial o totalmente hemoglobinizadas (Stephenson *et al*, 1971; McLeod *et al*, 1974).

OBTENCIÓN DE CFU-E:

3.5.1. Animales

Se emplearon ratones hembras de la cepa Balb/c de 10 semanas de edad con peso comprendido entre 23-29 g. Los animales fueron alojados en jaulas mantenidas en ambiente con temperatura controlada y ciclos de luz de 12 h. Se proporcionó alimento balanceado *ad libitum*.

3.5.2. Medio de cultivo de las CFU-E

- **Medio de cultivo básico:** medio mínimo esencial de Eagle α -modificado, con sales de Earle sin ribósidos o deoxirribósidos (α -MEM). La adición de NaHCO_3 26 mM y *buffer* HEPES 25 mM permitió regular el pH entre 7,2-7,4.

- **Medio de recolección:** medio de cultivo básico adicionado con SFB 2% (McLeod *et al*, 1974).
- **Medio semisólido:** medio de cultivo básico adicionado con SFB 25%; L-glutamina 2 mM; 2-mercaptoetanol 0,1 mM; sulfato de gentamicina 50 mg/L y metilcelulosa 0,8% (p/v) (Iscove *et al*, 1974).

3.5.3. Obtención de células de médula ósea

Los animales fueron sacrificados por inhalación de CO₂. Cada animal fue rociado con etanol 96°. A través de una amplia incisión en el muslo, se extrajo el fémur, y se cortaron ambas epífisis del hueso mantenido en hielo desde su extracción. El contenido medular fue obtenido por perfusión con 1 mL de medio de recolección y el material, fue recogido en una caja de Petri colocada en hielo. La suspensión medular fue aspirada e impelida varias veces con pipeta tipo Pasteur para disgregar las células, fue lavada con 10 mL de medio de recolección a 4 °C (McLeod *et al*, 1974) y centrifugada a 500 g durante 10 min a 4 °C. Se descartó el sobrenadante y se repitió el procedimiento.

Las células fueron suspendidas en 2 mL de medio de recolección. Una alícuota de la suspensión fue diluida convenientemente con solución de ácido acético 3% (v/v) coloreado con azul de metileno para determinar el recuento celular en cámara de Neubauer.

3.5.4. Cultivo celular de las CFU-E

Las células de médula ósea (m.o.) fueron suspendidas en medio semisólido en concentración final de 2×10^5 cél/mL y estimuladas con Epo o cEpo. Un mililitro de esta suspensión celular fue distribuida en placas de Petri de poliestireno (10x35 mm). Cada ensayo fue realizado por triplicado. Las placas fueron incubadas a 37 °C en atmósfera saturada con vapor de agua y en presencia de 5% de CO₂ durante 48 h. La tinción citoquímica pone de manifiesto la actividad pseudoperoxidásica de las células eritroides cuando se las incuba con H₂O₂ en presencia de un sustrato cromogénico. Por lo tanto, para el recuento de CFU-E, se utilizó una solución recién preparada de 2,7-diaminofluoreno (DAF). Este compuesto es oxidado debido a la actividad de la hemoglobina sobre el H₂O₂ y genera un compuesto coloreado azul fluoreno cuya concentración muestra una relación lineal con la concentración de la hemoglobina presente. Las colonias eritroides fueron teñidas con DAF 0,9 mg/L en buffer Tris-HCl 0,2 M, pH 7,0 y contadas en

microscopio invertido con aumento de 400x, contando 250 campos.

$$\text{Formula} = \frac{\text{N}^\circ \text{ colonias contadas} \times \text{superficie de la placa} \times \text{aumento del objetivo}}{\text{N}^\circ \text{ de campos} \times \frac{\text{superficie del reticulo}}{\text{aumento del ocular}}}$$

donde: Formula= del número de colonias totales en cada placa.

superficie de la placa= 962 mm²

aumento del objetivo= 40x

superficie del reticulo= 49 mm²

aumento del acular= 10x

4. DIFERENCIACIÓN CELULAR

4.1. Diferenciación de las células K562, UT-7 y TF-1

Para inducir diferenciación eritroide, se utilizó hemina (H), compuesto hemo preformado. La hemina induce hemoglobinización de las células.

Para preparar H, 10 mg de la misma fue humedecida con 100 µL de etanol absoluto y 200 µL de NaOH 1M, homogenizando con varilla de vidrio. Se agregaron 7,85 mL de NaHCO₃ 0,1 M y la suspensión fue agitada durante 2 h, protegida de la luz. A continuación, la misma fue filtrada en esterilidad y se midió absorbancia a 388 nm, máxima de absorción del compuesto. Se calculó la concentración de H en la solución empleando como datos la lectura de la absorbancia a 388 nm y el coeficiente de absorción molar ($\epsilon = 47,9$) (Pérez *et al*, 2001). La solución se prepara en el día de su utilización.

4.2. Diferenciación de las células SH-SY5Y

Las células SH-SY5Y pueden diferenciarse hacia un fenotipo colinérgico, adrenérgico o dopaminérgico, dependiendo de las condiciones de cultivo y del inductor de diferenciación a emplear (Xie *et al*, 2010).

El ácido trans-retinoico (AR) presenta un rol importante durante la embriogénesis de diversos tejidos, incluido el nervioso. A su vez, es un reconocido inductor de diferenciación celular. El AR induce la diferenciación neuronal hacia un fenotipo colinérgico. Actúa mediante su unión a los receptores RARs (*retinoic acid receptors*) y RXRs (*retinoic X receptors*), los cuales pertenecen a la familia de receptores nucleares de hormonas no esteroides.

Otro diferenciador celular y, agente proapoptotico a mayor concentración, es la staurosporina (STP).

5. INDUCTORES DE MUERTE CELULAR

5.1. Staurosporina

La STP es un producto natural originalmente aislado de la bacteria *Streptomyces staurosporeus Sp.* (Omura *et al*, 1977).

Una de las actividades biológicas de la STP es la de inhibir proteína quinasas induciendo una desregulación de la señalización celular, la cual puede llevar a la diferenciación o a la muerte, de acuerdo al tipo celular y a las condiciones de tiempo y concentración.

La STP es un potente inhibidor de la proteína quinasa C (PKC) y en menor medida de la proteína quinasa A, quien es ampliamente utilizada como inductor de apoptosis en células de origen neuronal (López *et al*, 2000; Tieu *et al*, 1999).

Se ha demostrado que este inhibidor puede inducir muerte celular en la línea SH-SY5Y en estado indiferenciado (Pregi *et al*, 2006).

5.2. TNF- α

El factor de necrosis tumoral (*Tumour necrosis factor alfa*, TNF- α) es una citoquina con funciones pleiotrópicas.

En trabajos previos de nuestro laboratorio hemos demostrado que dicha citoquina puede inducir muerte celular en la línea SH-SY5Y en estado indiferenciado (Pregi *et al*, 2009), y en células K562 diferenciadas con hemina (Vittori *et al*, 2010).

6. VIABILIDAD Y PROLIFERACIÓN CELULAR

6.1. Ensayo de exclusión del colorante azul Tripán

La prueba de exclusión de colorante supravital azul Tripán permite distinguir células viables de las que no lo son. La membrana plasmática de las células muertas pierde la propiedad de permeabilidad selectiva, de modo que el colorante penetra tiñendo el citoplasma de color azulado opaco. Las células vivas permanecen brillantes e incoloras (Phillips y Terryberry, 1957).

El recuento celular diferencial fue realizado por microscopía óptica en una dilución 1:2 de la suspensión celular con azul Tripán 2 g/L en PBS, empleando cámara de Neubauer.

6.2. Microscopía Electrónica de Barrido

Para la observación morfológica de las células se empleó Microscopía Electrónica de Barrido (MEB), analizándose imágenes tridimensionales de la superficie celular y tomando fotografías de campos representativos.

Las células (1×10^5 cél/mL) fueron sembradas sobre un soporte de vidrio de 10 mm de diagonal. Luego del crecimiento celular bajo los tratamientos correspondientes, cada muestra fue fijada con glutaraldehído 3% (v/v) en *buffer* fosfato 0,1 M, pH 7,4 durante 20 min. A continuación, fueron efectuados 3 lavados con el mismo *buffer*, retirando el exceso de las soluciones de fijación. Posteriormente, las muestras fueron sometidas a un proceso de deshidratación, sumergiéndolas sucesivamente en acetona 25%, 50%, 75%, 80%, 90% y 100%, repitiendo tres veces cada operación (Vittori *et al*, 2005). Para completar, el secado de la muestra biológica fue efectuado el punto crítico, proceso que, mediante variaciones de presión y temperatura, reemplaza la acetona por dióxido de carbono gaseoso, empleando una bomba de punto crítico (Balzers CPD 030, servicio de CITEFA). Como último tratamiento, la muestra fue cubierta con carbono y metalizada con oro (Balzers Union SCD 040). Este proceso de metalizado permite la interacción entre el haz de electrones del microscopio y la muestra, la cual emite señales que luego se traducen en pulsos eléctricos.

6.3. Ensayo de MTT

Mediante el ensayo colorimétrico del 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) (Mosmann, 1983), se determinó la proliferación celular y citotoxicidad. El mismo se basa en la reducción metabólica de bromuro del MTT, realizada por la enzima mitocondrial succinato–deshidrogenasa que lo transforma en un compuesto coloreado azul (formazán). El número de células vivas es proporcional a la cantidad de formazán formado.

Luego de los tratamientos realizados, se llevó a cabo la incubación con el sustrato (Conc. final = 5 mg/mL) durante 2 h a 37 °C. Finalizada la incubación, el precipitado azul de formazán se solubilizó con 100 μ L de solución HCl en

isopropanol (0,04M). Se cuantificó la absorbancia, a 570 nm referida a la obtenida a 655 nm en lector de microplacas.

7. EVALUACIÓN DE APOPTOSIS

7.1. Determinación de núcleos apoptóticos

El colorante Hoechst 33258 es una sustancia con capacidad para intercalarse entre las bases adenina y timina del ADN. El ADN teñido con dicho colorante, y excitado con luz de longitud de onda apropiada ($\lambda=350$ nm), emite fluorescencia de color azul brillante. El recuento diferencial de células apoptóticas se realiza mediante microscopía de fluorescencia. Los núcleos apoptóticos a diferencia de las células intactas, se observan más brillantes y de tamaño reducido debido a la condensación de la cromatina, y se visualiza la presencia de cuerpos apoptóticos como pequeños desprendimientos del núcleo también de color azul brillante.

Los cultivos de células fueron realizados sobre cubreobjetos, previamente esterilizados por tratamiento con etanol 96° y calor, y colocados en placas de Petri de 35 mm estériles. Después de una incubación de 48 h a 37 °C en atmósfera con 5% de CO₂ y 100% de humedad, se agregaron 5 gotas de fijador Carnoy (ácido acético:metanol, 3:1) sobre la suspensión celular UT-7, TF-1 y K562. Luego de 2 min se descartó el líquido de las placas y se repitió el proceso dos veces con 1 mL de fijador Carnoy durante 5 min. Las células SH-SY5Y fueron fijadas durante 20 min a 4°C, con solución de paraformaldehído (4 % v/v en PBS). Posteriormente se agregó el reactivo de Hoechst 33258 (0,05 g/L en PBS) manteniendo 10 min a temperatura ambiente y en oscuridad. Con el fin de retirar remanentes de dicho intercalante, se realizaron tres lavados con H₂O, finalizando el procedimiento con el montaje del preparado colocándolo sobre una gota de PBS en sentido invertido sobre un portaobjetos.

La cuantificación de núcleos apoptóticos fue realizada mediante el recuento de 600 células, empleando microscopía de fluorescencia, con filtro de 365 nm. Las imágenes fueron digitalizadas (Vittori *et al*, 2005).

7.2. Clivaje de la proteína PARP

PARP (*poly-adenosin ribose polymerase*) es una proteína nuclear que protege al ADN de su degradación. Es blanco de acción de caspasa 3, la cual cliva esta proteína permitiendo así la fragmentación del ADN durante la apoptosis. Por este

motivo, el clivaje de PARP es una medida de los niveles de apoptosis en una población celular y puede evaluarse por la técnica de *Western blotting*, utilizando un anticuerpo que reconozca tanto a la proteína intacta (116 kDa) como a un fragmento resultante del clivaje (85 kDa).

7.3. Determinación de exposición de residuos de fosfatidilserina

Una de las modificaciones celulares que ocurren durante la muerte celular programada es la pérdida de la asimetría de la membrana plasmática, donde el fosfolípido de membrana fosfatidilserina (PS) se trasloca de la capa interna de la bicapa lipídica hacia la capa externa, quedando de esta manera expuesto hacia el espacio extracelular.

La anexina V es una proteína con alta afinidad y especificidad por los residuos de PS y no atraviesa la membrana plasmática, por lo que se une a este fosfolípido sólo cuando el mismo se encuentra externalizado. La anexina V conjugada con fluorocromos como isocianato de fluoresceína (FITC) se puede utilizar para determinar el número de células que externalizaron PS luego de un tratamiento, mediante el uso de citometría de flujo.

Luego de realizar los diferentes tratamientos, las células fueron lavadas y resuspendidos en *binding buffer* (HEPES/NaOH 0,01 M pH 7.4, NaCl 0,14 M, CaCl₂ 2,5 mM) en una concentración de 1×10^6 células/mL. Un volumen de 100 μ L de suspensión celular fue incubado con 4 μ L de anexina V-FITC durante 15 min a temperatura ambiente en oscuridad. La reacción fue detenida por el agregado de 400 μ L de *binding buffer* y el análisis por citometría de flujo fue realizado dentro de la primera hora siguiente excitando las muestras con un láser de argón a 488 nm. Los datos fueron analizados con el programa WinMDI 2.9.

8. ELECTROTRANSFERENCIA E IMMUNOBLOTTING

8.1. Lisis celular

8.1.1. Lisis celular de UT-7 y TF-1

Las células (4×10^6) fueron lavadas 3 veces con PBS por centrifugación a 350 *g* durante 10 min a 22 °C. Posteriormente, fueron lisadas con 130 μ L de *buffer* hipotónico (Tris 50 mM, pH 8; NaCl 150 mM; Tritón X-100 1%) conteniendo inhibidores de proteasas (PMSF 1 mM; aprotinina 1 μ g/mL y leupeptina 2 μ g/mL)

y Na_3VO_4 1 mM. Luego de 30 min de incubación a 0 °C el material insoluble fue removido por centrifugación a 17.300 *g* durante 15 min.

8.1.2. Lisis celular de SH-SY5Y

La monocapa celular (5×10^6 cél/mL) fue suspendida en 1,5 mL de PBS frío y centrifugada a 400 *g* durante 10 min. El sobrenadante fue descartado y el *pellet* celular fue lavado con PBS a fin de eliminar contaminantes del medio. Luego de centrifugar, el *pellet* fue tratado con 100 μL de *buffer* de lisis RIPA (50 mM Tris, pH 8,0, 150 mM NaCl, 1 % Nonidet P-40, 0,1 % SDS y 0,5 % de deoxicolato de Na), conteniendo inhibidores de proteasas (PMSF 1 mM, leupeptina 4 μM y pepstatina A 2 μM) en una relación de 200 $\mu\text{L}/10^7$ células. Luego de incubación con agitación frecuente por 1 h a 0 °C, se centrifugó a 15.000 *g* durante 15 min a 4 °C (Pregi *et al.*, 2006).

SDS-PAGE

La cuantificación de proteínas se llevó a cabo según el método de Lowry (1951). Las electroforesis fueron realizadas en condiciones nativas y desnaturizantes en geles con tamaño de poro (T%) apropiado para cada ensayo. Se usó una cuba electroforética (Miniprotean III, BioRad) y una fuente de poder (EPS 600, Pharmacia).

1) Sistema discontinuo en condiciones nativas:

Para la preparación del gel se partió de una solución madre de acrilamida/N,N'-metilenbisacrilamida en proporción 30:0,8 % en buffer Tris-HCl 0,125 M pH 6,8 en el gel concentrador y Tris-HCl 0,375 M pH 8,8 en el gel separador. Para el desarrollo electroforético se empleó Tris 0,025 M-Glicina 0,192 M pH 8,3. Como iniciador de la polimerización se empleó persulfato de amonio 0,5 g/L y como catalizador de la reacción N,N,N',N'-tetrametilendiamina (TEMED $\delta=0,77\pm 0,02$ g/l) 0,5 ml/L.

Para la siembra, se agregó a la muestra sacarosa con azul de bromofenol 0,01 g/L.

2) Electroforesis en condiciones desnaturizantes:

Se realizó la electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (*SDS-PAGE*) de las proteínas de los lisados celulares, empleando el sistema discontinuo de Laemmli (1970). El tratamiento con SDS equipara la densidad de carga superficial de las proteínas por lo que, empleando geles con tamaño de poro selectivo, la velocidad

electroforética de las proteínas se relaciona con las diferencias entre sus tamaños moleculares.

Las concentraciones en el gel concentrador fueron: acrilamida 39 g/L; bisacrilamida 1 g/L; SDS 1 g/L en Tris-HCl 125 mM, pH 6,8. Como catalizador de la polimerización se empleó N,N,N',N'-tetrametilendiamina (TEMED $\delta=0,77\pm 0,02$ g/L) 0,3 ml/L y persulfato de amonio 0,37 g/L como iniciador.

Las concentraciones en el gel separador fueron: acrilamida 78 g/L; bisacrilamida 2 g/L; SDS 1 g/L; TEMED 0,3 ml/L; persulfato de amonio 0,37 g/L en Tris-HCl 375 mM, pH 8,8.

Las proteínas fueron solubilizadas en el *buffer* de muestra (dual color protein *buffer* (Tris-HCl 0,0625 M, EDTA 0,4 mM, SDS 2% (p/v), glicerol 10% (v/v); DTT 0,5 M) por calentamiento a ebullición durante 4 min. Una masa determinada de proteínas fue sembrada en cada calle y en cada placa fue incluido un marcador de pesos moleculares precoloreado.

La electroforesis fueron desarrolladas a corriente constante de 20 mA durante el proceso de isotacoforesis en el gel concentrador y de 25 mA durante el desarrollo electroforético en el gel separador.

Las proteínas separadas por electroforesis fueron electrotransferidas a membranas de nitrocelulosa (NC) a 350 mA y 100 V por 90 min, siguiendo la metodología descrita por Towbin y colaboradores (1979).

Previo a la transferencia, las NC y los geles fueron hidratados durante 30 min en el *buffer* de transferencia (Tris 25 mM; glicina 195 mM; SDS 0,05%, pH 8,3; metanol 20%, v/v).

Al finalizar la transferencia, las NC fueron lavadas varias veces con *buffer* TBS (Tris 25 mM; NaCl 137 mM; KCl 3 mM; pH 7,4). Los sitios de unión inespecíficos fueron bloqueados con leche descremada 5% (p/v) en TBS-Tween 20 0,1% (TBS-T) durante 1 h. Luego, las NC fueron incubadas durante toda la noche a 4 °C con una dilución de anticuerpo primario con TBS-T.

Se utiliza la evaluación de actina como control de la cantidad de proteínas totales sembrada en cada calle, ya que es una proteína celular cuya concentración se mantiene constante en todas las células y no se modifica por los tratamientos.

Luego de 3 lavados de 10 min cada uno con TBS-T se procedió a incubar las NC durante 1 h con agitación, en presencia del anticuerpo secundario correspondiente, conjugado con peroxidasa diluido 1:1000 en TBS-T. Las proteínas no unidas fueron removidas mediante un procedimiento de lavado igual al anteriormente explicado. Las bandas fueron reveladas por quimioluminiscencia utilizando un equipo Dark Box II Fujifilm Intelligent acoplado a una cámara

digital. En la reacción enzimática ocurre oxidación del luminol en presencia de H_2O_2 por acción de la peroxidasa, obteniéndose un compuesto excitado que emite luz al retornar a su estado basal. La solución reveladora posee fenoles para aumentar la luz emitida aproximadamente 1000 veces además de extender el tiempo de emisión de la misma. Las bandas fueron visualizadas mediante el uso del programa Image Reader LAS-1000.

9. EVALUACIÓN DE LOS NIVELES DE ARN MENSAJERO

Para analizar la expresión génica de distintas proteínas fue utilizada la técnica de RT-PCR (*reverse transcriptase-polymerase chain reaction*). Dicha metodología consta de dos etapas: uso de oligo dTs (complementario a la cola poli A de los ARNm) como *primer* para la reacción de transcripción reversa de la cual se obtiene ADN copia (ADNc) a partir de ARNm, seguido de la amplificación mediante PCR y el uso de *primers* específicos de los ADNc correspondientes a los ARNm de interés.

9.1 Extracción de ARN total

El ARN total de 4×10^6 células fue extraído mediante incubación durante 5 min a temperatura ambiente con 0,5 mL de reactivo de fenol e isotiocianato de guanidina (Trizol Reagent), de acuerdo al método de Chomczynski y Sacchi (1987). Se agregó 0,1 mL de cloroformo y se agitó vigorosamente durante 15 s. Luego de 3 min, se centrifugó por 15 min a 9500 *g* a 4 °C. Se descartó la fase orgánica. Se agregaron 0,25 mL de alcohol isopropílico a la fase acuosa y se incubó 10 min a temperatura ambiente. Al finalizar este período, se centrifugó 10 min a 9.500 *g*.

El ARN contenido en el *pellet* fue lavado con 0,5 mL de etanol 75% agitando vigorosamente y centrifugado a 7.500 *g* durante 5 min. El ARN fue disuelto en 30 μ L de H_2O -DEPC e incubado 10 min a 60 °C. Una alícuota de esta solución se utilizó para medir la absorbancia a 260 y 280 nm en espectrofotómetro. La concentración de ARN total fue calculada considerando que 1 unidad de densidad óptica a 260 nm corresponde a 40 μ g/mL de ARN simple cadena (Sambrook y Russel, 2001). La relación de A_{260}/A_{280} del ARN aislado se encontró entre 1,6 y 1,8. Estos valores concuerdan con los valores de preparaciones puras de ARN. En este paso se estudió la integridad del ARN mediante electroforesis en agarosa 1% (p/v) en *buffer* TEB (Tris 90 mM; EDTA 2 mM; ácido bórico 90 mM; pH 8 en H_2O -DEPC, v/v), conteniendo 0,5 mg/L de bromuro de etidio.

9.2. Obtención de ADN copia

El ADNc fue sintetizado a partir del ARN total extraído, por transcripción reversa de los ARNm utilizando oligo (dT) como *primer* y enzima transcriptasa reversa, empleando el *kit* optimizado “Ready To Go T-Primed First-Strand Kit”.

La síntesis de ADNc fue realizada a partir de 2,5 µg de ARN total, de acuerdo a las especificaciones del fabricante. El ADNc fue fraccionado y conservado a -20 °C hasta el momento de su utilización.

9.3. Amplificación de los fragmentos de ADNc por RT-PCR

Para comenzar la PCR, se preparó una mezcla de reacción en *buffer* Tris-HCl 10 mM, pH 8,3; KCl 50 mM; MgCl₂ 1,5 mM, conteniendo Taq polimerasa 25 U/mL; *primers* adecuados 0,25 µM y dNTPs 200 µM. Con el fin de optimizar las condiciones de amplificación, se estandarizaron las cantidades de ADNc inicial y temperatura de *annealing* (temperatura en la cual se unen los *primers* a las hebras de ADN) en un termociclador. Una vez decididos estos parámetros se realizó una curva de número de ciclos térmicos para evaluar la cantidad óptima de ciclos a utilizar.

Las condiciones seleccionadas para amplificar cada secuencia se muestran en la siguiente tabla:

	REpo	Rβcommon	GAPDH
ADNc inicial	1 µL (dilución 1/10)	1 µL (dilución 1/10)	1 µL (dilución 1/10)
Desnaturalización inicial	94 °C, 5 min	94 °C, 5 min	94 °C, 5 min
Cantidad de ciclos	35	40	40
Desnaturalización de cada ciclo	94 °C, 20 s	94 °C, 30 s	94 °C, 45 s
Primer <i>annealing</i>	56 °C, 30s	55 °C, 30 s	61 °C, 45 s
Elongación	72 °C, 40 s	72 °C, 20 s	72 °C, 45 s
Elongación final	60 °C, 7 min	72 °C, 10 min	72 °C, 5 min

Primers utilizados:REpo:

Forward: 5´ AATTCAAGGCTCAGAAGCGA 3´

Reverse: 5´ GGCAGAAACTCTGCTGTTCC 3´

Rβ common:

Forward: 5´ GGACAGVAAGACCGAGAC 3´

Reverse: 5´ CATAGGCAGCACCGACTC 3´

GAPDH:

Forward: 5´ TGATGACATCAAGAAGGTGGTGAAG 3´

Reverse: 5´ TCCTTGGAGGCCATGTAGGCCAT 3´

En cada ensayo de amplificación fue incluido un control negativo en el cual se excluyó el agregado de ADNc. El objetivo de este control fue comprobar que los diferentes reactivos empleados no se hubieran contaminado con ADN externo.

9.4. Análisis de los productos de amplificación

Los productos de PCR fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa 1,5% (p/v) con bromuro de etidio 0,005% (v/v). Cada producto de PCR (10 µL) fue mezclado con 4 µL de *buffer* de siembra (azul de bromofenol 0,25%, p/v; sacarosa 4%, p/v en *buffer* TEB) y sembrado en el gel. En sendas calles, se sembraron un marcador de pb como control del tamaño de los fragmentos amplificados y un control negativo de PCR. La electroforesis se desarrolló a 280 V durante 25 min en una cuba electroforética Liberty 2. Los productos de amplificación obtenidos fueron detectados mediante la observación en transiluminador de las señales emitidas por el bromuro de etidio intercalado en el ADNc. Los geles fueron fotografiados empleando una cámara digital (Kodak DC 120) y las fotografías, analizadas utilizando dos programas para digitalización de imagen (Array Gauge e Image Gauge, Fujifilm).

Los niveles de intensidad de las bandas fueron normalizados con respecto a los valores correspondientes al estándar interno GAPDH (Sambrook y Russell, 2001).

10. EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS FOSFORILADAS POR CITOMETRÍA DE FLUJO

Luego de lavar las células dos veces con PBS 2% de SFB (5x10⁵ células), fueron fijadas y permeabilizadas por 20 min a 4 °C con el *buffer* comercial *cytofix/Cytoperm*. Posteriormente fueron lavadas con *Perm Wash*, el *pellet* se lo

incubo con anticuerpo fosforilado humano por 30 min a 4 °C. Luego de lavar con *Perm Wash* se incubó con el segundo anticuerpo Alexa Fluor 488 durante 30 min a 4 °C. La expresión de la proteína fosforilada fue determinada por citometría de flujo y los datos analizados con el programa WinMDI 2.9.

11. CICLO CELULAR POR CITOMETRÍA DE FLUJO

Luego de los tratamientos, los cultivos celulares fueron lavados con PBS frío. El *pellet* fue resuspendido en etanol 70%. Las muestras fueron colocadas a -20 °C por al menos 16-24 h, posteriormente fueron lavadas con PBS e incubadas con 120 µg/mL de RNasa A, 0,05 ng/mL de Ioduro de propidio (IP) y PBS durante 1 h a 37 °C en oscuridad. Las muestras fueron analizadas con citometro de flujo. Los datos fueron analizados utilizando el programa WinMDI 2.9.

12. EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA PTP1B POR MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA

Las células (5×10^5) fueron lavadas dos veces con PBS 2% de SFB, fueron fijadas y permeabilizadas por 20 min a 4 °C con el *buffer* comercial *cytofix/Cytoperm*. Posteriormente fueron lavadas con *Perm Wash*, el *pellet* se lo incubo con el anticuerpo PTP1B humano por 30 min a 4 °C. Luego de lavar con *Perm Wash* se incubó con el segundo anticuerpo Alexa Fluor 488 durante 30 min a 4 °C, se realizó tinción nuclear con solución de Hoechst y se montaron los preparados en portaobjetos para observarlos al microscopio de fluorescencia.

13. EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA PTP1B Y R β c POR MICROSCOPIA CONFOCAL

Las células (5×10^5) fueron lavadas dos veces con PBS 2% de SFB, fueron fijadas y permeabilizadas por 20 min a 4 °C con el *buffer* comercial *cytofix/Cytoperm*. Posteriormente fueron lavadas con *Perm Wash*, el *pellet* se lo incubo con el anticuerpo de conejo PTP1B y anti R β c de ratón por 30 min a 4 °C. Luego de lavar con *Perm Wash* se incubó con el segundo anticuerpo Alexa Fluor 488 y Alexa Fluor 590 durante 30 min a 4 °C. Posterior a los lavados, se montaron los preparados en portaobjetos de polilisina y cubre para ser observados en microscopio confocal, con láseres Argón 488 y HeNe Green 543. Las imágenes fueron analizadas con el software de adquisición Olympus Fluoriew 5.0.

14. DETECCIÓN DE LA ACTIVIDAD DE PTP1B

14.1. Inmunoprecipitación

A partir de 5×10^6 de células, se realizó la lisis celular con 50 mM tris pH 8, Tritón X100 1%, 150 mM NaCl, durante 30 min a 0 °C. Luego de centrifugar a 13.000 *g* y 4 °C, se colectaron los sobrenadantes y se los incubó con anticuerpo monoclonal de ratón anti PTP1B humana concentración final de 2 µg/mL a 4 °C por 1 h en agitación suave. A continuación se agregó proteína A agarosa y luego de incubar toda la noche en agitación a 4 °C, los inmunocomplejos fueron colectados por centrifugación (15.000 *g*, 15 min) y lavados 2 veces con *buffer* de lisis.

14.2. Medición de la actividad enzimática

La actividad de PTP1B se determinó mediante la hidrólisis del sustrato de fosfatasas p-nitrofenilfosfato (p-NPP) provisto por el kit ALP 405 AA líquida.

Los inmunoprecipitados de PTP1B a partir de membranas eritrocitarias fueron lavados con *buffer* de ensayo (dietanolamina 1,0 M; Mg²⁺ 0,5 mM). La actividad de fosfatasas fue determinada en un volumen final de 200 µL por incubación de los inmunoprecipitados de PTP1B en *buffer* de ensayo conteniendo p-nitrofenil fosfato (p-NPP) 2,4 mM. La densidad óptica del producto de hidrólisis del p-NPP fue medida a 415 nm en un espectrofotómetro de placas. La corrección por hidrólisis de p-NPP no enzimática fue evaluada mediante la detección de la absorbancia en ausencia de enzima (Callero *et al*, 2007).

15. CUANTIFICACIÓN DEL CONTENIDO INTRACELULAR DE CALCIO POR CITOMETRÍA DE FLUJO

A fin de cuantificar la variación del contenido de calcio intracelular [Cai] luego de los diferentes tratamientos, las células fueron lavadas e incubadas con la sonda fluorescente FLUO-4 AM en una concentración final de 2,5 µM, a 25 °C durante 30 min. El reactivo FLUO-4 AM es un indicador de calcio incoloro que entra a la célula libremente y es hidrolizado por esterasas intracelulares no específicas resultando en un producto fluorescente al unirse al [Cai] libre. Luego de ser lavadas con PBS, las células fueron resuspendidas en PBS y luego de 30 min, analizadas por citometría de flujo.

16. DESCARTE DEL MATERIAL BIOLÓGICO Y RESIDUOS PELIGROSOS

El material que estuvo en contacto con el colorante de Hoechst y los geles conteniendo bromuro de etidio fueron inactivados bajo luz UV durante 1 h y, posteriormente, descartados como residuos peligrosos a través del Servicio de Higiene y Seguridad de la FCEN.

Los animales de experimentación y el material de descarte (plástico, guantes, geles de poliacrilamida) fueron eliminados como residuo peligroso a través del Servicio de Higiene y Seguridad de la FCEN. De la misma forma fueron descartadas las soluciones de DAF y las soluciones conteniendo solventes orgánicos (metanol) o ácidos (ácido acético).

Los líquidos biológicos y las células fueron descontaminados mediante el agregado de hipoclorito de sodio 5% durante 2 h, previo al lavado.

17. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO

Los resultados se expresan como media aritmética y error estándar de la media (Media \pm SEM) como medida de tendencia central y de dispersión, respectivamente.

La prueba de Kruskal-Wallis se utilizó para comparar más de dos grupos independientes. De hallarse diferencias significativas, posteriormente se realizó la prueba de Mann-Whitney entre dos grupos para comparar distribuciones poblacionales. Diferencias de hasta $P < 0,05$ fueron consideradas estadísticamente significativas.

CAPÍTULO I

CARACTERIZACIÓN Y FUNCIÓN DE LA ERITROPOYETINA CARBAMILADA

Con el objeto de evitar los efectos secundarios y/o de cambiar la actividad de la Epo, conceptos que fueron explicados en la Introducción, se han obtenido proteínas derivadas modificadas y péptidos sintéticos con variada actividad biológica (Fisher, 2003; Leist *et al*, 2004).

Las modificaciones químicas de la Epo, como guanidación o carbamilación de residuos de lisina, altera no sólo la conformación molecular sino también su actividad biológica (Mun y Golper, 2000).

Cuando todos los residuos de lisina han sido transformados en homocitrulina por carbamilación, el producto resultante, llamado cEpo por algunos autores, deja de mostrar actividad hematopoyética mientras que mantiene su actividad neuroprotectora, abriendo de esta manera, un camino promisorio para la aplicación farmacológica de la nueva molécula.

El tratamiento en ratas con cEpo, con concentraciones de cianato similares a las que pueden encontrarse *in vivo* en pacientes urémicos, resultó ineficaz para modificar los parámetros hematológicos, sugiriendo la pérdida de actividad biológica de la Epo (Park *et al*, 2004).

Como primer paso, hemos obtenido cEpo y caracterizado su función sobre células eritroides y neuronales, para luego poder comparar los efectos eritropoyético y no-eritropoyético de esta proteína modificada con los de la Epo. A continuación, se muestran los resultados de ensayos *in vitro* con líneas celulares y cultivos de células progenitoras eritroides realizados con el fin de evaluar funciones características de la Epo, tales como estímulo de la proliferación, inhibición de la apoptosis y modulación de la respuesta inflamatoria.

I.1. EVALUACIÓN DEL PROCESO DE CARBAMILACIÓN

La carbamilación de la eritropoyetina, luego de la incubación de Epo con cianato de potasio por 48 h y posterior diálisis, fue analizada por electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones nativas, electrotransferencia a membrana de nitrocelulosa y detección por reacción inmunológica con anticuerpo anti Epo. Como control, se realizaron los mismos pasos del proceso de carbamilación de la Epo pero sin la presencia de cianato de potasio (Epo lavada, Epo_L) (Figura 1).



Figura 1: Evaluación del cambio de estructura de Epo por carbamilación.

Luego del proceso de carbamilación, la cEpo fue analizada, en comparación con Epo_L, por electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones nativas y posterior *immunoblotting*. La inmunodetección, correspondiente a 10 µg de proteína, fue realizada usando un anticuerpo anti Epo, un segundo anticuerpo anti IgG de conejo conjugado con peroxidasa y posterior revelado por quimioluminiscencia. La figura es representativa de 3 ensayos con resultados similares.

En la figura 1 se observa una movilidad diferencial entre Epo y cEpo. La movilidad electroforética de cEpo, mayor con respecto a la de Epo_L, es debido a que, la unión del grupo cianato bloquea las cargas positivas de los grupos lisina de la Epo. Esto genera mayor exposición de las cargas negativas de la proteína y, por lo tanto, un aumento de la migración electroforética en condiciones nativas debido a un aumento neto de la relación carga/masa.

Los resultados muestran el reconocimiento de la cEpo por el anticuerpo anti Epo. La Epo presenta varias isoformas que difieren en la variedad y cantidad de su contenido en hidratos de carbono. Esto explica la presencia de diferentes bandas en el perfil de *Western blotting*.

I.2. EFECTO DE LA ERITROPOYETINA CARBAMILADA SOBRE EL LINAJE ERITROIDE

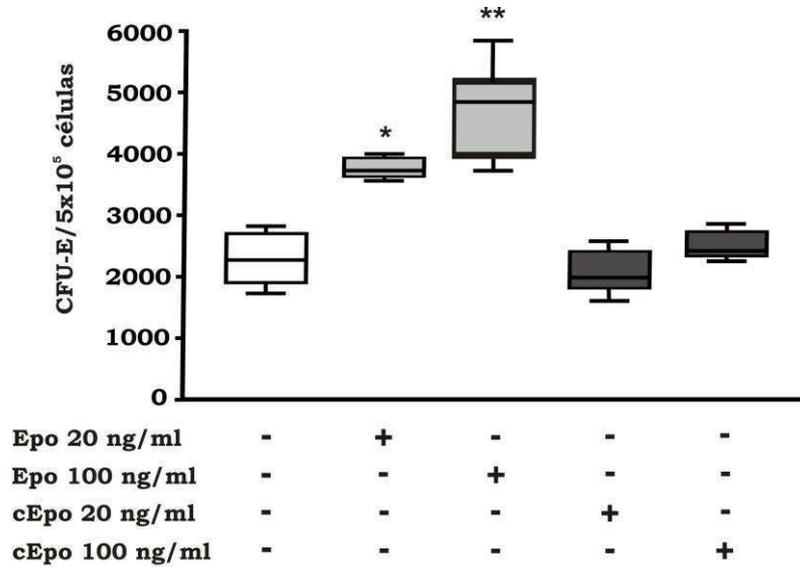
Para evaluar si cEpo manifiesta alguna función eritropoyética, se decidió estudiar sus efectos a nivel fisiológico sobre progenitores eritroides de médula ósea de ratón y en cultivos de líneas celulares con capacidad de diferenciación eritroide; UT-7, TF-1 y K562, para luego compararlos con la acción conocida que tiene la Epo nativa.

