

UCH-FC /
Biotecnología
F219e
C.1



**FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE**

**EL RECEPTOR DE EGF MEDIA LOS EFECTOS DE TGF- β 1 SOBRE LA
MALIGNIDAD DE QUERATINOCITOS TRANSFORMADOS**

**Seminario de Título
Entregado a la
Universidad de Chile
En cumplimiento parcial de los requisitos
Para optar al Título de
Ingeniero en Biotecnología Molecular**



**Por
NICOLE ELISA FARFÁN BECERRA**

Director de Seminario de Título: Dr. JORGE MARTÍNEZ WINKLER

**Octubre, 2008
Santiago - Chile**



**EL RECEPTOR DE EGF MEDIA LOS EFECTOS DE TGF- β 1 SOBRE LA
MALIGNIDAD DE QUERATINOCITOS TRANSFORMADOS**

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular.

NICOLE ELISA FARFÁN BECERRA

Director Seminario de Título:

Dr. Jorge Martínez Winkler

Comisión de Evaluación Seminario de Título:

Dr. Juan Fernández Hidalgo

Presidente

Dr. Alejandro Roth Metcalfe

Evaluador



Santiago de Chile, Octubre de 2008

DEDICATORIA

“Aun cuando haya pasado por todo lo que pasé, no me arrepiento de los problemas en que me metí, porque fueron ellos los que me condujeron hasta donde deseé llegar. Ahora, todo lo que tengo es esta espada, y la entrego a cualquiera que desee seguir su peregrinación. Llevo conmigo las marcas y las cicatrices de los combates; ellas son testimonio de lo que viví, y recompensas de lo que conquisté.

Son estas marcas y cicatrices queridas las que me abrirán las puertas del Paraíso. Hubo una época en la que viví escuchando historias de hazañas. Hubo otras épocas en las que viví simplemente porque necesitaba vivir. Pero ahora vivo porque soy un guerrero y porque quiero un día estar en la compañía de aquel por quien tanto luche.”

Paulo Coelho



AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer a todos aquellos que me ayudaron en la realización de mi tesis. A mi familia, por todo el amor que me han dado y su apoyo durante todos mis años de universidad, a Rodrigo González y Andrea Flores, que fueron cómplices en mi estadía en el laboratorio e hicieron mis días más entretenidos. A mi tutor Jorge Martínez, Juan Francisco Santibáñez y Mónica Cáceres por haberme guiado y enseñado.





INDICE DE CONTENIDOS

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Factor de Crecimiento Transformante – $\beta 1$.	3
1.2. Transición Epitelio-Mesénquima.	5
2. HIPÓTESIS	9
3. OBJETIVOS	
3.1. Objetivo General.	9
3.2. Objetivos Específicos.	9
4. MATERIALES	
4.1. Material Biológico	10
4.1.1. Células	10
4.1.2. Anticuerpos	10
4.1.3. Partidores	11
4.1.4. Factores de Crecimiento	11
4.2. Reactivos	12
4.2.1. Medios y Suplementos de cultivo	12
4.2.2. Marcadores de Peso Molecular	12
4.2.3. Inhibidores	12
4.2.4. Reactivos Generales	13
4.3. Instrumentos y Equipos	14

5. MÉTODOS

5.1. Cultivo Celular	15
5.2. Western blot	15
5.2.1. Extracción de proteínas	15
5.2.2. Electroforesis en geles de Poliacrilamida-SDS	16
5.2.3. Transferencia y revelado	16
5.3. Cuantificación de proteínas	18
5.4. Inmunoprecipitación del receptor de EGF	18
5.5. Zimografía	19
5.6. Ensayo de Migración	19
5.7. Inmunofluorescencia	20
5.8. RT-PCR	21
5.8.1. Extracción de RNA	21
5.8.2. Síntesis de cDNA	21
5.8.3. PCR	22

6. RESULTADOS

6.1. TGF- β 1 induce la activación de la vía ERK-MAPK.	23
6.2. La adición de TGF- β 1 provoca la transactivación de EGFR en queratinocitos transformados de ratón.	24
6.3. TGF- β 1 activa la ruta ERK/MAPK a través de un mecanismo dependiente de la activación de EGFR.	26
6.4. En células PDV el estímulo migratorio mediado por TGF- β 1 es mediado por EGFR.	28

6.5. La producción de uPA es estimulada por TGF- β 1 es parcialmente mediado por EGFR y depende de la actividad de T β RI.	31
6.6. TGF- β 1 induce la pérdida de adhesión célula-célula y la reorganización del citoesqueleto de actina.	34
6.6.1. Estímulo de TGF- β 1 sobre la pérdida de adhesión célula-célula.	34
6.6.2. Estímulo de TGF- β 1 sobre la reorganización del citoesqueleto de actina.	36
6.7. TGF- β 1 estimula la transcripción de uPA, PAI-1 y vimentina.	38
6.8. Evolución temporal de la inhibición por AG1478 del estímulo a la expresión de mRNA para uPA por TGF- β 1.	41
7. DISCUSIÓN	44
8. CONCLUSIONES	50
9. BIBLIOGRAFÍA	52

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Vía de señalización TGF- β 1.	5
Figura 2. Vía de señalización ERK-MAPK.	7
Figura 3. Efecto de TGF- β 1 sobre la fosforilación de ERK 1,2 en células PDV.	24
Figura 4. Transactivación del receptor de EGF inducida por TGF- β 1.	25
Figura 5. EL receptor de EGF media la activación de la vía de ERK-MAPK por TGF- β 1.	27
Figura 6. El estímulo de la migración celular por TGF- β 1 involucra la actividad del receptor de EGF.	29
Figura 7. La actividad de los receptores de EGF y TGF- β 1 determina la capacidad estimuladora de TGF- β 1 sobre la producción de uPA.	32
Figura 8. TGF- β 1 estimula la pérdida de adhesión célula-célula mediada por Cadherina E.	35
Figura 9. Efecto de TGF- β 1 sobre la reorganización del citoesqueleto de actina.	37
Figura 10. EGFR media el aumento de la expresión de uPA, Vimentina y PAI-1 estimulada por TGF- β 1 en células PDV.	39
Figura 11. Curva de progreso temporal del efecto de AG1478 sobre el estímulo de TGF- β 1 en la expresión del mRNA para uPA en células PDV.	42