I.2.1. EFECTO DE ERITROPOYETINA CARBAMILADA SOBRE EL DESARROLLO DE PROGENITORES ERITROIDES

Con el fin de investigar si la cEpo posee acción eritropoyética sobre células fisiológicas, se probó su efecto en cultivos de células de médula ósea de ratones

Balb/c para evaluar el desarrollo de CFU-E (célula progenitora que da origen a una colonia conformada por un grupo de 8 a 65 células parcial o totalmente hemoglobinizadas).

A)



B)

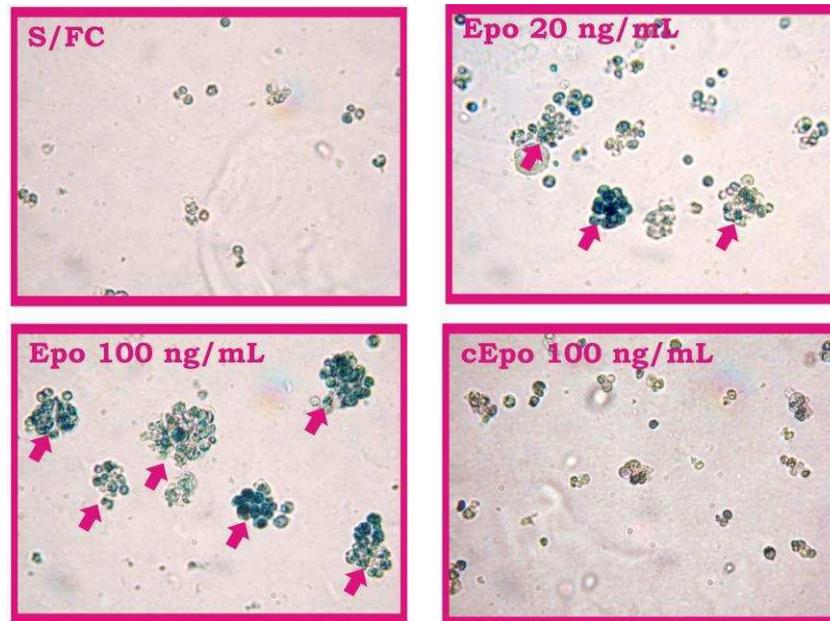


Figura 2: Efectos de Epo y cEpo sobre el desarrollo de colonias eritroides. (A) Células progenitoras eritroides de m.o. de ratones Balb/c (2×10^5), fueron estimuladas por 48 h con 20 ng/mL o 100 ng/mL de Epo o cEpo, en medio semisólido de metilcelulosa. Control: cultivo en ausencia de factores de crecimiento (S/FC). Posteriormente se realizó una tinción con 2-7 diaminofluoreno para visualizar las CFU-E, realizando el recuento de colonias hemoglobinizadas en microscopio invertido. Epo vs. cEpo o S/FC, $**P < 0,01$, $*P < 0,05$ ($n=4$). (B) Morfología de cultivos de células de m.o. (400x). Las flechas indican CFU-E (colonias con ≥ 8 células hemoglobinizadas).

La Epo recombinante estimuló el desarrollo de un número importante de colonias, en forma dosis-respuesta, mientras que los cultivos con cEpo tuvieron un desarrollo de colonias eritroides similar al de los cultivos no estimulados (S/FC). La observación del crecimiento de colonias eritroides en los cultivos controles no estimulados con Epo podría explicarse por el desarrollo y diferenciación de las células más maduras de la progenie eritroide de los ratones, estimuladas *in vivo* por la hormona circulante endógena.

I.2.2. EFECTO DE LA ERITROPOYETINA CARBAMILADA SOBRE LA LÍNEA CELULAR UT-7

La línea celular UT-7 tiene capacidad de diferenciación hacia el linaje eritroide y necesita de la presencia de Epo para su supervivencia. Como mencionamos anteriormente, se estudió la acción de cEpo para compararla con la función de la Epo nativa.

I.2.2.A. Efecto de la eritropoyetina carbamilada sobre la morfología de las células UT-7

Análisis por microscopía óptica

Se investigaron los cambios morfológicos sufridos por las células UT-7 cuando fueron incubadas en presencia de cEpo. Se realizaron cultivos celulares en ausencia o presencia de Epo y cEpo y como control, se utilizó Epo_L.

En la Figura 3A se muestran las características morfológicas de las células UT-7, observadas por microscopía óptica. El deterioro celular de los cultivos realizados en presencia de cEpo es similar al observado en células cultivadas en ausencia del factor de crecimiento (S/FC). Por comparación de los resultados obtenidos en presencia de Epo y Epo_L, puede determinarse que los lavados realizados durante el procedimiento de carbamilación de la proteína (Epo_L) no introducen modificaciones que afecten la morfología celular.

Análisis por microscopía electrónica

Después de realizados los cultivos celulares en presencia de Epo o de cEpo, se prepararon muestras para análisis por microscopía electrónica de barrido (MEB). Las mismas fueron fijadas, deshidratadas, sometidas a punto crítico y metalizadas

para su observación. El análisis por MEB permitió observar con más detalle la morfología celular.

Las células cultivadas en presencia de Epo mostraron estructura y tamaño uniforme. En cambio, las expuestas a cEpo presentaban alteraciones morfológicas y gran variación de tamaño (Figura 3B).

En la figura 3 podemos observar, tanto por microscopía óptica como en MEB, que la morfología de las células UT-7 dejó de ser redondeada y uniforme cuando son expuestas a cEpo, mientras que tanto en presencia de Epo como Epo_L, presentan su morfología característica cuando se encuentran en crecimiento normal.

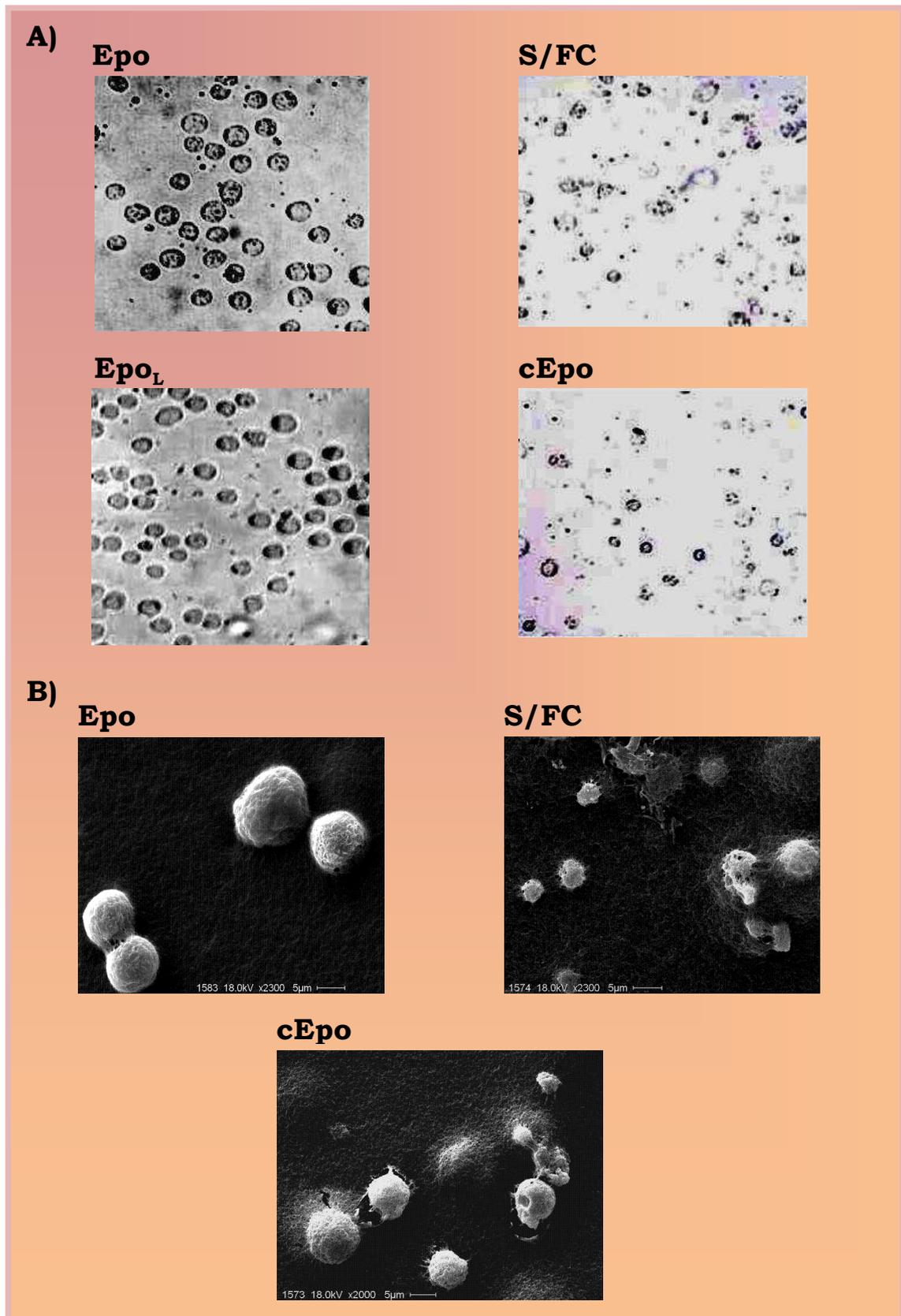


Figura 3: Aspecto morfológico de células UT-7 cultivadas en presencia de cEpo. Las células fueron incubadas en ausencia o en presencia de 20 ng/mL de Epo, Epo_L o cEpo durante 48 h. Se presentan las imágenes obtenidas en microscopio invertido con magnificación de 400x (A) y en microscopio electrónico de barrido con magnificación de 2000-2300x (B).

I.2.2.B. Efecto de la eritropoyetina carbamilada sobre la viabilidad y proliferación de las células UT-7

Con el fin de analizar si, además de los cambios morfológicos observados anteriormente, la presencia de cEpo afectaba la viabilidad celular, se determinó el porcentaje de células vivas en cultivos de la línea UT-7 por el método de exclusión de colorante supravital (Figura 4).

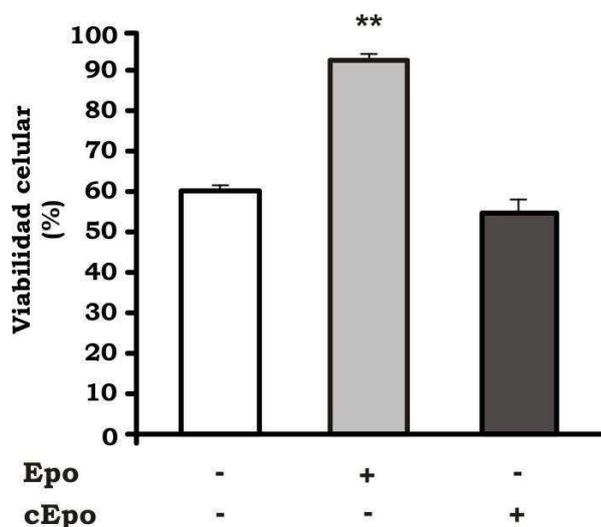


Figura 4: Efecto de cEpo sobre la viabilidad celular de la línea UT-7. Luego de incubar células UT-7 durante 48 h sin Epo o con 20 ng/mL de Epo o cEpo, se realizó el recuento diferencial de células vivas y muertas por tinción con colorante azul Tripán en cámara de Neubauer. Diferencias significativas: Epo vs. cEpo o S/FC, **P<0,01 (n=4).

En la Figura 4 se observa una significativa disminución de la viabilidad en cultivos expuestos a cEpo. Se puede sugerir que, a diferencia de Epo, la cEpo no mantiene la viabilidad de las células UT-7. Además, se pudo determinar que la presencia de cEpo no produce un efecto tóxico en las células, ya que no existe una disminución significativa de la viabilidad con respecto a las células desarrolladas en ausencia de Epo. De los resultados se puede deducir que no quedaron restos de cianato, resultado del proceso de carbamilación. Esto fue confirmado en un ensayo similar en el que se agregó al cultivo el último lavado del proceso de carbamilación sin observarse efectos citotóxicos (datos no mostrados).

La proliferación y viabilidad celular, fueron también evaluados por el método colorimétrico de MTT. El colorante es reducido a formazán por una enzima mitocondrial, siendo indicio de la cantidad de células viables (Figura 5).

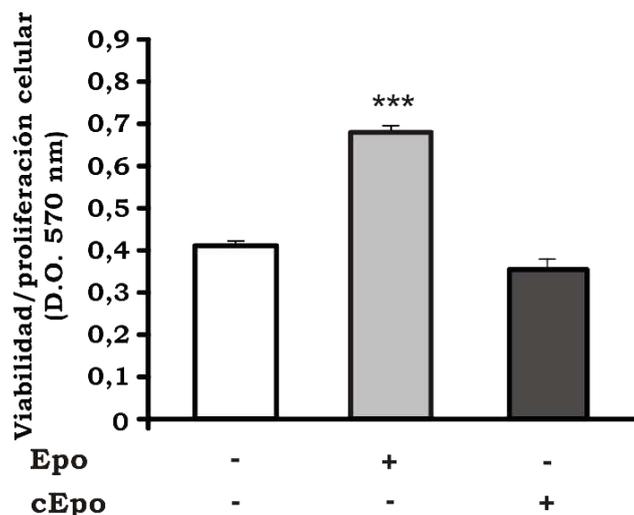


Figura 5: Efecto de cEpo sobre la proliferación y viabilidad de células UT-7.

Células UT- 7 fueron incubadas en ausencia o en presencia de 20 ng/mL de Epo o cEpo durante 48 h. Finalizado el cultivo, se realizó la exposición por 2 h a MTT. El producto coloreado solubilizado en isopropanol/HCl, fue cuantificado por su absorbancia a 570 nm con referencia a 655 nm. Diferencias significativas: Epo vs. cEpo o S/FC, ***P<0,001 (n=6).

Solamente Epo fue capaz de aumentar significativamente la viabilidad/proliferación de las células UT-7, mientras que la cEpo es incapaz de inducir el desarrollo de esta línea celular, en comparación con los cultivos en presencia de Epo.

Los resultados mostraron una correlación entre la determinación de la viabilidad celular en cámara de Neubauer y el ensayo de proliferación celular por medición espectrofotométrica de MTT.

1.2.2.C. Efecto de la eritropoyetina carbamilada sobre células UT-7 en ensayos de apoptosis

Con el fin de determinar si la disminución de la viabilidad de las células UT-7 incubadas en presencia de cEpo podría deberse a un estímulo del proceso de apoptosis, se realizaron cultivos celulares sometidos a los mismos tratamientos en los que se estudió viabilidad y proliferación celular.

Evaluación de núcleos apoptóticos

Durante el proceso de apoptosis ocurren cambios morfológicos y bioquímicos, entre los cuales se encuentran la fragmentación y condensación de la cromatina producidos por la activación de endonucleasas. Este cambio en la morfología

nuclear puede ser observado utilizando el colorante fluorescente Hoechst, el cual por su capacidad para intercalarse en el ADN, permite la visualización de los núcleos por microscopía de fluorescencia. Los núcleos intactos se observaron homogéneamente teñidos, mientras que los núcleos apoptóticos tenían menor tamaño y más intensa fluorescencia debido a la condensación de la cromatina (Figura 6).

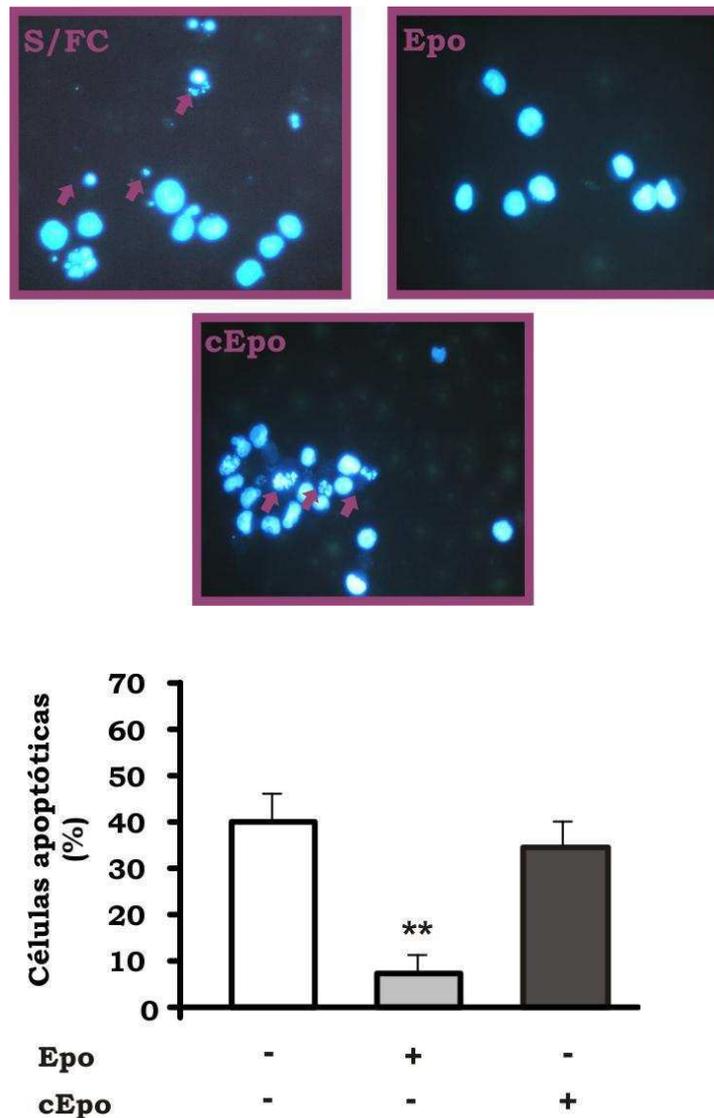


Figura 6: Investigación de la posible acción antiapoptótica de Epo y cEpo sobre células UT-7. Los cultivos fueron incubados con 20 ng/mL de Epo o cEpo o sin factor de crecimiento (S/FC) durante 48 h. A continuación, se realizó la tinción de Hoechst y el recuento diferencial de núcleos apoptóticos sobre un total de 600 células (400x). Diferencias significativas: Epo vs. S/FC, ** P<0,01; cEpo vs. S/FC, NS.

El análisis del recuento diferencial de núcleos apoptóticos muestra el efecto antiapoptótico de la Epo. Por el contrario, la presencia de cEpo no modificó el

nivel de apoptosis de las células UT-7 observado en cultivos realizados en ausencia del factor de crecimiento.

Clivaje de PARP

PARP (*poly-adenosin ribose polymerase*) es una proteína nuclear que protege al ADN de su degradación. El clivaje de esta proteína es signo de apoptosis debido a que es sustrato de la caspasa 3 activada. Se decidió analizar la proteína PARP para corroborar los resultados obtenidos por la técnica de Hoechst (Figura 7).

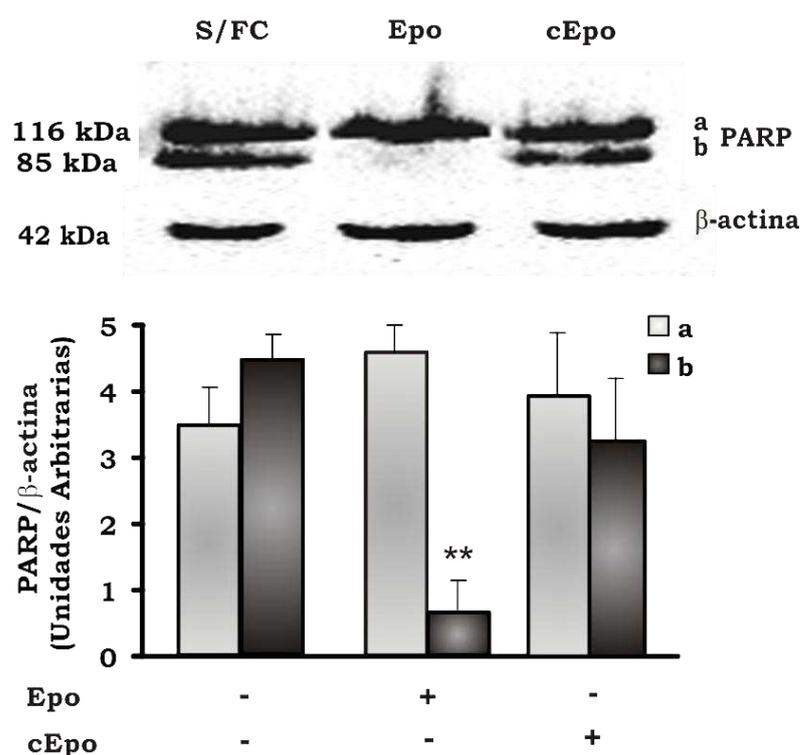


Figura 7: Clivaje de la proteína PARP en cultivos de células UT-7 en presencia de Epo o cEpo. Después de los tratamientos (sin factor de crecimiento, con Epo o con cEpo), los lisados celulares fueron analizados por SDS-PAGE e *immunoblotting*. Se realizó la detección por reacción con anticuerpo monoclonal anti PARP y segundo anticuerpo anti IgG de ratón conjugado con peroxidasa, revelando por quimioluminiscencia. La detección de β -actina se utilizó como control de carga proteica. El *blot* es representativo de los resultados de 6 ensayos y la media de la densidad de banda de cada fracción de PARP con respecto a la de β -actina es indicada en cada barra. Diferencias significativas: Epo (b) vs. S/FC (b), $**P < 0,01$ (n=6).

Las células cultivadas en ausencia de Epo presentaron una banda de clivaje de 85 kDa de intensidad similar a las de las células que fueron incubadas en

presencia de cEpo. En cambio, se observa mayor nivel de la proteína intacta en las muestras obtenidas a partir de células incubadas con Epo.

Translocación de fosfatidilserina

Una de las modificaciones celulares que ocurren durante la muerte celular programada es la pérdida de asimetría de la membrana plasmática. En el proceso de apoptosis, el fosfolípido de membrana fosfatidilserina (PS) se transloca de la capa interna de la bicapa lipídica hacia la capa externa, quedando de esta manera expuesto hacia el espacio extracelular.

Se estudió la translocación de PS, detectando su unión a anexina V-FITC por citometría de flujo (Figura 8).

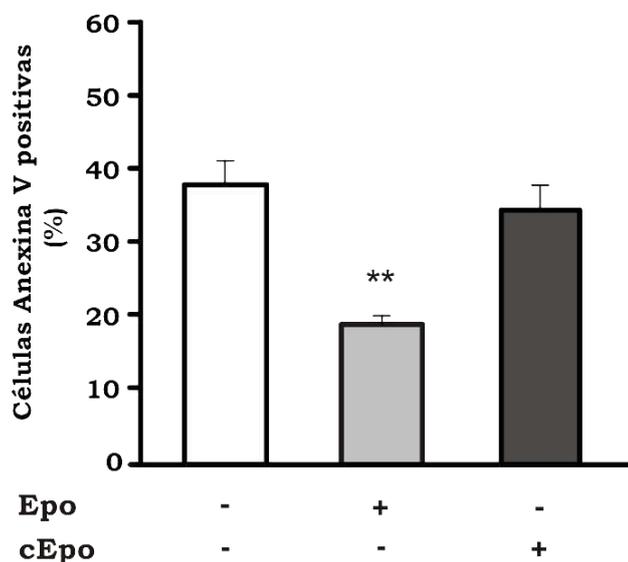


Figura 8: Exposición de fosfatidilserina en cultivos de células UT-7 en presencia de Epo o cEpo. Células UT-7 fueron incubadas durante 48 h en ausencia de factor de crecimiento o en presencia de Epo o cEpo (20 ng/mL). Luego de la incubación con anexina V-FITC los cultivos fueron analizados por citometría de flujo. Diferencias significativas: Epo vs. cEpo o S/FC, **P<0,01; cEpo vs. S/FC, NS (n=4).

Los resultados de la Figura 8 muestran un aumento del porcentaje de células anexina V positivas en los cultivos realizados en presencia de cEpo o en ausencia de Epo con respecto a los estimulados con Epo.

Tanto la viabilidad/proliferación estudiada por el método de exclusión celular de colorante supravital y por el método de MTT, como la apoptosis analizada mediante la tinción de Hoechst, el clivaje de PARP y la translocación de PS, se

pudo advertir que la cEpo no mantiene la supervivencia de las células UT-7, demostrando que la modificación molecular realizada sobre la Epo anula el efecto que la hormona nativa ejerce como factor antiapoptótico y de crecimiento sobre éstas células. El aumento de núcleos apoptóticos en cultivos incubados con cEpo permitiría explicar la presencia de los cuerpos de tamaño reducido observados por microscopía electrónica, ya que la contracción celular es una característica morfológica de apoptosis. Los resultados indican que la cEpo pierde su función como factor de crecimiento eritroide en esta línea celular.

I.2.3. EFECTO DE ERITROPOYETINA CARBAMILADA SOBRE LA LÍNEA CELULAR TF-1

I.2.3.A. Efecto de la eritropoyetina carbamilada sobre la viabilidad y proliferación de las células TF-1

Otra línea celular con capacidad de diferenciación eritroide es la de células TF-1, la cual responde a Epo pero se desarrolla en presencia de IL-3 o GM-CSF, por el cual se estudió el efecto de cEpo en ensayos similares a los realizados con células UT-7. En la Figura 9 se presentan los resultados de crecimiento y viabilidad celular.

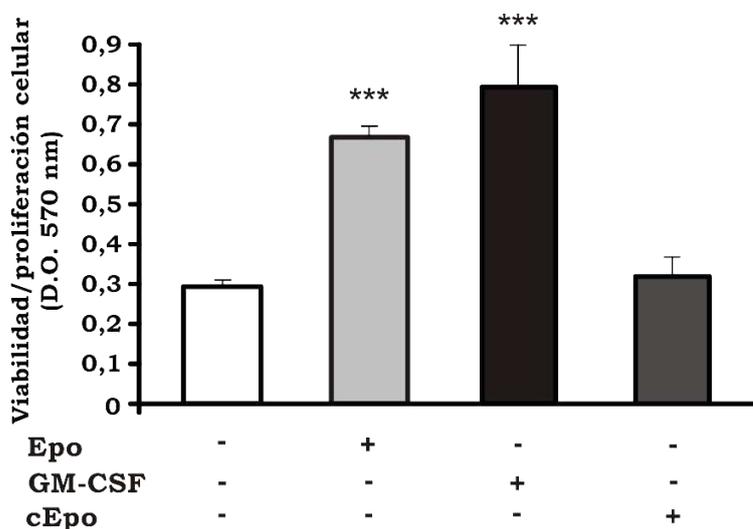


Figura 9: Comparación de los efectos de Epo, cEpo y GM-CSF sobre la viabilidad de células TF-1. Las células fueron privadas de factor de crecimiento por 18 h (t = 0) y luego incubadas en presencia de Epo, cEpo (20 ng/mL) o GM-CSF (4 ng/mL) o sin factor de crecimiento (S/FC) por 24 h. Se evaluó la viabilidad celular por el ensayo de MTT. Diferencias significativas: Epo o GM-CSF vs. S/FC, ***P<0,001; cEpo vs. S/FC, NS (n=4).

En la Figura 9 se muestra que la cEpo no permite mantener la viabilidad y proliferación celular en la línea TF-1, mientras que en presencia de ambos factores de crecimiento, Epo o GM-CSF, se mantuvo intacta la viabilidad celular.

I.2.3.B. Efecto de la eritropoyetina carbamilada sobre células TF-1 en ensayos de apoptosis

Evaluación de núcleos apoptóticos

En primer lugar se evaluaron los cambios de morfología nuclear utilizando el colorante de Hoechst para la visualización de los núcleos apoptóticos por microscopía de fluorescencia (Figura 10).

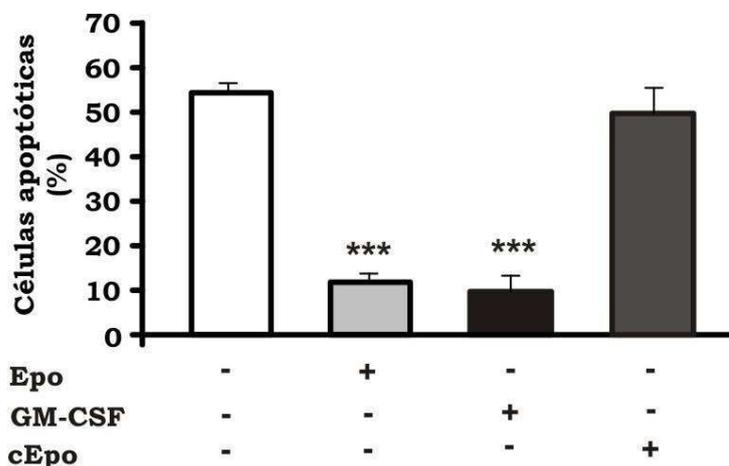


Figura 10: Acción de Epo, GM-CSF y cEpo sobre la muerte celular programada de células TF-1. Los cultivos fueron privados de su factor de crecimiento por 18 h y luego incubados con Epo (20 ng/mL), GM-CSF (4 ng/mL), cEpo (20 ng/mL), o sin factor de crecimiento (S/FC) durante 48 h. A continuación, se realizó la tinción de Hoechst y el recuento diferencial de núcleos apoptóticos. Diferencias significativas: Epo o GM-CSF vs. S/FC, ***P<0,001; cEpo vs. S/FC, NS (n=6).

La evaluación de apoptosis por microscopía de fluorescencia (Figura 10) mostró que las células que fueron cultivadas en ausencia de ambos factores de crecimiento o en presencia de cEpo presentaban un aumento significativo de los núcleos apoptóticos, a diferencia de los cultivos en presencia de Epo o de GM-CSF que evidenciaron la habilidad antiapoptótica de estos factores.

Clivaje de la proteína PARP

Como en la línea celular UT-7, también estudiamos la apoptosis mediante el clivaje de la proteína PARP por electroforesis y posterior electrotransferencia en las células TF-1 (Figura 11).

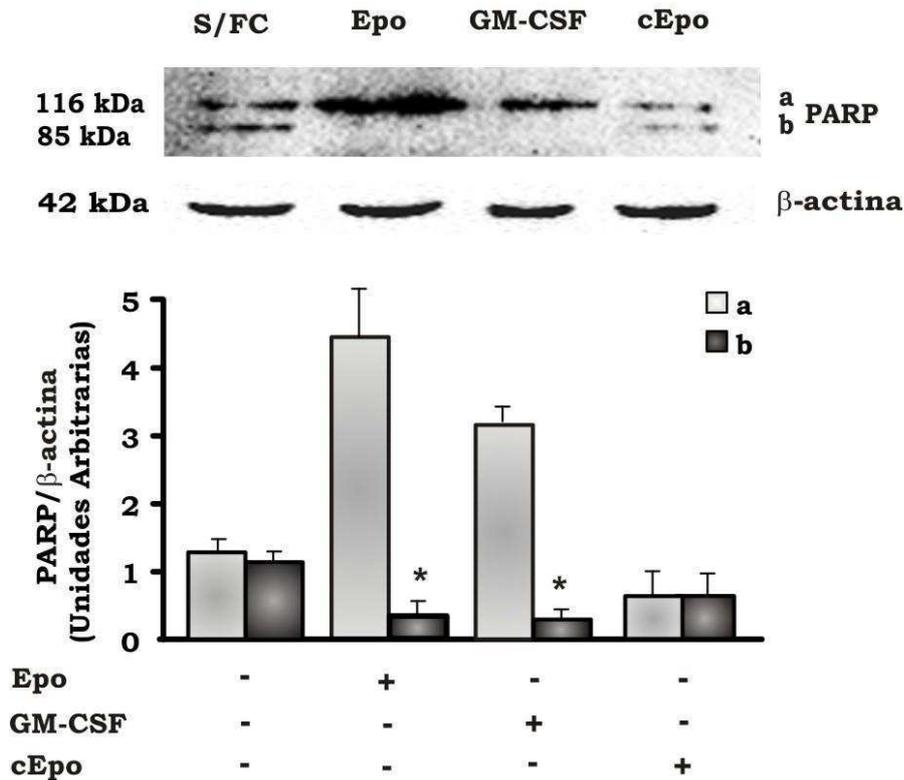


Figura 11: Clivaje de PARP en cultivos de células TF-1 estimulados por distintos factores. Las células TF-1, fueron privadas de factores de crecimiento por 18 h y luego expuestas a Epo (20 ng/mL), GM-CSF (4 ng/mL) o cEpo (20 ng/mL) por 48 h. Los lisados celulares fueron analizados por SDS-PAGE e *immunoblotting*. Se realizó la detección por reacción con anticuerpo monoclonal anti PARP y con anticuerpo anti IgG de ratón conjugado con peroxidasa, revelando por quimioluminiscencia. La detección de la proteína β-actina se utilizó como control de carga proteica. Diferencias significativas: Epo (b) o GM-CSF (b) vs. S/FC (b), *P<0,05 (n=3).

Los resultados obtenidos por *Western blotting* avalan lo observado por la técnica de Hoechst. Las células en presencia de factores de crecimiento presentaron una banda de clivaje de intensidad similar mientras que la presencia de cEpo produjo una banda de clivaje de PARP (85 kDa) claramente más intensa,

similar a la observado en ausencia de factores de crecimiento, y contrariamente a lo observado con GM-CSF y Epo.

Translocación de fosfatidilserina

Mediante la técnica de citometría de flujo se analizó la translocación de PS como marcador de apoptosis.

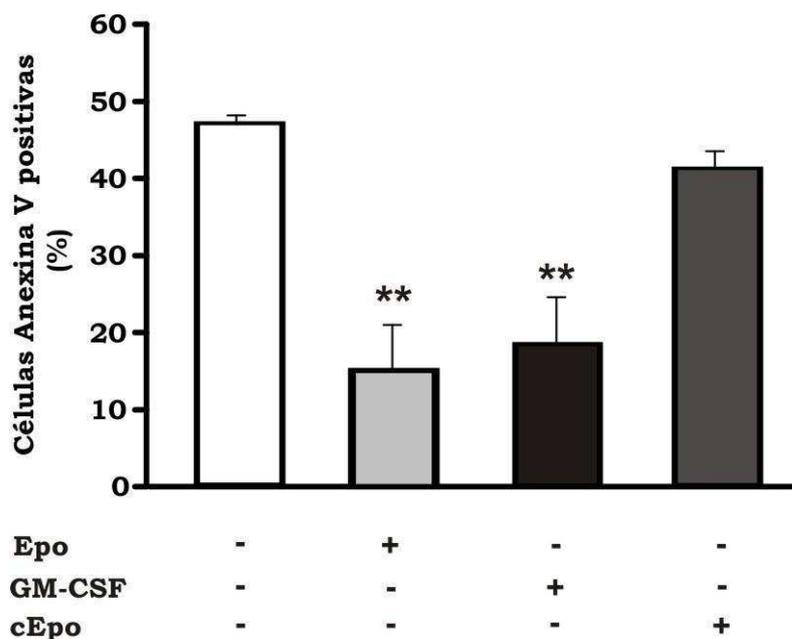


Figura 12: Translocación de fosfatidilserina en cultivos de células TF-1 estimulados por distintos factores. Las células TF-1 fueron privadas de factores de crecimiento por 18 h y posteriormente cultivadas durante 48 h a 37 °C en ausencia de factor de crecimiento o en presencia de Epo (20 ng/mL), GM-CSF (4 ng/mL) o cEpo (20 ng/mL). Luego, fueron incubadas con anexina V-FITC y analizadas por citometría de flujo. Diferencias significativas: Epo o GM-CSF vs. S/FC, **P<0,01 (n=4).

A diferencia de los cultivos desarrollados en presencia de Epo o de GM-CSF, factores que muestran una acción antiapoptótica, se puede observar un aumento del porcentaje de células anexina V positivas en los cultivos tratados con cEpo, resultado similar al de los cultivos realizados en ausencia de factores de crecimiento.

Así como en las células UT-7, en las células TF-1 pudimos observar que la cEpo no tiene ningún efecto sobre las mismas, ya sea a nivel de la viabilidad o de proliferación celular. La cEpo no estimuló el crecimiento de las células, así como

tampoco mostró acción antiapoptótica. Por el contrario, los factores de crecimiento, ya sea GM-CSF o Epo, efectuaron sus dos funciones conocidas, eritropoyética y antiapoptótica.

I.2.4. EFECTO DE ERITROPOYETINA CARBAMILADA SOBRE LA LÍNEA CELULAR K562

I.2.4.A. Efecto de la eritropoyetina carbamilada sobre la viabilidad y proliferación de las células K562

En otros estudios desarrollados en nuestro laboratorio, se demostró el efecto protector de Epo frente a la acción proapoptótica del factor de necrosis tumoral TNF- α en células de la línea de origen eritroleucémico K562 cuando se encuentran en estadio de diferenciación eritroide (Vittori *et al*, 2010). Sin embargo, se desconoce si la cEpo puede ejercer una acción similar.

Células K562 fueron inducidas a diferenciación eritroide con hemina y luego se las incubó con TNF- α . Se analizó la proliferación y viabilidad celular por la técnica de MTT.