ABREVIATURAS

APS	Persulfato de amonio
BSA	Albúmina de suero bovino
CaCl ₂	Cloruro de Calcio
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementario
CuSO ₄	Sulfato de Cobre
DMBA	Dimetil benzoantraceno
DMEM	Medio Eagle modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetilsulfoxido
EDTA	Ácido etilen diamino tetra acético
EGF	Factor de Crecimiento Epidérmico
EGFR	Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico
EGTA	Ácido etilen glicol tetra acético
ERK	Quinasas reguladas por señales extracelulares
GPDH	glicerol 3- fosfato deshidrogenasa
HCl	Ácido Clorhídrico
KCl	Cloruro de Potasio
KH ₂ PO ₄	Fosfato diácido de Potasio
MAPK	Proteína quinasa activada por mitógeno
MgCl ₂	Cloruro de Magnesio
mRNA	Ácido Ribonucleico mensajero
NaF	Fluoruro de sodio
NEM	n-etil-maleimida
NaCl	Cloruro de Sodio

NaHPO ₄	Fosfato de sodio
NaH ₂ PO ₄	Fosfato diácido de Sodio
NaOH	Hidroxido de Sodio
PAI-1	Inhibidor del Activador de Plasminógeno-1
PBS	Buffer Fosfato Salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PMSF	fenil metil sulfonil floururo
RT-PCR	Transcripción reversa - PCR
SDS	Dodecil Sulfato de Sodio
SFB	Suero Fetal Bovino
TBE	Tris Borato Acido
TβRI	Receptor del Factor de Crecimiento – β1 tipo I
TEM	Transición Epitelio-Mesenquima
TGF-β1	Factor de Crecimiento Transformante - β1
uPA	Activador del plasminógeno tipo uroquinasa

RESUMEN

En la enfermedad cancerosa, la célula tumoral manifiesta una serie de alteraciones funcionales y morfológicas, que le permiten tanto el crecimiento autónomo como la movilización a tejidos distantes. El Factor de Crecimiento Transformante $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) ha sido asociado a la carcinogénesis con función bimodal. En los inicios del proceso, TGF- $\beta 1$ actúa como inhibidor de la proliferación epitelial; mientras que en etapas más avanzadas de la enfermedad, promueve la malignización.

En este trabajo se utilizó una línea celular de queratinocitos transformados de ratón (línea celular PDV) para investigar la posibilidad de que el Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico (EGFR), molécula frecuentemente sobre-expresada en cánceres epiteliales, forme parte del complejo de señalización intracelular activado por TGF- $\beta 1$. Los resultados indican que, TGF- $\beta 1$ provoca la transactivación de EGFR y la subsecuente fosforilación de ERK 1,2 (quinasas reguladas por señales extracelulares), activando una ruta alternativa a la vía canónica de TGF- $\beta 1$. Se observó también que la inhibición de la fosforilación de EGFR, mediante su inhibidor específico AG1478 (Tirfostina), impide la activación de ERK 1,2 por TGF- $\beta 1$.

Se determinó que TGF- $\beta 1$ estimula la migración celular y la producción de uPA (activador del plasminógeno similar a uroquinasa) soluble, acciones que fueron parcialmente bloqueadas ante la inhibición de EGFR. Se observó también que la incubación de células PDV con TGF- $\beta 1$, provocó la disociación de los contactos intercelulares mediados por Cadherina E y la reorganización del citoesqueleto de

actina en fibras de estrés; mientras que la adición de los inhibidores de T β RI (receptor de TGF- β tipo I) y EGFR, impidieron esta respuesta.

Se observó que en células PDV, TGF- β 1 provoca un aumento en los niveles de mRNA de uPA y de PAI-1, efecto que fue inhibido por SB431542 (inhibidor específico de T β RI) pero no por AG1478. En tanto, el nivel de transcripción de Cadherina E, no fue modificado con ninguno de los factores utilizados. Además, TGF- β 1 provocó un aumento en los niveles del transcrito de Vimentina, efecto que fue bloqueado cuando se inhibió EGFR y T β RI. Lo anterior sugiere que la participación de EGFR en los cambios estimulados por TGF- β 1 afecta en forma desigual la expresión de marcadores específicos.

Los resultados permiten sugerir que la activación de EGFR podría estar involucrada en la señalización inducida por TGF- β 1, lo cual permite plantear un mecanismo que explicaría la activación de la ruta de las ERK-MAPK (proteína quinasa activada por mitógeno) por TGF- β 1.

ABSTRACT

In cancerous diseases, tumor cells manifest a series of morphological and functional changes, that allow both autonomous growth and mobilization to distant tissues. The Transforming Growth Factor β 1 (TGF- β 1), has been implicated in carcinogenesis in a bimodal manner. At the onset of the process, TGF- β 1 acts as an inhibitor of epithelial proliferation, whereas in more advanced stages of the disease, this factor promotes malignancy.

In this study was used a murine transformed keratinocyte cell line (PDV cell line), to investigate the possibility that the Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR), which is frequently overexpressed in epithelial cancers, constitutes part of the intracellular signaling complex induced by TGF- β 1. The results indicate that TGF- β 1 induces EGFR transactivation and subsequently ERK 1,2 (extracellular signal-related kinase) phosphorylation, through an alternative route to the main activation pathway of TGF- β 1. Also noticed that inhibiting the auto-activation of EGFR (with its specific inhibitor AG1478) prevented the activation of ERK 1,2 by TGF- β 1.

Was determined that TGF- β 1 stimulates cellular migration and the production of soluble uPA (urokinase-type plasminogen activator). Actions that were partially blocked through the inhibition of EGFR. Also noticed that incubation of PDV cells with TGF- β 1, causes dissociation of E-Cadherin mediated intercellular junctions and stimulates the formation of stress fibers, while the inhibition of T β RI (TGF- β type I receptor) and EGFR prevented this response at different degrees.

It was found that TGF- β 1 stimulated an increment in the level of uPA transcription and this effect was inhibited by SB431542 (specific inhibitor of T β RI) but

not by AG1478. E Cadherin transcript levels did not change with any of the factors used. TGF- β 1 increased the level of vimentin transcripts, effect that was blocked by AG1478 and SB431542.

Results presented suggest that activation of EGFR could be an important event in TGF- β 1 induced signalling and would point to a mechanism that explain the activation of the MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase) pathway by TGF- β 1.

1. INTRODUCCIÓN

La enfermedad cancerosa es una patología cuya principal característica es la pérdida del control de la proliferación celular y la manifestación, por parte de la célula tumoral, de una gama de alteraciones funcionales y morfológicas que le permiten su crecimiento autónomo y movilización a tejidos distantes (Hanahan y Weinberg, 2000). Esta última característica se observa en los estados avanzados de esta enfermedad y deriva en un fenómeno conocido como metástasis (Thiery y Chopin, 1999).