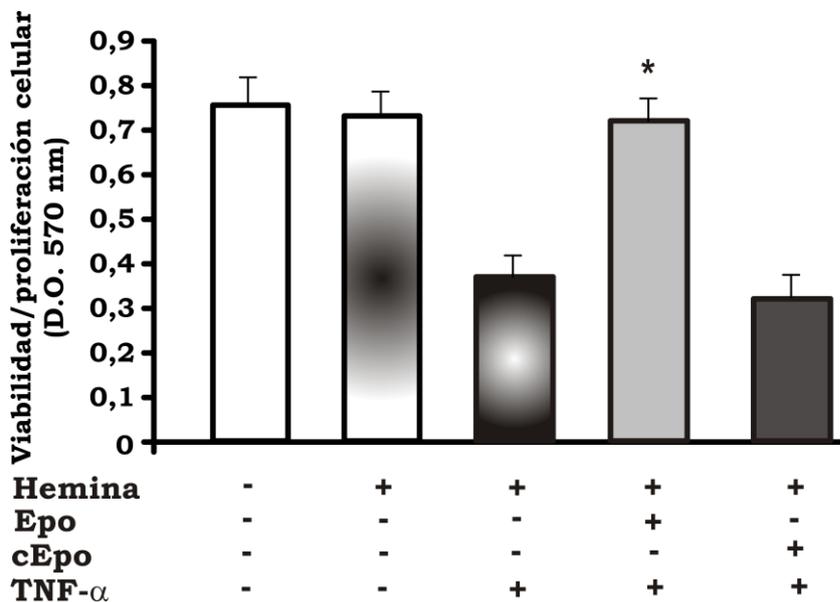


Figura 13: Comparación de la acción de Epo y cEpo sobre células K562 inducidas a apoptosis por TNF- α . Las células K562 (control) fueron diferenciadas con hemina 30 μ M en presencia de 30 ng/mL TNF- α por 48 h. Algunos cultivos diferenciados, fueron pretratados con Epo o cEpo (25 ng/mL) durante 18 h antes de la exposición a TNF- α . Posteriormente, se evaluó la viabilidad celular mediante el ensayo de MTT. Diferencias significativas: Hemina+Epo+TNF- α vs. Hemina+TNF- α , *P<0,05; Hemina+cEpo+TNF- α vs. Hemina+TNF- α , NS (n=4).

El pretratamiento con cEpo no produjo el mismo efecto que Epo frente a la acción proapoptótica de TNF- α (Figura 13). Se puede observar que cEpo, a diferencia de Epo, no genera protección en las células K562, cuando son diferenciadas y expuestas a la citoquina proinflamatoria TNF- α .

I.2.4.B. Efecto de la eritropoyetina carbamilada sobre células K562 en ensayos de apoptosis

Evaluación de núcleos apoptóticos

La muerte celular programada también fue estudiada mediante microscopía de fluorescencia, por tinción de los núcleos apoptóticos con el colorante de Hoechst.

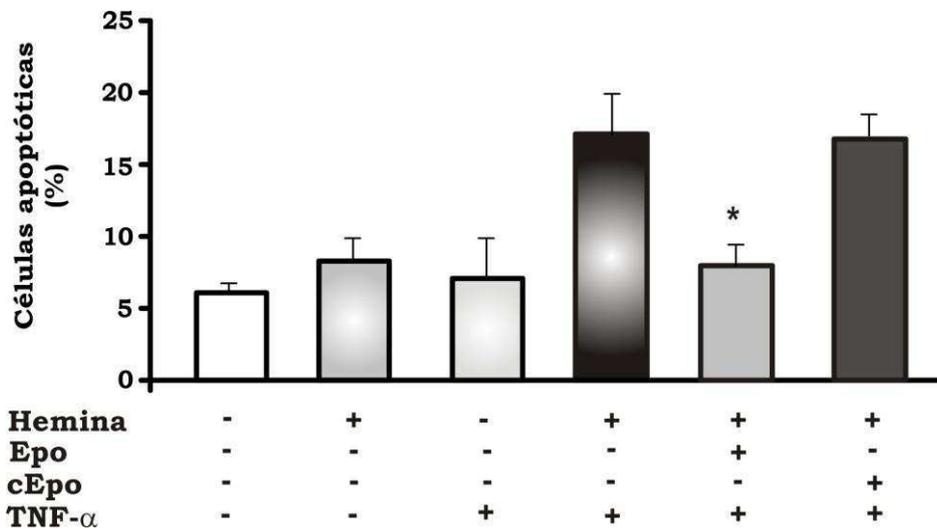
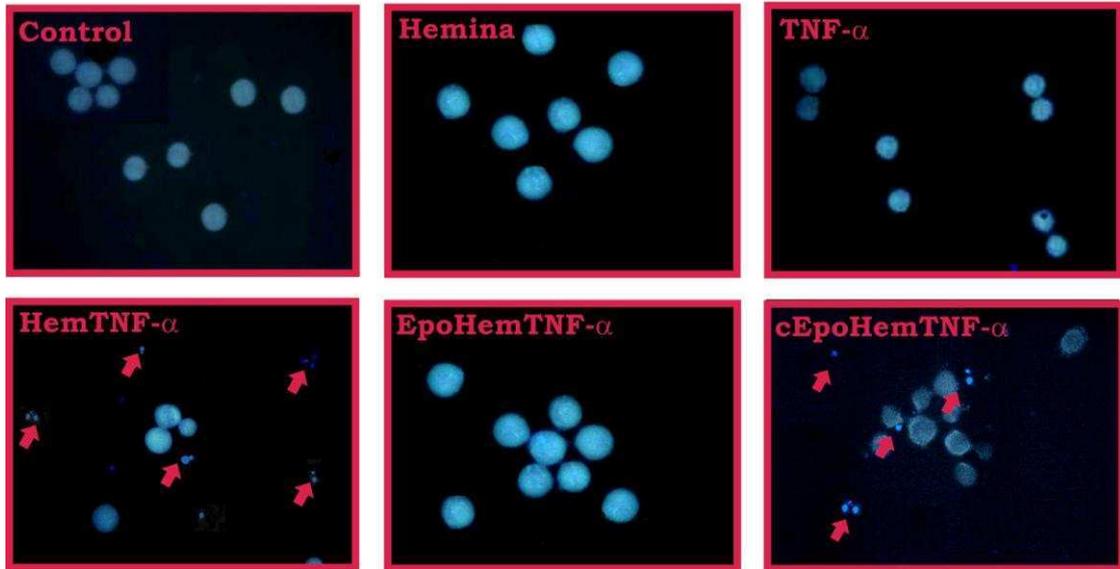


Figura 14: Evaluación de la apoptosis inducida por TNF- α en cultivos de células K562 pretratadas con Epo o cEpo. Las células K562 fueron diferenciadas con hemina 30 μ M, y luego incubadas en presencia de 30 ng/ml TNF- α por 48 h. Algunos cultivos diferenciados fueron pretratados con Epo o con cEpo (25 ng/mL) 18 h antes de la exposición a TNF- α . A continuación, se realizó la tinción de Hoechst y el recuento diferencial de núcleos apoptóticos por microscopía de fluorescencia sobre un total de 600 células (400x). Diferencias significativas: Hemina+Epo+TNF- α vs. Hemina+TNF- α , *P<0,05; Hemina+cEpo+TNF- α vs. Hemina+TNF- α , NS (n=4).

La Figura 14 muestra que la presencia de cEpo no previene la apoptosis celular inducida por TNF- α en los cultivos de células K562 diferenciadas con hemina, como sí lo hace Epo.

La diferenciación eritroide incrementó la sensibilidad de las células K562 frente a la acción proapoptótica de TNF- α . Epo, pero no cEpo, protegió a estas células frente a la apoptosis inducida por la citoquina.

I.3. EFECTO DE LA ERITROPOYETINA CARBAMILADA SOBRE CÉLULAS DE ORIGEN NEURONAL

En trabajos previos del laboratorio, se demostró que Epo actúa como agente protector frente a acciones proapoptóticas tanto de staurosporina (STP) como de TNF- α en células de neuroblastoma humano (Pregi *et al*, 2006).

Para investigar si cEpo presenta el mismo efecto protector que Epo sobre la línea SH-SY5Y, cultivos celulares fueron tratados con Epo y con cEpo previo a la inducción de apoptosis por staurosporina o TNF- α .

I.3.1. Acción de la eritropoyetina carbamilada en células expuestas al agente proapoptótico staurosporina

Células SH-SY5Y fueron tratadas con STP. Se analizó si el pretratamiento con Epo o cEpo prevenía la acción perjudicial de STP. Se estudio la proliferación y viabilidad celular mediante el ensayo de MTT (Figura 15).

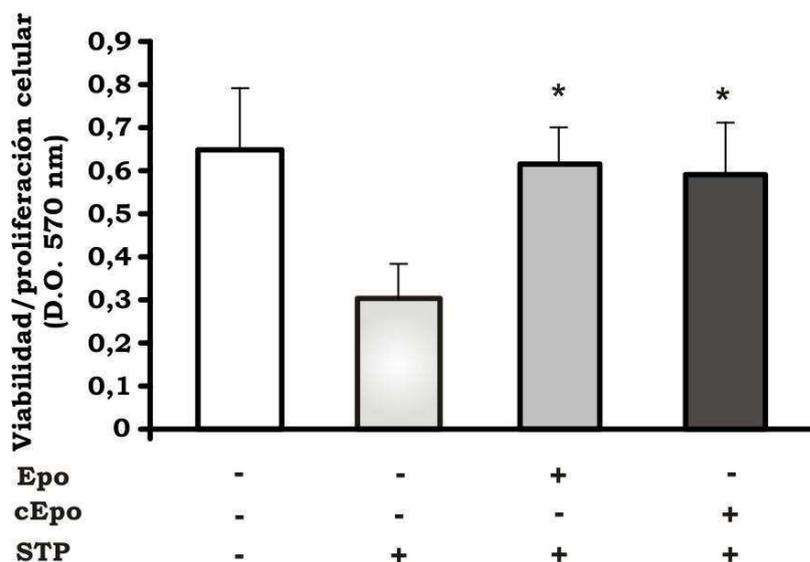


Figura 15: Protección de células SH-SY5Y pretratadas con Epo o cEpo. Cultivos de células SH-SY5Y fueron incubados con Epo o cEpo (250 ng/mL) durante 24 h y luego expuestos a STP (50 nM) durante las siguientes 24 h. Finalizado el cultivo, se analizó la viabilidad/proliferación mediante el ensayo de MTT. El producto coloreado solubilizado en isopropanol/HCl, fue cuantificado por su absorbancia a 570 nm con referencia a 655 nm. Diferencias significativas: Epo+STP o cEpo+STP vs. STP, *P<0,05 (n=6).

También se analizó la inducción de apoptosis de las células de origen neuronal SH-SY5Y y los efectos de Epo y cEpo sobre las mismas. Los resultados del recuento diferencial de células apoptóticas obtenidos mediante tinción con Hoechst y microscopía de fluorescencia se resumen en la Figura 16.

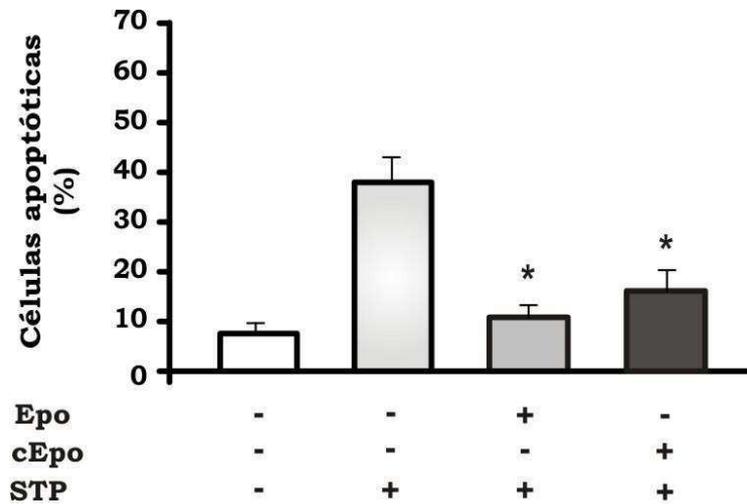


Figura 16: Acción antiapoptótica de Epo y cEpo sobre células SH-SY5Y. Cultivos de células SH-SY5Y fueron incubados con Epo o cEpo (250 ng/mL) durante 24 h y luego expuestos STP (50 nM) durante las 24 h siguientes. A continuación, se realizó el recuento diferencial de núcleos apoptóticos sobre un total de 600 células mediante microscopía de fluorescencia (Hoechst). Diferencias significativas: Epo+STP o cEpo+STP vs. STP, *P<0,05; Epo+STP vs. cEpo+STP, NS (n=4).

El análisis del recuento diferencial de núcleos apoptóticos muestra el efecto antiapoptótico, tanto de Epo como de cEpo, frente al agente proapoptótico STP.

La apoptosis en este modelo también fue evaluada mediante el clivaje de la proteína PARP (Figura 17).

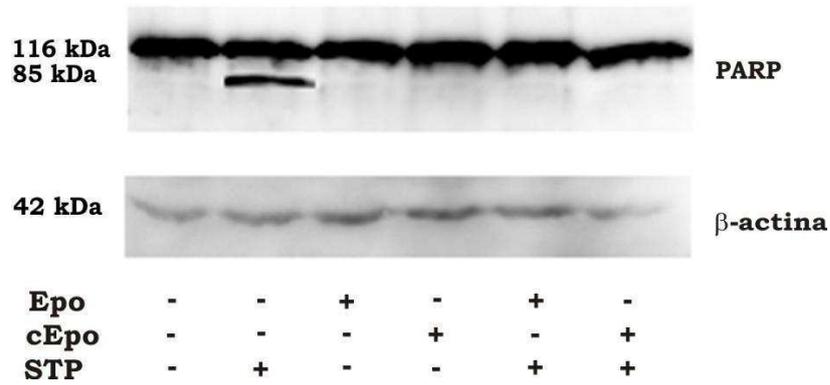


Figura 17: Clivaje de PARP en cultivos de células SH-SY5Y inducidas a apoptosis. Después de los tratamientos celulares similares a los descritos en la figura anterior, los lisados celulares fueron analizados por SDS-PAGE e *immunoblotting*. Se realizó la detección por reacción con anticuerpo monoclonal anti PARP y segundo anticuerpo anti IgG de ratón conjugado con peroxidasa, revelando por quimioluminiscencia. La detección de la proteína actina se utilizó como control de carga proteica.

Los resultados obtenidos por *Western blotting* avalan lo observado por la técnica de microscopía de fluorescencia (Figura 16). Las células incubadas con Epo o cEpo previo al agregado de STP, presentaron una banda de clivaje de intensidad muy tenue mientras que solamente en presencia de STP, sin la adición de factores antiapoptóticos, se observó una banda de clivaje de PARP (85 kDa) claramente más intensa.

Para complementar y confirmar los resultados observados por las técnicas anteriores, investigamos la translocación de PS por citometría de flujo.

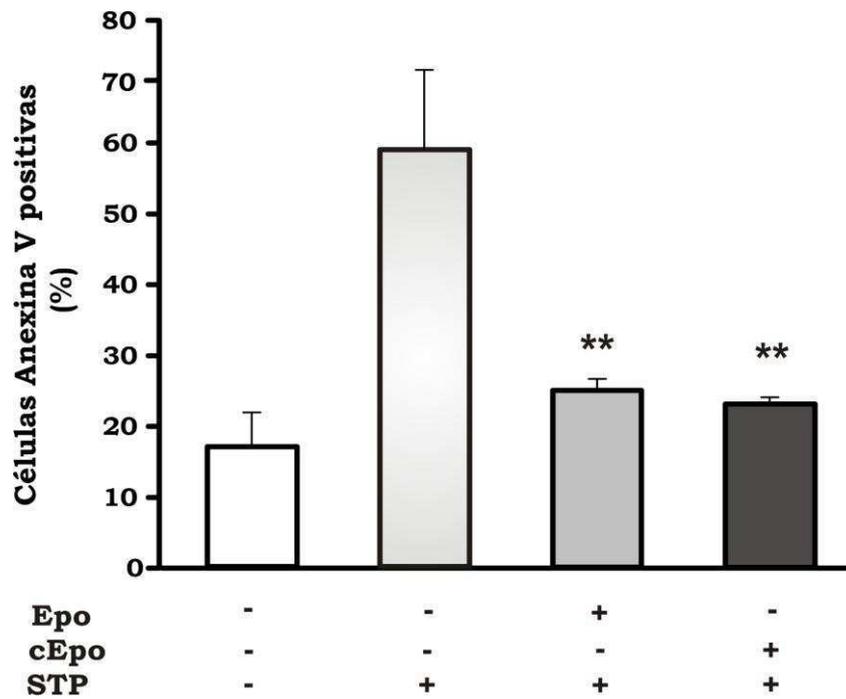


Figura 18: Translocación de fosfatidilserina en ensayos con células SH-SY5Y inducidas a apoptosis. Las células SH-SY5Y, expuestas a Epo o cEpo (250 ng/mL) y posteriormente incubadas en presencia de STP (50 nM), fueron marcadas con anexina V-FITC y analizadas por citometría de flujo. Diferencias significativas: Epo+STP o cEpo+STP vs. STP, **P<0,01 (n=4).

I.3.2. Acción de la eritropoyetina carbamilada en células expuestas a la citoquina proinflamatoria TNF- α

Para evaluar la protección neuronal de Epo y cEpo, se utilizó también otro agente proapoptótico, la citoquina proinflamatoria TNF- α . Se evaluó la viabilidad y proliferación celular (Figura 19) y la presencia de células apoptóticas (Figura 20) después de someter a las células SH-SY5Y a los distintos tratamientos.

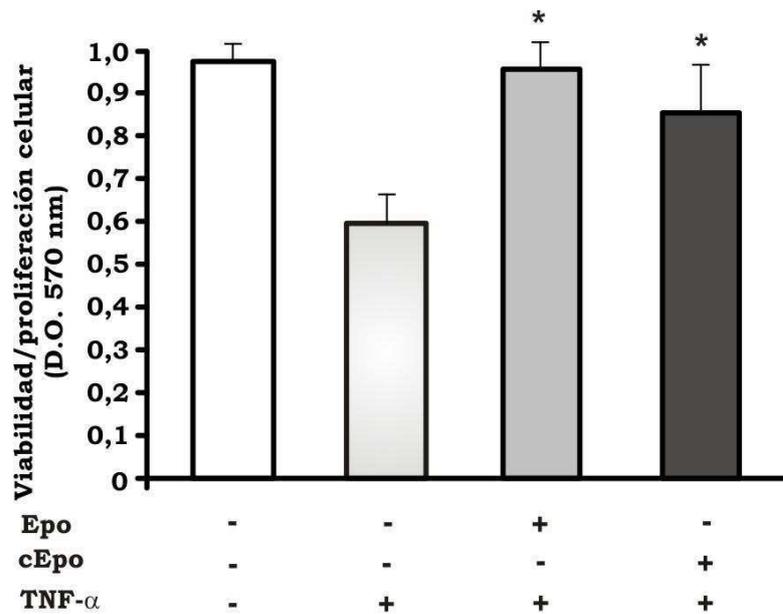


Figura 19: Protección de células SH-SY5Y por Epo y cEpo frente a la inducción de apoptosis. Células SH-SY5Y fueron incubadas durante 24 h en presencia de Epo o cEpo (250 ng/mL) y luego con TNF- α (20 ng/mL) durante las 24 h posteriores. La viabilidad/proliferación celular fue evaluada por MTT y la lectura del formazán generado fue realizada en lector de placas. Diferencias significativas: Epo+TNF o cEpo+TNF vs. TNF, * P<0,05 (n=4).

La presencia tanto de Epo como cEpo, generó protección de las células neuronales frente a TNF- α , manteniendo intacta la viabilidad celular.

Los efectos de Epo y cEpo frente a la apoptosis celular fueron evaluados por microscopía de fluorescencia después de la tinción con Hoechst en las células SH-SY5Y sometidas a los mismos tratamientos que en la Figura 19.

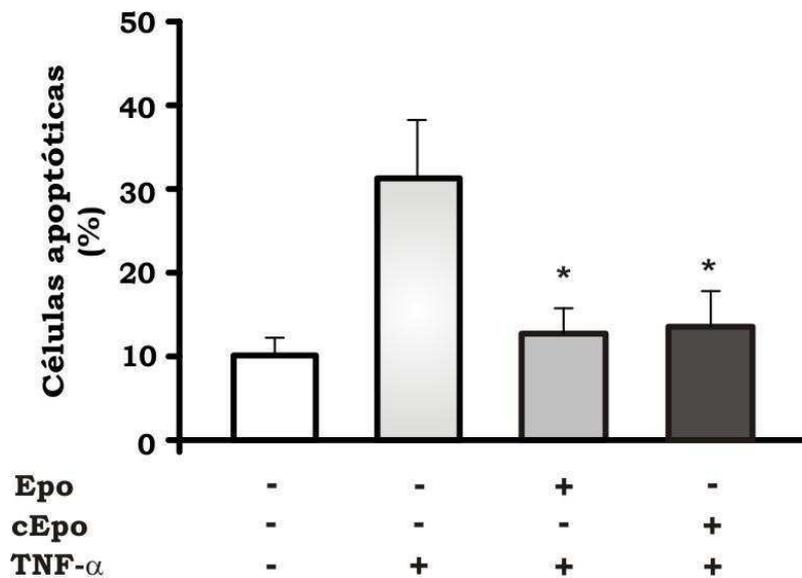
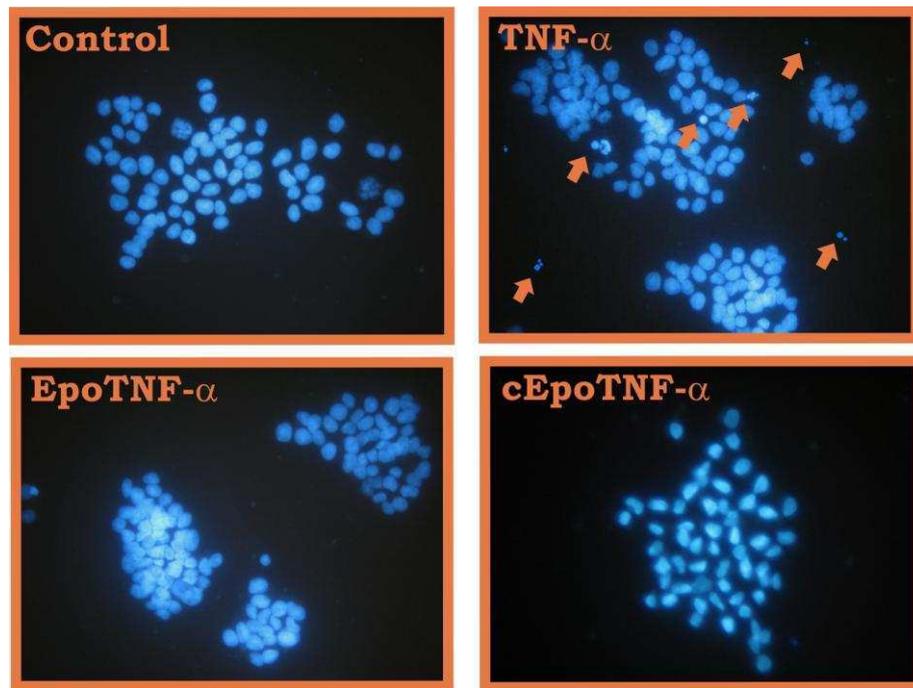


Figura 20: Acción antiapoptótica de Epo y cEpo frente a la acción de TNF- α sobre células SH-SY5Y. Cultivos de células SH-SY5Y fueron incubados con Epo o cEpo (250 ng/mL) por 24 h y luego expuestos TNF- α (20 ng/mL) durante las siguientes 24 h. A continuación, se realizó la tinción de Hoechst y el recuento diferencial de núcleos apoptóticos por microscopía de fluorescencia sobre un total de 600 células (400x). Diferencias significativas: Epo+TNF- α o cEpo+TNF- α vs. TNF- α , *P<0,05 (n=6).

En la Figura 20 se puede observar que la presencia de TNF- α en los cultivos induce la muerte programada de las células neuronales SH-SY5Y, la cual es prevenida por la presencia de Epo y de cEpo.

Los resultados que muestran las Figuras 15-20 demuestran que la eritropoyetina carbamilada (cEpo) muestra un efecto protector sobre células neuronales (SH-SY5Y) semejante al de la Epo.

CONCLUSIONES

➤ **La eritropoyetina modificada estructuralmente por carbamilación no genera efecto sobre las líneas celulares con capacidad de diferenciación eritroide, ni como factor de crecimiento (CFU-E, UT-7 y TF-1) ni como factor antiapoptótico (K562).**

➤ **En las células de origen neuronal SH-SY5Y, al igual que Epo, cEpo genera protección celular frente a los agentes proapoptóticos staurosporina y la citoquina proinflamatoria TNF- α .**

DISCUSIÓN

Los efectos neuroprotectores bien documentados de la eritropoyetina recombinante humana (rhEpo) han sido asociados a una estimulación indeseada de la eritropoyesis (policitemia), con el riesgo subsecuente de complicaciones tromboembólicas. La forma modificada de la Epo que ha despertado más interés, por su potencial aplicación farmacológica es el derivado carbamilado (cEpo). Como ha sido mencionado en la Introducción de este trabajo, existe evidencia, por ensayos *in vitro* e *in vivo*, de una acción diferencial de esta proteína modificada con respecto a su efecto sobre distintos tejidos. Sin embargo, poco se conoce acerca de las causas de esta acción diferencial entre cEpo y Epo.

Con el objeto de profundizar el conocimiento sobre las diferencias observadas en la función de Epo, debido al proceso de carbamilación que sufre esta molécula, en el presente trabajo utilizamos distintos tipos celulares eritroides y una línea de origen neuronal, para evaluar en conjunto los efectos de cEpo y compararlos con los de Epo realizando ensayos paralelos. Se emplearon células de la línea UT-7, con capacidad de diferenciación eritroide, dependiente de Epo para su supervivencia; células TF-1 que pueden diferenciarse hacia el linaje eritroide, dependientes de GM-CSF pero que también pueden proliferar durante períodos cortos por estímulo con Epo; la línea celular eritroleucémica K562 independiente de Epo; y progenitores eritroides de médula ósea de ratón. Con respecto a la línea de origen neuronal, la estudiada fue la de neuroblastoma humano SH-SY5Y.

El primer paso consistió en realizar la carbamilación de la rhuEpo, utilizando cianato de potasio, una sal que en medio soluble se descompone generando un anión que le permite unirse a los residuos lisina de la proteína. La metodología fue previamente estandarizada por carbamilación de albúmina. La obtención de cEpo fue demostrada empleando técnicas de electroforesis, electrotransferencia e inmunodetección, a través de las cuales pudo demostrarse la disminución de la carga positiva de la cEpo debido al bloqueo de los grupos lisina y, en consecuencia el aumento de su carga neta negativa con respecto a la de Epo (Figura 1).

En el producto de carbamilación (cEpo), un residuo carbamilo va acoplado a cada monómero de lisina de la molécula de Epo, modificando, de esta forma, la estructura de la proteína, lo que podría causar alteraciones funcionales.

Como fue descrito anteriormente, las CFU-E son células fisiológicas que poseen receptores para Epo y, por lo tanto, responden al estímulo de esta hormona para proliferar y diferenciarse. Por este motivo, analizamos, en primer lugar, el efecto de la hormona modificada a nivel eritroide, utilizando cultivos de

progenitores eritroides de médula ósea. cEpo no estimuló el desarrollo de unidades formadoras de colonia (CFU-E) (Figura 2). En cultivos de la línea celular UT-7, cEpo, a diferencia de Epo, no actuó como factor de crecimiento, observándose disminución de la viabilidad celular (Figuras 3-5), justificada, probablemente, por el aumento de células apoptóticas (Figuras 6-8). Esta falta de actividad eritropoyética es coincidente con resultados de estudios experimentales en los que se demostró que el aumento de hematocrito producido por la administración de Epo en ratas no fue observado cuando los animales fueron tratados con cEpo (Coleman *et al*, 2006). En otros estudios en los que se emplearon modelos de infarto del miocardio (Fiordaliso *et al*, 2004) o daño traumático cerebral en ratas (Mahmood *et al*, 2007), el postratamiento con cEpo generó protección sin incremento de la masa eritroide.

Otra de las líneas celulares con características similares a las UT-7 estudiada en este trabajo fue la TF-1. Los tratamientos realizados para el estudio de la cEpo en estas células fueron los mismos que los utilizados en cultivos de las UT-7 y también fueron similares las conclusiones. La presencia de cEpo no permitió el crecimiento de los cultivos como sí lo hicieron los factores de crecimiento –GM-CSF y Epo– necesarios para el desarrollo de estas células (Figura 9).

En los ensayos de apoptosis, en los que se evaluó la aparición de núcleos apoptóticos (Figura 10), el clivaje de la proteína PARP (Figura 11) y la translocación de PS (Figura 12), se observó que la cEpo generó apoptosis celular.

En un estudio anterior (Vittori *et al*, 2010), se había demostrado el efecto protector de Epo frente a la acción proapoptótica de la citoquina proinflamatoria TNF- α en células de la línea de origen eritroleucémico K562 cuando se encuentran en estadio de diferenciación eritroide. En este trabajo, la viabilidad celular no fue mantenida por la presencia de cEpo frente a la acción de TNF- α en células K562 sensibilizadas (Figura 13), y tampoco actuó la cEpo como agente antiapoptótico (Figura 14).

Para estudiar el efecto de cEpo sobre la línea de origen neuronal SH-SY5Y, se indujo apoptosis por la citoquina proinflamatoria TNF- α y por STP, un eficiente agente proapoptótico e inductor de diferenciación de células de neuroblastoma humano (Yuste *et al*, 2002). El pretratamiento de las células neuronales, tanto con Epo como con cEpo, previno la muerte celular y por lo tanto permitió la supervivencia celular frente a ambos inductores de apoptosis estudiados (Figuras 15-20).

La eficiencia de cEpo para la protección cerebral general ha sido demostrada por Mahmood y colaboradores (2007) en un trabajo en el que describieron que

Epo y cEpo son igualmente eficaces para promover la recuperación de la transmisión nerviosa luego de generar un daño traumático en el cerebro de ratas. La apoptosis inducida por STP en cardiomiocitos *in vitro* fue atenuada por cEpo con un efecto similar al de Epo (Fiordaliso *et al*, 2004; Moon *et al*, 2005). La administración subcutánea de cEpo en ratas demostró la reducción de estrés metabólico causado por hipoxia crónica, mejorando la supervivencia celular (Fantacci *et al*, 2006). La protección tanto por Epo como por cEpo fue observada luego de eventos neurodegenerativos tempranos inducidos por hemisección de la médula espinal (King *et al*, 2007).

En conclusión, los resultados hallados demuestran que las modificaciones moleculares que sufre la Epo debido al proceso de carbamilación, genera la pérdida de su habilidad para inducir el crecimiento y supervivencia de las células capaces de diferenciarse hacia el linaje eritroide, UT-7, TF-1 y CFU-E, así como para proteger de apoptosis a las células K562. Sin embargo, cEpo demostró acción neuroprotectora frente a la exposición de las células SH-SY5Y a agentes proapoptóticos con una potencia y eficacia similar a la que posee la Epo no carbamilada.

Es interesante destacar que la incapacidad de la cEpo está vinculada a su relación con células con capacidad de diferenciarse al linaje eritroide ya que no sólo pierde la acción proliferativa de Epo sino también su propiedad antiapoptótica sobre las células K562, propiedad que sí mantiene en los cultivos de células neuronales inducidas a apoptosis.

Este hallazgo es novedoso y pudo demostrarse al utilizar un modelo combinado que involucra ensayos simultáneos con distintos tipos celulares, a diferencia de publicaciones anteriores, con las que, igualmente, nuestros resultados son coincidentes.

A partir de estos resultados, el desafío implica el diseño de ensayos que permitan dilucidar mecanismos de acción de cEpo y compararlos con los involucrados en la actividad celular por Epo.

CAPÍTULO II

RECEPTORES INVOLUCRADOS EN LA ACCIÓN DE ERITROPOYETINA Y ERITROPOYETINA CARBAMILADA EN LÍNEAS CELULARES ERITROIDES Y NEURONALES

La acción diferencial entre Epo y cEpo en los tejidos neuronales y eritroides, demostrada en el capítulo I, podría ser explicada por diferentes formas de contacto de Epo y cEpo con sus células blanco.

Aún existe controversia con respecto a la interacción de Epo con nuevos receptores. La sugerencia de que la acción eritropoyética de la Epo depende del receptor homodimérico (REpo)₂, mientras que la acción antiapoptótica en tejidos no hematopoyéticos es mediada por el receptor heterodimérico (REpo/Rβc) (Brines *et al*, 2004) no coincide con resultados de Um y colaboradores (2007). Estos últimos demostraron que la Epo ejerce su acción protectora en líneas neuronales por mecanismos que involucran al complejo de señalización "clásico" a través del (REpo)₂. En otros estudios se demostró que el Rβc constitutivo activa al REpo en líneas celulares hematopoyéticas (Blake *et al*, 2002). De acuerdo con lo expresado por Arcasoy (2008) en una revisión sobre el tema, consideramos que se necesita mayor investigación para dilucidar la potencial funcionalidad biológica de estas interacciones entre REpo y Rβc, así como la unión de Epo y cEpo con estos receptores. En base a ello y al hallazgo de la acción diferencial entre Epo y cEpo (Capítulo I) es que abordamos el estudio de los receptores con los cuales interaccionarían Epo y cEpo en las distintas líneas celulares.

II.1. EXPRESIÓN DEL REpo Y DEL Rβ *common* EN CÉLULAS ERITROIDES Y NEURONALES

En primer lugar se determinó la expresión del receptor de Epo y de la subunidad β *common* en las distintas líneas celulares en estudio en diferentes estadios de diferenciación (Figura 21).

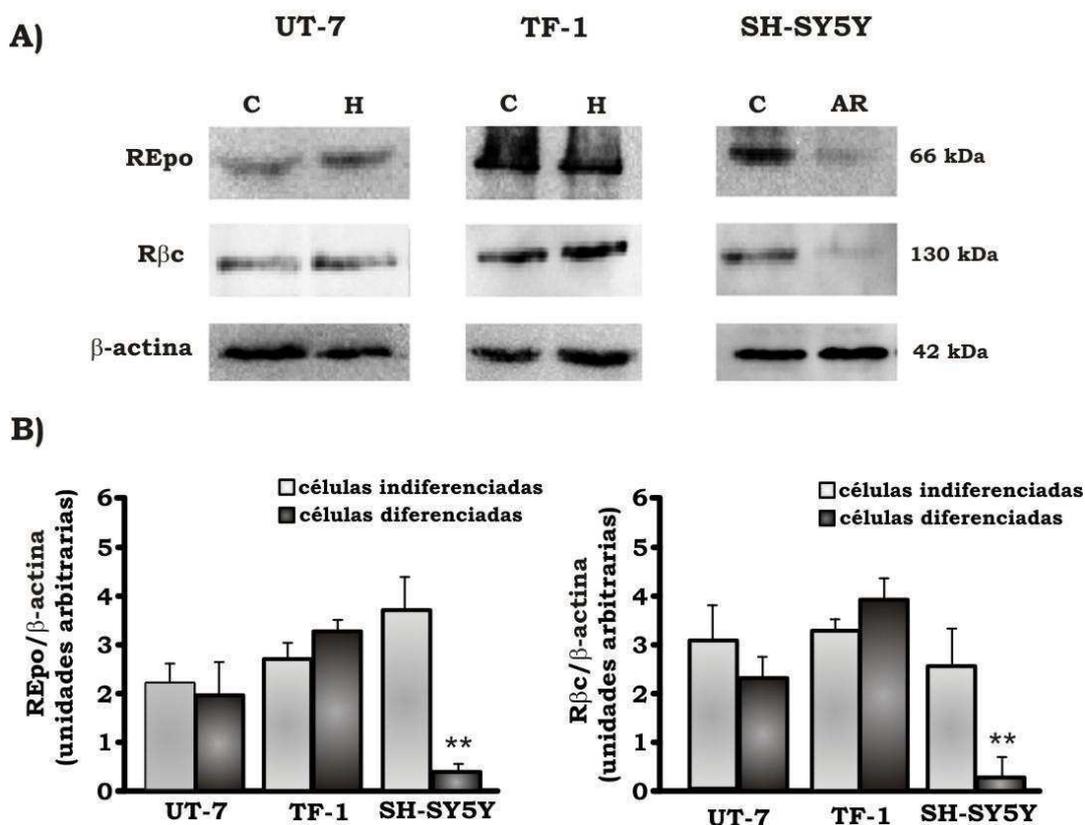


Figura 21: Expresión de receptores REpo y Rβc. Las células UT-7 y TF-1 fueron diferenciadas con 30 μM de hemina (H) durante 48 h mientras que las células SH-SY5Y fueron diferenciadas durante 4 días por tratamiento con 10 μM de ácido retinoico (AR). Transcurridos los periodos correspondientes de diferenciación, los cultivos celulares indiferenciados (C) y diferenciados (H o AR) fueron lisados y los extractos proteicos resueltos por SDS-PAGE y electrotransferencia. (A) Los geles fueron revelados por inmunodetección con anticuerpos específicos, utilizando β-actina como control de carga proteica. (B) La densidad de cada banda fue relativizada con respecto a la de β-actina. Diferencias significativas entre las células diferenciadas e indiferenciadas de la línea SH-SY5Y, **P<0,01 (n=3 ensayos independientes).

Tanto REpo como la subunidad Rβc se encontraron expresados en las células indiferenciadas de todas las líneas estudiadas. En células diferenciadas, la expresión de ambos receptores fue fácilmente detectada en las líneas UT-7 y TF-1, mientras que en las células neuronales SH-SY5Y diferenciadas la expresión del REpo fue similar a la del Rβc y muy débil.

II.2. MODULACIÓN DEL REpo-REpo y DEL REpo-R β common EN CÉLULAS ERITROIDES Y NEURONALES

Para avanzar en el conocimiento de la relación de Epo y cEpo con los receptores homo y heterodimérico, investigamos su modulación a través de ARNm en las distintas líneas celulares.

II.2.1. Modulación del REpo-REpo y REpo-R β common en células UT-7

En la Figura 22 se pueden observar los resultados del análisis por RT-PCR semicuantitativa de los niveles de ARNm del receptor de Epo y de la subunidad β c en las células UT-7 expuestas a Epo o cEpo por 24 h, luego de ser privadas de su factor de crecimiento.