La evidencia acumulada en los últimos años, apunta a la existencia de mecanismos celulares específicos durante el proceso de invasión local, que representan la primera etapa en la cascada metastásica de los carcinomas, la forma predominante de tumores del humano adulto (Hanahan y Weinberg, 2000; Stetler-Stevenson y col., 1993). En general, se puede decir que la carga mutacional de una célula tumoral metastásica es superior a la de una célula en proceso de iniciación (etapa inicial del proceso carcinogénico en el que ocurren alteraciones a nivel genómico por acción de carcinógenos). Sin embargo, son muy pocos los proto-oncogenes cuya activación se asocia directamente con la capacidad metastásica (Nguyen y Massagué, 2007; Yarden y Sliwkowski, 2001). Más bien, lo más común es que la célula sobre-exprese moléculas que normalmente cumplen un papel regulatorio en la proliferación y/o movilización celular (Yarden y Sliwkowski, 2001). Un ejemplo de estas proteínas lo constituye el Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico

(EGFR), cuya sobre-expresión se asocia a estados avanzados de malignidad, fundamentalmente en células epiteliales (Aguirre-Ghiso y col., 1999; Maheshwari y col., 2001; Prenzel y col., 2000). La célula tumoral que sobre-expresa EGFR presenta una "ventaja de crecimiento" respecto de sus congéneres normales puesto que está provista de muchas copias de un receptor que se activa por la unión de un factor (EGF) característicamente ubicuo, lo que permite su proliferación en territorios diversos (Ullrich y Schlessinger, 1990; Yarden, 2001; Yarden y Sliwkowski, 2001).

Se ha postulado también, que la adquisición de motilidad por la célula epitelial, incluye la sobre-expresión de un conjunto de proteasas que degradan la matriz extracelular (MEC), facilitando la migración de la célula tumoral (Friedl y Wolf, 2003; Liu y col., 2002; Murphy y Gavrilovic, 1999; Santibáñez y col., 2002). Esta propiedad también está asociada a la activación de rutas de señalización específicas que activan la expresión de proteasas (Santibáñez y col., 2000; Santibáñez y col., 2002). Sin embargo, existen proteasas que, además de degradar MEC, son también responsables de la activación de rutas de señalización, actuando como ligandos de receptores de membrana. Un caso es el del activador del plasminógeno similar a uroquinasa (uPA), cuya unión a su receptor (uPAR) activa una ruta de señalización específica que, a su vez, es un elemento modulador de la motilidad celular (Andreasen y col., 2000; Blasi y Carmeliet, 2002; Irigoyen y col., 1999). En nuestro laboratorio, se ha demostrado que la unión de uPA a su receptor, resulta en la transactivación de EGFR, un fenómeno que depende de la actividad de metaloproteasas de matriz (MMPs) inducidas por la interacción uPA/uPAR, que –muy probablemente- libera un ligando insoluble de EGFR responsable de la activación del receptor (Guerrero y col., 2004).

1.1. Factor de Crecimiento Transformante – β 1

Los factores de crecimiento transformante (TGF- β) son polipéptidos que forman parte de una superfamilia que incluye 2 subfamilias: la subfamilia TGF- β /Activinas/Nodal y la subfamilia BMP (proteínas morfogenéticas de hueso)/GDF (factor de crecimiento y diferenciación)/MIS (del inglés, muellirian inhibiting substance) (Massagué y Chen, 2000; Massagué y Gomis, 2006; Shi y Massagué, 2003; Sporn y Roberts, 1992). La actividad de TGF- β 1, ha sido asociada con el proceso carcinogénico de una manera bimodal (Valdés y col., 2004): en los inicios del proceso TGF- β 1 actuaría como inhibidor de la proliferación epitelial (Pierce y col., 1995), mientras que en estados más avanzados de la tumorigénesis, se convertiría en un activo promotor de la malignidad (Akhurst y Derynck, 2001). Este faceta dual ha sido interpretado como la evasión del control antiproliferativo por las células tumorales mediante mecanismos que van, desde una sensibilidad alterada a TGF- β 1 mediada por mutaciones inactivantes de sus receptores, hasta alteraciones en sus mecanismos de transducción (Chen y col., 1998; Grady y col., 1999; Markowitz y col., 1995; Massagué, 1998).

Como ocurre con la mayoría de los factores de crecimiento de tipo polipeptídico, la actividad señalizadora de TGF- β 1, depende inicialmente de la unión del factor a receptores de membrana. En este caso particular, se trata de dos receptores con actividad serina/treonina quinasa (conocidos como tipo I y II) (Lin y col., 1992). Ambos tipos de receptores están constituidos por aproximadamente 500 aminoácidos,

organizados en: un dominio N-terminal de unión a ligando, una región transmembrana y un dominio C-terminal con actividad quinasa. Solo los receptores tipo I poseen un segmento regulatorio de 30 aminoácidos o región GS, río arriba de su dominio quinasa que es fosforilado por la actividad quinasa del receptor tipo II unido a ligando (Massagué y Gomis, 2006; Shi y Massagué, 2003). La unión del ligando se realiza predominantemente al receptor tipo II (T β RII), evento que luego permite la fosforilación en la región GS y activación del receptor tipo I (T β RI). Una vez activado el receptor tipo I, se desencadena la activación de la llamada vía canónica de señalización (figura 1), que incluye la fosforilación de las proteínas Smad 2,3, que forman un complejo con la proteína Smad 4, para así traslocar al núcleo donde regulan la transcripción de ciertos genes (Jayaraman y Massagué, 2000; Massagué y Chen, 2000; Shi y Massagué, 2003; Sporn y Roberts, 1992). Existe abundante evidencia de que el exceso de producción y/o activación de TGF- β 1 en tumores puede fomentar la progresión del cáncer por mecanismos autocrinos y paracrinos (Dumont y Arteaga, 2003; Newman, 1993). En modelos murinos de cáncer de mama, se ha observado que la señalización activada por TGF- β 1 promueve el desarrollo de metástasis (Siegel y col., 2003; Muraoka-cook y col., 2004), lo que incluye la inhibición de los mecanismos de respuesta inmune del huésped y el aumento de: la motilidad celular, la supervivencia, la neo-angiogénesis tumoral y la expresión de metaloproteasas tumorales (Dumont y Arteaga, 2000; Muraoka y col., 2003; Siegel y col., 2003).