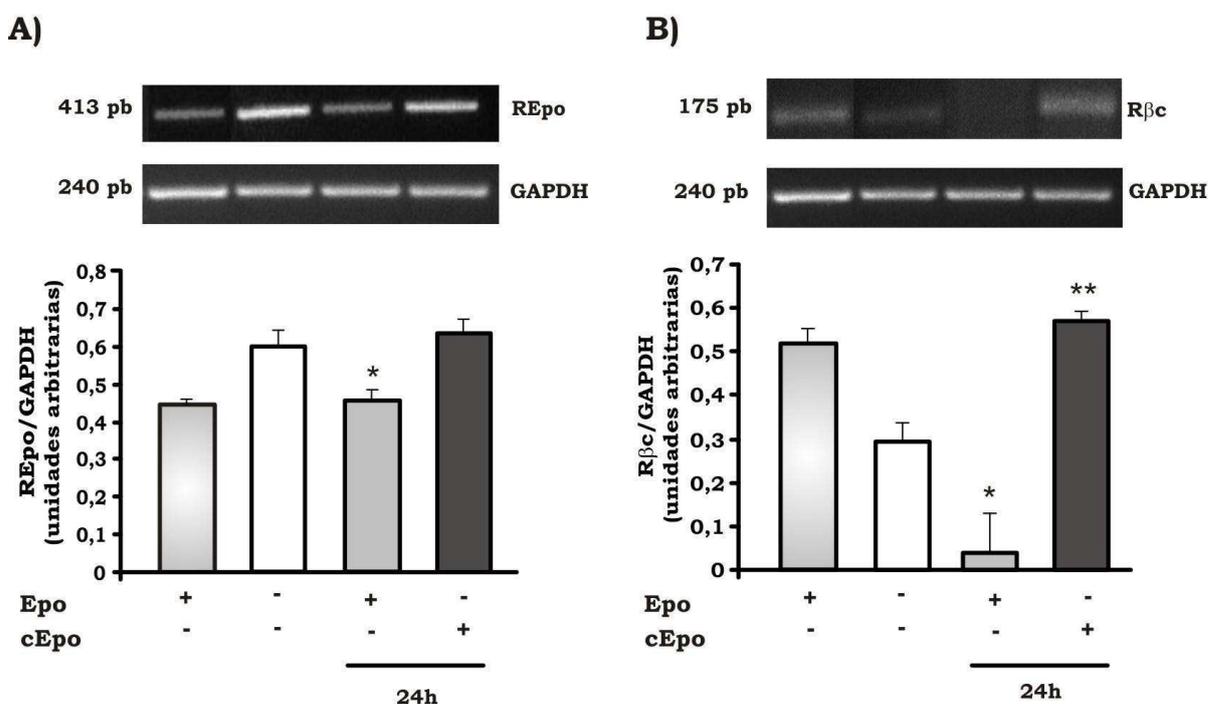


Figura 22: Modulación de receptores REpo y R β c en células UT-7. Las células fueron cultivadas sin factor de crecimiento por 18 h (t=0) y luego tratadas con Epo o cEpo (200 ng/mL) por 24 h para estudiar su modulación a nivel de ARNm. Las células control (Epo) fueron mantenidas durante el mismo tiempo con 20 ng/mL de Epo. Se realizó la extracción de ARN, la transcripción a ADNc y posterior análisis por RT-PCR semicuantitativa. Los niveles de intensidad de las bandas del REpo (A) y R β c (B) fueron normalizados con respecto a los valores correspondientes al estándar interno GAPDH y analizados por el programa GelPro. Diferencias significativas: (A): Epo(24h) vs. S/FC, *P<0,05; cEpo(24h) vs. S/FC, NS. (B): Epo(24h) vs. S/FC, *P<0,05; cEpo(24h) vs. S/FC, **P<0,01 (n=3).

A diferencia de Epo, cEpo no regula la expresión del REpo en células UT-7. Contrariamente, se pudo observar, en esta línea celular, una regulación positiva de la cEpo sobre el ARNm de la subunidad R β c.

En la figura 22 se observa el aumento de la expresión del REpo durante la privación del factor de crecimiento Epo, lo que, probablemente, se deba a la necesidad de aumentar el acceso a la baja cantidad del ligando, mientras que al agregar al cultivo la hormona, la célula no requiere una elevada disponibilidad del receptor. Una regulación similar del R β c por Epo no fue observada, debido a que las células son dependientes de Epo a través del camino de señalización Epo/REpo.

II.2.2. Modulación del REpo-REpo y REpo-R β common en células TF-1

Como describimos anteriormente, las células TF-1 utilizan Epo y/o GM-CSF como factores de crecimiento. GM-CSF actúa a través de su unión al heteroreceptor formado por la subunidad α -específica para GM-CSF y la subunidad β *common*. Esta última subunidad junto con una subunidad del REpo, formarían el posible heteroreceptor involucrado en los efectos de ambas eritropoyetinas.

En estas células, analizamos también la modulación de ambos receptores por Epo, GM-CSF o cEpo, luego de haber sido privadas de factores de crecimiento.

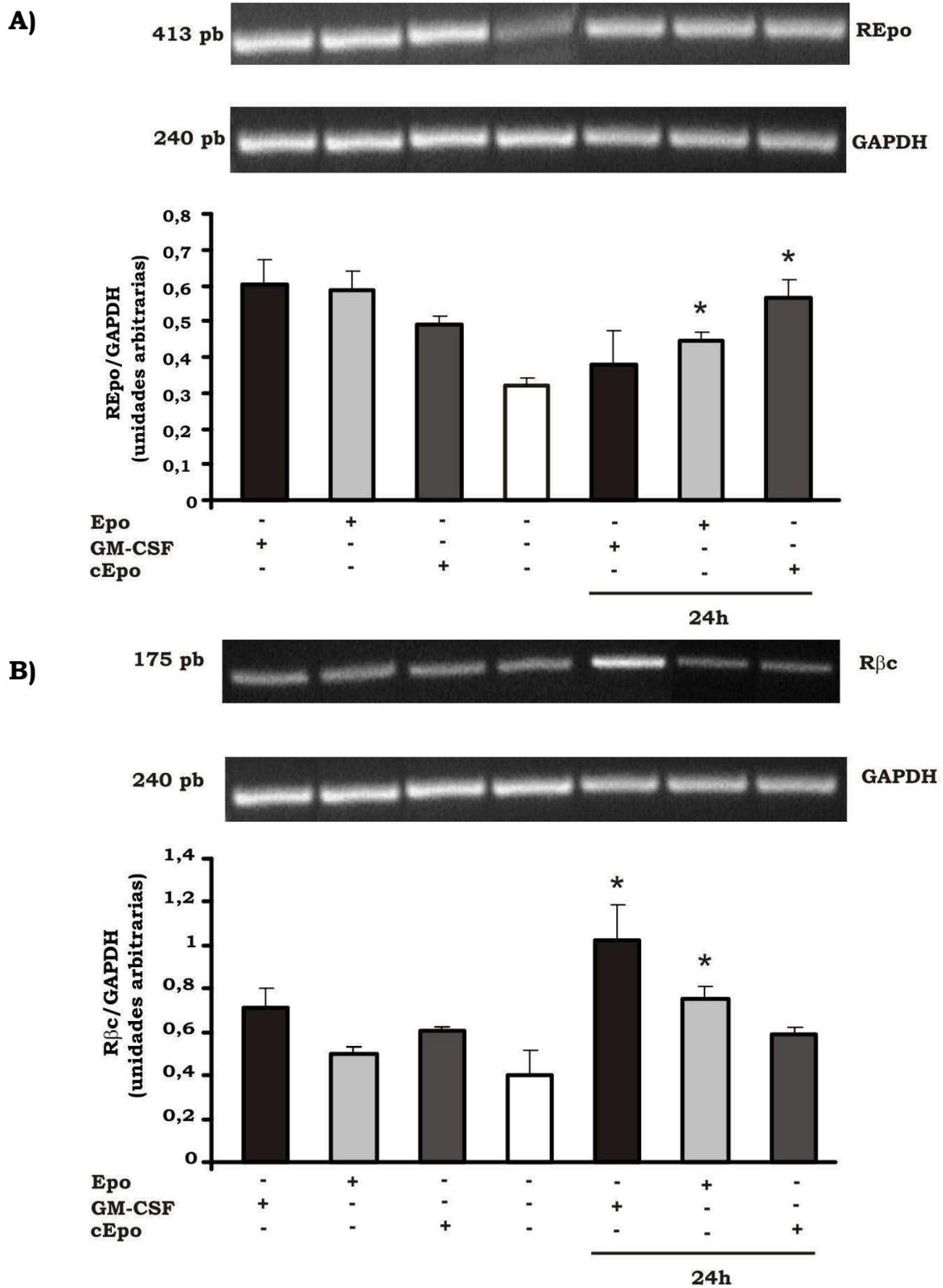


Figura 23: Modulación de receptores REpo y Rβc en células TF-1. Las células TF-1 fueron de privadas de su factor de crecimiento GM-CSF por 18 h (t=0), y luego fueron estimuladas con 200 ng/mL de Epo o cEpo, o con 40 ng/mL de GM-CSF por 24 h. Controles: cultivos celulares mantenidos con GM-CSF, Epo o cEpo (24 h). El ARN total fue extraído y la expresión de los receptores cuantificada por RT-PCR. Diferencias significativas: (A) Epo (24 h) o cEpo (24 h) vs. S/FC, *P<0,05 (n=3). (B) GM-CSF (24 h) vs. S/FC, Epo (24 h) vs. Epo, *P<0,05 (n=3).

Los resultados sugieren que tanto Epo como cEpo regulan la expresión del REpo en las células TF-1. A diferencia de las células UT-7, los cultivos de la línea TF-1 no alcanzan el nivel basal del ARNm de REpo en el periodo de estimulación por Epo estudiado en este ensayo (24 h).

Se observó la regulación del R β c por GM-CSF, luego de un periodo de privación de este factor de crecimiento, dado que es una subunidad de su receptor específico (R α /R β c). Tanto GM-CSF como Epo regulan la expresión del ARNm del R β c en estas células.

II.2.3. Modulación del REpo-REpo y REpo-R β c en células SH-SY5Y

Como en las células neuronales ya habíamos observado una acción protectora tanto de Epo como de cEpo (Capítulo I), resultó interesante comparar los efectos de ambas eritropoyetinas en la modulación de los receptores homo y heterodimérico en la línea SH-SY5Y. Por lo tanto analizamos la expresión del ARNm del REpo y R β c cuando esta línea celular fue tratada con Epo o con cEpo durante 24 h. Los resultados pueden observarse en la siguiente figura:

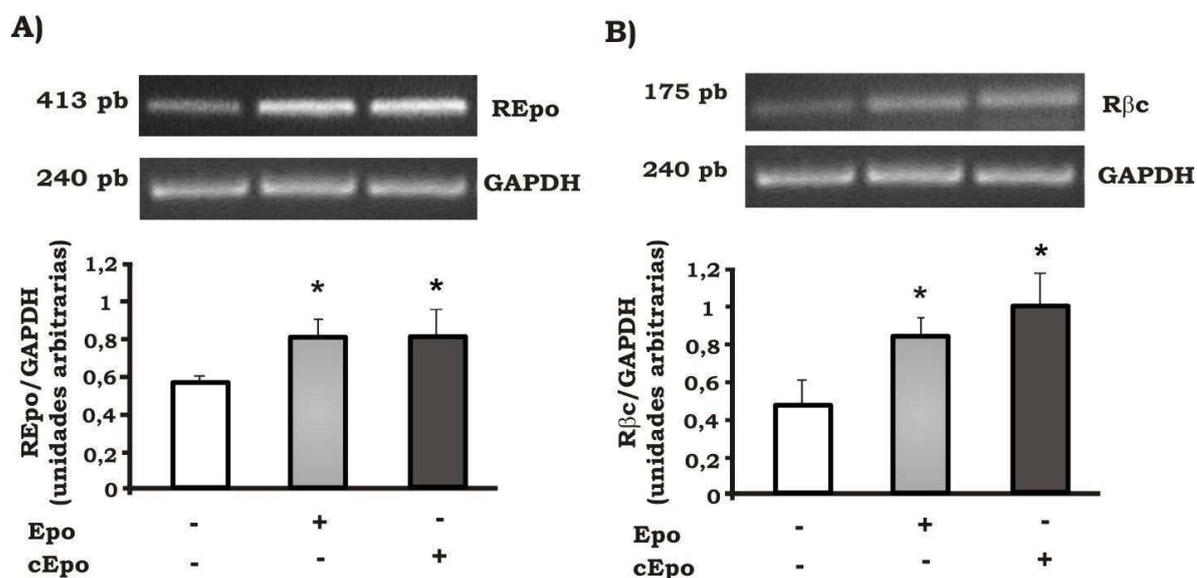


Figura 24: Modulación de los receptores REpo y R β c por Epo y cEpo en células SH-SY5Y. Cultivos celulares de SH-SY5Y fueron tratados con 100 ng/mL de Epo o cEpo por 24 h. Se realizó la extracción de ARN, la transcripción a ADNc y el análisis por RT-PCR. Los niveles de intensidad de las bandas fueron normalizados con respecto a los valores correspondientes al estándar interno GAPDH y analizados por el programa GelPro. Diferencias significativas: Epo o cEpo vs. C, *P<0,05 (n=3).

En las células SH-SY5Y se pudo apreciar una modulación positiva de ambos receptores, tanto por cEpo como por Epo, por lo que no se descarta la posibilidad de que una o ambas eritropoyetinas estén actuando a través de los posibles receptores postulados para sus acciones, (REpo)₂ y REpo/Rβc.

II.3. INTERFERENCIA DE cEpo CON LOS FACTORES DE CRECIMIENTO Epo Y GM-CSF EN CÉLULAS ERITROIDES Y NEURONALES

Dado que distintos autores concuerdan en atribuir el efecto diferencial entre Epo y cEpo a su acción mediada por diferentes receptores, decidimos realizar ensayos de interferencia empleando los modelos de células eritroides y neuronales. Para avanzar en el conocimiento de la participación de los dos receptores en su interacción con Epo y con cEpo, se realizaron cultivos en presencia de altas concentraciones de cEpo para probar la posible competencia con respecto a Epo en células progenitoras eritroides de ratón y en la línea celular UT-7, así como la posible interferencia de cEpo con respecto a Epo y GM-CSF en las células TF-1. Además, se investigó la posible interferencia de GM-CSF en la acción protectora de cEpo sobre células neuronales SH-SY5Y.

II.3.1. Interferencia de cEpo en el desarrollo de unidades formadoras de colonias (CFU-E) en progenitores eritroides

Para investigar la posible interferencia de cEpo en la acción proliferativa de Epo, se estudió el desarrollo de unidades formadoras de colonias, a partir de cultivos de progenitores eritroides fisiológicos, estimulados con Epo en presencia de cEpo en exceso (Figura 25).

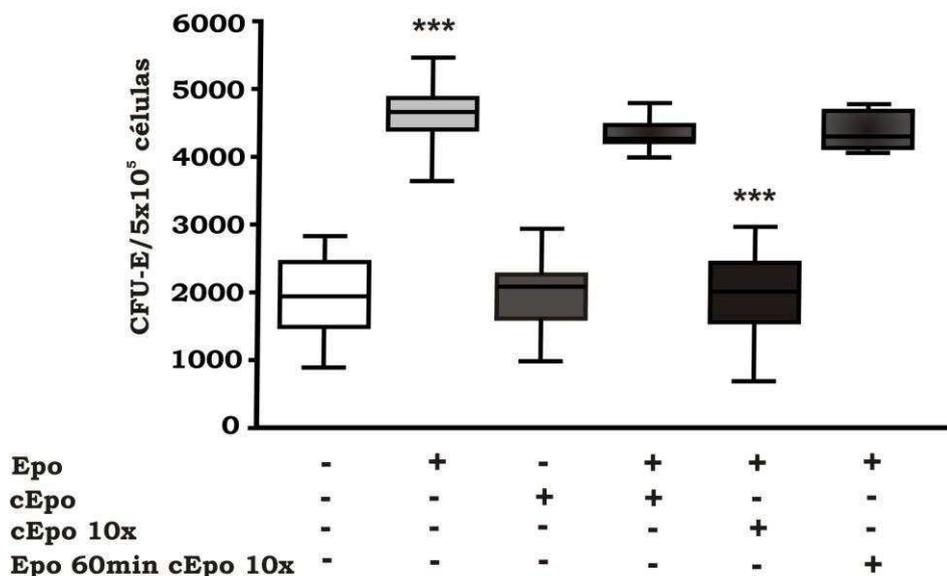


Figura 25: Efecto de la interferencia de cEpo en la acción de Epo sobre el desarrollo de colonias eritroides. Células de médula ósea de ratones Balb/c (5×10^5 /mL) fueron cultivadas en α -MEM, 0,8% de metilcelulosa y 5% de SFB por 48 h en ausencia o en presencia de 20 ng/mL de Epo o cEpo. Otros cultivos fueron expuestos a Epo y cEpo en iguales (Epo+cEpo) o distintas concentraciones (cEpo 10x) y tiempos (Epo 60 min+cEpo 10x). El desarrollo de CFU-E fue evaluado por el recuento de colonias formadas por 8 o más células hemoglobinizadas, utilizando microscopio invertido (aumento 400x) después de la tinción con DAF y H_2O_2 . Diferencias significativas: Epo vs. S/FC o cEpo y Epo+cEpo(10x) vs. Epo, *** $P < 0,001$. Epo(60 min)+cEpo(10x) vs. Epo y Epo+cEpo(10x) vs. cEpo o S/FC, NS (n=10).

En forma similar a lo demostrado en el capítulo I, Epo, pero no cEpo, indujo un crecimiento significativo de CFU-E. En este ensayo, cEpo, agregada al cultivo en elevada concentración con respecto a Epo interfirió sobre el efecto de ésta. Cuando se encuentra presente en concentraciones elevadas (10x con respecto a Epo), cEpo produce una significativa interferencia en el desarrollo de unidades formadoras de colonias estimuladas por Epo. Este ensayo sugiere que, en alguna etapa de la activación celular por Epo, la proteína carbamilada interfiere en su vía de activación. Sin embargo, este efecto competitivo de cEpo no se observó cuando los cultivos fueron estimulados con Epo durante 60 min previo al agregado de cEpo. Esto se podría explicar porque al estimular las células con Epo, ésta genera la activación celular antes de que la cEpo compita por la utilización del o de los receptores involucrados.

II.3.2. Interferencia de cEpo en la acción de Epo en células UT-7

Las células UT-7 cultivadas con Epo, fueron sometidas al mismo tiempo a altas concentraciones de cEpo para estudiar la posible interferencia de ésta sobre la proliferación y viabilidad celular inducida por Epo, y de esta forma, evaluar si ambas pueden ser ligandos del mismo receptor en esta línea celular (Figura 26).

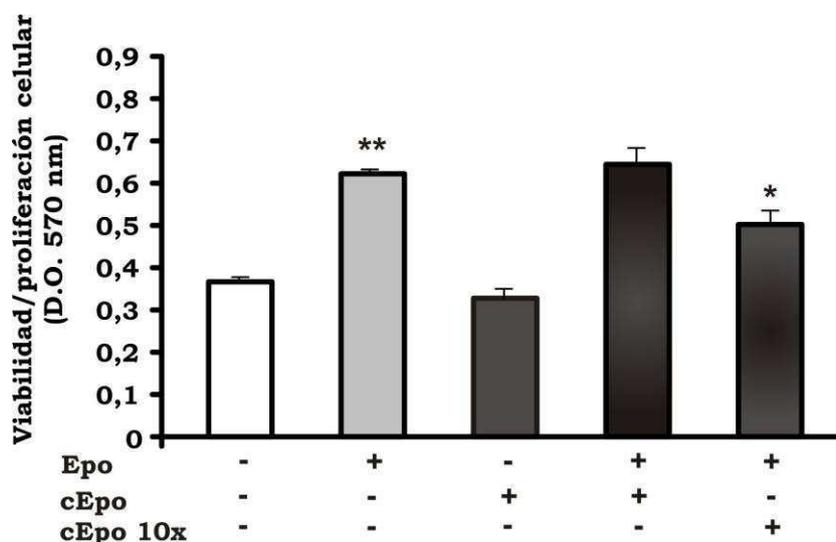


Figura 26: Interferencia de cEpo con Epo en la viabilidad/proliferación de células UT-7. Las células fueron cultivadas por 48 h en presencia de Epo o cEpo (20 ng/mL), de Epo + cEpo (20 ng/mL), o en presencia de Epo (20 ng/mL) + cEpo 200 ng/mL (10x). Las células fueron incubadas con MTT y el precipitado azul de formazán producido fue solubilizado y analizado midiendo la absorbancia del producto coloreado a 570 nm con referencia a 655 nm. Los resultados se expresan como D.O.. Diferencias significativas: Epo vs. S/FC, **P<0,01; cEpo vs. S/FC, NS; Epo+cEpo(10x) vs. Epo, *P<0,05 (n=4).

Similar a lo mostrado en el capítulo I, Epo pero no cEpo mostró un efecto proliferativo sobre la línea celular UT-7. La acción de Epo, en presencia de una elevada concentración de cEpo fue parcial.

Para determinar si los resultados observados en los ensayos de viabilidad se correlacionan con la aparición de células apoptóticas, la muerte celular fue evaluada mediante la tinción con el colorante Hoechst en los mismos tratamientos sometidos al ensayo de MTT (Figura 27).

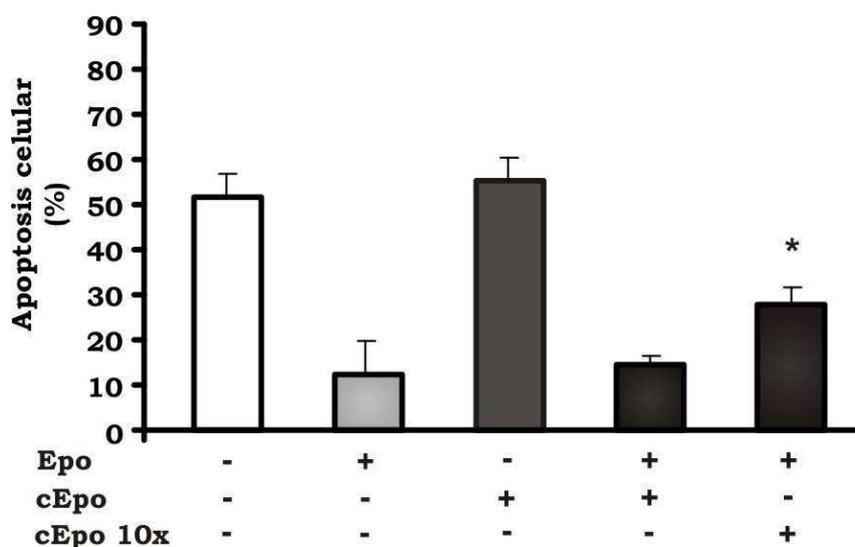


Figura 27: Interferencia de cEpo en la acción antiapoptótica de Epo en células UT-7. Cultivos de células UT-7 fueron incubados con Epo o cEpo 20 ng/mL, Epo + cEpo (20 ng/mL) o con Epo (20 ng/mL) + cEpo (200 ng/mL) (10x) durante 48 h. A continuación, se realizó la tinción de Hoechst y el recuento diferencial de núcleos apoptóticos por microscopía de fluorescencia sobre un total de 600 células. Diferencias significativas: Epo+cEpo(10x) vs. Epo, *P<0,05 (n=4 ensayos independientes).

A pesar de la presencia de Epo, la apoptosis celular aumentó por la elevada concentración de cEpo en el cultivo, sin embargo este aumento no alcanzó los niveles de apoptosis observados en las células cultivadas sin factor de crecimiento o cultivadas en presencia de cEpo.

En conjunto, los resultados mostrados en las Figuras 26 y 27 sugieren que la cEpo interfiere, al menos parcialmente, en la acción de la Epo sobre la supervivencia, proliferación y apoptosis celular de la línea con capacidad de diferenciación eritroide UT-7.

II.3.3. Interferencia de cEpo en la acción de Epo y de GM-CSF en células TF-1

En forma similar a los ensayos realizados con células UT-7, se desarrollaron experiencias de interferencia entre factores de crecimiento en cultivos de células TF-1. Utilizando el ensayo de MTT para evaluar la proliferación y viabilidad celular, los cultivos fueron expuestos a los dos factores de crecimiento a los cuales responde esta línea celular (GM-CSF y Epo) en presencia de altas concentraciones de cEpo.

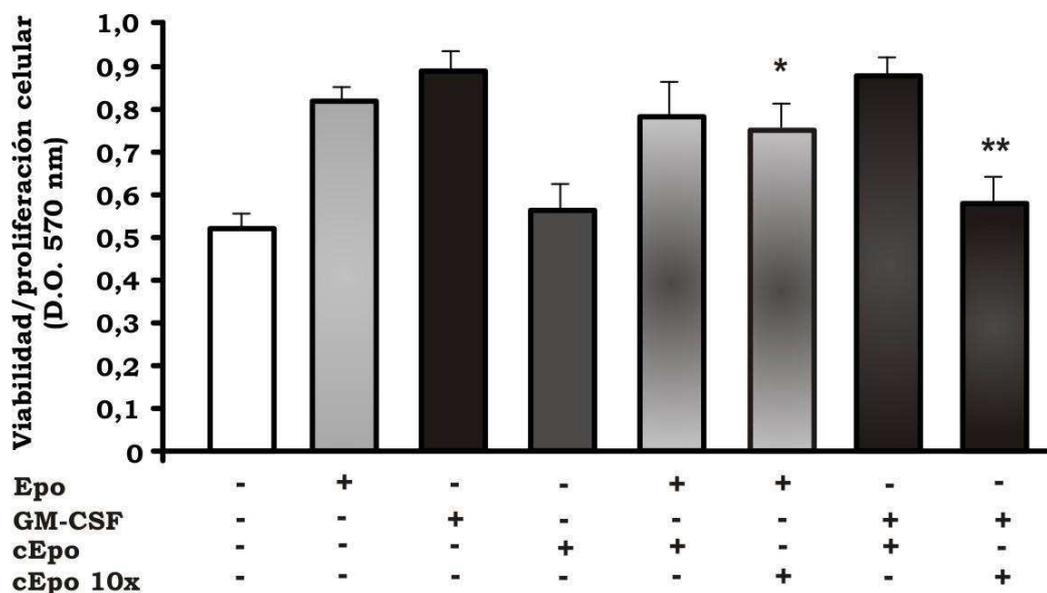


Figura 28: Interferencia de cEpo en la acción de GM-CSF y de Epo en células TF-1. Células, privadas de factores de crecimiento (GM-CSF o Epo) por 18 h, fueron expuestas a Epo 20 ng/mL o GM-CSF (4 ng/mL) en presencia de 20 o de 200 ng/mL de cEpo durante 24 h. Se estudió la viabilidad celular mediante el ensayo de MTT, expresándose los resultados como D.O. a 570 nm con referencia a 655 nm. Diferencias significativas: Epo+cEpo(10x) vs. Epo, *P<0,05; GM-CSF+cEpo(10x) vs. GM-CSF, **P<0,01; GM-CSF+cEpo(10x) vs. cEpo, NS (n=4).

La presencia de cEpo en altas concentraciones interfirió completamente la acción de GM-CSF como factor de crecimiento, mientras que en los cultivos estimulados con Epo sólo generó una disminución parcial de la viabilidad celular.

La interferencia de cEpo en la acción antipoptótica de GM-CSF y de Epo sobre las células TF-1 también fue determinada, mediante la aparición de células apoptóticas analizando como marcador el número de núcleos apoptóticos por microscopía de fluorescencia después de la tinción con reactivo de Hoechst y por la detección de la translocación de PS mediante citometría de flujo. Las células TF-1 fueron expuestas a los mismos tratamientos ensayados anteriormente, es decir, cultivos estimulados con GM-CSF o Epo en presencia de elevada concentración de cEpo (Figura 29).

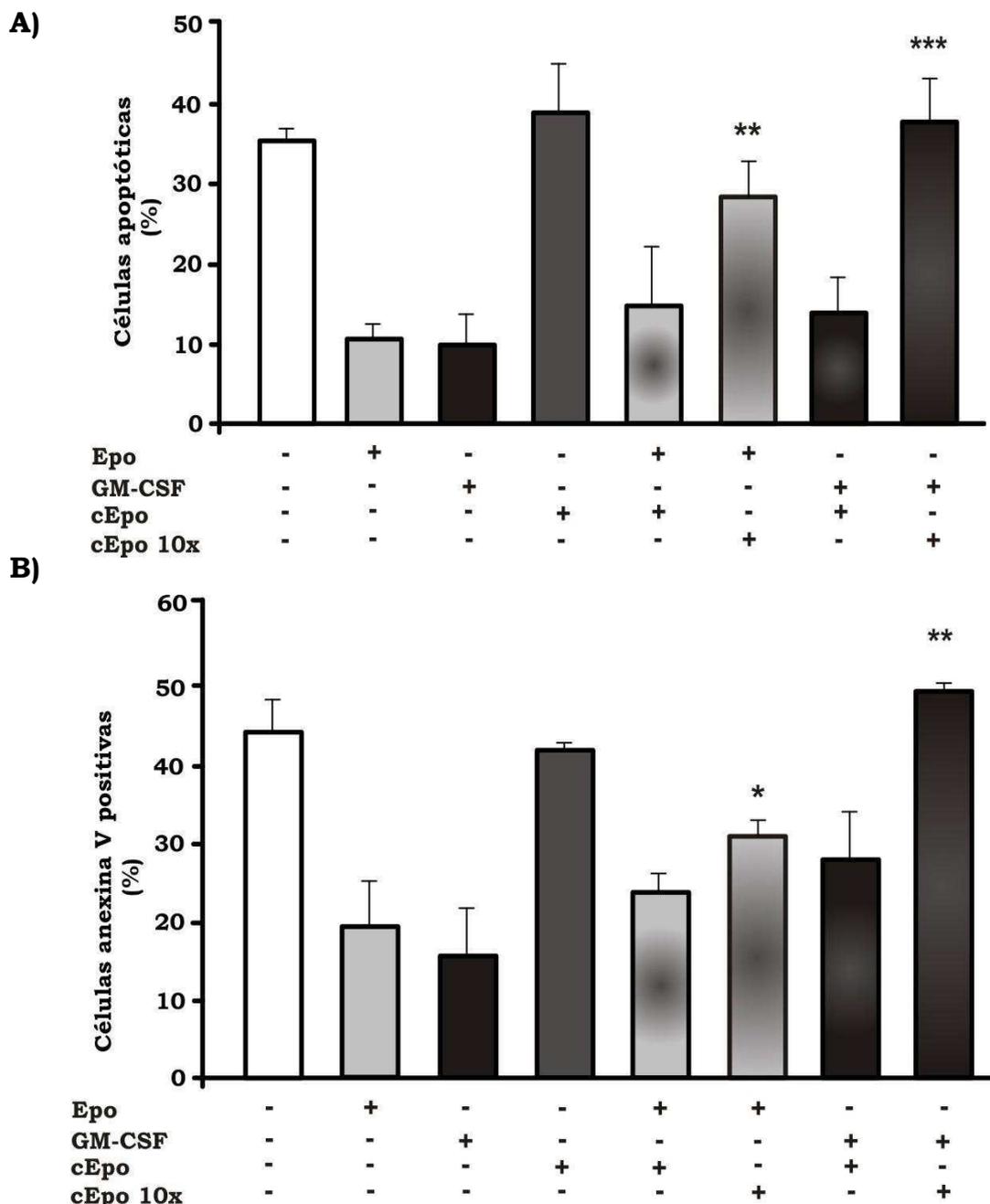


Figura 29: Interferencia de cEpo en los efectos antiapoptóticos de GM-CSF y Epo sobre células TF-1. Células TF-1 fueron privadas de factores de crecimiento por 18 h y luego expuestas por 24 h a Epo (20 ng/mL), GM-CSF (4 ng/mL), cEpo (20 ng/mL) y combinaciones de ésta en baja (20 ng/mL) y alta concentración (200 ng/mL) junto a los 2 factores de crecimiento. (A) Se utilizó la tinción de Hoechst para analizar los núcleos apoptóticos por microscopía de fluorescencia, expresándose los resultados como porcentaje de células apoptóticas con respecto al total de células analizadas (600). (B) Los cultivos celulares fueron marcados con anexina-V-FITC y analizados por citometría de flujo. Los resultados se expresan como porcentaje de células anexina positivas. Diferencias significativas: (A) Epo+cEpo(10x) vs. Epo, **P<0,01; GM-CSF+cEpo(10x) vs. GM-CSF, ***P<0,001 (n=3). (B) Epo+cEpo(10x) vs. Epo, *P<0,05; GM-CSF+cEpo(10x) vs. GM-CSF, **P<0,01 (n=3).

Los núcleos apoptóticos aumentaron significativamente en los cultivos de células a los que se habían adicionado altas concentraciones de cEpo, aunque se encontraran presentes, simultáneamente, los factores de crecimiento GM-CSF o Epo.

Los resultados de apoptosis, analizados por exposición de PS, son coincidentes con los de microscopía de fluorescencia. La presencia de cEpo en elevada concentración generó un aumento de la exposición de PS a pesar de la presencia de GM-CSF o de Epo en los cultivos.

Estos resultados demuestran que cEpo ejerce una interferencia con Epo parcial, aunque significativa, mientras que la interferencia de cEpo con GM-CSF es total, impidiendo que se manifieste el efecto protector del factor de crecimiento esencial para esta línea celular.

II.3.4. Interferencia de GM-CSF con respecto a la función de Epo y cEpo en células SH-SY5Y

Los resultados de la sección II.3.3 permiten suponer que la interferencia de la proteína carbamylada en la acción del factor de crecimiento GM-CSF sobre las células TF-1 podría ser un indicio de la interacción de cEpo con la subunidad β *common*, la cual, como describimos anteriormente, forma parte del heteroreceptor de GM-CSF. A partir de estos resultados surge la hipótesis de la interferencia de GM-CSF sobre la acción protectora de Epo y principalmente de cEpo, frente al agente proapoptótico staurosporina en las células neuronales. Para demostrarlo, decidimos realizar ensayos de competencia entre los distintos factores, Epo, cEpo y GM-CSF, utilizando las mismas técnicas de análisis que las empleadas en los ensayos con células eritroides, en cultivos de células de origen neuronal SH-SY5Y indiferenciados, que es el estadio en que se detectó la expresión de la subunidad R β c.

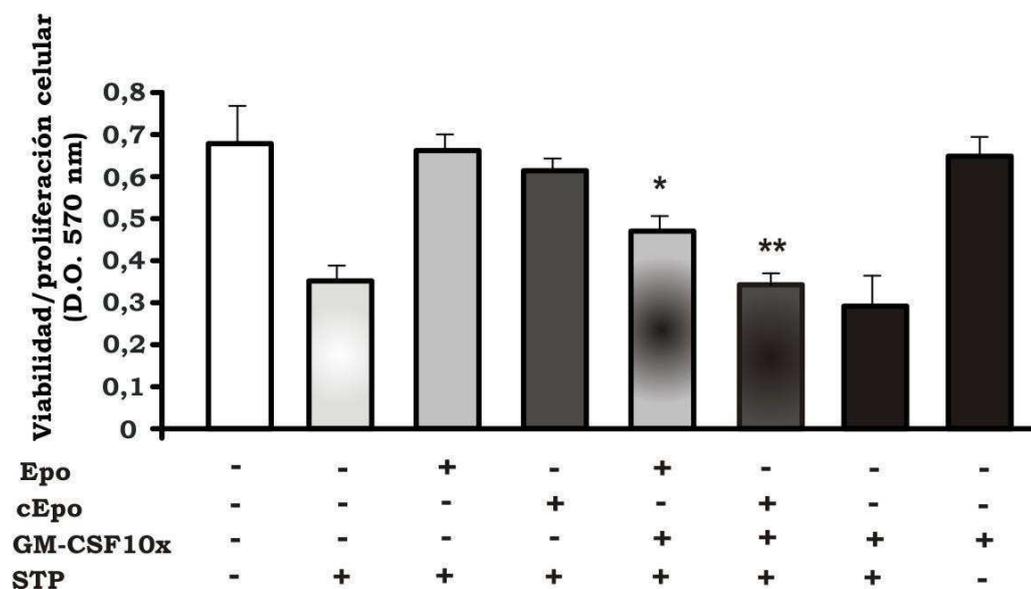
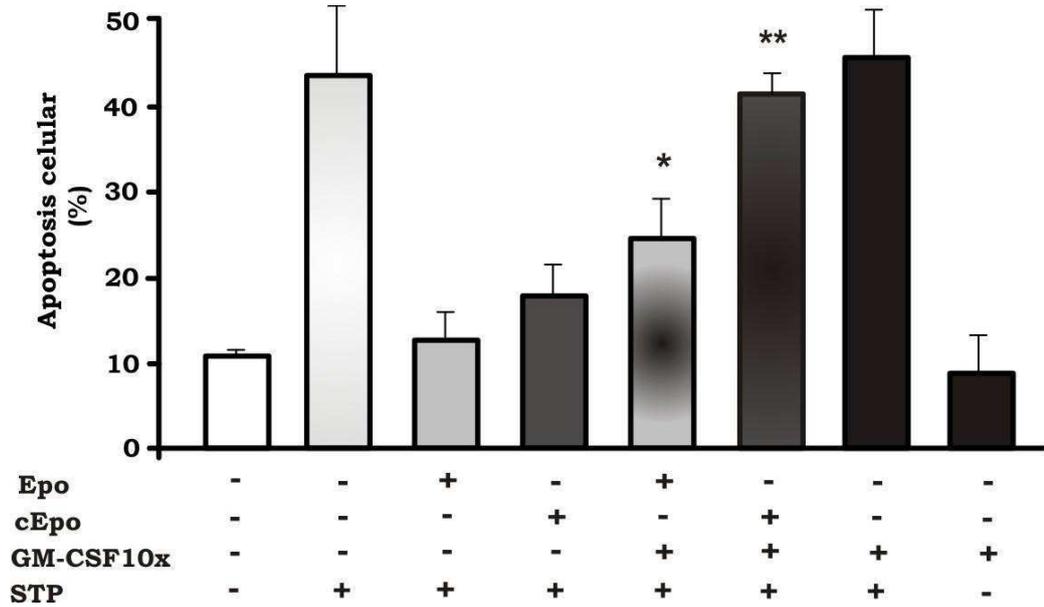


Figura 30: Interferencia de GM-CSF en la acción de Epo y cEpo en cultivos de células SH-SY5Y en presencia de staurosporina. Los cultivos celulares de SH-SY5Y fueron pretratados con Epo (100 ng/mL) o cEpo (100 ng/mL) 24 h antes de la exposición con el agente proapoptótico STP (50nM). Algunos cultivos fueron tratados con GM-CSF en elevadas concentraciones (40 ng/mL) al mismo tiempo que Epo o cEpo previos a la exposición a STP. Se estudió la viabilidad y proliferación celular por el ensayo de MTT. Diferencias significativas: cEpo+GM-CSF(10x)+STP vs. cEpo+STP, **P<0,01; Epo+GM-CSF(10x)+STP vs. Epo+STP, *P<0,05; GM-CSF(10x)+cEpo+STP vs. STP, NS (n=3).

La viabilidad celular disminuyó significativamente en presencia de altos niveles de GM-CSF, en los cultivos pretratados con cEpo frente a STP, impidiendo de esta manera, que cEpo genere su acción protectora. En los cultivos en presencia de Epo, GM-CSF interfirió parcialmente en el efecto protector de Epo frente a STP.

En el mismo modelo celular se analizó la prevención, por parte de Epo o cEpo, de la apoptosis inducida por STP, mediante la tinción de núcleos apoptóticos por Hoechst y recuento por microscopía de fluorescencia, así como por la detección de la translocación de PS por citometría de flujo.

A)



B)

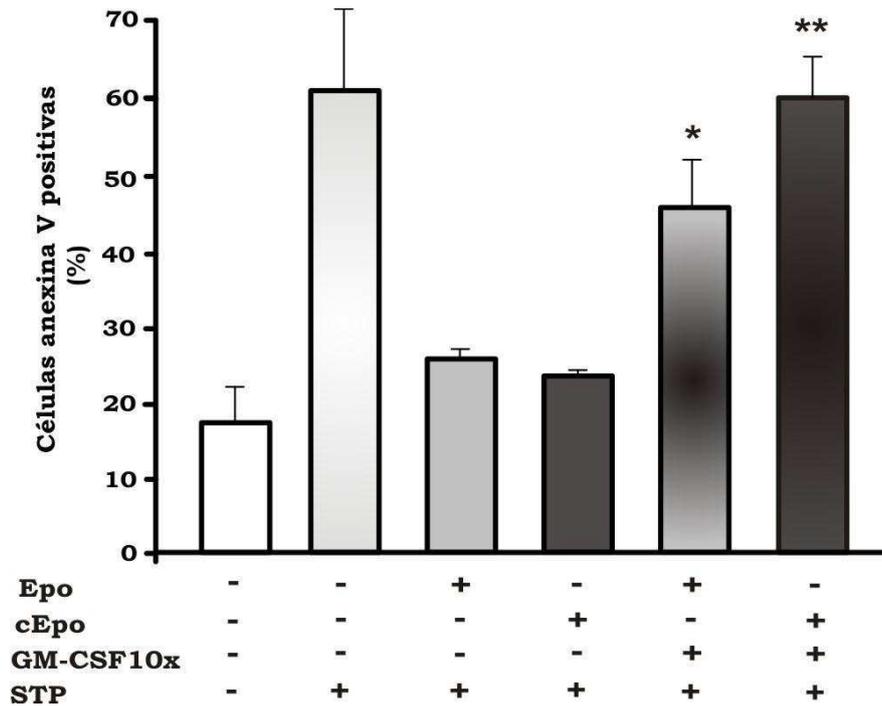


Figura 31: Interferencia de GM-CSF en la apoptosis de las células SH-SY5Y mediante Hoechst y translocación de fosfatidil serina. Células SH-SY5Y fueron pretratadas con Epo (100 ng/mL), cEpo (100 ng/mL) durante 24 h antes de la exposición con el agente proapoptótico STP (50nM). Algunos cultivos fueron tratados con GM-CSF en elevadas concentraciones (40 ng/mL) al mismo tiempo que Epo o cEpo previos a la exposición a STP. Se evaluó el número de células apoptóticas por tinción con Hoechst (A) y translocación de fosfatidil serina (B). Diferencias significativas: Epo+GM-CSF(10x)+STP vs. Epo+STP, *P<0,05; cEpo+GM-CSF(10x)+STP vs. cEpo+STP **P<0,01; GM-CSF(10x)+STP vs. STP, NS (n=4).

El factor GM-CSF no tiene efecto antiapoptótico en cultivos de las células de origen neuronal SH-SY5Y frente a la inducción de apoptosis por staurosporina pero tampoco ejerce un efecto tóxico directo sobre las células.

La presencia de GM-CSF en altas concentraciones impidió la protección celular por parte de cEpo frente a la apoptosis inducida por STP, mientras que en los cultivos estimulados por Epo, la interferencia de GM-CSF fue parcial.

II.4. INHIBICIÓN DE LOS EFECTOS PROTECTORES DE Epo Y cEpo UTILIZANDO ANTICUERPOS DE LOS RECEPTORES INVOLUCRADOS

Para estudiar si la interferencia observada entre GM-CSF y cEpo se debía al hecho de que ambos factores estuvieran utilizando el mismo receptor, R β c, se realizaron ensayos con anticuerpos anti REpo y anti R β c en experimentos diseñados para evaluar la acción protectora de Epo o cEpo en cultivos de células SH-SY5Y inducidas a apoptosis por STP. Después de realizar la estandarización del ensayo con curvas de concentración de anticuerpos, se efectuaron los tratamientos que se muestran en la Figura 32.

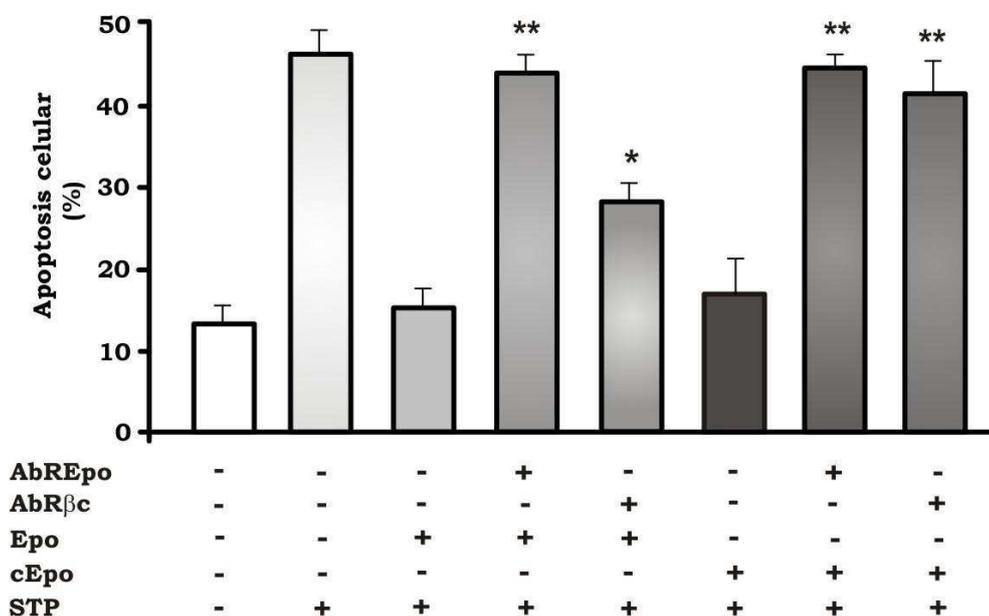


Figura 32: Inhibición de la acción antiapoptótica de Epo y cEpo en células SH-SY5Y. Se realizaron cultivos celulares en presencia de anticuerpos anti REpo (AbREpo) (400 ng/mL) y anti R β c (AbR β c) (400 ng/mL), 2 h antes del tratamiento con Epo (100 ng/mL) o cEpo (100 ng/mL) por 24 h y luego exposición a STP (50 nM). Posteriormente se realizó el recuento de los núcleos apoptóticos por microscopía de fluorescencia (Hoechst). Diferencias significativas: AbREpo+Epo+STP vs. Epo+STP y AbREpo+cEpo+STP vs. cEpo+STP, **P<0,01; AbR β c+Epo+STP vs. Epo+STP, *P<0,05; AbR β c+cEpo+STP vs. cEpo+STP, **P<0,01 (n=4).

La presencia del anti REpo en cultivos de células neuronales SH-SY5Y anuló los efectos protectores tanto de Epo como de cEpo frente a la apoptosis inducida por STP. Por otra parte, la presencia del anticuerpo contra la subunidad βc anuló completamente la acción protectora de cEpo pero sólo parcialmente la de Epo.

CONCLUSIONES

➤ **En células SH-SY5Y, Epo estaría actuando, principalmente, a través de su receptor REpo-REpo, ya que en ensayos de interferencia, GM-CSF no interfirió totalmente en su acción antiapoptótica, y en los de inhibición con anticuerpos, el anti R βc no anuló completamente su función protectora sobre las células SH-SY5Y.**

➤ **No se descarta la posibilidad de que Epo actúe también a través del REpo-R βc , ya que su acción antiapoptótica en células SH-SY5Y disminuyó levemente, tanto en presencia de elevadas cantidades de GM-CSF en los ensayos de interferencia, como por la acción del anticuerpo anti R βc en los ensayos de inhibición.**

➤ **El receptor para cEpo parecería ser el REpo-R βc , mediante el cual ejercería su acción antiapoptótica sobre la línea SH-SY5Y y con el cual interaccionaría en las células TF-1. Este concepto se basa en que la concentración elevada de GM-CSF anuló completamente la acción protectora de cEpo en las células neuronales SH-SY5Y, mientras que en células eritroides TF-1, elevadas cantidades de cEpo interfirieron significativamente en la acción de GM-CSF como factor de crecimiento.**

DISCUSIÓN

La acción diferencial entre Epo y cEpo relacionada con el estímulo eritropoyético y con la protección de tejidos fuera de la médula ósea sugirió la participación de distintos receptores de membrana. Se ha demostrado la asociación entre el REpo y la subunidad β *common* (R β c), también conocido como CD131 (Sautina *et al*, 2010), componente común de los receptores de las citoquinas IL-3 e IL-5 y del factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), este último también factor de crecimiento de las células TF-1 (Jubinsky *et al*, 1997). Basado en diferentes observaciones, se cree que el receptor heterodimérico formado por las subunidades REpo y R β c juega un rol en la acción antiapoptótica de la Epo (Jubinsky *et al*, 1995; Hanazono *et al*, 1997, Brines *et al*, 2004). La expresión del R β c en células del sistema nervioso y de otros órganos, así como el comportamiento de ratones *knockout* para R β c, apoyan la hipótesis de que la protección tisular por Epo sería mediada por un complejo heterodimérico (Brines *et al*, 2004; Swartjes *et al*, 2013). En células del sistema nervioso central, incluyendo la microglía, se ha detectado la expresión de R β c y demostrado la capacidad de respuesta a IL-3, IL-5, y GM-CSF *in vivo* e *in vitro*, lo que indicaría que este receptor está funcionalmente presente en células del cerebro. Recientemente, Bennis y colaboradores (2012) establecieron que la Epo aumenta el potencial angiogénico de progenitores endoteliales y que esta acción es mediada por la subunidad β c. Se demostró que los ratones *knockout* para R β c exhiben hematopoyesis normal. Estos hallazgos son coherentes con la propuesta del grupo de Brines y colaboradores (2004), quienes sugirieron que la acción eritropoyética de la Epo depende del receptor homodimérico (REpo)₂, mientras que la acción antiapoptótica en distintos tejidos estaría mediada por el receptor heterodimérico.

Sin embargo, la discusión no está cerrada. Los datos de un experimento *in vivo* sugieren que la mayoría de las neuronas en el cerebro de rata son propensas a expresar altos niveles de REpo pero bajos niveles del R β c (Sánchez *et al*, 2009). Um y colaboradores (2007) demostraron que la Epo ejerce su acción antiapoptótica en las líneas neuronal SH-SY5Y y PC-12 por un mecanismo de estequiometría estándar por el cual una molécula de Epo se une a dos subunidades de REpo, componiendo el complejo de señalización "clásico" del (REpo)₂. Estos autores también reportaron que las células SH-SY5Y diferenciadas con ácido retinoico no expresan un nivel detectable de receptor β c, siendo la Epo

capaz de unirse específicamente con alta afinidad a los sitios de unión del REpo para ejercer su actividad neuroprotectora.

Estos hallazgos muestran que la información acerca de los receptores involucrados en la actividad citoprotectora de la Epo en células neuronales es, al menos, controversial.

Las células UT-7 y TF-1 han sido incluidas entre los modelos experimentales de este trabajo porque ambas líneas responden a Epo para proliferar pero tienen distinta dependencia de este factor de crecimiento. La diferencia podría ser explicada por el tipo de REpo expresado en ambas líneas celulares. Chrétien y colaboradores (1996) observaron que las células TF-1, las cuales sobreexpresan un REpo truncado, muestran una activación alterada del factor de transcripción STAT5 cuando son activadas por Epo. Células de médula ósea humana expresan formas truncadas y *full-length* del REpo, con predominio de la primera en progenitores inmaduros y la última en estadios más maduros (Nakamura *et al*, 1992). En un trabajo anterior de nuestro laboratorio se evaluaron diferentes transcritos de REpo en las dos líneas celulares, UT-7 y TF-1, observándose patrones semejantes entre ellas (Callero M, Tesis de Doctorado, 2010). La estructura del REpo en diferentes células todavía se encuentra bajo estudio y falta determinar si la presencia de isoformas del REpo puede o no tener relación con la diferente estimulación por Epo que muestran algunas células. Sin embargo, este punto no parece relevante para explicar los diferentes efectos de Epo y cEpo sobre células con capacidad de diferenciación eritroide, ya que, como hemos presentado, los resultados muestran un comportamiento de cEpo similar en células UT-7 y en células TF-1.

En este capítulo enfocamos nuestra investigación al estudio de los receptores involucrados en la acción diferencial de Epo y cEpo en células con capacidad de diferenciación eritroide y células neuronales. Ambos receptores, REpo y R β c, se encontraron expresados en las células UT-7 y TF-1, tanto diferenciadas como indiferenciadas, así como en las células neuronales SH-SY5Y indiferenciadas (Figura 21). En cambio, en estas últimas, después del proceso de diferenciación, se detectó muy baja expresión de ambos receptores, REpo y R β c. Los resultados obtenidos en cultivos de células neuronales coinciden con las observaciones de otros autores (Um *et al*, 2007; Sánchez *et al*, 2009) y con un trabajo previo de nuestro laboratorio en el que se reportó la disminución de la expresión de REpo cuando las células SH-SY5Y fueron diferenciadas con ácido retinoico (Wenker *et al*, 2010). Debido a la ausencia de R β c en células neuronales diferenciadas, Um y colaboradores concluyeron que la acción protectora de Epo en esta línea celular

sería mediada por el homodímero (REpo)₂. Sin embargo, en nuestro trabajo, el hallazgo de una elevada expresión de R β c en las células indiferenciadas no nos permite descartar la posibilidad de que Epo pueda actuar en las células neuronales a través del heterodímero REpo/R β c.

Los estudios realizados sobre la modulación de los receptores mencionados en células UT-7 permitieron determinar la existencia de una modulación positiva del REpo por parte de Epo, pero no de cEpo, mientras que el R β c, sólo fue positivamente modulado por cEpo (Figura 22). La expresión del REpo en células TF-1 se vio regulada tanto por Epo, como por cEpo, mientras que el R β c fue regulado, principalmente, por GM-CSF (Figura 23). En las células SH-SY5Y, tanto Epo como cEpo indujeron una modulación positiva de ambos receptores, REpo y R β c (Figura 24).

En ensayos de interferencia, Coleman y colaboradores (2006) no observaron aumento ni disminución de la capacidad de estímulo de Epo para formar colonias eritroides a partir de células de médula ósea humana en presencia de elevadas concentraciones de cEpo (100 ng/mL) en los cultivos. A diferencia de esos resultados, nosotros observamos que concentraciones de cEpo de 200 ng/mL interfieren el desarrollo de CFU-E bajo el estímulo de Epo en cultivos de progenitores eritroides de médula ósea de ratón (Figura 25). Sin embargo, el pretratamiento con Epo 60 min antes del agregado de la cEpo, anuló la interferencia de ésta sobre el estímulo de Epo en el desarrollo de CFU-E (Figura 25). Estos resultados concuerdan con un trabajo previo del laboratorio en el que se demostró que la incubación con Epo durante 60 min antes del agregado de sales de aluminio también anuló la acción inhibitoria del metal sobre los progenitores eritroides de ratón (Garbossa *et al*, 1994). Esto indicaría que si se le permite a la célula un período apropiado de activación puede responder al estímulo, independientemente de la presencia *a posteriori* de factores adversos. Además, se puede sugerir que la interferencia de cEpo con Epo ocurre a nivel de la interacción Epo con la célula.

Estos hallazgos se podrían explicar por el hecho de que la activación del REpo después de la unión de Epo es transitoria. El REpo es ubiquitinado en el citoplasma y rápidamente degradado por dos sistemas proteolíticos que proceden simultáneamente: los proteasomas remueven parte del dominio intracelular del receptor a nivel de la superficie celular y los lisosomas degradan el remanente del complejo hormona-receptor (Walrafen *et al*, 2005).

El hallazgo de la expresión de REpo y R β c en todas las líneas celulares utilizadas en este estudio nos permitió diseñar experimentos de inhibición con

anticuerpos neutralizantes y ensayos de competición entre cEpo y los factores de crecimiento específicos para las líneas eritroides. En ensayos de interferencia en células UT-7, los resultados sugieren que la cEpo interfiere parcialmente la acción de la Epo sobre la supervivencia, proliferación y apoptosis celular (Figuras 26 y 27).

Como describimos en los resultados, teniendo en cuenta que βc es también una subunidad involucrada en el receptor de GM-CSF, y que éste es un factor de crecimiento esencial para las células TF-1, se eligió este modelo para los ensayos de competición. El estímulo de GM-CSF para el desarrollo de esta línea celular se vio alterado por la presencia de altas concentraciones de cEpo (Figuras 28-30). En un experimento inverso con células SH-SY5Y, el co-cultivo en presencia de exceso de GM-CSF impidió la prevención por cEpo de la apoptosis inducida por STP (Figuras 31 y 32). Por otro lado, en ensayos de inhibición con anticuerpos, en células SH-SY5Y, la acción protectora de cEpo fue anulada tanto en presencia del anti REpo, como del anti R βc (Figura 33).

De acuerdo con nuestros resultados, cEpo interacciona con REpo y R βc , lo que, en consecuencia, sugiere su unión al receptor heterodimérico REpo/R βc . Estos resultados concuerdan con los de Xu y colaboradores (2009), quienes, en un ensayo de protección del miocardio por cEpo frente a un daño por isquemia en ratones Balb/c, observaron co-inmunoprecipitación de R βc con REpo.

La interacción de cEpo y el receptor heterodimérico fue demostrada en las líneas celulares SH-SY5Y y TF-1, y probablemente podría ocurrir también en la línea UT-7. Sin embargo, si la cEpo actúa vía el heteroreceptor en todas estas líneas, resulta insólito que la acción de cEpo sea tan diferente en las células neuronales y en las eritroides.

Por otro lado, Epo estaría actuando a través de su receptor REpo-REpo, ya que en ensayos de interferencia, GM-CSF no interfiere en su acción, aunque no se descarta la posibilidad de que también lo pueda hacer a través del REpo-R βc , ya que la acción protectora disminuye levemente en presencia de GM-CSF o de anti R βc . Este hallazgo no es inesperado ya que hay antecedentes de que Epo induce la fosforilación de tirosina en la subunidad R βc de células UT-7 (Hanazono *et al*, 1995). La capacidad dual de la Epo probablemente depende de la densidad de subunidades de los receptores. Así, la subunidad REpo se asociaría con otra igual para formar el dímero (REpo)₂ o, según la disponibilidad, podría asociarse con una subunidad R βc para formar el complejo heterodimérico.

Se puede concluir que, en los modelos celulares empleados, Epo actuaría a través de ambos receptores, el homodímero (REpo/REpo) y el heterodímero (REpo/R β c), en coincidencia con Sautina y colaboradores (2010), y Brines y colaboradores (2004), y cEpo a través del heterodímero.

Si bien los resultados de este capítulo aportan información novedosa con respecto a la interacción de ambas eritropoyetinas con los receptores en estudio, ni la modulación de la expresión de los receptores ni la interferencia de los distintos factores en la unión del ligando a su receptor permite explicar completamente el comportamiento diferente entre Epo y cEpo demostrado en el capítulo I.

CAPÍTULO III

VÍAS DE SEÑALIZACIÓN ACTIVADAS POR ERITROPOYETINA Y ERITROPOYETINA CARBAMILADA EN LINEAS CELULARES ERITROIDES Y NEURONALES

En los capítulos anteriores hemos demostrado la acción de la eritropoyetina y su variante modificada, la eritropoyetina carbamilada, en distintos modelos celulares, así como también los receptores involucrados en los efectos de ambas eritropoyetinas sobre célula eritroides y neuronales. Una de las preguntas que surgió al interpretar los datos obtenidos en los ensayos de los Capítulos I y II fue la siguiente: Si la cEpo interacciona con receptores en las células TF-1, y probablemente también en las UT-7, ¿por qué no manifiesta una acción similar a la de Epo o del factor de crecimiento GM-CSF?

Para lograr explicar la acción diferencial observada entre Epo y cEpo, decidimos enfocarnos en el estudio de distintos intermediarios de la vía de proliferación celular, ya que según nuestra hipótesis, esta vía sería la clave por la cual la cEpo no estimula la eritropoyesis.

III.1. FOSFORILACIÓN DE JAK2 EN CÉLULAS SH-SY5Y, TF-1 Y UT-7

Como ya describimos, cuando la Epo se une a su receptor, se genera la activación de la tirosina kinasa Jak2. Dicha activación, lleva a la fosforilación de distintas moléculas *target*, las cuales forman parte de diversas vías de señalización. Como ya mencionamos, una de estas vías es la de la proliferación celular. Comenzamos evaluando si cEpo, como Epo, es capaz de generar la activación de Jak2, analizando la fosforilación de este factor, tanto en las células eritroides UT-7 y TF-1, como en las células neuronales SH-SY5Y. Los resultados obtenidos pueden observarse en la figura 33.

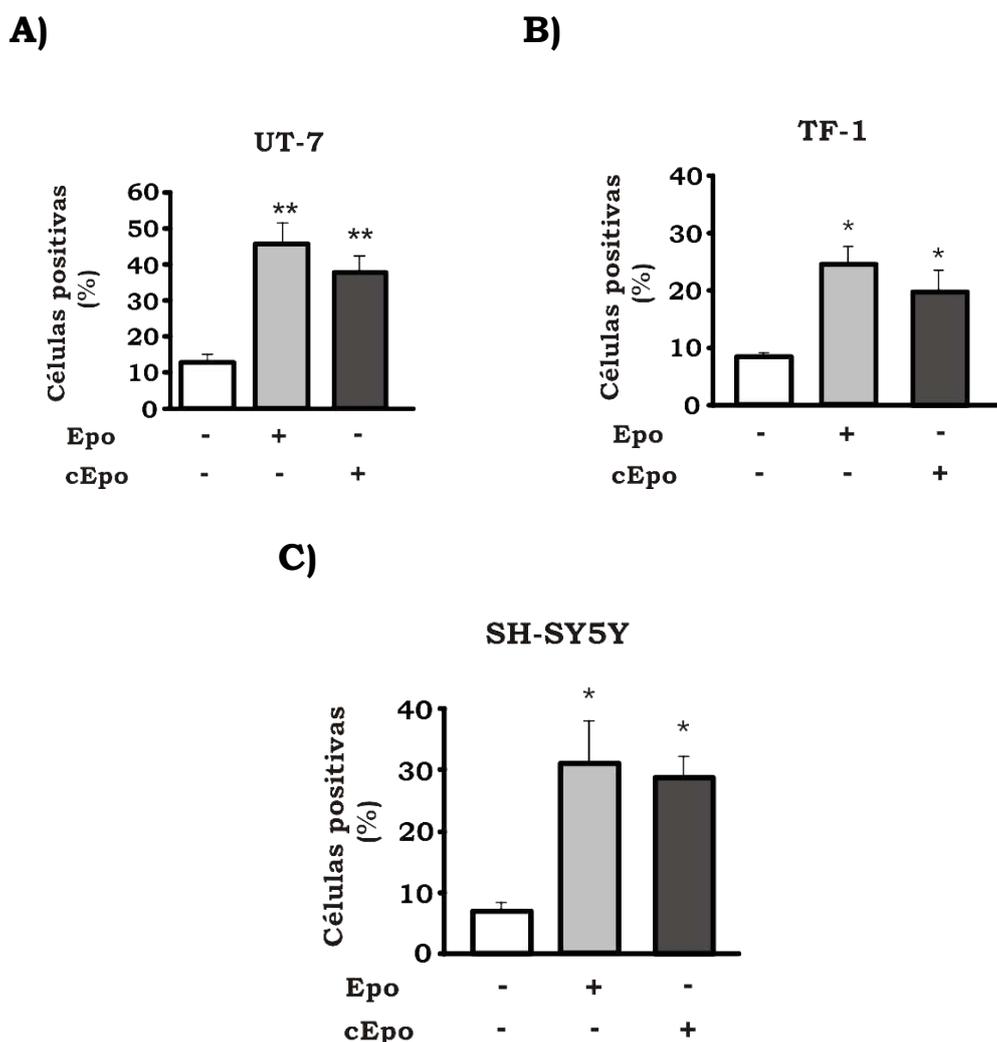


Figura 33: Activación por cEpo y Epo de Jak2 en distintas líneas celulares. Las células UT-7 (A) o TF-1 (B) fueron privadas de factores de crecimiento por 18 h y luego incubadas con Epo o cEpo (20 ng/mL), mientras que las células SH-SY5Y fueron incubadas con Epo o cEpo (250 ng/mL) (C). El período de tratamiento fue de 10 min. Los cultivos celulares fueron expuestos durante 20 min a un anticuerpo anti pJak2 y luego, 30 min, a un segundo anticuerpo acoplado a Alexa Fluor 488. La fosforilación de Jak2 fue analizada por citometría de flujo. Diferencias significativas: (A y B) cEpo o Epo vs. S/FC, **P<0,01 ó *P<0,05; cEpo vs. Epo, NS. (C) cEpo o Epo vs. Control, *P<0,05 (n=3).

Como se esperaba debido a su acción similar, ambas eritropoyetinas activan a Jak2 en células neuronales SH-SY5Y. Sin embargo, inesperadamente, se encontró que tanto cEpo como Epo, inducen la fosforilación de Jak2 en las células UT-7 y TF-1, a pesar de que la cEpo no permite la supervivencia celular y proliferación celular. Este hallazgo da indicio y confirmaría la interacción de ambas

eritropoyetinas con receptores de las células eritroides, detectada en el Capítulo anterior.

III.2. VÍA DE SEÑALIZACIÓN PI3K/Akt/FOXO3a/p27^{Kip1}, RELACIONADA CON LA SUPERVIVENCIA Y PROLIFERACIÓN CELULAR

III.2.1. FOSFORILACIÓN DE Akt

Continuando con la vía de señalización de proliferación celular, estudiamos la proteína Akt, activada por Jak2 en esta vía de señalización. Analizamos su fosforilación en cultivos de células UT-7 incubados con Epo o cEpo, durante distintos periodos (Figura 34).

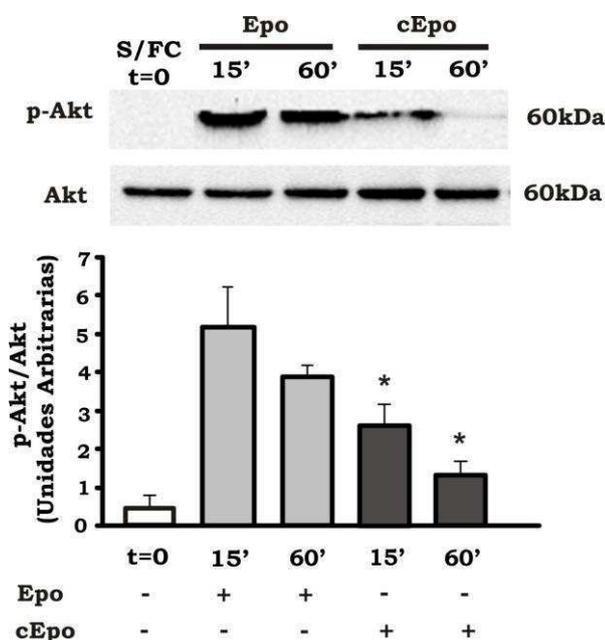


Figura 34: Evaluación de la fosforilación de Akt por Epo y cEpo en células UT-7. Células UT-7 fueron privadas de su factor de crecimiento por 18 h (t=0), y luego expuestas a Epo (20 ng/mL) o cEpo (20 ng/mL) durante 15 min (15') o 60 min (60'). Los lisados celulares fueron analizados por SDS-PAGE e *immunoblotting*, realizando la detección por quimioluminiscencia después de reacción con anticuerpo anti pAkt y anti Akt, y posteriormente con un segundo anticuerpo anti IgG conjugado con peroxidasa. La detección de la proteína Akt se utilizó como control de carga proteica. Los resultados que se muestran son representativos de 3 ensayos independientes. Diferencias significativas: cEpo 60' vs. Epo 60' y cEpo 15' vs. Epo 15', *P<0,05.

Los resultados obtenidos por *Western blotting*, indican que cEpo generó fosforilación de Akt a los 15 min, mientras que a los 60 min la intensidad de la carga proteica es inapreciable. En tanto, Epo indujo la fosforilación de Akt a los 15 min con mayor intensidad que con cEpo, y esta expresión se mantuvo en el tiempo, por lo menos hasta los 60 min.

III.2.2. FOSFORILACIÓN DE FOXO3a

El siguiente paso fue determinar la fosforilación del factor de transcripción FOXO3a en las células UT-7 y TF-1 estimuladas con Epo, GM-CSF o cEpo.

III.2.2.1. Fosforilación de FOXO3a en células UT-7

Los resultados obtenidos de fosforilación de FOXO3a en células UT-7, a distintos tiempos, tanto en presencia de Epo o cEpo pueden observarse en la siguiente figura.

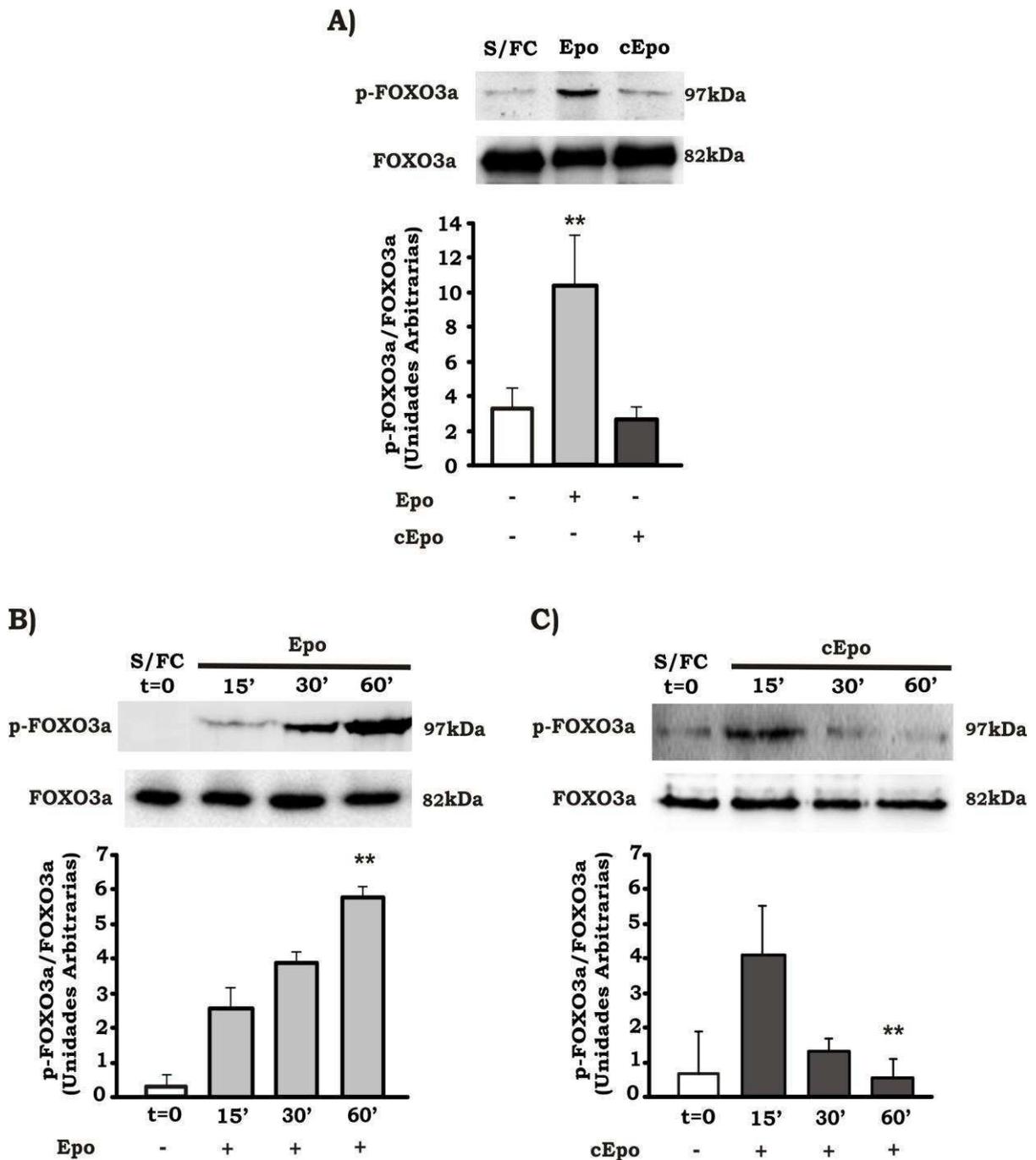


Figura 35: Inducción de la fosforilación de FOXO3a en células UT-7, por Epo o cEpo. Células UT-7 fueron privadas del factor de crecimiento por 18 h (t=0) y luego expuestas a Epo (20 ng/mL) o cEpo (20 ng/mL) durante 24 h (A). Otros cultivos fueron expuestos por 15 min, 30 min o 60 min a Epo (20 ng/mL) (B) o cEpo (20 ng/mL) (C). Se determinó la fosforilación de FOXO3a por SDS-PAGE y *Western blotting*. Se realizó la detección por reacción con anticuerpo monoclonal anti pFOXO3a y anti FOXO3a, y un segundo anticuerpo anti IgG conjugado con peroxidasa, revelando por quimioluminiscencia. Los resultados que se muestran son representativos de 3 ensayos con resultados similares. Diferencias significativas: (A) Epo vs. cEpo o S/FC, **P<0,01. (B y C) Epo 60' vs. Epo 15' y cEpo 60' vs. cEpo 15', **P<0,01.

Después de observar, en un primer ensayo, la acción significativamente diferente de Epo y cEpo con respecto a la activación de FOXO3a después de 24 h de cultivo (Figura 35.A), se decidió realizar un estudio cinético para explicar mejor la acción diferencial de las eritropoyetinas. En la figura se puede apreciar que en la línea celular UT-7, cEpo induce la fosforilación de FOXO3a sólo a los 15 min, efecto que luego decae hasta desaparecer antes de los 60 min (Figura 35.C). Mientras tanto, la Epo induce fosforilación de FOXO3a ya a los 15 min, observándose un aumento paulatino de la intensidad de fluorescencia a los 30 min y aún mayor a los 60 min (Figura 35.B).

III.2.2.2. Fosforilación de FOXO3a en células TF-1

Debido a que el hallazgo mostrado en la Figura 35 constituye la primera diferencia entre las vías de señalización inducidas por Epo o por cEpo, se decidió analizar la fosforilación de FOXO3a también en las células TF-1. Los resultados pueden observarse en la figura 36.

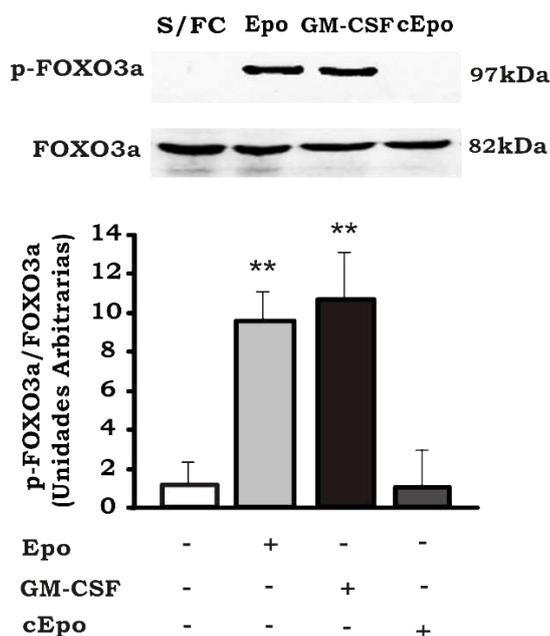


Figura 36: Fosforilación de FOXO3a en TF-1, expuestas a distintos factores de crecimiento. Células TF-1 fueron privadas de sus factores de crecimiento por 18 hs (t=0) y luego expuestas a Epo (20 ng/mL), GM-CSF (4 ng/mL) o cEpo (20 ng/mL) durante un periodo de 30 min. Los lisados celulares fueron analizados por SDS-PAGE e *immunoblotting*. Se realizó la detección por quimioluminiscencia después de reacción con anticuerpo anti pFOXO3a y anti FOXO3a, y un segundo anticuerpo anti IgG conjugado con peroxidasa. La detección de la proteína FOXO3a se utilizó como control de carga proteica. Diferencias significativas: Epo o GM-CSF vs. cEpo o S/FC, **P<0,01 (n=4).