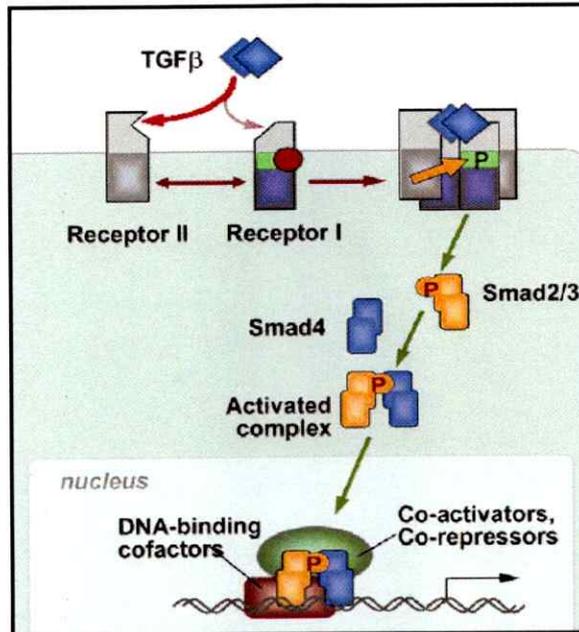


Figura 1. Vía de señalización TGF-β1. El factor de crecimiento transformante-β1 se une predominantemente al receptor tipo II, recluta al receptor tipo I y lo fosforila en la región GS. El receptor tipo I activado fosforila a las proteínas Smad (Smad 2/3) en el motivo SXS C-terminal, lo que les permite trasladarse al núcleo. La incorporación de las proteínas Smads activas al núcleo se realiza luego de la unión a Smad 4. Una vez en el núcleo, las proteínas Smads activas forman un complejo que regula la transcripción de ciertos genes (Massagué y Gomis, 2006).

1.2. Transición Epitelio-Mesénquima

Uno de los eventos que determina la progresión tumoral (desarrollo del carcinoma) de células epiteliales, es la pérdida de sus características y la adquisición de rasgos de tipo mesenquimático, fenómeno que se conoce como Transición Epitelio-Mesénquima (TEM) (Boyer y col., 2000; Hugo y col., 2007; Savagner, 2001; Thiery, 2002). El modelo de la carcinogénesis de piel de ratón, ha permitido definir con

precisión este proceso y se ha descrito que TGF- β 1, es responsable directo de la adquisición por la célula epitelial de algunas propiedades de célula mesenquimática (Caulín y col., 1995; Santibáñez, 2006). En nuestro laboratorio hemos estudiado este fenómeno utilizando una línea celular que corresponde a queratinocitos transformados de ratón (línea PDV) que, bajo el estímulo de TGF- β 1, pierden consistentemente los rasgos epiteliales y adquieren marcadores de tipo mesenquimático, como lo es la expresión de proteasas tumorales, entre otros rasgos y que, en conjunto, le confieren a la célula propiedades invasivas (Santibáñez y col., 1999; Santibáñez y col., 2002; Santibáñez, 2006).

Además de la ruta canónica, caracterizada por la activación de las proteínas Smad, se ha descrito que TGF- β 1 también es capaz de activar la ruta de las MAPK (proteínas quinasas activadas por mitógenos) (figura 2), lo que ha sido interpretado como un incremento de versatilidad de la capacidad activadora del factor (Akhurst y Balmain, 1999; Mulder, 2000; Tian y col., 2007). Los datos de nuestro laboratorio, que permitieron asignar a TGF- β 1 un papel en la TEM de queratinocitos transformados de ratón, mostraron que la adquisición de propiedades malignas secundarias a la TEM estaban asociadas a la activación de la ruta de señalización ERK 1,2 (Santibáñez y col., 2000; Santibáñez y col., 2002).

En algunos sistemas celulares, se ha descrito que la inducción de una TEM dependiente de TGF- β 1, requiere del establecimiento de una cooperación sinérgica entre la activación de Ha-Ras y la señalización TGF- β 1 (Derynck y Zhang, 2003;

Gotzmann y col., 2002; Janda y col., 2002; Kretzchmar y col., 1999; Mulder, 2000; Oft y col., 1996). La participación de estas vías de señalización específicas abre la posibilidad de que, a nivel de receptores, también se produzcan eventos de cooperación.

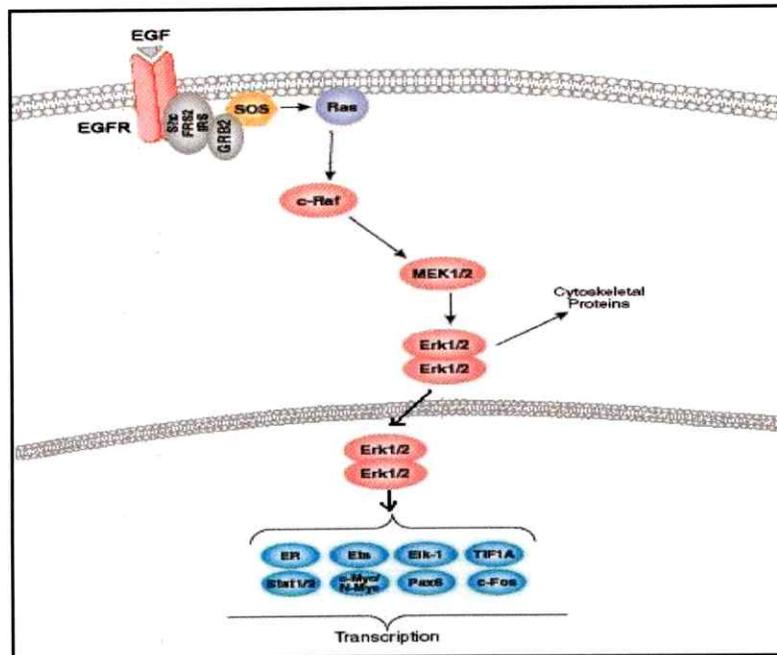


Figura 2. Vía de señalización ERK-MAPK. La unión del factor de crecimiento epidérmico (EGF) a su receptor (EGFR), provoca la activación éste por auto-fosforilación en tirosina. El recetor de EGF activo, transduce la señal a través de proteínas adaptadoras (Shc, Grb2 y Sos) a la GTPasa Ras, la cual se une a Raf y la activa. La proteína Raf activada, fosforila a MEK 1,2 que a su vez fosforila y activa a ERK 1,2. El dímero ERK activo puede regular blancos en el citosol o traslocar al núcleo donde fosforila varios factores de transcripción, regulando así la expresión de ciertos genes (modificado de Dhanasekaran y col., 2007;; Dhillon y col., 2007).

La activación de EGFR constituye uno de los mecanismos centrales para la mantención del fenotipo maligno (Fischer y col. 2003). De hecho, la expresión de formas activas del receptor se asocia con estados avanzados de la enfermedad cancerosa (Salomón y col., 1995). La activación de EGFR es un proceso que supone la

unión de ligandos al segmento extracelular de la molécula del receptor (Yarden y Sliwkowski, 2001). La célula tumoral utiliza múltiples mecanismos para lograr este objetivo de activación, entre los que podemos mencionar: la generación autocrina de ligandos; y la fosforilación del receptor como resultado de la activación de otro receptor no relacionado por unión a su ligando (transactivación). Este último caso, ha sido estudiado en nuestro laboratorio para la transactivación de EGFR estimulada por la unión de uPA a su receptor (Guerrero y col., 2004).

Tomando en consideración estos antecedentes se planteó estudiar la posibilidad de que, en la inducción por TGF- β 1 del fenómeno de transición epitelio-mesénquima y la activación de la ruta de las ERK-MAPK, la fosforilación de EGFR sea el elemento que active la ruta de señalización MAPK; y por tanto, sea en parte responsable de la transición epitelio-mesénquima.

2. HIPÓTESIS.

“La activación del receptor de EGF es un evento central en la señalización mediada por TGF- β 1 y determinaría la progresión tumoral en queratinocitos transformados de ratón”.

3. OBJETIVOS.

3.1. Objetivo General

Determinar el papel que juega el receptor de EGF en la progresión tumoral mediada por TGF- β 1 en células PDV.

3.2. Objetivos específicos.

- 1.- Estudiar el papel que juega el receptor de EGF en las vías de señalización activadas por TGF- β 1 en células PDV.
2. Estudiar el papel del receptor de EGF en el estímulo de la expresión de proteasas tumorales como uroquinasa, inducido por TGF- β 1 en células PDV.
3. Analizar el papel del receptor de EGF en el aumento de la actividad migratoria inducida por TGF- β 1, en queratinocitos transformados.
4. Determinar el papel del receptor de EGF en la inducción de la transición epitelio-mesénquima (TEM) mediada por TGF- β 1 en queratinocitos transformados.

4. MATERIALES.

4.1. Material Biológico.

4.1.1. Células.

Las células utilizadas corresponden a la línea celular PDV, donada por el Dr. Miguel Quintanilla (Instituto de Investigaciones Biomédicas, Madrid, España) y corresponden a queratinocitos epidérmicos transformados de ratón. Esta línea celular se obtuvo mediante el tratamiento *in vitro* de células epidermales primarias con el carcinógeno DMBA (dimetil benzoantraceno), el cual provoca una transversión A a T en el codón 61 del gen *ras*, generando la forma oncogénica de esta proteína (Akhurts y Balmain, 1999; Bremner y Balmain, 1990; Fusenig y col., 1978; Quintanilla y col., 1991). Esta línea celular produce carcinomas escamosos cuando son inyectados subcutáneamente en el dorso de ratones desnudos atímicos (un tipo de ratón sin pelo, que posee un timo anormal y un sistema inmune defectuoso por mutación genética) (Caulín y col., 1995; Díaz-Guerra y col., 1992; Quintanilla y col., 1986; Quintanilla y col., 1991).

4.1.2. Anticuerpos.

- **Monoclonales:** anti-p-ERK (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), La anti-p-Tyr (4G10) fue donada por la Dra. Maria Rosa Bono (Facultad de

Ciencias, Universidad de Chile) y la anti-Cadherina E fue donada por el Dr. Miguel Quintanilla (Instituto de Investigaciones Biomédicas, Madrid, España).

- **Policlonales:** anti-ERK, anti-EGFR, anti-Smad 3 y anti-p-Smad 2,3 fueron obtenidos de Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA.
- **Secundarios:** peroxidasa anti-ratón, peroxidasa anti-conejo y peroxidasa anti-cabra fueron obtenidos de ROCKLAND, Gilbertsville, PA.
- **Fluorescentes:** anti-ratón FITC, anti-conejo FITC y Faloidina Alexa Fluor® 594 fueron obtenidos de Molecular Probes, Eugene, OR.

4.1.3. Partidores.

Proteína	Partidores	°C	Ciclos	Producto (pb)
GPDH	S 5' ACC ACA GAT CCA TGC CAT CAC 3' AS 5' TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA 3'	60	25	456
uPA	S 5' CCT AAG GCA GTT TGT CC 3' AS 5' CTT CCC TGT AGT ATT CGT G 3'	52	33	392
Cadherina E	S 5'CGT GAT GAA GGT CTC AGC C 3' AS 5' ATG GGG GCT TCA TTC AC 3'	52	30	615
Vimentina	S 5' GAA CGG AAA GTG GAA TCC TTG C 3' AS 5' GGT TGG CAG AGG CAG AGA AAT C 3'	66	30	591
PAI-1	S 5' ATC CTG CCT AAG TTC TCT CTG 3' AS 5' ATT GTC TCT GTC GGG TTG TG 3'	60	30	290

4.1.4. Factores de Crecimiento.

TGF- β 1 y EGF fueron obtenidas de R&D (MN, USA) y Upstate-Cell Signaling Solution (New York) respectivamente.

4.2. Reactivos.

4.2.1. Medios y Suplementos de Cultivo.

Para el cultivo de células PDV se utilizaron los medios DMEM y F-12 (Invitrogen, Carlsbad, CA), suero fetal bovino (Hyclone, Logan, UT) y gentamicina (Laboratorio Bestpharma S.A.)

4.2.2. Marcadores de Peso Molecular.

Para geles de DNA se utilizó un marcador de 100 bp (Invitrogen, Carlsbad, CA). Para geles de poliacrilamida-SDS se utilizaron los estándares preteñidos Bio-Rad (Hercules, CA) (Miosina 211,24 kDa; β -Galactosidasa 117,76 kDa; BSA 99,81 kDa; Ovoalbumina 49,78 kDa).

4.2.3. Inhibidores.

- **Ortovanadato:** Inhibidor de tirosina-fosfatasa (SIGMA-Aldrich, St. Louis, MO).
- **PMSF:** Inhibidor de serina proteasas (SIGMA-Aldrich, St. Louis, MO).

- **Leupeptina:** Inhibidor de cisteina/serina proteasas (Calbiochem, San Diego, CA).
- **NaF:** Inhibidor de serina/treonina-fosfatasa (MERCK, Darmstadt, Alemania).
- **NEM:** Inhibidor de grupos sulfhidrilos (Calbiochem, San Diego, CA).
- **AG1478:** Inhibidor de la auto-fosforilación de EGFR (Calbiochem, San Diego, CA).
- **SB431542:** Inhibidor de la actividad quinasa de T β RI (SIGMA-Aldrich, St. Louis, MO).

4.2.4. Reactivos Generales.

- **AGFA:** Revelador y fijador radiográfico.
- **Bio-RAD:** Acrilamida Mix 30%, Kit de cuantificación de proteínas.
- **GIBCO:** RNasa away.
- **Invitrogen:** Platimun PCR SuperMix, ThermoScript™ RT-PCR System, Trizol.
- **MERCK:** HCl, NaHCO₄, MgCl₂, KCl, KH₂PO₄, iso-propanol, β -mercaptoetanol, APS, NaOH, cristal violeta, paraformaldehído, etanol.
- **Perkin Elmer *precisely*:** Western lightning Chemiluminescence Reagent plus (kit de revelado).