El análisis de la expresión de pFOXO3a en células TF-1, determina que tanto Epo, como cEpo inducen la activación del factor de transcripción a los 30 min, mientras que en presencia de cEpo, al igual que en ausencia de factores de crecimiento, no se observó la fosforilación de dicho factor.

III.2.3. EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA REGULATIVA DEL CICLO CELULAR

p27^{kip1}

En la terminación del camino de señalización, p27^{kip1} es la proteína involucrada en la continuación del ciclo celular y, por lo tanto de la proliferación celular. Estudiamos su expresión en las líneas celulares UT-7, TF-1 y SH-SY5Y (Figura 37).

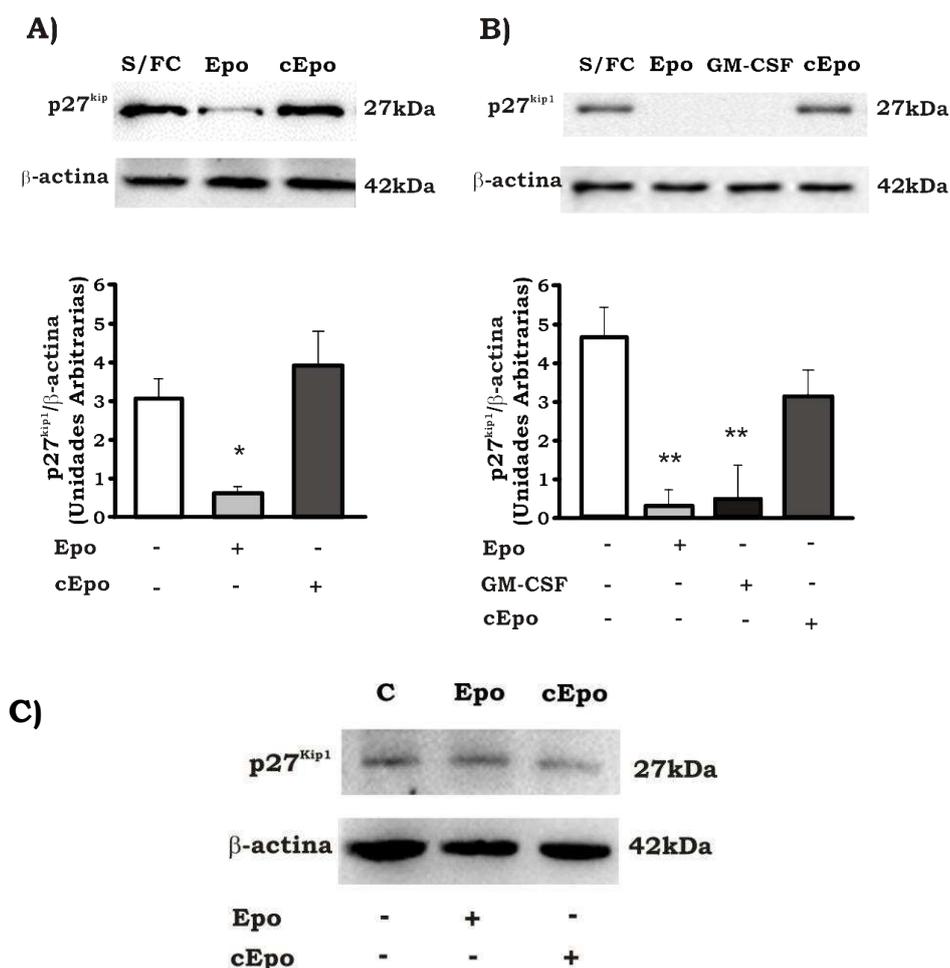


Figura 37: Expresión de la proteína regulativa de la proliferación celular p27^{kip1} en células eritroides. Las células UT-7 (A) o TF-1 (B) fueron privadas de factores de crecimiento por 18 h y luego incubadas con Epo (20 ng/mL), GM-CSF (4 ng/mL) o cEpo (20 ng/mL) durante 24 h adicionales. Cultivos de células SH-SY5Y fueron incubados con Epo o cEpo (20 ng/mL) durante 24 h (C). Los lisados celulares fueron analizados por SDS-PAGE e *immunoblotting*, siendo expuestos al anticuerpo anti p27^{kip1} y posteriormente a anti IgG conjugado con peroxidasa, para ser revelado por quimioluminiscencia. La detección de β-actina se utilizó como control de carga proteica. Diferencias significativas: (A) Epo vs. cEpo o S/FC, *P<0,05. (B) Epo o GM-CSF vs. cEpo o S/FC, **P<0,01 (n=4).

La presencia de cEpo en los cultivos mantuvo los niveles de la expresión de p27^{kip1}, al igual que en los cultivos en ausencia del factor de crecimiento en ambas líneas celulares. Al contrario, la presencia de Epo en los cultivos de células UT-7 o la de Epo o GM-CSF, en los cultivos de células TF-1, impidió la expresión de la proteína reguladora p27^{kip1}.

Resultó interesante comparar estos datos con los de la expresión de p27^{kip1} en las células neuronales SH-SY5Y, ya que éstas no dependen de Epo o cEpo para proliferar. En esta línea celular se encontró, aunque débil, la expresión de p27^{kip1} en presencia de ambas eritropoyetinas (Figura 37.C).

III.2.4. DETERMINACIÓN DEL CICLO CELULAR

Mayores detalles de la evaluación de la proliferación celular fueron obtenidos mediante la determinación del ciclo celular por citometría de flujo. Luego de realizados los tratamientos, los cultivos celulares fueron incubados con yoduro de propidio, para la tinción nuclear. Los resultados obtenidos se pueden apreciar en la siguiente figura.

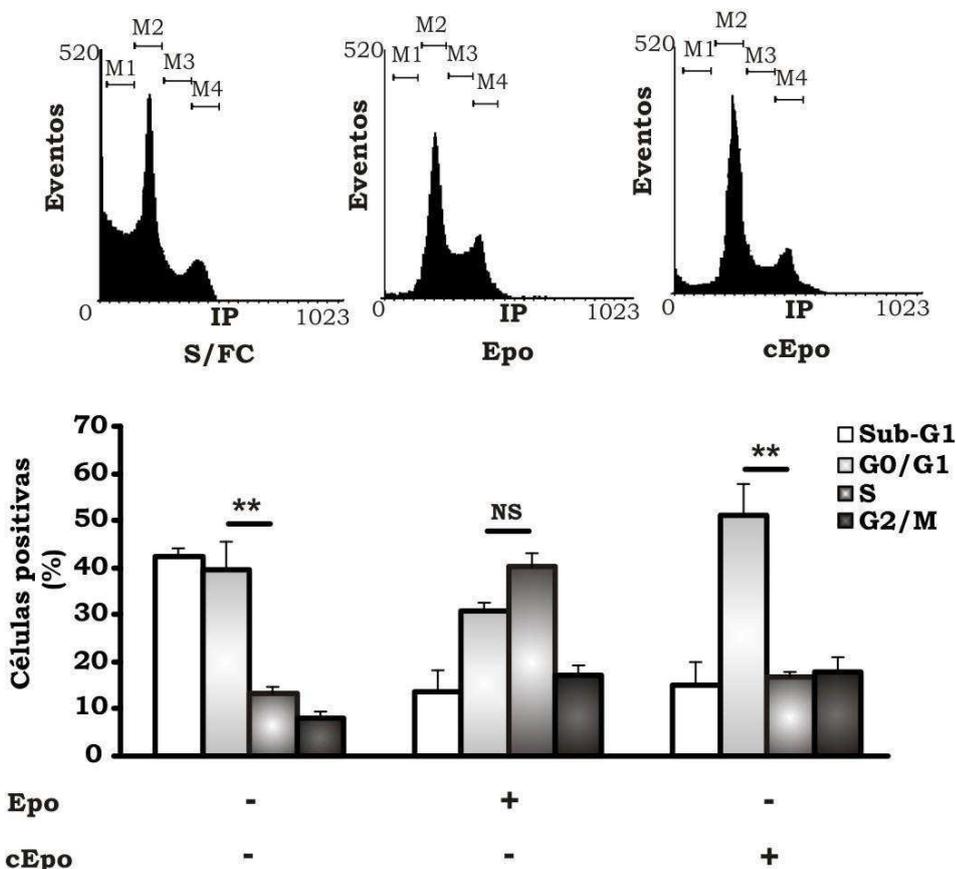


Figura 38: Determinación del ciclo celular en células UT-7. Los cultivos celulares fueron privados de Epo y luego de la incubación con Epo (20 ng/mL) o cEpo (20 ng/mL) por 24 h, se determinó el contenido de ADN por tinción con IP y citometría de flujo. Los histogramas indican el porcentaje de células con respecto a la intensidad de fluorescencia (contenido de ADN), representativos de 4 ensayos independientes. Cada barra corresponde a células positivas en cada fase del ciclo celular. **P<0,01; NS: no significativo.

En cultivos de células UT-7, Epo generó un aumento de la fase S y G2/M mientras que en presencia de cEpo se observó un arresto celular en la fase G1, sin permitir la progresión hacia S. Estos resultados concuerdan con lo observado en los ensayos de fosforilación de FOXO3a por parte de Epo y no de cEpo, así como la coincidente disminución de la transcripción de la proteína reguladora del ciclo celular p27^{kip1} por parte de Epo y no de cEpo.

III.3. VÍA Ras/ERK1/ERK2 DE PROLIFERACIÓN Y DIFERENCIACIÓN CELULAR. FOSFORILACIÓN DE LA PROTEÍNA ERK1/2

Además de la ya mencionada vía de señalización de Akt/FOXO3a/p27^{kip1}, otra de las vías también involucradas en la proliferación celular es la de Ras/ERK1 y ERK2, activada también por Jak2. Hemos estudiado la fosforilación de ERK1/2, para determinar si existe una correlación con los resultados obtenidos en la sección III.2. (Figura 39).

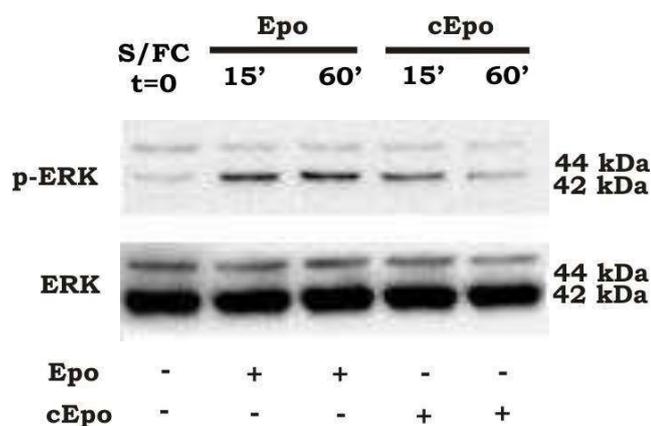


Figura 39: Evaluación de la fosforilación de ERK por Epo y cEpo en células UT-7. Cultivos celulares fueron privados de su factor de crecimiento por 18 h (t=0), y luego expuestos a Epo (20 ng/mL) o cEpo (20 ng/mL) durante 15 min (15') o 60 min (60'). Los lisados celulares fueron analizados por SDS-PAGE e *immunoblotting*, realizando la detección por quimioluminiscencia después de reacción con anticuerpo anti pERK y anti ERK, y posteriormente un segundo anticuerpo anti IgG conjugado con peroxidasa. La detección de la proteína ERK se utilizó como control de carga proteica.

El estudio de la proliferación celular por otras de las vías de señalización involucradas, demostró que, nuevamente, la presencia de cEpo solo permitió la fosforilación de ERK1/2 a los 15 min, mientras que la presencia de Epo mantuvo la fosforilación tanto a los 15 min, como a los 60 min.

III.4. EXPRESIÓN DE FACTORES ANTIAPOPTÓTICOS

En la vía de señalización por Epo, también se activan factores antiapoptóticos para la supervivencia celular, como Bcl2 y BclX_L. La inducción de ambos agentes por Epo y por cEpo fue analizada mediante su expresión proteica en la línea eritroide UT-7.

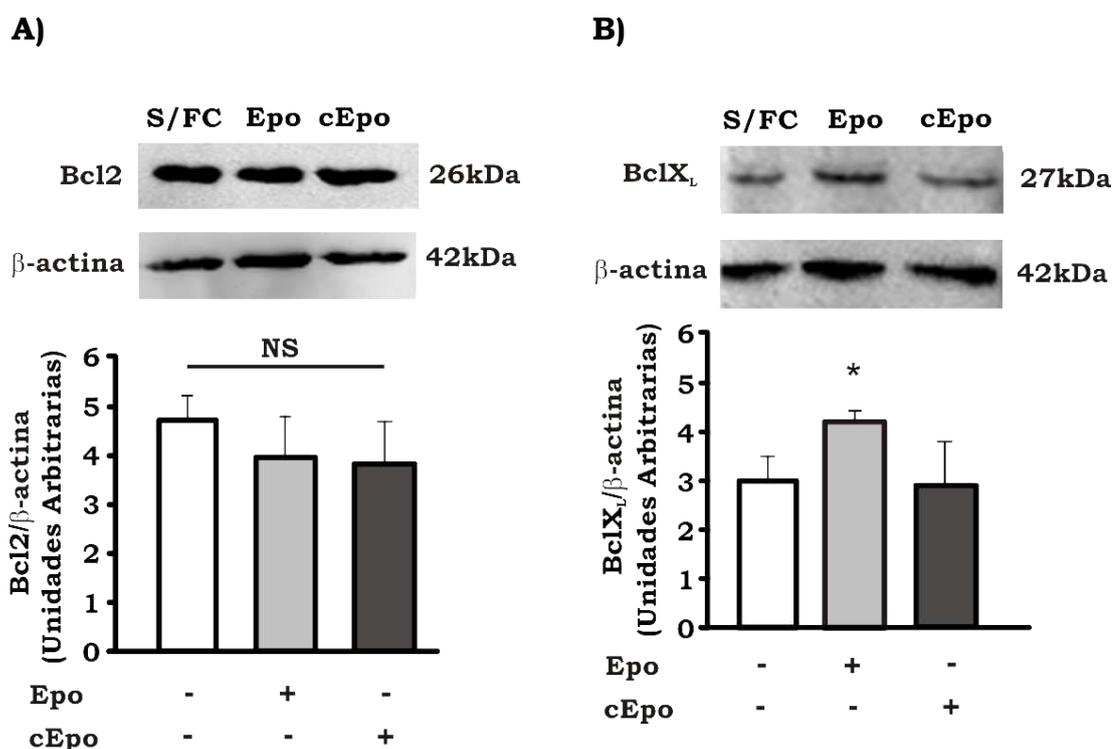


Figura 40: Expresión de las proteínas antiapoptóticas Bcl2 y BclX_L en células UT-7. Las células UT-7 fueron privadas de Epo por 18 h y luego incubadas con Epo (20 ng/mL) o cEpo (20 ng/mL) por 24 h. Los lisados celulares fueron analizados por SDS-PAGE e *immunoblotting*, siendo expuestos al anticuerpo anti Bcl2 (A) o anti BclX_L (B), y posteriormente a anti IgG conjugado con peroxidasa, para su revelado por quimioluminiscencia. La detección de β-actina se utilizó como control de carga proteica. Diferencias significativas: Epo vs. cEpo o S/FC, *P<0,05; NS, no significativo (n=3).

En células UT-7 no se observaron diferencias significativas en la expresión del agente antiapoptótico Bcl2 con respecto a las células control. La intensidad de BclX_L se vio disminuida en los cultivos que no presentaban factor de crecimiento, al igual que en presencia de cEpo, a diferencia de aquéllos estimulados por Epo donde sí se puede observar un aumento la expresión del agente antiapoptótico BclX_L.

III.5. ACTIVACIÓN DE JAK2 Y PI3K POR Epo Y POR cEpo EN CÉLULAS SH-SY5Y

No se ha observado una acción proliferativa de la Epo sobre células neuronales, por eso, tampoco se espera una acción similar por cEpo. En cambio, la acción antiapoptótica de Epo en células SH-SY5Y, así como su activación mediada por las vías de Jak2 y PI3K, ya es bien conocida y ha sido estudiada anteriormente en el laboratorio. Por eso, se comparó la activación de esta vía por cEpo.

Hemos analizado la participación de PI3K, utilizando el inhibidor Ly294002, y para corroborar lo observado en la sección III.1.C., también utilizamos el inhibidor de Jak2 (AG490). Se realizaron ensayos para determinar la participación de los factores de señalización mencionados en los efectos protectores de Epo y cEpo en cultivos de células neuronales SH-SY5Y frente a dos agentes proapoptóticos, STP y TNF- α .

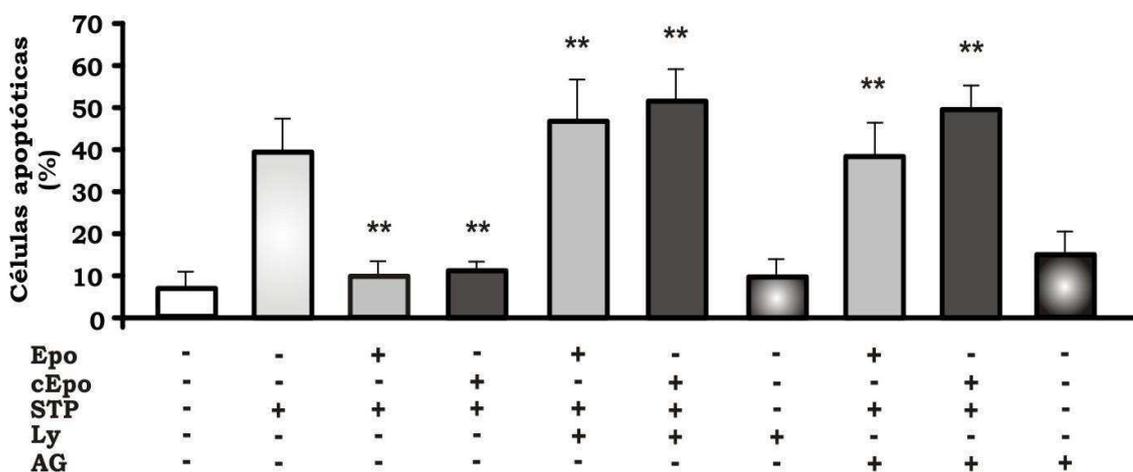


Figura 41: Inhibición de las vías de señalización de PI3K y Jak2 en células SH-SY5Y frente al agente proapoptótico STP. Células SH-SY5Y fueron cultivadas en presencia de 250 ng/mL de Epo o cEpo durante 24 h y luego, expuestas a 50 nM de STP por 24 h adicionales. Diferentes cultivos fueron preincubados con 25 μ M Ly294002 (inhibidor de la vía PI3K) o 25 μ M AG490 (inhibidor de la vía Jak2), 2 h antes del agregado de las variantes eritropoyéticas. Los cambios de la morfología nuclear fueron detectados por microscopía de fluorescencia luego de la tinción con Hoechst. Diferencias significativas: Epo+STP o cEpo+STP vs. STP; Ly+Epo+STP o Ly+cEpo+STP vs. Epo+STP o cEpo+STP; y AG+Epo+STP o AG+cEpo+STP vs. Epo+STP o cEpo+STP, **P<0,01; Epo+STP vs. cEpo+STP, NS; Ly+Epo+STP vs. Ly+cEpo+STP, NS; AG+Epo+STP vs. AG+cEpo+STP, NS (n=3).

Las acciones antiapoptóticas de cEpo y Epo en células SH-SY5Y muestran mecanismos mediados por las vías de señalización PI3K y Jak2, ya que en presencia de los inhibidores de PI3K y de Jak2, fue anulado el efecto antiapoptótico de ambas eritropoyetinas en las células neuronales, frente al agente proapoptótico STP.

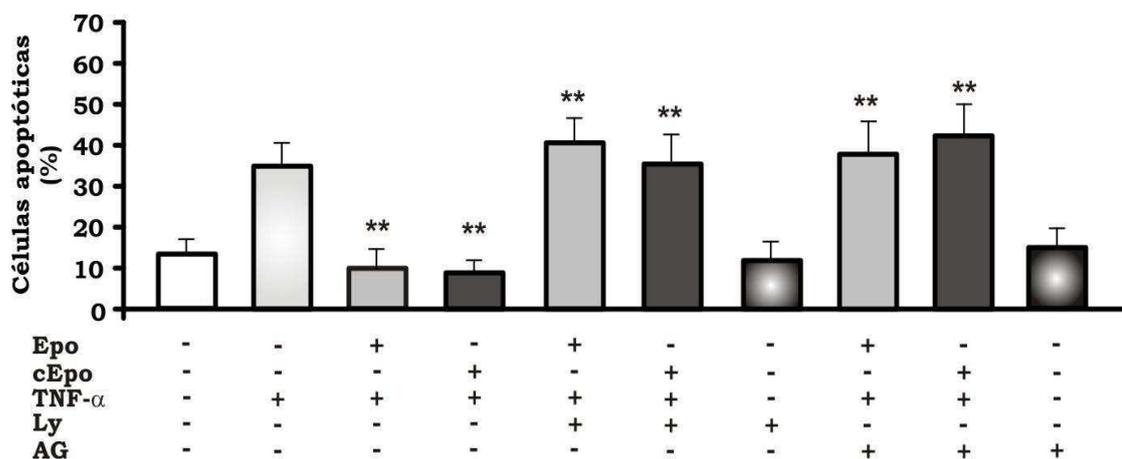


Figura 42: Inhibición de las vías de señalización de PI3K y Jak2 en células SH-SY5Y frente al agente proapoptótico TNF- α . Células SH-SY5Y fueron cultivadas en presencia de 250 ng/mL de Epo o cEpo durante 24 h y luego, expuestas 24 h más a 25 ng/mL TNF- α . Se realizaron ensayos con LY294002 o AG490 adicionados a los cultivos 2 h antes de la adición de las eritropoyetinas: Diferencias significativas: Epo+TNF- α o cEpo+TNF- α vs. TNF- α ; Ly+Epo+TNF- α o Ly+cEpo+TNF- α vs. Epo+TNF- α o cEpo+TNF- α ; AG+Epo+TNF- α o AG+cEpo+TNF- α vs. Epo+TNF- α o cEpo+TNF- α , **P<0,01; Epo+TNF- α vs. cEpo+TNF- α , NS; Ly+Epo+TNF- α vs. Ly+cEpo+TNF- α , NS; AG+Epo+TNF- α vs. AG+cEpo+TNF- α , NS (n=3).

La presencia de cualquiera de los inhibidores, Ly294002 o AG490, impidió las acciones antiapoptóticas de cEpo y de Epo, frente a la citoquina proinflamatoria TNF- α . Por lo tanto, confirmando lo observado en los resultados anteriores, las vías de señalización mediadas por Jak2 y por PI3K están involucradas en los efectos neuroprotectores tanto de Epo como de cEpo.

CONCLUSIONES

- **cEpo, al unirse a “su receptor”, genera la fosforilación de Jak2, tanto en células eritroides como neuronales. Dicha activación es mediada por PI3K, como en la vía de señalización ya conocida de la Epo.**
- **La activación de Akt y FOXO3a sólo es observada a los 15 minutos por cEpo, mientras que con Epo perdura más en el tiempo, ya que no sólo se observa a los 15 minutos, sino también a los 60 minutos.**
- **En la activación por cEpo, al disminuir la fosforilación de FOXO3a, este factor se transloca al núcleo donde promueve la transcripción de p27^{kip1}.**
- **Aumenta la expresión de p27^{kip1} en presencia de cEpo, mientras que no ocurre lo mismo en cultivos estimulados por Epo.**
- **La modulación positiva del factor regulatorio de la proliferación celular es coincidente con el arresto del ciclo celular en la fase G1, observado en presencia de cEpo, a diferencia de los cultivos estimulados por Epo en los que continúa el ciclo a la fase de división celular, S.**
- **En la vía de Ras, cEpo sólo indujo una fosforilación transitoria de ERK, observada a los 15 min. En cambio, en presencia de Epo la fosforilación se mantiene aún a los 60 min, algo similar a lo observado en la vía de PI3K.**
- **El efecto final en presencia de cEpo es la disminución o anulación de la proliferación de células eritroides, motivo por el cual la cEpo no presenta el efecto eritropoyético de la Epo. A ello se suma que cEpo, no logra activar uno de los factores antiapoptóticos, el bclX_L.**
- **En células SH-SY5Y, la protección tanto por Epo como de cEpo sería a través de las mismas vías de señalización, Jak2/PI3K.**

DISCUSIÓN

En el capítulo II, concluimos que la cEpo estaría actuando a través del heteroreceptor REpo-R β c y Epo a través de REpo-REpo, aunque no descartamos la posibilidad de que también lo haga a través del REpo-R β c. Sin embargo esta información es incompleta para explicar el objetivo principal de este trabajo de tesis, con respecto a la acción diferencial de ambas eritropoyetinas. Por este motivo, en este capítulo III, enfocamos la investigación al camino de señalización intracelular, más específicamente a la vía de proliferación, que es la diferencia principal encontrada entre ambas en el capítulo I.

El dominio citoplásmico del receptor de Epo, perteneciente a la superfamilia de receptores de citoquina, se puede dividir en dos regiones principales. La parte más cercana a la membrana plasmática es requerida para la generación de las señales de proliferación y diferenciación (Ohashi *et al*, 1994). El dominio restante no se requiere para esta señalización, y por el contrario, actúa en la amortiguación de las señales. Se sabe que la quinasa de tirosina Jak2 está asociada a la región cercana a la membrana plasmática, y sufre autofosforilación, al mismo tiempo que fosforila al receptor de Epo, y a otros factores de transcripción (Witthuhn *et al*, 1993).

Inesperadamente, observamos que, en forma similar a su efecto sobre células neuronales, la cEpo indujo la fosforilación de Jak2 en las células UT-7 y TF-1 (Figura 33) a pesar de su incapacidad para actuar como factor de crecimiento en estas líneas celulares. Este hallazgo indica que la interacción de cEpo involucra un receptor que pertenece a la superfamilia de las citoquinas. La posibilidad de interacción de cEpo con el R β c en las células TF-1 y la activación de las células UT-7 y TF-1 por cEpo, detectada por la fosforilación de Jak2, nos motivó a investigar la vía relacionada con la acción de la eritropoyetina que se altera después de la carbamilación de la molécula.

Jak2 es generalmente importante en la transmisión de señales desde la superficie celular al núcleo. Como cEpo parece retener la capacidad antiapoptótica de Epo, se enfocó el análisis hacia factores que se encuentran involucrados en la proliferación celular, tales como Akt, FOXO3a y p27^{kip1}.

La activación de Akt, detectada por la expresión de la proteína fosforilada, fue observada a los 15 minutos de ser expuestas las células eritroides a cEpo pero la expresión fue prácticamente indetectable a los 60 minutos. En cambio, la incubación con Epo generó la fosforilación de Akt y se vio sólo levemente disminuida en el mismo periodo (Figura 34).

El hecho de que un mayor nivel de expresión de pFOXO3a se correlacione en forma directamente proporcional con la supervivencia refleja el hecho de que el factor de transcripción FOXO3a, al ser activado por Akt, vía PI3K, se fosforila, lo que provoca su salida del núcleo impidiendo la transcripción de genes fundamentales para apoptosis y regulación del ciclo celular (Medema *et al*, 2000; Accili *et al*, 2004).

En las células UT-7, cEpo sólo indujo la fosforilación de FOXO3a a los 15 minutos, activación que fue luego decayendo rápidamente, mientras que, en presencia de Epo, los niveles de expresión de pFOXO3a fueron aumentando progresivamente desde los 15 hasta los 60 minutos, manteniéndose aún a las 24 h (Figura 35). En las células TF-1, a los 30 minutos sólo se observó fosforilación de FOXO3a en presencia de Epo y GM-CSF (Figura 36).

Uno de los genes clave que regula FOXO3a, es *TP27*, cuya producto de expresión es la proteína p27^{kip1} o inhibidor de quinasa dependiente de la ciclina 1B. Es un importante regulador del ciclo celular dado que inhibe las ciclinas E y A, provocando el arresto del ciclo celular en G1 (Shin *et al*, 2005; Grimmler *et al*, 2007). Tal como se esperaba, los mayores niveles de pFOXO3a se asociaron con disminuida expresión de p27^{kip1} (Figuras 35-37). Se conoce que Epo controla la fosforilación de FOXO3a por la vía de señalización PI3K/Akt, así como su retención en el citoplasma a través de la unión a proteínas 14-3-3 (Maiese *et al*, 2008). De esta forma, FOXO3a fosforilado no se transloca al núcleo, y por consiguiente, genera la disminución de la transcripción de los genes diana, entre los cuales se encuentra, p27^{kip1}, conocido por ser una molécula clave en la modulación del ciclo celular (Nakao *et al*, 2008).

Como vimos anteriormente, al disminuir el período de fosforilación de FOXO3a en presencia de cEpo, este factor se transloca rápidamente al núcleo y promueve la transcripción de p27^{kip1}, el inhibidor de la quinasa dependiente de ciclina (Figura 37). Por ello, resultó interesante estudiar el ciclo celular en cultivos estimulados con Epo y con cEpo. Bajo el estímulo de Epo, se incrementó el número de células en fase S, mostrando que el estímulo podía promover la transición G1-S, mientras que la presencia de cEpo generó arresto celular en las fases G0-G1 (Figura 38), frenando así la proliferación celular. Este resultado coincide con la inducción de la fosforilación de FOXO3a y la concomitante regulación negativa de p27^{kip1} por acción de Epo y la rápida desaparición de pFOXO3a que permite la inducción del factor inhibidor del ciclo celular en cultivos estimulados por cEpo.

Los resultados observados en la vía de Jak2/PI3K/Akt (Figura 34), se correlacionan con los hallados en el estudio de otra de las vías de proliferación, como la de Jak2/Ras, ERK1 y ERK2, donde sólo se observó fosforilación de cEpo a los 15 minutos, a diferencia de lo ocurrido en presencia de Epo, factor que indujo una fosforilación más prolongada (al menos 60 min) (Figura 39).

Estos resultados podrían explicar los reportados por Ramírez y colaboradores (2009), quienes observaron fosforilación de la señal Jak2/Akt en células UT-7 inducidas por darbepoetina carbamilada, observando poco efecto en las señales de proliferación celular (ERK1/2, NF- κ B y STAT-5) en células progenitoras endoteliales. Sin embargo, los resultados de nuestro trabajo permiten interpretar vías de señalización más avanzadas que confirman que la cEpo tiene disminuida su capacidad para activar caminos de señalización de proliferación celular.

Con respecto a la comparación con la vía antiapoptótica de Epo, cEpo fue incapaz de activar el factor antiapoptótico Bcl X_L en las células eritroides UT-7, mientras que no se observó modulación del factor antiapoptótico Bcl2 por ninguna de las eritropoyetinas estudiadas (Figura 40).

Con respecto a la comparación entre las acciones de Epo y cEpo sobre células neuronales, se realizaron ensayos con inhibidores de la vía Jak2/PI3K, evaluando la apoptosis de las células neuronales SH-SY5Y. Se pudo observar un comportamiento similar de Epo y cEpo sugiriendo que ambas actuarían por mecanismos iguales a pesar de estar, posiblemente, mediados por distintos receptores (Figuras 41,42). Estos resultados están en concordancia con los de Xu y colaboradores (2009), quienes observaron que el tratamiento de ratones con eritropoyetina carbamilada protegía la lesión del miocardio por isquemia/reperfusión aguda a través de un mecanismo dependiente de PI3K/Akt.

La actividad similar de Epo y cEpo sobre las células SH-SY5Y así como el hallazgo de p27^{kip1} después de la activación de estas células por Epo o cEpo no resulta inesperada, dado que cEpo mantiene su habilidad antiapoptótica ya que la línea neuronal de células SH-SY5Y no depende de estos factores de crecimiento para proliferar.

CAPÍTULO IV

ACCIÓN DE LA FOSFATASA PTP1B EN EL EFECTO DE LA ERITROPOYETINA Y LA ERITROPOYETINA CARBAMILADA EN CÉLULAS ERITROIDES

Si bien en el capítulo III se demuestra que la cEpo, al igual que la Epo, activa la señalización Jak2/PI3K, surgió la pregunta de cuál sería el posible hecho por el cual observamos que los intermediarios de dicha vía (Akt/FOXO3a), en presencia de cEpo, se encuentran fosforilados durante tiempos mucho más cortos que con Epo, llevando a la interrupción de la proliferación celular eritroide. Nuestra hipótesis fue que la diferencia de acción entre Epo y cEpo se podía deber a distinta activación de fosfatasa involucradas en la finalización de las señales.

Trabajos previos han probado que la PTP1B participa en la regulación negativa de la cascada de traducción de señales mediada por Epo. Esto sucede vía defosforilación del receptor de Epo, previamente activado por Epo (Cohen *et al*, 2004). En trabajos de nuestro laboratorio se ha visto una regulación recíproca de la PTP1B por Epo dependiendo de cada línea celular y su estadio de diferenciación. Además de la participación de diferentes mediadores de la vía de señalización como Jak2 y PI3K, así como de la respuesta de mensajeros secundarios como el calcio (Callero *et al*, 2007, Callero *et al*, 2011). Dado que esta fosfatasa ya ha sido bien estudiada en nuestro laboratorio en cultivos de células UT-7 y TF-1, los mismos modelos utilizados en este trabajo, postulamos que la PTP1B podría estar involucrada en la acción diferencial entre Epo y cEpo en células eritroides.

IV.1. EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA PTP1B FRENTE A LA ACCIÓN DE ERITROPOYETINA Y ERITROPOYETINA CARBAMILADA

Para investigar nuestra hipótesis, analizamos las posibles variaciones en los niveles de expresión de PTP1B en células UT-7 estimuladas con Epo o cEpo, luego de la privación del factor de crecimiento. Los resultados obtenidos pueden observarse en las siguientes figuras.

IV.1.1. Análisis por Western blotting

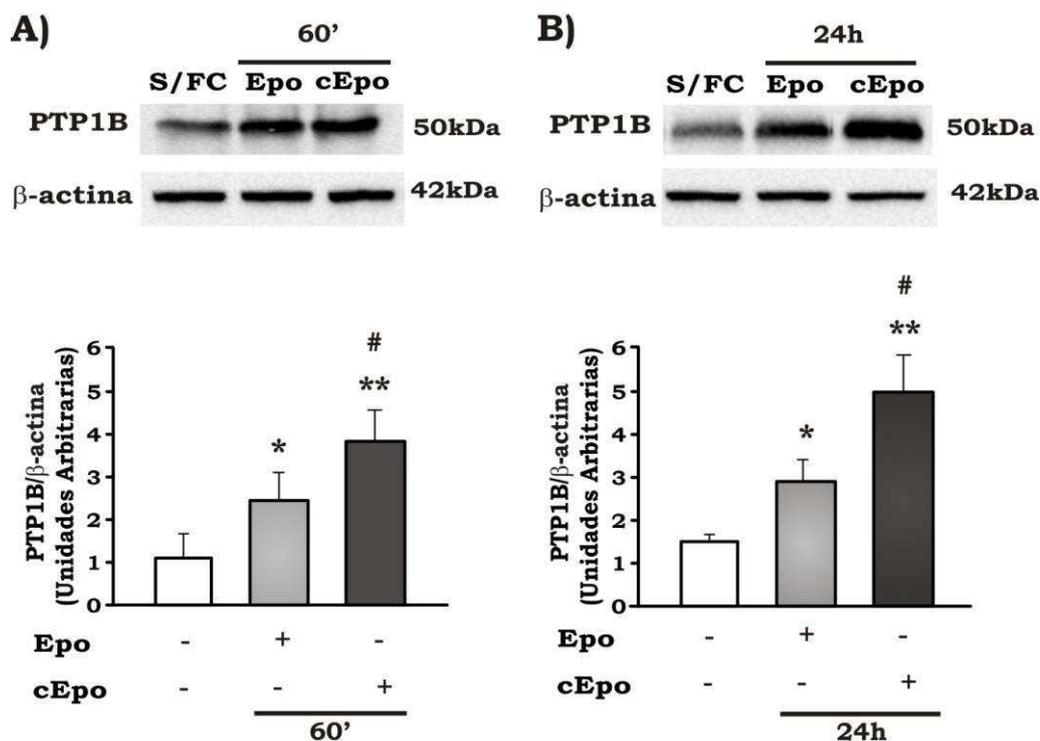


Figura 43: Expresión de la proteína fosfatasa PTP1B por Epo y cEpo en células UT-7. Las células fueron privadas de su factor de crecimiento por 18 h (t=0) y luego incubadas sin factor de crecimiento, con Epo (20 ng/mL) o cEpo (20 ng/mL) durante 60 min o 24 h. Los lisados celulares fueron analizados por SDS-PAGE e *immunoblotting*, siendo expuestos a un anticuerpo anti PTP1B y posteriormente a anti IgG conjugado con peroxidasa, para ser revelado por quimioluminiscencia. La detección de β-actina se utilizó como control de carga proteica. Diferencias significativas: cEpo vs. S/FC, **P<0,01; Epo vs. S/FC, *P<0,05, cEpo vs. Epo, #P<0,05 (n=4).

La expresión de la proteína fosfatasa 1B, aumentó bajo el estímulo celular por Epo, tanto a los 60 min como a las 24 horas. Esto es razonable ya que al unirse la Epo a su receptor se activa la señalización intracelular, así como también se activa la defosforilación de la señal por fosfatasas. De gran interés resultó el hallazgo de la generación de niveles significativamente mayores de la expresión de PTP1B en presencia de cEpo en comparación con Epo, en ambos tiempos analizados.