- **Pierce:** Membranas de PVDF.
- **ROCKLAND:** Albúmina de suero bovino.
- **TCL:** Alcohol 70%, Tris Grado Buffer, Metanol.
- **US Biological:** SDS, Tritón X-100, Glicina, CuSO₄.
- **SIGMA:** CaCl₂, DMSO, EDTA, EGTA, TEMED, hepes, plasminógeno, bromuro de etidio, tripsina.
- **WINKLER Ltda:** NaCl, Na₂HPO₄, Glicerol, Tween 20, Caseína, Agarosa, agua libre de RNasa, Cloroformo, TBE.

4.3. Instrumentos y Equipos.

Los instrumentos utilizados corresponden a: Campana de bioseguridad (Forma Scientific modelo 1129), Incubador CO₂ automático (Lab-Line), Cámaras de transferencia (Bio-Rad), Centrífuga Biofuge prime R (Heraeus), Microscopio de fluorescencia labophot-2 (Nikon), Microscopio invertido de contraste de fase modelo TMS-F (Nikon), lector de ELISA modelo Elix-806 y Termociclador modelo TC-312 (TECHNE).

5. MÉTODOS.

5.1. Cultivo Celular.

Las células PDV fueron cultivadas en un ambiente húmedo a una temperatura de 37°C y una concentración de 5% CO₂. El medio de cultivo usado fue DMEM/F-12 (1:1) suplementado con 5% de SFB y 2 mg/L de gentamicina, el cual fue cambiado cada 2-3 días. Para reemplazar el medio de cultivo, las células fueron lavadas con PBS 1X (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, ajustar pH 7.2, KH₂PO₄ 1,8 mM); para luego ser incubadas en Tripsina-EDTA a 37°C, hasta que las células se soltaron. Para detener la reacción, se adicionó medio de cultivo y la suspensión celular fue centrifugada a 1.800 rpm durante 5 minutos. El precipitado celular fue resuspendido en medio de cultivo fresco y sembrado nuevamente en placas para la continuación del cultivo, o resuspendido en 90% SFB y 10% DMSO para su criopreservación en alícuotas de aproximadamente 3X10⁶ células utilizando criotubos de 1,8 ml.

5.2. Western Blot.

5.2.1. Extracción de Proteínas.

Las células fueron crecidas en placas de 60 ó 100 mm de diámetro. Una vez que el cultivo alcanzó confluencia el medio fue eliminado de las placas, y las células fueron lavadas con PBS 1X. Luego se agregó tampón de lisis EGFR (Hepes 50 mM, NaCl 150 mM, EGTA 1 mM, Glicerol 10%, Tritón X-100 1% y MgCl₂ 2 mM) con

inhibidores de proteasas (NaF 5 mM, NEM 2 mM, PMSF 0.15 mg/ml, Ortovanadato 2 mg/ml, Leupeptina 5 µg/ml) y se dejó a 4°C por 10 min. Transcurrido este tiempo, las células fueron lisadas mecánicamente utilizando un rascador de goma (del inglés "rubber policeman"), para obtener un homogeneizado que luego fue centrifugado a 14.000 rpm por 10 minutos a 4°C. El sobrenadante fue recuperado y se tomó una alícuota de 5 µl para la cuantificación de proteínas, al resto se le agregó tampón de muestra 1X con β-mercaptoetanol 5% y fue calentado a 60°C en baño María por 5 minutos. El homogeneizado obtenido fue utilizado inmediatamente o almacenado a -20°C hasta su utilización.

5.2.2. Electroforesis en geles de Poli(acrilamida)-SDS.

Para la electroforesis 20-30 µg de las muestras fueron cargadas por carril en geles de poli(acrilamida)-SDS 10%. Se utilizó una cámara vertical de electroforesis para geles de 11 x 8,5 x 0.15 cm. Los geles se corrieron a voltajes constantes de 80 V para el gel concentrador y 120 V para el gel separador hasta observar la caída del frente de azul de bromofenol.

5.2.3. Transferencia y revelado.

Luego de la electroforesis, se realizó una electrotransferencia en cámara de inmersión completa a 15 V durante toda la noche a 4°C. Se utilizaron membranas de PVDF, las cuales fueron previamente activadas por 30 segundos en metanol puro.

Finalizada la transferencia las membranas se bloquearon con leche descremada al 10% o BSA al 3% en TBS-Tween, durante 1 hr con agitación y a temperatura ambiente. Luego fueron lavadas con TBS-Tween (0,05%) por 5 min., y posteriormente incubadas durante 1 hr con los anticuerpos primarios: anti-p-ERK (1/1000), anti-ERK (1/1000), anti-p-Tyr (1/2000), anti-EGFR (1/1000), anti-p-Smad 2,3 (1/1000), en una solución de leche al 5% o BSA al 3% en TBS-Tween. Al finalizar la incubación, las membranas fueron lavadas nuevamente con TBS-Tween e incubadas por 30 minutos o 1 hr a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario: peroxidasa anti-ratón (1/5000), peroxidasa anti-conejo (1/10000) o peroxidasa anti-cabra (1/5000), en TBS-Tween. Finalmente se realizaron 3 lavados de 10 minutos cada uno con TBS-Tween. Finalmente el revelado de las proteínas se realizó por quimioluminiscencia utilizando un kit de revelado.

El lavado (*stripping*) de las membrana, para la reincubación con nuevos anticuerpos, se realizó con un lavado en agua destilada por 5 min., para la posterior incubación con una solución de *stripping* (10% SDS, Tris-base 0,5 M, 0,7% β -mercaptoetanol en agua destilada) por 30 min. a 60°C, o en NaOH 0,2 N por 10 min. a temperatura ambiente. Finalmente la membrana fue lavada con agua destilada 2 veces por 10 minutos y una vez con TBS-Tween por 10 minutos, antes de ser incubada con los anticuerpos correspondientes, como se describió anteriormente.

5.3. Cuantificación de Proteínas.

La cuantificación de proteínas se realizó por el método Bradford, para el cual se tomaron 5 μ l de lisado por punto a cuantificar. Se realizó una curva estándar con concentraciones conocidas de BSA (0,1-3 μ g/ μ l) en buffer de lisis de EGFR. La cuantificación se realizó en un lector de ELISA a 630 nm.

5.4. Inmunoprecipitación del receptor de EGF.

Para la inmunoprecipitación de EGFR se utilizaron 30 μ l de una solución de proteína-A por cada placa. Se preparó en forma previa el complejo proteína A-anticuerpo como se describe a continuación: La proteína-A se lavó con 1 ml de tampón de lisis EGFR y luego se resuspendió nuevamente en 1 ml de tampón de lisis EGFR más 10 μ l de anti-EGFR en rotación a 4°C por toda la noche. Al día siguiente fue centrifugado, lavado con tampón de lisis EGFR y resuspendido en 100 μ l de tampón de lisis EGFR por placa a homogeneizar.

Las células PDV crecidas a confluencia en placas de cultivo de 100 mm, se incubaron en 4 ml de medio sin suero (durante 24 hr) antes de ser estimuladas con TGF- β 1 (10 ng/ml) por 5 y 10 minutos, o EGF (100 ng/ml) por 5 minutos. Luego el medio fue eliminado y las células fueron lisadas en hielo, como se describió anteriormente. Los lisados fueron incubados con 100 μ l del complejo proteína A-anti-EGFR, en rotación a 4°C por toda la noche. Al día siguiente la mezcla se sometió a centrifugación y se lavó 3 veces con tampón de lisis EGFR. Finalmente el precipitado

fue resuspendido en 60 μ l de tampón de lisis EGFR y 20 μ l de tampón de muestra con β -mercaptoetanol al 5%, se incubaron a 60°C por 10 minutos para luego ser separados por electroforesis, como se indicó anteriormente.

5.5. Zimografía.

Para detectar actividad de uroquinasa (uPA) las células PDV fueron cultivadas en placas de 40 mm de diámetro a confluencia en medio sin suero, durante 24 hr en presencia de estímulos (TGF- β 1, EGF) y/o inhibidores (AG1478, SB431542). Al cabo de este tiempo, el medio de cultivo (medios condicionados) fue removido y centrifugado a 12.000 rpm por 10 minutos a 4°C. Posteriormente a los medios condicionados se le agregó tampón de muestra sin β -mercaptoetanol y 40 μ l de estos medios fueron corridos, a 80 V, en un gel de poliacrilamida-SDS al 10% a 4°C. Una vez terminada la electroforesis el gel fue lavado con Tritón X-100 al 2,5% 2 veces por 30 min. cada vez, con el fin de eliminar el SDS y renaturar las proteínas. Finalmente, el gel de poliacrilamida fue puesto sobre un gel de revelado (1% agarosa, Tris 50 mM pH 8,0, caseína 0,5%, plasminógeno 1 μ g/ μ l, CaCl₂ 40 mM) e incubado a 37°C durante 24 hr hasta observar halos de degradación. Para detener la reacción se usó 2 ml de CuSO₄ al 3%.

5.6. Ensayo de Migración.

Para estudiar la migración celular se realizaron ensayos de "cierre de herida" en monocapas celulares. En estos ensayos las células fueron crecidas a confluencia en

placas de 24 o 48 pozos, luego se procedió a hacer una "herida" con la punta de una pipeta estéril de 200 µl. Las células fueron lavadas con PBS 1X para eliminar aquellas que se hayan soltado y se dejaron en medio DMEM/F-12 5% SFB. Las células fueron luego estimuladas con TGF-β1 o EGF, y/o los inhibidores con AG1478 o SB431542, durante 24 hrs. Al cabo de este tiempo el medio fue eliminado, las células fueron teñidas y fijadas con cristal violeta-etanol (0,1%) durante 10 minutos, lavadas con PBS 1X y fotografiadas. Luego se cuantificó el número de células que migra al espacio vacío dejado por el paso de la punta de la pipeta estéril.

5.7. Inmunofluorescencia.

Las células fueron sembradas en cubreobjetos de 12 mm., y luego estimuladas durante 48 hr con los factores de crecimiento e inhibidores mencionados anteriormente. Transcurrido dicho tiempo, las células fueron lavadas con PBS 1X, fijadas por 10 min. con paraformaldehído 4% y lavadas nuevamente con PBS 1X. Los sitios inespecíficos se saturaron con BSA al 4% en PBS 1X por 1 hr y luego las células fueron incubadas con anti -Cadherina E (1/50) por 1hr, lavadas con PBS 1X por 10 minutos e incubadas con anti-ratón FITC (1/200) por 1 hr, todos diluidos en BSA al 4%-PBS. Para teñir el citoesqueleto de actina, las células fueron permeabilizadas con Tritón X-100 al 0,025% por 2 min. y luego incubadas con Faloidina Alexa Fluor®594 (1/200) por 20 min. Finalmente los cubreobjetos fueron lavados 2 veces con PBS 1X, y una vez con agua destilada por 10 min., montados en portaobjetos y observados en microscopio de inmunofluorescencia.

5.8. RT-PCR.

5.8.1. Extracción de RNA.

La extracción de RNA se realizó con el Reactivo Trizol. Las células PDV sembradas en placas de 40 mm de diámetro fueron lisadas con 1 ml de Trizol y transferidas a tubos Eppendorf de 1,5 ml. El homogeneizado fue incubado por 5 min. a temperatura ambiente, se agregó 0,2 ml de cloroformo y se agitó vigorosamente por 15 segundos, incubando nuevamente por 2-3 min. a temperatura ambiente. Las muestras se centrifugaron a 12.000 g por 15 min. a 4°C. La fase acuosa que contiene el RNA se transfirió a otro tubo, se mezcló con 0,5 ml de iso-propanol y se incubó por 10 min. a temperatura ambiente, para luego centrifugar a 12.000 g por 10 min. a 4°C. Finalmente el sobrenadante se removió y el precipitado de RNA fue lavado una vez con 1 ml de etanol al 75%, agitado en vortex y centrifugado a 7.500 g por 5 min. a 4°C. El RNA fue brevemente secado y disuelto en 25 µl de agua libre de RNasa.

5.8.2. Síntesis de cDNA.

Para la síntesis de cDNA se utilizó el Kit ThermoScript™ RT-PCR. En un tubo Eppendorf de 0,2 ml se mezclaron: 1 µl de Oligo dT, 2 µg de RNA, 2 µl de dNTP Mix 10 mM y se lleva a 12 µl con agua tratada con DEPC. El RNA y partidores son desnaturados a 65°C por 5 min. y puesto en hielo.

Se preparó la solución master mix en hielo. Para 1 reacción se mezclaron: 4 μ l buffer de síntesis cDNA 5X, 1 μ l de DTT 0.1 M, 1 μ l de RNasaOUT™ (40 U/ μ l) y 1 μ l de ThermoScript™ RT (15 U/ μ l). Se agregaron 8 μ l de esta solución a cada tubo con RNA y se llevaron al termociclador para la síntesis de cDNA (30-60 min. a 55°C; 5 min. a 85°C).

5.8.3. PCR.

En tubos de PCR de 0,2 ml se mezclaron: 300 ng de cDNA, 2,5 μ l de buffer PCR 10X, 0,5 μ l de dNTP 10 mM, 0,75 μ l de MgCl₂, 0.5 μ l de Taq 5 U/ μ l, 0,5 μ l de cada partidor 10 pmol/ μ l y agua libre de nucleasa hasta completar 25 μ l.