IV.1.2. Análisis por microscopía de fluorescencia

La variación de la expresión PTP1B también fue analizada por inmunofluorescencia, los resultados obtenidos se pueden observar en la figura 44.

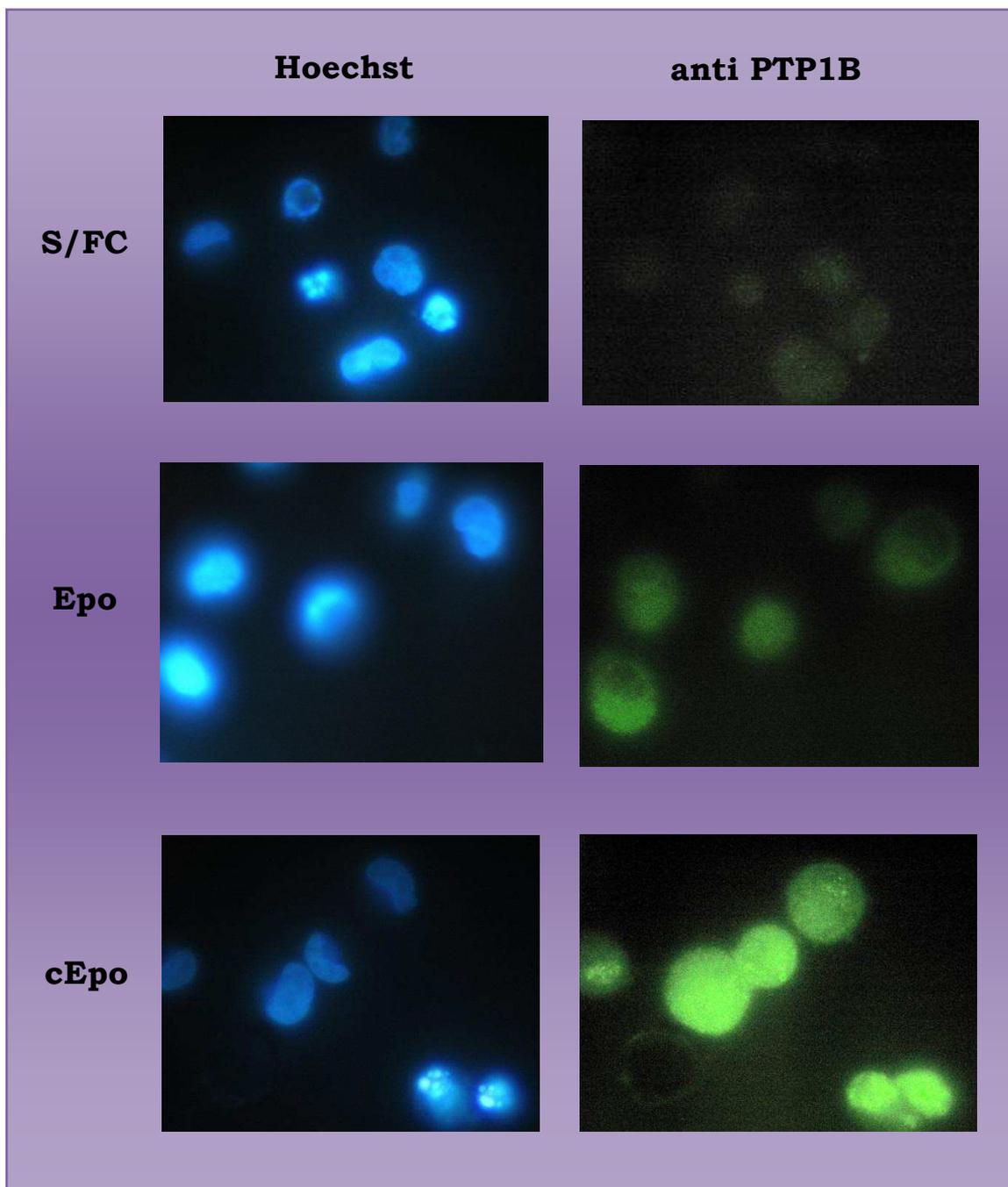


Figura 44: Expresión por fluorescencia de la fosfatasa PTP1B en células UT-7. Las células fueron privadas de su factor de crecimiento por 18 h y luego incubadas sin factor de crecimiento, con Epo (20 ng/mL) o cEpo (20 ng/mL) durante 60 min. Los cultivos celulares fueron incubados con el anticuerpo anti PTP1B, y luego, con un segundo anticuerpo acoplado a Alexa Fluor 488. Después de exposición al colorante Hoechst, una alícuota de la suspensión celular, fue analizada por microscopía de fluorescencia (1000x). Se observan los núcleos marcados con Hoechst en azul y la presencia de PTP1B con coloración verde, correspondientes a un mismo campo. Las fotografías son representativas de 3 ensayos independientes.

Al analizar este ensayo, se puede observar que la intensidad de fluorescencia de PTP1B en los tratamientos con cEpo fue mayor que en los tratamientos con Epo y más aún que en los cultivos no tratados. Estos resultados se correlacionan con la expresión proteica de PTP1B por *Western blotting*.

IV.1.3. Análisis mediante citometría de flujo

Otro de los métodos utilizados para determinar la expresión de PTP1B, fue el análisis por citometría de flujo (Figura 45).

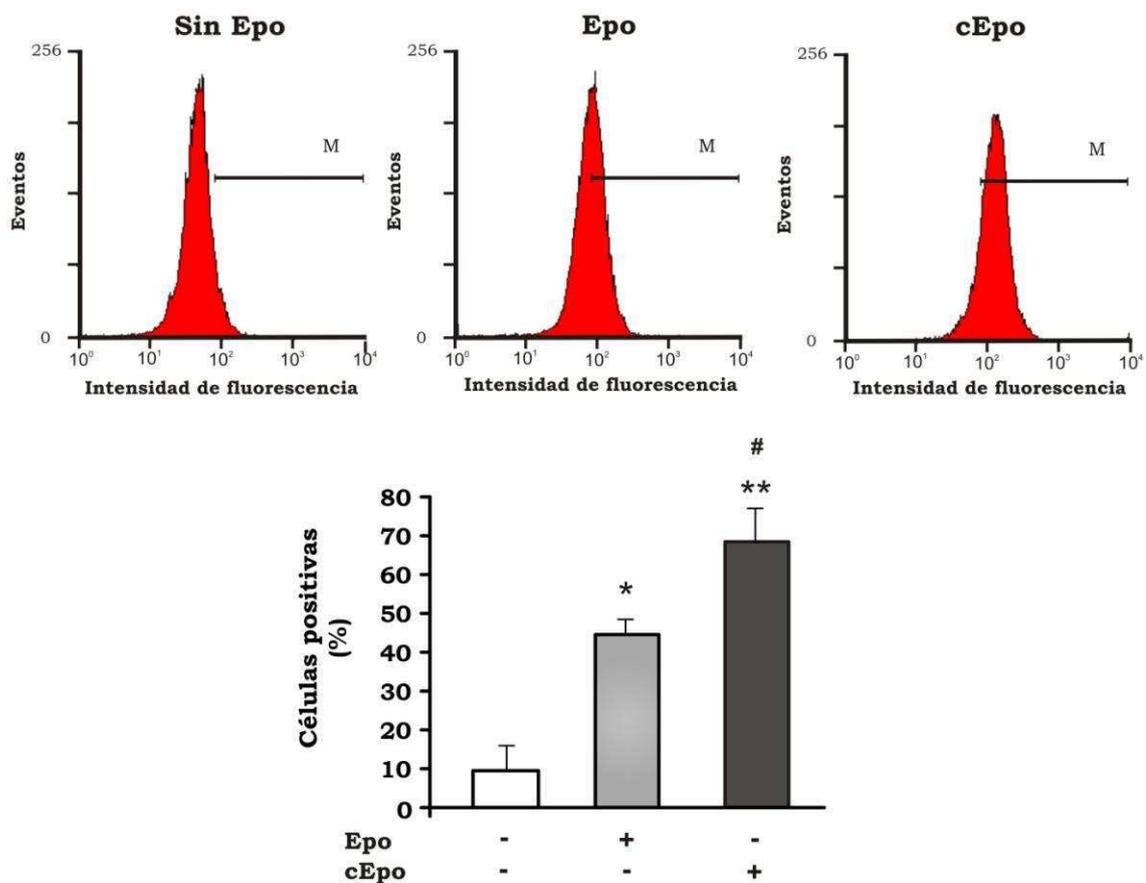


Figura 45: Modulación de la expresión de PTP1B por cEpo y Epo en células UT-7. Las células, privadas de su factor de crecimiento por 18 h y luego incubadas con Epo (20 ng/mL) o cEpo (20 ng/mL), fueron expuestas al anticuerpo anti PTP1B y luego, a un segundo anticuerpo acoplado a Alexa Fluor 488. La expresión de PTP1B fue analizada por citometría de flujo. Se observan los histogramas pertenecientes a un ensayo y las barras representan los resultados de 3 ensayos independientes. Diferencias significativas: cEpo vs. S/FC, **P<0,01; Epo vs. S/FC, *P<0,05; cEpo vs. Epo, #P<0,05.

En concordancia con lo observado por las técnicas de *Western blotting* y microscopía de fluorescencia, encontramos, también por citometría de flujo, que la expresión de PTP1B aumenta en células estimuladas por cEpo. Si bien la Epo, como era de esperar, indujo la expresión de PTP1B con respecto a los cultivos sin factor de crecimiento, la inducción de la fosfatasa por cEpo fue significativamente mayor.

IV.2. ACTIVIDAD DE LA FOSFATASA PTP1B FRENTE A LA ESTIMULACIÓN CELULAR CON ERITROPOYETINA Y ERITROPOYETINA CARBAMILADA

Ha sido reportado que tanto el factor de crecimiento epidérmico como la insulina estimulan la fosforilación de residuos tirosina de la PTP1B, lo que conlleva a un aumento de su actividad enzimática (Liu y Chernoff, 1997; Dadke *et al*, 2001). Dado este resultado observado en ensayos con otros factores, se decidió investigar la actividad fosfatasa de PTP1B en cultivos de células UT-7 realizados en presencia de cEpo. Los resultados se observan en la figura 46.

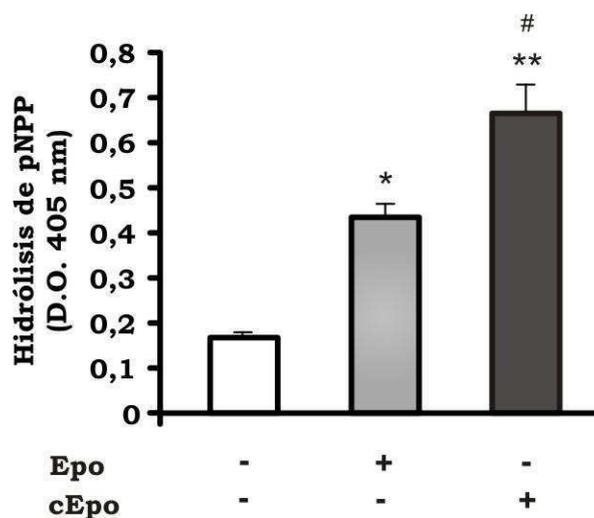


Figura 46: Modulación de la actividad de PTP1B por Epo y cEpo en células UT-7. Las células fueron tratadas con Epo (20 ng/mL) o cEpo (20 ng/mL) por 2 h luego de ser privadas de Epo por 18 h. Los lisados celulares fueron inmunoprecipitados con anticuerpo anti PTP1B. La actividad de fosfatasas fue cuantificada en el *pellet* resultante por medición de absorbancia a 405 nm del producto de la hidrólisis de paranitrofenil fosfato (pNPP) y expresada como densidad óptica del producto a 405 nm. Diferencias significativas: cEpo vs. S/FC, **P<0,01; Epo VS. S/FC, *P<0,05, cEpo vs. Epo, #P<0,05 (n=4).

Se corroboró la actividad de fosfatasa en ensayos de inhibición con o-vanadato de sodio, en los cuales no se pudo detectar el producto de hidrólisis del pNPP.

La actividad de fosfatasa de la PTP1B, medida por la velocidad de hidrólisis de pNPP, aumentó significativamente por la estimulación con cEpo con respecto a Epo, aunque la actividad de la fosfatasa en presencia de Epo fue mayor que en ausencia de su factor de crecimiento. Estos resultados presentan un patrón similar a los obtenidos al analizar la expresión proteica de la PTP1B (sección IV.1).

IV.3. PROLIFERACIÓN DE CÉLULAS UT-7 EN ENSAYOS DE INHIBICIÓN DE PTP1B

En este capítulo se emplearon ensayos de inhibición de PTP1B. Se sabe que algunos inhibidores son inespecíficos debido a su tamaño y a la naturaleza de su interacción con las fosfatasas. El vanadio, en el estado de oxidación apropiado, es muy similar al fosfato (Rehder, 1991) y puede unirse covalentemente al sitio catalítico de la fosfatasa inhibiendo de este modo su actividad enzimática (Denu *et al*, 1996; Zhang *et al*, 1997). Se han descubierto potentes inhibidores específicos de la PTP1B, entre los que se encuentran Cinngel 2Me, que inhibe competitivamente la PTP1B. Este es un éter que al ser hidrolizado por esterasas intracelulares libera ácido cinámico, el cual inhibe selectivamente a la PTP1B.

El resultado novedoso que mostró que la presencia de cEpo genera un aumento significativo tanto de la expresión como de la actividad de PTP1B, sugirió que este sería el motivo por el cual la fosforilación de los intermediarios de la vía de señalización proliferativa en células eritroides inducidas por cEpo desaparece rápidamente. Nos preguntamos cuál sería la respuesta celular a la cEpo al inhibir esta fosfatasa con Cinngel 2Me en cultivos de células UT-7 (Figura 47).

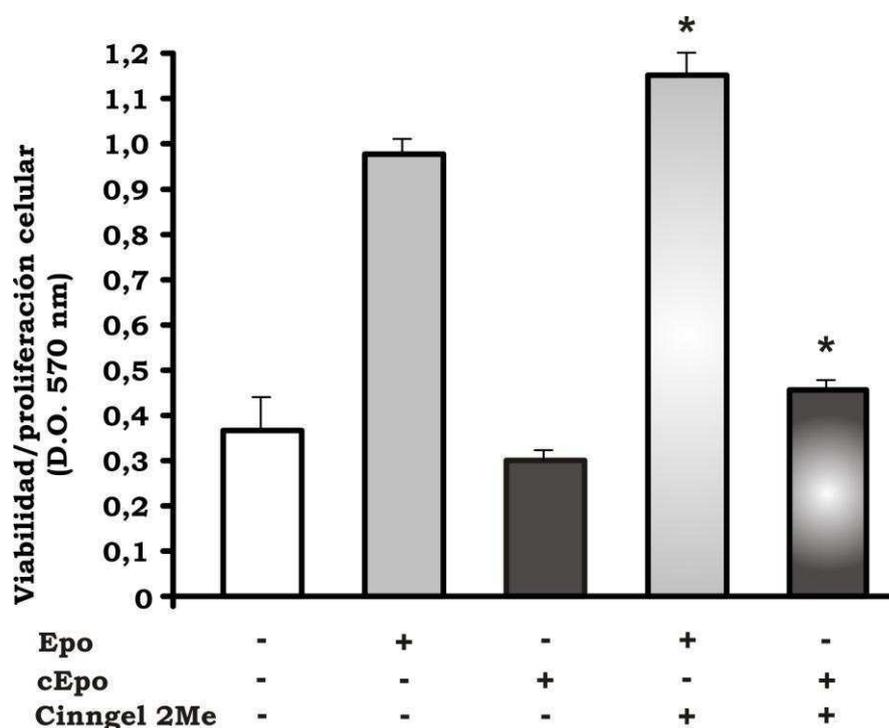


Figura 47: Efecto de cEpo y Epo sobre la proliferación de células UT-7, en presencia del inhibidor de fosfatasa PTP1B. Células UT-7, fueron privadas de Epo por 18 h y luego expuestas o no a Cinngel 2Me (1 nM) durante 2 h. Posteriormente, los cultivos celulares fueron incubados con Epo (20 ng/mL) o cEpo (20 ng/mL) durante 48 h. Finalmente, se analizó la viabilidad/proliferación celular mediante el ensayo de MTT. El producto coloreado fue cuantificado por su absorbancia a 570 nm (referencia 655 nm). Diferencias significativas: Epo+Cinngel 2Me vs. Epo; cEpo+Cinngel 2Me vs. cEpo, *P<0,05, (n=3).

En presencia del inhibidor de PTP1B, Cinngel 2Me, Epo aumentó la proliferación celular, en comparación a las células cultivadas con Epo y sin el inhibidor de la fosfatasa. En la misma proporción, el inhibidor permitió que cEpo aumentara la proliferación celular respecto a los cultivos con cEpo, que no se diferencian de los cultivos en ausencia de factores de crecimiento. Este aumento, sin embargo, no alcanzó los mismos niveles que los inducidos por Epo, y resultó todavía más bajo con respecto a la proliferación celular inducida por Epo en presencia del inhibidor de PTP1B. Los resultados sugieren que, al menos en parte, se podría explicar la inactividad de la cEpo sobre la proliferación de las células UT-7 por el aumento de la actividad de PTP1B.

IV.4. MODULACIÓN DEL CALCIO INTRACELULAR MEDIADO POR ERITROPOYETINA Y ERITROPOYETINA CARBAMILADA

El calcio es uno de los mensajeros intracelulares secundarios que influyen en varias funciones celulares de los eritrocitos y sus progenitores eritroides a través del REpo. Este ión cumple un papel fundamental en el crecimiento de las colonias eritroides y en los estadios de diferenciación (Misiti y Spivak, 1979; Hesold *et al*, 1991; Gillo *et al*, 1993; Berridge *et al*, 2000). Se sabe que la Epo induce un rápido aumento del influjo de calcio intracelular como evento inicial del estímulo de células eritroides. Por otra parte, ha sido sugerido que el aumento intracelular de calcio induce la activación de calpaína, una tiol-proteasa calcio-dependiente, regulando el clivaje de PTP1B y resultando en un aumento de su actividad enzimática. De acuerdo a esto, decidimos evaluar si cEpo modulaba el calcio intracelular (Figura 48).

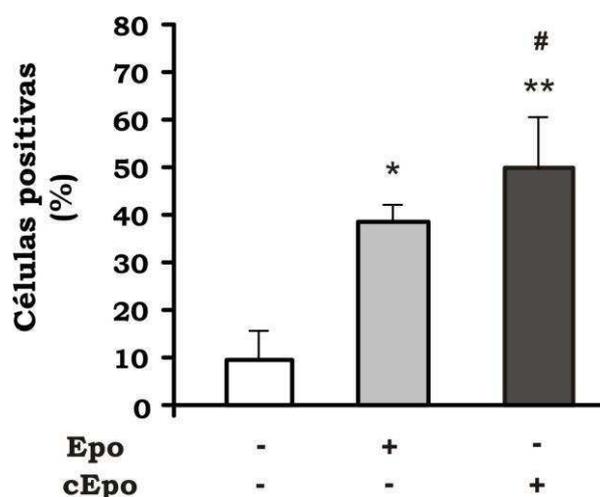


Figura 48: Cuantificación del Ca²⁺ intracelular en presencia de Epo y cEpo. Las células UT-7 fueron privadas de su factor de crecimiento por 18 h y luego incubadas con Epo (20 ng/mL) o cEpo (20 ng/mL) durante 15 min. Los cultivos celulares fueron marcados con FLUO-4AM 2 mM durante 20 min y luego analizados por citometría de flujo. Diferencias significativas: cEpo vs. S/FC, **P<0,01; Epo vs. S/FC, *P<0,05; Epo vs. cEpo, #P< 0,05 (n=3).

Los resultados muestran un aumento del calcio intracelular por ambas eritropoyetinas, respecto de las células sin factor de crecimiento. La presencia de cEpo, en comparación con Epo, generó un aumento mayor del influjo celular de calcio.

IV.5. RELACIÓN DE LA PROTEÍNA PTP1B CON EL RECEPTOR β COMMON

Los resultados de este capítulo muestran la acción inductora de cEpo sobre la expresión y la activación de la PTP1B. En el capítulo II se mostró la modulación de la subunidad βc del heteroreceptor por cEpo. Por otra parte, en el capítulo III se observó una disminución significativa de los tiempos de fosforilación de factores involucrados en caminos de señalización de la proliferación celular debido a la presencia de cEpo con respecto a la de Epo. En base a ello, se decidió investigar si la proteína PTP1B colocaliza con el $R\beta c$, para evaluar su posible asociación que permitiría explicar el aumento de la velocidad de defosforilación del receptor por la fosfatasa en presencia de cEpo. Los resultados del estudio por microscopía confocal se muestran en la figura 49.

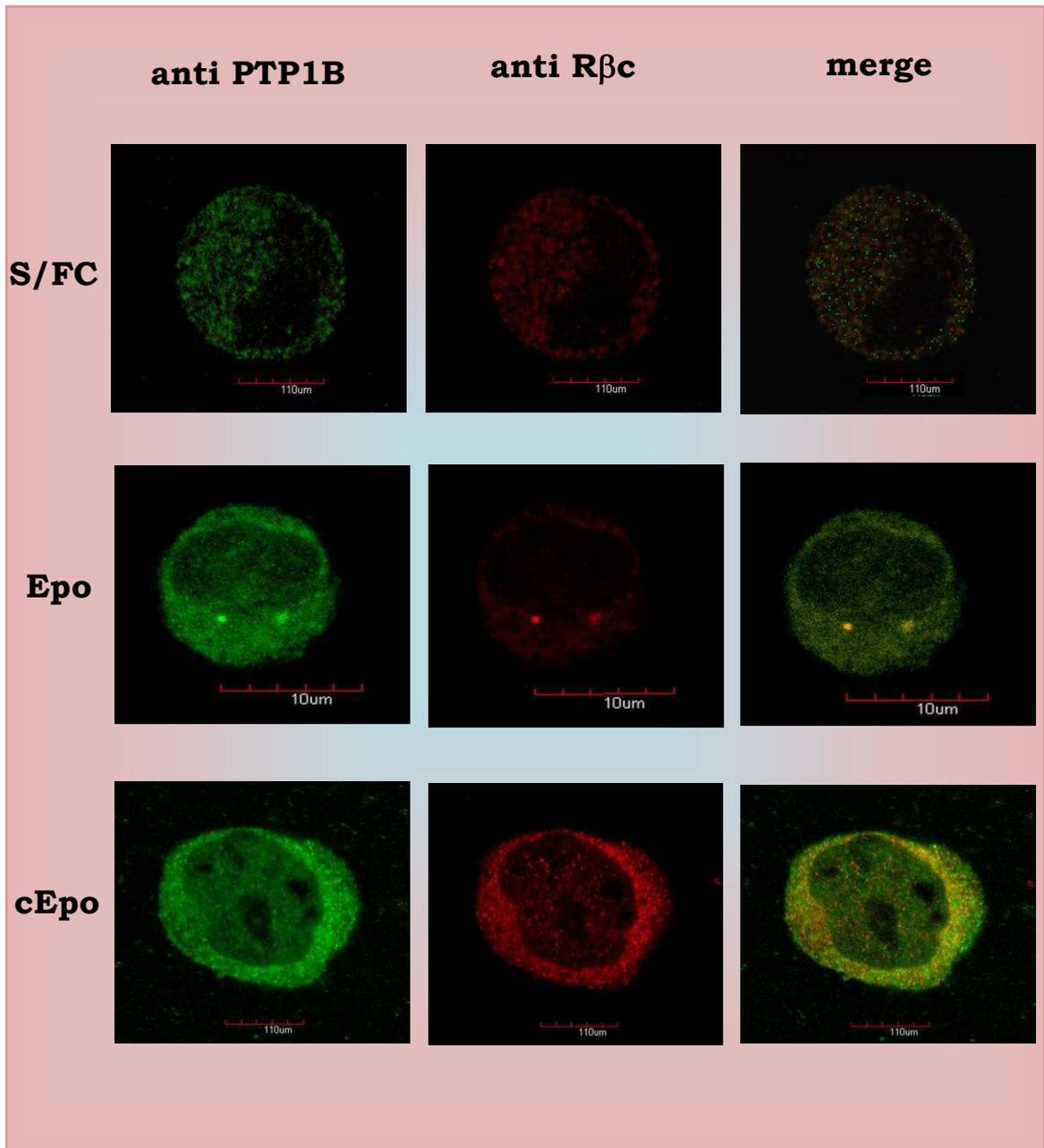


Figura 49: Imágenes de microscopia confocal de la colocalización de PTP1B y Rβc. los cultivos de UT-7 fueron privados de su factor de crecimiento por 18 h y luego incubados sin o con Epo (20 ng/mL) o cEpo (20 ng/mL) durante 10 min. Las células fueron expuestas al anticuerpo anti PTP1B de conejo y anti Rβc de ratón, durante 20 min. Luego de los lavados fueron expuestas a un segundo anticuerpo acoplado a Alexa Fluor 488 y Alexa Fluor 590, durante 20 min. Una alícuota de la suspensión celular, fue analizada por microscopía confocal (1500x). Se observa en verde la localización de la proteína PTP1B, la presencia del Rβc en color rojo, y el *merge* de ambos, correspondiente a un mismo campo.

En las imágenes de fluorescencia del *merge*, se puede observar que la inducción de los cultivos de células UT-7 con cEpo, a diferencia de los inducidos por Epo, permitió la colocalización de la proteína PTP1B y el R β c con gran intensidad. En cambio, en ausencia del factor de crecimiento no se observa tal colocalización.

Por otro lado, el análisis de este ensayo permite corroborar datos aportados en capítulos anteriores. En ausencia del factor de crecimiento, se observa una intensidad muy tenue de ambas marcaciones por separado y la intensidad de fluorescencia para PTP1B y R β c fue mayor con cEpo que con Epo. Estos resultados coinciden con los mostrados en las figuras 22.B (Capítulo II) y 43, 44 y 45 de este capítulo.

CONCLUSIONES

- **Tanto Epo como cEpo inducen el aumento de la proteína PTP1B, así como su actividad, en comparación con cultivos de células UT-7 desarrollados en ausencia de factor de crecimiento.**
- **Los aumentos de la expresión y actividad de PTP1B se correlacionan con el influjo de calcio intracelular.**
- **El incremento de la expresión y actividad de PTP1B es significativamente mayor en presencia de cEpo con respecto al efecto mostrado por la Epo.**
- **PTP1B y la subunidad R β c del heteroreceptor colocalizan en cultivos inducidos por cEpo.**

DISCUSIÓN

La fosforilación de proteínas en sus residuos tirosina es un elemento clave en los caminos de señalización inducidos por diferentes estímulos que regulan respuestas celulares tales como crecimiento, diferenciación, proliferación y metabolismo. Dado que se trata de procesos estrictamente controlados, debe existir un completo balance entre proteínas kinasas y fosfatasa.

Como la fosforilación es un evento que participa en los distintos pasos de activación celular por Epo, la defosforilación es necesaria para regular su actividad. Este proceso involucra varias fosfatasa. La PTP1B, prototipo de la familia de las proteínas tirosina fosfatasa (PTPs), se relaciona con la regulación de vías de señalización que involucran la fosforilación de tirosina inducida por factores de crecimiento, citoquinas y hormonas, y ya se ha demostrado que interviene en el silenciamiento de la señalización inducida por Epo. Por lo tanto, es altamente probable que la expresión de esta enzima, o bien su función, sea diferente en situaciones de desregulación de la activación celular. Por otro lado, la resistencia al tratamiento con eritropoyetina recombinante, encontrada con frecuencia en pacientes con anemia de enfermedades crónicas podría estar vinculada a un funcionamiento distinto de la PTP1B.

También se ha reportado que PTP1B también participa en los mecanismos descriptos para modular negativamente la activación de los receptores de GM-CSF, IL-3 e IL-5, en los que está involucrada la subunidad β *common*. Puede modular negativamente la vía Jak/STAT por defosforilación ya sea del receptor asociado a Jak o bien a factores localizados en estadios más avanzados del camino de señalización. En este contexto, se ha propuesto que PTP1B tiene un rol importante en el “ajuste fino” de estas vías de señalización intracelulares (Feldhammer *et al*, 2013). Este conocimiento y nuestra previa experiencia en la función de PTP1B en la activación celular por Epo justifican su selección para este trabajo.

Los resultados del estudio de la proteína PTP1B en el modelo de células con capacidad de diferenciación eritroide estimuladas por cEpo fue diseñado para explicar por qué cEpo es incapaz de estimular la proliferación celular. En nuestros resultados se observó la desregulación de la activación celular, hallándose el aumento significativo de la expresión (Figura 43-45) y actividad (Figura 46) de la PTP1B en cultivos desarrollados en presencia de cEpo. Esto significa que PTP1B, al estar más aumentada, desactivaría la señalización por cEpo más rápidamente que en los cultivos estimulados por Epo, y podría

justificar por qué cEpo no logra mantener la activación (fosforilación) de los factores de proliferación celular, como Akt/FOXO3a, y consecuentemente la inhibición de p27^{Kip1}, generando así el arresto del ciclo celular.

En ensayos de inhibición de la PTP1B, la presencia de cEpo generó un incremento de la proliferación celular, que no alcanzó los niveles inducidos por Epo (Figura 47), sugiriendo que la acción de esta fosfatasa no es la única involucrada en la desactivación del heteroreceptor activado por cEpo.

Los resultados muestran un incremento del calcio intracelular en cultivos estimulados con cEpo con respecto no sólo a los cultivos realizados en ausencia de factor de crecimiento sino también con respecto a los estimulados por Epo, lo que permite sugerir que el significativo aumento de la actividad de PTP1B podría ser mediado por calpaína. Esta proteasa, dependiente de calcio para su activación, produce un clivaje proteolítico que resulta en una isoforma de PTP1B de 46 kDa, asociada a mayor actividad enzimática de la fosfatasa. Los resultados que se presentan concuerdan con los de Frangioni *et al* (1993) quienes observaron que el clivaje de PTP1B catalizado por calpaína estaba asociado a un aumento de la actividad enzimática en plaquetas. En el mismo sentido, Callero y colaboradores (2011) reportaron la participación de calpaína en la aparición de la isoforma de PTP1B 46kDa con mayor actividad enzimática asociada al incremento del influjo de calcio inducido por Epo en células UT-7 y TF-1. Algunos autores han sugerido que la regulación de los niveles de calcio intracelular mediada por Epo es uno de los mecanismos de señalización que controlan la proliferación y diferenciación de las células eritroides (Cheung *et al*, 1997; Akimoto *et al*, 2001). En nuestros ensayos se observó el incremento de calcio intracelular por Epo aunque el aumento inducido por cEpo fue significativamente mayor (Figura 48).

La asociación de PTP1B y R β c es un resultado que sustenta la hipótesis de que la cEpo, actuando a través del heteroreceptor REpo-R β c, induce la expresión y actividad de PTP1B, lo cual desactiva rápidamente y con gran eficiencia la acción del receptor, llevando a la interrupción de la señal de proliferación (Figura 49).

En este trabajo se ha cumplido el objetivo de avanzar en el conocimiento de los efectos diferenciales entre cEpo y Epo sobre células hematopoyéticas y no hematopoyéticas, ya que por primera vez se informa acerca de la incapacidad de la eritropoyetina carbamilada para activar completamente las vías de señalización enfocadas a la proliferación celular. El silenciamiento rápido de las señales relacionadas con la proliferación de las células con capacidad de diferenciación eritroide UT-7 estimuladas por cEpo se debería, al menos en parte, al aumento en la inducción de la actividad fosfatasa de la proteína PTP1B. El aumento de la actividad de esta fosfatasa por cEpo podría no sólo ser debido a un aumento de la expresión de la proteína sino también a la activación de la PTP1B por proteólisis vía calpaína debido al incremento del flujo de calcio.

Al comenzar el trabajo, ya existía evidencia de la actividad diferencial entre Epo y cEpo sobre tejidos hematopoyético y no hematopoyéticos. Dado que, como primer paso, carbamilamos la eritropoyetina en el laboratorio, fue necesario corroborar sus características, con los resultados que constituyen el capítulo I. La diferencia de este trabajo con otros de distintos autores es la utilización de varios modelos celulares simultáneamente. Como modelo de tejido hematopoyético fueron incluidas no sólo células progenitoras eritroides provenientes de médula ósea de ratón sino también líneas celulares con capacidad de diferenciación eritroide y distinta dependencia del factor de crecimiento: UT-7, dependiente de Epo para proliferar, TF-1, dependiente de GM-CSF pero que responde a la Epo durante períodos cortos y K562, independiente de Epo para su desarrollo pero sensible a la acción antiapoptótica de Epo frente a una injuria celular. Como modelo de tejido no hematopoyético se empleó la línea de origen neuronal SH-SY5Y para estudiar el efecto neuroprotector de las eritropoyetinas, el más característico luego de la acción de la Epo sobre la eritropoyesis.

Los resultados también permiten sugerir que la Epo puede utilizar ambos receptores, el homodímero y el heterodímero $-(REpo)_2$ y $REpo-R\beta c$ en la activación de células neuronales y, probablemente también en células eritroides, dependiendo de la disponibilidad de las subunidades. En cambio, cEpo sólo utilizaría el heterodímero, por lo que sólo las células que expresan REpo y R βc serían potenciales *targets* para que la actividad antiapoptótica de la cEpo conduzca a la reducción del daño tisular.

Si bien el hallazgo del aumento de expresión y actividad de PTP1B puede explicar la incapacidad de cEpo para permitir el crecimiento de las células de origen eritroide, deben considerarse otros factores para explicar completamente la acción diferencial entre Epo y cEpo. Esto es debido a que en los ensayos de

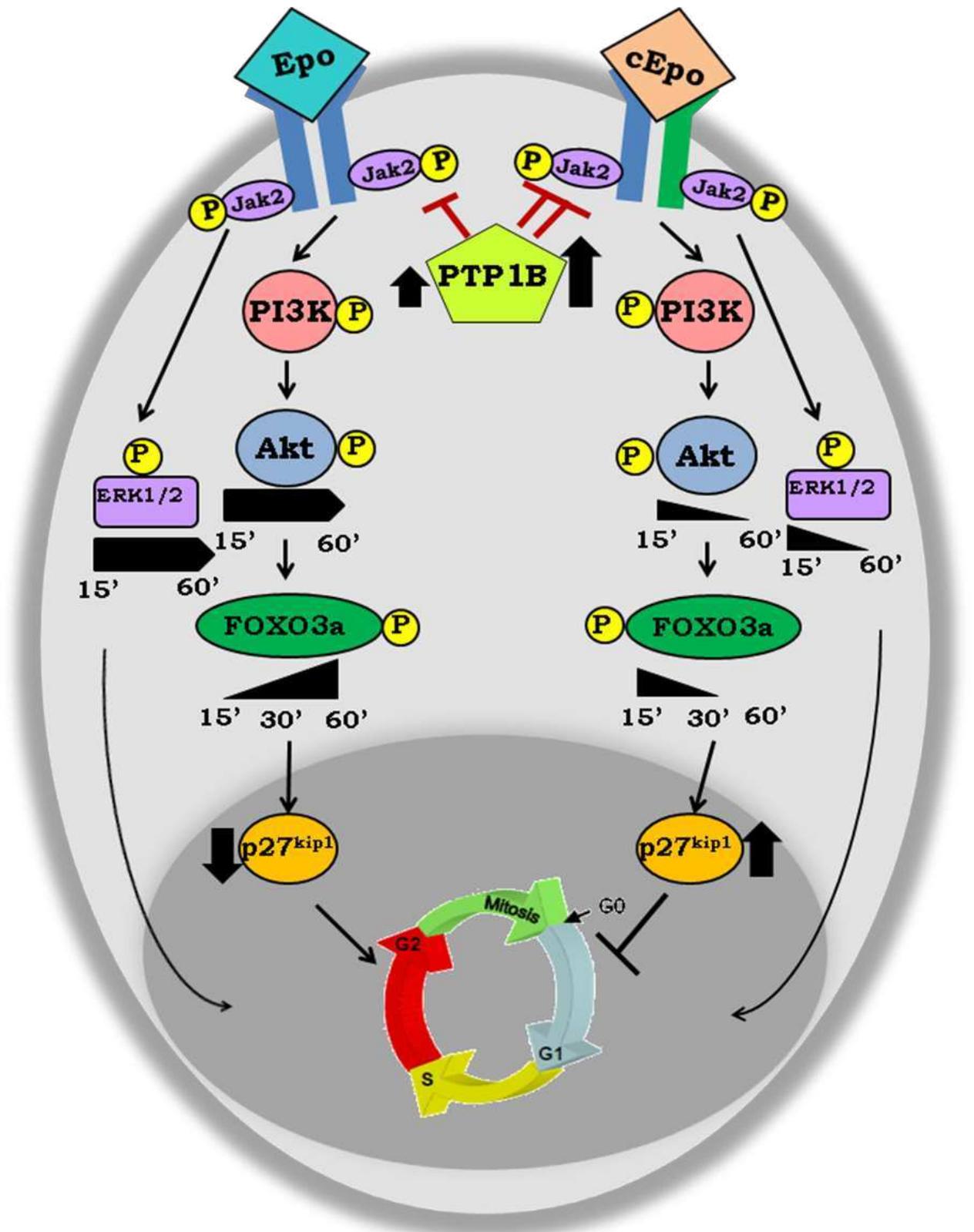
inhibición de la PTP1B en los cultivos con cEpo se observó un incremento parcial de la proliferación celular.

Habría que considerar, por ejemplo, el incremento de otras fosfatasa que, además de PTP1B, también están involucradas en la finalización de las señales de activación celular por factores de crecimiento.

Otro mecanismo involucrado en la finalización de las señales de transducción de IL-3, IL-5 y GM-CSF es la endocitosis y degradación. La subunidad β *common* es regulada negativamente por ubiquitinación y degradación de su dominio citoplasmático en el proteasoma, resultando en la generación de productos de proteólisis de β c truncados. Dada la importancia de esta vía de finalización de la activación de las señales inducidas por la unión cEpo/Receptor, no se puede descartar un aumento en la degradación del receptor debido a la presencia de cEpo en los cultivos.

En el marco de la implementación de estrategias terapéuticas resultará importante, en el futuro, considerar los diferentes mecanismos de acción entre Epo y cEpo, identificando los factores críticos involucrados en los efectos diferenciales entre ambas eritropoyetinas. Esto es importante porque se ha demostrado, en este trabajo, que la Epo carbamilada no parece totalmente incapaz de activar la célula eritroide, sino que modula negativamente las vías de proliferación. De acuerdo con los resultados presentados y con el fin de discriminar entre riesgos y beneficios de futuros tratamientos también deberán evaluarse posibles interferencias que podrían producirse en presencia de elevadas concentraciones de cEpo, en las funciones de Epo, de GM-CSF y de otras citoquinas.

En la figura que se muestra a continuación se resumen los principales resultados obtenidos en este trabajo en respuesta a los objetivos planteados y, a partir de los mismos, se sugieren modificaciones en las vías de señalización de la eritropoyetina originadas por la carbamilación de la molécula proteica.



- Accili D, Arden KC. FoxOs at the crossroads of cellular metabolism, differentiation, and transformation. *Cell* 117:421-426, 2004.
- Anagnostou A, Liu Z, Steiner M, Chin K, Lee ES, Kessimian N, Noguchi CT. Erythropoietin receptor mRNA expression in human endothelial cells, *Proc Natl Sci USA* 91:3974-3978, 1994.
- Arcasoy MO. The non-haematopoietic biological effects of erythropoietin. *Br J Haematol* 141:14-31, 2008.
- Bazan JF. Haemopoietic receptors and helical cytokines. *Immunol Today* 10:305-314, 1990.
- Benn S, Woolf C. Adult neuron survival strategies- Slamming on the brakes. *Nature Rev* 5:686-700, 2004.
- Bennis Y, Sarlon-Bartoli G, Guillet B, Lucas L, Pellegrini L, Velly L, Blot-Chabaud M, Dignat-Georges F, Sabatier F, Pisano P. Priming of late endothelial progenitor cells with erythropoietin before transplantation requires the CD131 receptor subunit and enhances their angiogenic potential. *J Thromb Haemost* 10:1914-1928, 2012.
- Berridge MJ, Lipp P, Bootman MD. The versatility and universality of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1:11-21, 2000.
- Blake TJ, Jenkins BJ, D'Andrea RJ, Gonda TJ. Functional cross-talk between cytokine receptors revealed by activating mutations in the extracellular domain of the beta-subunit of the GM-CSF receptor. *J Leukoc Biol* 72:1246-1255, 2002.
- Brines M, Cerami A. Emerging biological roles for erythropoietin in the nervous system. *Nat Rev Neurosci* 6:484-494, 2005.
- Brines M, Grasso G, Fiordaliso F, Sfacteria A et al. Erythropoietin mediates tissue protection through an erythropoietin and common beta-subunit heteroreceptor. *Proc Natl Acad Sci* 101:14907-14912, 2004.
- Brines ML, Ghezzi P, Keenan S, Agnello D, de Lanerolle NC, Cerami C, Itri LM, Cerami A. Erythropoietin crosses the blood-brain barrier to protect against experimental brain injury. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:10526-10531, 2000.
- Budd SL, Tenneti L, Lishnak T, Lipton SA. Mitochondrial and extramitochondrial apoptotic signaling pathways in cerebrocortical neurons. *Proc Natl Acad Sci* 97:6161-6166, 2000.
- Byts N, Samoylenko A, Fasshauer T, Ivanisevic M, Hennighausen L, Ehrenreich H, Sirén AL. Essential role for Stat5 in the neurotrophic but not in the neuroprotective effect of erythropoietin. *Cell Death Differ* 15:783-792, 2008.
- Callero M, Pérez G, Vittori D, Pregi N, Nesse A. Modulation of protein tyrosine phosphatase 1B by erythropoietin in UT-7 cell line. *Cell Physiol Biochem* 20:319-328, 2007.
- Callero M, Vota D, Chamorro ME, Wenker S, Vittori D, Nesse A. Calcium as a mediator between erythropoietin and protein tyrosine phosphatase 1B, *Arch Biochem Biophys* 505:242-249, 2011.
- Callero M. Tesis Doctoral: Proteína tirosina fosfatasa 1B en la vía de señalización de la eritropoyetina. Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, 2010.
- Carnot P, Deflandre C. Sur l'activite hemopoietique du serum au cours de la regeneration du sang. *C R Acad Sci Paris* 143:384-386, 1906.
- Catania MA, Marciano MC, Parisi A, Sturiale A, Buemi M, Grasso G, Squadrito F, Caputi AP, Calapai G. Erythropoietin prevents cognition impairment induced by transient brain ischemia in gerbils. *Eur J Pharmacol* 437:147-150, 2002.
- Cayot P, Tainturier G. The Quantification of Protein Amino Groups by the Trinitrobenzenesulfonic Acid Method. A Reexamination. *Anal Biochem* 249:184-200, 1997.

- Chernoff J, Liu F. Protein tyrosine phosphatase 1B interacts with and is tyrosine phosphorylated by the epidermal growth factor receptor. *Biochem J* 327, 139-145, 1997.
- Cheung JY, Zhang XQ, Bokvist K, Tillotson DL, Miller BA. Modulation of calcium channels in human erythroblasts by erythropoietin. *Blood* 89:92-100, 1997.
- Chrétien S, Varlet P, Verdier F, Gobert S, Cartron JP, Gisselbrecht S, Mayeux P, Lacombe C. Erythropoietin-induced erythroid differentiation of the human erythroleukemia cell line TF-1 correlates with impaired STAT5 activation. *EMBO J* 15:4174-4181, 1996.
- Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162:156-159, 1987.
- Cohen J, Oren-Young L, Klingmüller U, Neumann D. Protein tyrosine phosphatase 1B participates in the down-regulation of the erythropoietin receptor signaling. *Biochem J* 377:517-524, 2004.
- Coleman T, Westenfelder C, Tögel F, Yang Y et al. Cytoprotective doses of erythropoietin or carbamylated erythropoietin have markedly different procoagulant and vasoactive activities. *Proc Natl Acad Sci* 10:5965-5970, 2006.
- Constantinescu S, Ghaffari S, Lodish F. The erythropoietin receptor: Structure, activation and intracellular signal transduction. *Trends Endocrinol Metab* 10:1043-2760, 1999.
- Dadke S, Kusari A, Kusari J. Phosphorylation and activation of protein tyrosine phosphatase (PTP) 1B by insulin receptor. *Mol Cell Biochem* 221:147-154, 2001.
- D'Andrea AD, Zon L. Erythropoietin receptor. Subunit structure and activation. *J Clin Invest* 86:681-687, 1990.
- Davis J, Arakawa T, Strikland TW, Yphantis DA. Characterization of recombinant human erythropoietin produced in chinese hamster ovary cells. *Biochemistry* 26:2638-2641, 1987.
- Dean E. Apoptosis in Neurodegeneration: Programmed Cell Death and its Role in Alzheimer's and Huntington's Diseases. *Eukaryon* 4:42-47, 2008.
- Denu J, Lohse DL, Vijayalakshmi J, Saper MA, Dixon JE. Visualization of intermediate and transition-state structures in protein-tyrosine phosphatase catalysis. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:2493-2498, 1996.
- Donovan M, Cotter T. Control of mitochondrial integrity by Bcl-2 family members and caspase-independent cell death. *Biochim Biophys Acta* 1644:133-147, 2004.
- Edsjö A, Nilsson H, Vandesompele J, Karlsson J, Pattyn F, Culp LA, Speleman F, Pählman S. Neuroblastoma cells with overexpressed MYCN retain their capacity to undergo neuronal differentiation. *Lab Invest* 84:406-417, 2004.
- Ehrenreich H, Hasselblatt M, Dembowski C, Cepek L, Lewczuk P, Stiefel M et al. Erythropoietin therapy for acute stroke is both safe and beneficial. *Mol Med* 8:495-505, 2002.
- Elmore S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol Pathol* 35: 495-516, 2007.
- Erbayraktar S, Yilmaz O, Gökmen N, Brines M. Erythropoietin is a multifunctional tissue-protective cytokine. *Curr Hematol Rep* 2:465-470, 2003.
- Erbayraktar S, Grasso G, Sfacteria A, Xie Q-W et al. Asialoerythropoietin is a nonerythropoietic cytokine with broad neuroprotective activity in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:6741-6746, 2003.
- Erslev AJ, Lavietes PH, van Wagenen G. Erythropoietic stimulation induced by anemic serum. *Proc Exp Biol Med* 83:548-550, 1953.

- Eschbach JW, Egrie JC, Downing MR, Browne JK, Adamson JW. Correction of the anemia of end-stage renal disease with recombinant human erythropoietin. Results of a combined phase I and II clinical trial. *New Engl J Med* 316:73-78, 1987.
- Evans T, Rosenthal ET, Youngblom J, Distel D, Hunt T. Cyclin: a protein specified by maternal mRNA in sea urchin eggs that is destroyed at each cleavage division. *Cell* 33:389-396, 1983.
- Fantacci M, Bianciardi P, Caretti A, Coleman T, Cerami A, Brines M, Samanja M. Carbamylated erythropoietin ameliorates the metabolic stress in vivo by severe chronic hypoxia. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:17531-17536, 2006.
- Feldhammer M, Uetani N, Miranda-Saavedra D, Tremblay ML. PTP1B: a simple enzyme for a complex world. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 48:430-445, 2013.
- Fiordaliso F, Chimenti S, Staszewsky L, Bai A, Carlo E, Cuccovillo I, Doni M, Mengozzi M, Tonelli R, Ghezzi P, Coleman T, Brines M, Cerami A, Latini R. A nonerythropoietic derivative of erythropoietin protects the myocardium from ischemia reperfusion injury. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:2046-2051, 2004.
- Fisher JW. Erythropoietin: Physiology and Pharmacology Update. *Exp Biol Med* 228:1-14, 2003.
- Frangioni JV, Oda A, Smith M, Salzman EW, Neel BG. Calpain-catalyzed cleavage and subcellular relocation of protein phosphotyrosine phosphatase 1B (PTP-1B) in human platelets. *EMBO J* 12:4843-4846, 1993.
- Frangioni JV, Beahm PH, Shifrin V, Jost CA, Neel BG. The nontransmembrane tyrosine phosphatase PTP-1B localizes to the endoplasmic reticulum via its 35 amino acid C-terminal sequence. *Cell* 68:545-560, 1992.
- Fraser JK, Lin F, Berridge MV. Expression and modulation of specific, high affinity binding sites for erythropoietin on the human erythroleukemic cell line K562. *Blood* 71:104-109, 1988.
- Garbossa G, Gutnisky A, Nesse A. The inhibitory action of aluminum on mouse bone marrow cell growth: evidence for an erythropoietin- and transferrin-mediated mechanism. *Miner Electrolyte Metab* 20:141-146, 1994.
- Genc S, Koroglu TF, Genc K. Erythropoietin as a novel neuroprotectant. *Restor Neurol Neurosci* 22:105-119, 2004.
- Gillo B, Ma YS, Marks AR. Calcium influx in induced differentiation of murine erythroleukemia cells. *Blood* 81:783-792, 1993.
- Grasso G, Sfacteria A, Cerami A, Brines M. Erythropoietin as a tissue protective cytokine in brain injury: what do we know and where do we go? *Neuroscientist* 10:93-98, 2004.
- Grimmler M, Wang Y, Mund T, Cilensek Z, Keidel EM, Waddell MB, Jäkel H, Kullmann M, Kriwacki RW, Hengst L. Cdk-inhibitory activity and stability of p27Kip1 are directly regulated by oncogenic tyrosine kinases. *Cell* 128:269-280, 2007.
- Guan KL, Haun RS, Watson SJ, Geahlen RL, Dixon JE. Cloning and expression of a protein-tyrosine-phosphatase. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:1501-1505, 1990.
- Hail N, Carter BZ, Konopleva M, Andreeff M. Apoptosis effector mechanisms: a requiem performed in different keys. *Apoptosis* 11:889-904, 2006.
- Habeeb A. Determination of Free Amino Groups in proteins by Trinitrobenzenesulfonic Acid. *Anal Biochem* 14:328-336, 1965.
- Haj FG, Verveer PJ, Squire A, Neel BG, Bastiaens PI. Imaging sites of receptor dephosphorylation by PTP1B the surface of the endoplasmic reticulum. *Science* 295:1708-1711, 2002.

- Hanazono Y, Sasaki K, Nitta H, Yazaki Y, Hirai H. Erythropoietin induces tyrosine phosphorylation of the beta chain of the GM-CSF receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 208:1060-1066, 1995.
- Haseyama Y, Sawada K, Oda A, Koizumi K, Takano H, Tarumi T, Nishio M, Handa M, Ikeda Y, Koike T. Phosphatidylinositol 3-Kinase is involved in the protection of primary cultured human erythroid precursor cells from apoptosis. *Blood* 94:1568-1577, 1996.
- Hay RJ. Cell line preservation and characterization. En: Freshney RI (ed.) *Animal cell culture. A practical approach*. Oxford University Press, New York, 2nd Edition, pp 95-148, 1992.
- Hayashida K, Kitamura T, Gorman DM, Arai K, Yokota T, Miyajima A. Molecular cloning of a second subunit of the receptor for human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF): reconstitution of a high-affinity GM-CSF receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:9655-9659, 1990.
- Hengst L, Reed SI. Translational control of p27Kip1 accumulation during the cell cycle. *Science* 271:1861-1864, 1996.
- Hensold JO, Dubyak G, Housman DE. Calcium ionophore, A23187, induces commitment to differentiation but inhibits the subsequent expression of erythroid genes in murine erythroleukemia cells. *Blood* 77:1362-1370, 1991.
- Hernández MV, Sala MG, Balsamo J, Lilien J, Arregui CO. ER-bound PTP1B is targeted to newly forming cell-matrix adhesions. *J Cell Sci* 119:1233-1243, 2006.
- Hoke A (Ed). *Erythropoietin and the Nervous System*. Berlin: Springer. ISBN 0-387-30010-4, 2005.
- Irie-Sasaki J, Sasaki T, Matsumoto W, Opavsky A, Cheng M, Welstead G, Griffiths E, Krawczyk C, Richardson CD, Aitken K, Iscove N, Koretzky G, Johnson P, Liu P, Rothstein DM, Penninger JM. CD45 is a JAK phosphatase and negatively regulates cytokine receptor signalling. *Nature* 409:349-354, 2001.
- Iyer NV, Kotch LE, Agani F, Leung SW, Laughner E, Wenger RH, Gassmann M, Gearhart JD, Lawler AM, Yu AY, Semenza GM. Cellular and developmental control of O₂ homeostasis by hypoxia-inducible factor-1 alpha. *Genes Dev* 12:149-162, 1998.
- Jelkmann W. Erythropoietin after a century of research: younger than ever. *Eur J Haematol* 78:183-205, 2007.
- Jelkmann W. Molecular Biology of Erythropoietin. *Int Med* 43:649-659, 2004.
- Johnson BW, Cepero E, Boise LH. Bcl-XL inhibits cytochrome C release but not mitochondrial depolarization during the activation of multiple death pathways by Tumor Necrosis Factor Alpha. *J Biol Chem* 275:31546-31553, 2000.
- Jordán J, Ceña V, Prehn JH. Mitochondrial control of neuron death and its role in neurodegenerative disorders. *J Physiol Biochem* 59:129-141, 2003.
- Jubisnysky PT, Krijanovski OI, Nathan DG, Tavernier J, Sieff CA. The β chain of the Interleukin-3 Receptor functionally associates with the erythropoietin receptor. *Blood* 90:1867-1873, 1997.
- Ketteler R, Moghraby CS, Hsiao JG, Sandra O, Lodish HF, Klingmüller U. The cytokine-inducible Src homology domain-containing protein negatively regulates signaling by promoting apoptosis in erythroid progenitor cells. *J Biol Chem* 278:2654-2660, 2003.
- King V, Averill S, Hewazy D, Priestley J, Torup L, Michael-Titus. Erythropoietin and carbamylated following spinal cord hemisection in the rat. *Eur J Neurosci* 26:90-100, 2007.
- Kitamura T, Sato N, Arai K, Miyajima A. Expression cloning of the human IL-3 receptor cDNA reveals a shared beta subunit for the human IL-3 and GM-CSF receptors 66:1165-1174, 1991.

- Kitamura T, Tange T, Terasawa T, Chiba S, Kuwaki T, Miyagawa K, Piao YF, Miyazono K, Urabe A, Takaku F. Establishment and characterization of a unique human cell line that proliferates dependently on GM-CSF, IL-3, or erythropoietin. *J Cell Physiol* 140:323-334, 1989.
- Klingmüller U, Lorenz U, Cantley LC, Neel BG, Lodish HF. Specific recruitment of SH-PTP1 to the erythropoietin receptor causes inactivation of JAK2 and termination of proliferative signals. *Cell* 80:729-738, 1995.
- Komatsu N, Nakauchi H, Miwa A, Ishihara T et al. Establishment and characterization of a human leukemic cell line with megakaryocytic features: dependency on granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, interleukin-3, or erythropoietin for growth and survival. *Cancer Res* 51:341-348, 1991.
- Koury MJ, Bondurant MC. Erythropoietin retards DNA breakdown and prevents programmed cell death in erythroid progenitor cells. *Science* 248:378-381, 1990.
- Koury MJ, Bondurant MC. Maintenance by erythropoietin of viability and maturation of murine erythroid precursor cells. *J Cell Physiol* 137:65-74, 1988.
- Kuchay SM, Kim N, Grunz EA, Fay WP, Chishti AH. Double knockouts reveal that protein tyrosine phosphatase 1B is a physiological target of calpain-1 in platelets. *Mol Cell Biol*. 27:6038-6052, 2007.
- Kumar S, Cakouros D. Transcriptional control of the core cell-death machinery. *Biochem Sci* 29:193-199, 2004.
- Lacombe C, Mayeux P. Biology of erythropoietin. *Haematologica* 83:724-732, 1998.
- Lacombe C, Da Silva JL, Bruneval P, Fournier JG, Wendling F, Casadevall N, Camilleri JP, Bariety J, Varet B, Tambourin P. Peritubular cells are the site of erythropoietin synthesis in the murine hypoxic kidney. *J Clin Invest* 81:620-623, 1988.
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685, 1970.
- Leist M, Ghezzi P, Grasso G, Bianchi R et al. Derivatives of Erythropoietin that are tissue protective but not erythropoietic. *Science* 305:239-242, 2004.
- Lin FK, Suggs S, Lin CH, Browne JK, Smalling R, Egrie JC, Chen KK, Fox GM, Martin F, Stabinsky Z. Cloning and expression of the human erythropoietin gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 82:7580-7584, 1985.
- Lui F, Chernoff J. Protein tyrosine phosphatase 1B interacts with and is tyrosine phosphorylated by the epidermal growth factor receptor. *Biochem J* 327:139-45, 1997.
- Livnah O, Stura EA, Middleton SA, Johnson DL, Jolliffe LK, Wilson IA. Crystallographic evidence for preformed dimers of erythropoietin receptor before ligand activation. *Science* 283:987-990, 1999.
- López E, Ferrer I. Staurosporine- and H-7-induced cell death in SH-SY5Y neuroblastoma cells is associated with caspase-2 and caspase-3 activation, but not with activation of the FAS/FAS-L-caspase-8 signaling pathway. *Brain Res Mol Brain Res* 85:61-67, 2000.
- Lowry OR, Roseborough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurements with the Folin phenol reagent, *J Biol Chem* 193:265-275, 1951.
- Lozzio CB, Lozzio BB. Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome, *Blood* 45:321-334, 1975.
- Maiese K. Triple play: promoting neurovascular longevity with nicotinamide, WNT, and erythropoietin in diabetes mellitus. *Biomed Pharmacother* 62:218-232, 2008.
- Mahmood A, Lu D, Qu C, Goussey A, Zhang G, Lu C, Chopp M. Treatment of traumatic brain injury in rats with erythropoietin and carbamylated erythropoietin. *J Neurosurg* 107:392-397, 2007.

- Marsden TJ. Erythropoietin-measurement and clinical applications. *Ann Clin Biochem* 43:97-104, 2006.
- Marti HH. Erythropoietin and the hypoxic brain (review). *Exp Biol J* 207:3233-3242, 2004.
- Martinez-Moczygamba M, Huston DP. Biology of common beta receptor-signaling cytokines: IL-3, IL-5, and GM-CSF. *J Allergy Clin Immunol* 112:653-665, 2003.
- Masuda S, Nagao M, Takahata K, Konishi Y, Gallyas F Jr, Tabira T, Sasaki R. Functional erythropoietin receptor of the cells with neural characteristics. Comparison with receptor properties of erythroid cells. *J Biol Chem* 268:11208-11216, 1993.
- McLeod DL, Shreeve MM, Axelrad AA. Improved plasma culture system for production of erythrocytic colonies in vitro: quantitative assay method for CFU-E. *Blood* 44:517-534, 1974.
- Medema RH, Kops GJ, Bos JL, Burgering BM. AFX-like Forkhead transcription factors mediate cell-cycle regulation by Ras and PKB through p27kip1. *Nature* 404:782-787, 2000.
- Meyer L, Deau B, Forejtníková H, Duménil D, Margottin-Goguet F, Lacombe C, Mayeux P, Verdier F. Beta-Trcp mediates ubiquitination and degradation of the erythropoietin receptor and controls cell proliferation. *Blood* 109:5215-5222, 2007.
- Millard S, Yan J, Nguyen H, Pagano M, Kiyokawa H, Koff A. Enhanced ribosomal association of p27(Kip1)mRNA is a mechanism contributing to accumulation during growth arrest. *J Biol Chem* 272:7093-7098, 1997.
- Misiti J, Spivak JL. Separation of erythroid progenitor cells in mouse bone marrow by isokinetic-gradient sedimentation. *Blood* 54:105-116, 1979.
- Miskimins W, Wang G, Hawkinson M, Miskimins R. Control of cyclin-dependent kinase inhibitor p27 expression by cap-independent translation. *Mol Cell Biol* 21:4960-4967, 2001.
- Miyake T, Kung, CK, Goldwasser, E. Purification of human erythropoietin. *J Biol Chem* 252:5558-5564, 1977.
- Moon C, Krawczyk M, Paik D, Coleman T, Brines M, Juhaszova M, Sollott S, Lakatta E, Talan M. Erythropoietin, modified to not stimulate red blood cell production, retains its cardioprotective properties. *J Pharmacol Exper Therap* 316:999-1005, 2005.
- Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65:55-63, 1983.
- Mulcahy L. The erythropoietin receptor. *Sem Oncol* 28:19-23, 2001.
- Mun K-Ch, Golper TA. Impaired biological activity of erythropoietin by cyanate carbamylation. *Blood Purif* 18:13-17, 2000.
- Myers MP, Andersen JN, Cheng A, Tremblay ML, Horvath CM, Parisien JP, Salmeen A, Barford D, Tonks NK. TYK2 and JAK2 are substrates of protein-tyrosine phosphatase 1B. *J Biol Chem* 276:47771-47774, 2001.
- Myklebust JH, Smeland EB, Josefsen D, Sioud M. Protein kinase C-alpha isoform is involved in erythropoietin-induced erythroid differentiation of CD34+ progenitor cells from human bone marrow. *Blood* 95:510-518, 2000.
- Murphy JM, Young IG. IL-3, IL-5, and GM-CSF signaling: crystal structure of the human beta-common receptor. *Vitam Horm* 74:1-30, 2006.
- Nakamura Y, Komatsu N, Nakauchi H. A truncated erythropoietin receptor that fails to prevent programmed cell death of erythroid cells. *Science* 257:1138-1141, 1992.
- Nakao T, Geddis A, Fox N, Kaushansky. PI3K/Akt/FOXO3a pathway contributes to thrombopoietin-induced proliferation of primary megakaryocytes in vitro and in vivo via modulation of p27^{Kip1}. *Cell Cycle* 7:257-266, 2008.

- Nicola NA. In: Guidebook to cytokines and their receptors. New York: Oxford University Press. pp. 171–177, 1994.
- Ohashi H, Maruyama K, Liu YC, Yoshimura A. Ligand-induced activation of chimeric receptors between the erythropoietin receptor and receptor tyrosine kinases. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:158-162, 1994.
- Omura S, Tanaka H, Oiwa R, Awaya J, Masuma R, Tanaka K. New antitumor antibiotics, OS-4742 A1, A2, B1 and B2 produced by a strain of *Streptomyces*. *J Antibiot* 30:908-916, 1977.
- Park K-D, Mun K-C, Chang E-J, Park S-B, Kim H-C. Inhibition of erythropoietin activity by cyanate. *Scand J Urol Nephrol* 38:69-72, 2004.
- Paschos N, Lykissas M, Beris A. The Role of Erythropoietin as an Inhibitor of Tissue Ischemia. *Int J Biol Sci* 4:161-168, 2008.
- Pérez G, Garbossa G, Sasseti B, Di Risio C, Nesse A. Interference of aluminium on iron metabolism in erythroleukaemia K562 cells. *J Inorg Biochem* 76:105-112, 1999.
- Pérez G, Garbossa G, Di Risio C, Vittori D, Nesse A. Disturbance of cellular iron uptake and utilization by aluminium, *J Inorg Biochem* 87:21-27, 2001.
- Peter M. The flip side of FLIP, *Biochem J* 382:1-3, 2004.
- Phillips HJ, Terryberry JE. Counting actively metabolizing tissue cultured cells. *Exp Cell Res* 13:341-347, 1957.
- Pines, J. Cyclins and cyclin-dependent kinases: a biochemical view. *Biochem J* 308:697-711, 1995.
- Pregi N, Wenker S, Vittori D, Perez Leiros C, Nesse A. TNF-alpha induced apoptosis is prevented by erythropoietin treatment on SH-SY5Y cells. *Exp Cell Res* 315:419–431, 2009.
- Pregi N, Vittori D, Pérez G, Pérez Leirós C, Nesse A. Effect of erythropoietin on staurosporine-induced apoptosis and differentiation of SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Biochim Biophys Acta (MCR)* 1763:238-246, 2006.
- Raguenes G, Desire L, Lantrua V, Courtois Y. Bcl-2 is upregulated in human SH-SY5Y neuroblastoma cells differentiated by overexpression of Fibroblast Growth Factor 1. *Biochim Biophys Res Commun* 258:745-751, 1999.
- Ramirez J, Carracedo S, Nogueras P, Buendia A, Merino S, Cañadillas M, Rodríguez C, Tetta A, Martin-Malo P, Aljama, Carbamylated darbepoetin derivative prevents endothelial progenitor cell damage with no effect on angiogenesis. *J Mol Cell Cardiol* 47:781–788, 2009.
- Rehder D. Is vanadium a more versatile target in the activity of primordial life forms than hitherto anticipated? *Org Biomol Chem* 6:957-964, 2008.
- Reissmann KR. Studies on the mechanism of the erythropoietic stimulation in parabiotic rats during hypoxia. *Blood* 5:372-380, 1950. Rozwarski DA, Gronenborn AM, Clore GM, Bazan JF, Bohm A, Wlodawer A, et al. Structural comparisons among the short-chain helical cytokines. *Structure* 2:159–173, 1994.
- Richmond TD, Chohan M, Barber DL. Turning cells red: signal transduction mediated by erythropoietin. *Trends Cell Biol* 15:146-55, 2005.
- Rossert J, Eckardt KU. Erythropoietin receptors: their role beyond erythropoiesis. *Nephrol Dial Transplant* 20:1025-1028, 2005.
- Sambrook J, Russell D, Chapter 7: Extraction, purification, and analysis of mRNA from eukaryotic cells. En: *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, 3rd. Ed., pp. 7.1-7.88, 2001.
- Sánchez P, Navarro F, Fares R, Nadam J, Georges B, Moulin C, Cavorsin M, Bonnet C, Ryvlin P, Belmenguenaï A, Bodennec J, Morales A, Bezin L. Erythropoietin receptor

expression is concordant with erythropoietin but not with common β chain expression in the rat brain throughout the life span. *J Comp Neurol* 514:403–414, 2009.

- Sasaki A, Yasukawa H, Shouda T, Kitamura T, Dikic I, Yoshimura A. CIS3/SOCS-3 suppresses erythropoietin (EPO) signaling by binding the EPO receptor and JAK2. *J Biol Chem* 275:29338-129347, 2000.
- Sautina L, Sautin Y, Beem E, Zhou Z, Schuler A, Brennan J, Zharikov S, Yanpeng D, Bungert J, Segal M. Induction of nitric oxide by erythropoietin is mediated by the b common receptor and requires interaction with VEGF receptor 2. *Blood* 115:896-905, 2010.
- Schievella AR, Paige LA, Johnson KA, Hill DE, Erikson RL. Protein tyrosine phosphatase 1B undergoes mitosis-specific phosphorylation on serine. *Cell Growth Differ* 4:239-246, 1993.
- Servant M, Coulombe P, Turgeon B, Meloche S. Differential regulation of p27(Kip1) expression by mitogenic and hypertrophic factors: Involvement of transcriptional and posttranscriptional mechanisms. *J Cell Biol* 148:543-556, 2000.
- Sherr C, and Roberts J. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev* 13:1501-1512, 1999.
- Shin I, Rotty J, Wu FY, Arteaga CL. Phosphorylation of p27Kip1 at Thr-157 interferes with its association with importin alpha during G1 and prevents nuclear reentry. *J Biol Chem* 280:6055-6063, 2005.
- Sirén AL, Fasshauer T, Bartels C, Ehrenreich H. Therapeutic potential of erythropoietin and its structural or functional variants in the nervous system. *Neurotherapeutics* 6:108-127, 2009.
- Sirén A-L, Fratelli M, Brines M, Goemans C, Casagrande S, Lewczuk P et al. Erythropoietin prevents neuronal apoptosis after cerebral ischemia and metabolic stress. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:4044-4049, 2001.
- Sola A, Rogido M, Lee BH, Genetta T, Wen TC. Erythropoietin alter focal cerebral ischemia activates the Janus kinase-signal transducer and activator of transcription signaling pathway and improves brain injury in postnatal day 7 rats. *Pediatr Res* 57:481-487, 2005.
- Sreelatha G, Rama R, Christopher S, Kiranmai A, Daniel F, Jeffrey D. Klopfenstein, Dzung H., Meena G, Jasti S. R. Co-Depletion of Cathepsin B and uPAR Induces G0/G1 Arrest in Glioma via FOXO3a Mediated p27Kip1 Upregulation. *PLoS One*. 5:e11668, 2010.
- Stephenson JR, Axelrad AA, McLeod DL, Shreeve MM. Induction of colonies of hemoglobin-synthesizing cells by erythropoietin in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 68:1542-1546, 1971.
- Swartjes M, Niesters M, Heij L, Dunne A, Aarts L, Hand CC, Kim HS, Brines M, Cerami A, Dahan A. Ketamine does not produce relief of neuropathic pain in mice lacking the β -common receptor (CD131). *PLoS One*. 8:e71326, 2013.
- Szenajch J, Wcislo G, Jeong JY, Szczylik C, Feldman L. The role of erythropoietin and its receptor in growth, survival and therapeutic response of human tumor cells from clinic to bench - a critical review. *Biochim Biophys Acta* 1806:82-95, 2010.
- Tauchi T, Damen JE, Toyama K, Feng GS, Broxmeyer HE, Krystal G. Tyrosine 425 within the activated erythropoietin receptor binds Syp, reduces the erythropoietin required for Syp tyrosine phosphorylation, and promotes mitogenesis. *Blood* 87:4495-4501, 1996.
- Tavernier J, Devos R, Cornelis S, Tuypens T, Van der Heyden J, Fiers W, et al. A human high affinity interleukin-5 receptor (IL5R) is composed of an IL5-specific alpha chain and a beta chain shared with the receptor for GM-CSF. *Cell* 66:1175–1184, 1991.

- Tieu K, Zuo DM, Yu PH. Differential effects of staurosporine and retinoic acid on the vulnerability of the SH-SY5Y neuroblastoma cells: involvement of Bcl-2 and p53 proteins. *J Neurosci Res* 58:426-435, 1999.
- Toliás CM, Bullock MR. Critical appraisal of neuroprotection trials in head injury: What have we learned? *Neuro Rx* 1:71-9, 2004.
- Tonks NK, Diltz CD, Fischer EH. Purification of the major protein-tyrosine-phosphatases of human placenta. *J Biol Chem* 263:6722-6730, 1988.
- Towbin H, Stachelint T, Gordan J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 76:4350-4354, 1979.
- Um M, Gross AW, Lodish HF. A "classical" homodimeric erythropoietin receptor is essential for the antiapoptotic effects of erythropoietin on differentiated neuroblastoma SH-SY5Y and pheochromocytoma PC-12 cells. *Cell Signalling* 19:634-645, 2007.
- Ungureanu D, Saharinen P, Junttila I, Hilton DJ, Silvennoinen O. Regulation of Jak2 through the ubiquitin-proteasome pathway involves phosphorylation of Jak2 on Y1007 and interaction with SOCS-1. *Mol Cell Biol* 22:3316-3326, 2002.
- Van der Kooij MA, Groenendaal F, Kavelaars A, Heijnen CJ, van Bel F. Neuroprotective properties and mechanisms of erythropoietin in in vitro and in vivo experimental models for hypoxia/ischemia. *Brain Res Rev* 59:22-33, 2008.
- Vittori D, Pregi N, Pérez G, Garbossa G, Nesse A. The distinct erythropoietin functions that promote cell survival and proliferation are affected by aluminium exposure through mechanisms involving erythropoietin receptor. *Biochim Biophys Acta (MCR)* 1743:29-36, 2005.
- Vittori D*, Vota D*, Callero M, Chamorro ME, Nesse A. c-FLIP is involved in erythropoietin-mediated protection of erythroid-differentiated cells from TNF alpha induced apoptosis. *Cell Biol Int* 34:621-630, 2010. *This authors contributed equally to this work.
- Vittori D, Nesse A, Pérez G, Garbossa G. Morphologic and functional alterations of erythroid cells induced by long-term ingestion of aluminium. *J Inorg Biochem* 76:113-120, 1999.
- Vota DM, Maltaneri RE, Wenker SD, Nesse AB, Vittori DC. Differential erythropoietin action upon cells induced to eryptosis by different agents. *Cell Biochem Biophys* 65:145-157, 2013.
- Walrafen P, Verdier F, Kadri Z, Chrétien S, Lacombe C, Mayeux P. Both proteasomes and lysosomes degrade the activated erythropoietin receptor. *Blood* 105:600-608, 2005.
- Wang L, Zhang ZG, Gregg SR, Zhang RL, Jiao Z, LeTourneau Y, Liu X, Feng Y, Gerwien J, Torup L, Leist M, Noguchi CT, Chen ZY, Chopp M. The Sonic hedgehog pathway mediates carbamylated erythropoietin-enhanced proliferation and differentiation of adult neural progenitor cells. *J Biol Chem* 282:32462-32470, 2007.
- Wang FF, Kung CK, Goldwasser E. Some chemical properties of human erythropoietin. *Endocrinology* 116:2286-2292, 1985.
- Wen D, Bissel JP, Showers M, Ruch BC, Bunn HF. Erythropoietin structure- function relationships. Identification of functionally important domains. *J Biol Chem* 269:22839-22846, 1994.
- Wenker SD, Chamorro ME, Vittori DC, Nesse AB. Protective action of erythropoietin on neuronal damage induced by activated microglia. *FEBS J* 280:1630-1642, 2013.
- Wenker SD, Chamorro ME, Vota DM, Callero MA, Vittori DC, Nesse AB. Differential antiapoptotic effect of erythropoietin on undifferentiated and retinoic acid-differentiated SH-SY5Y cells. *J Cell Biochem* 110:151-161, 2010.

-
- Witthuhn BA, Quelle FW, Silvennoinen O, Yi T, Tang B, Miura O, Ihle JN. JAK2 associates with the erythropoietin receptor and is tyrosine phosphorylated and activated following stimulation with erythropoietin. *Cell* 74:227-236, 1993.
 - Wojchowski DM, Sathyanarayana P, Dev A. Erythropoietin receptor response circuits. *Curr Opin Hematol* 17:169-176, 2010.
 - Xie HR, Hu LS, Li GY. SH-SY5Y human neuroblastoma cell line: in vitro cell model of dopaminergic neurons in Parkinson's disease. *Chin Med J (Engl)*. 123:1086-1092, 2010.
 - Xu X, Cao Z, Cao B, Li J, Guo L, Que L, Ha T, Chen Q, Li Ch, Li Y. Carbamylated erythropoietin protects the myocardium from acute ischemia/ reperfusion injury through a PI3K/ Akt-dependent mechanism. *J Surg* 146:506-514, 2009.
 - Yuste VJ, Sánchez-López I, Solé C, Encinas M, Bayascas JR, Boix J, Comella JX. The prevention of the staurosporine-induced apoptosis by Bcl-X(L), but not by Bcl-2 or caspase inhibitors, allows the extensive differentiation of human neuroblastoma cells. *J Neurochem* 80:126-139, 2002.
 - Zhande R, Karsan A. Erythropoietin promotes survival of primary human endothelial cells through PI3K-dependent, NF-kappaB-independent upregulation of Bcl-xL. *Am J Physiol* 292:2467-2474, 2007.
 - Zhang M, Zhou M, Van Etten RL, Stauffacher CV. Crystal structure of bovine low molecular weight phosphotyrosyl phosphatase complexed with the transition state analog vanadate. *Biochemistry* 36:15-23, 1997.