6. RESULTADOS

6.1. TGF- β 1 induce la activación de la vía ERK-MAPK.

TGF- β 1 es expresado abundantemente en tumores de origen epitelial en los que estimula la capacidad invasiva celular (Rossmanith y Schulte-Hermann, 2001), particularmente, en células que tienen alterada su respuesta a TGF- β 1; ya sea, por actividad anormal de Ras o mutaciones inactivantes de los receptores de TGF- β 1 (Buchmann y col., 1991; Quintanilla y col., 1986). Con el propósito de evaluar la capacidad de TGF- β 1 de activar rutas de señalización alternativas a su ruta canónica (Smad 2,3), a las que se les ha atribuido funciones en la invasividad celular (Santibáñez y col., 2000), se analizó la capacidad de TGF- β 1 de activar la vía de ERK-MAPK en queratinocitos transformados de ratón (PDV).

Del resultado de la Figura 3 se puede deducir que TGF- β 1 estimula la fosforilación transiente de las proteínas ERK 1,2 que llega a su punto máximo a los 10 min. y luego decae hasta alcanzar niveles cercanos al basal.

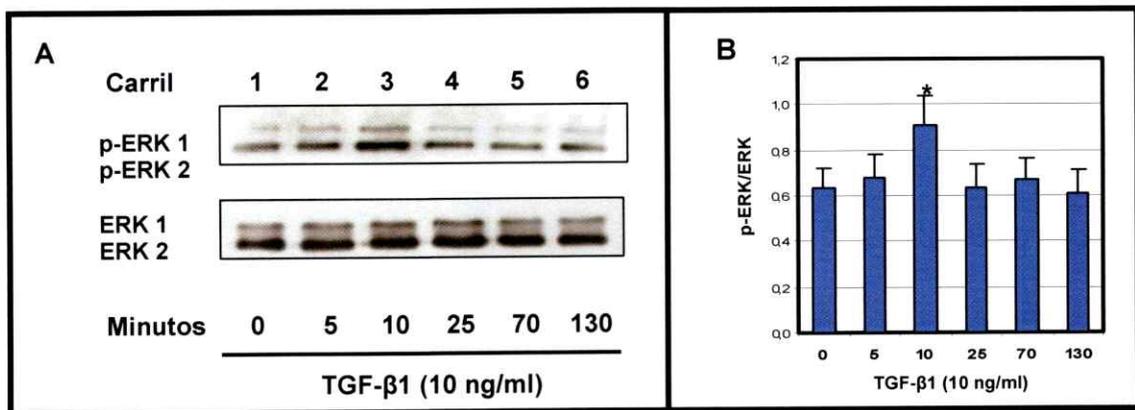


Figura 3. Efecto de TGF-β1 sobre la fosforilación de ERK 1,2 en células PDV. Las células PDV fueron tratadas con TGF-β1 en ausencia de suero fetal bovino, durante los tiempos indicados. (A) La fila superior muestra un western blot para las formas fosforiladas de ERK 1 (43 kDa) y ERK 2 (41 kDa), mientras que la fila inferior muestra un western blot para ERK 1,2 total, como control de carga. (B) Los valores de p-ERK 2 fueron normalizados por ERK 2. El gráfico representa el valor promedio de 3 experimentos \pm desviación estándar. El * indica una diferencia significativa respecto al control con $p < 0,05$.

6.2. La adición de TGF-β1 provoca la transactivación de EGFR en queratinocitos transformados de ratón.

Estudios previos de nuestro laboratorio han demostrado que la activación de EGFR constituye una etapa importante en el proceso de señalización que determina el grado de malignidad en células epiteliales de origen mamario (Guerrero y col., 2004). Considerando que se ha descrito que EGFR puede ser activado por mecanismos alternativos a la unión de su ligando EGF, en un fenómeno conocido como

transactivación (Fischer y col., 2003; Prenzel y col., 1999), y tomando en consideración el resultado mostrado en la figura 3, se analizó la posibilidad de que la activación de la vía de señalización ERK-MAPK por TGF- β 1, sea el reflejo de un fenómeno de transactivación de EGFR por TGF- β 1. Para ello, se incubó células PDV en presencia de TGF- β 1 y se analizó por inmunoprecipitación el nivel de fosforilación en tirosina de EGFR, utilizando EGF (el ligando natural de EGFR) como control positivo.

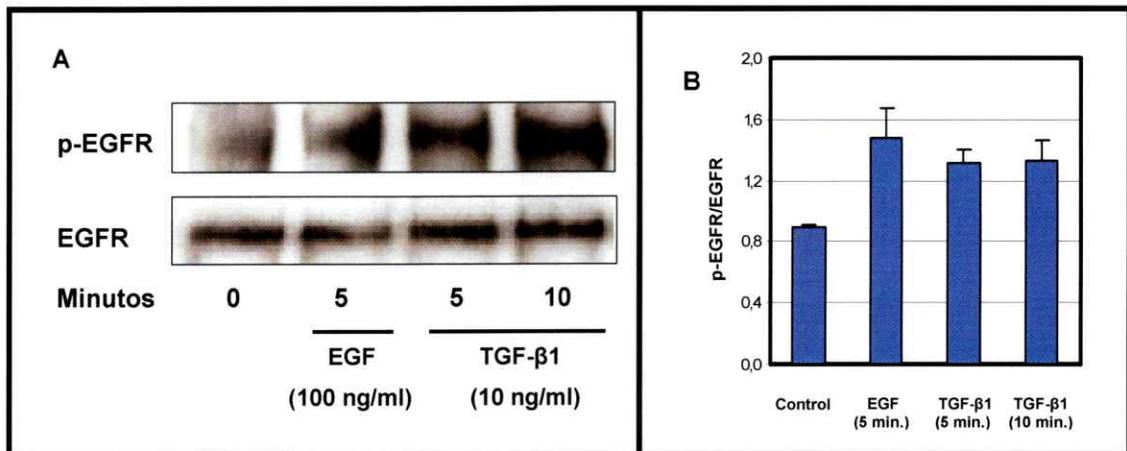


Figura 4. Transactivación del receptor de EGF inducida por TGF- β 1. Las células PDV fueron tratadas con los factores de crecimiento TGF- β 1 y EGF, en ausencia de suero fetal bovino, durante 5 y 10 min. Transcurridos los tiempos indicados las células fueron lisadas y se realizó una inmunoprecipitación para EGFR (135 kDa). (A) La fila superior muestra un western blot contra la forma fosforilada de EGFR y la inferior muestra un western blot para EGFR total. (B) Los valores de p-EGFR fueron normalizados por EGFR. El gráfico representa el valor promedio de 3 experimentos \pm desviación estándar. Todos lo estímulos mostraron una diferencia significativa respecto al control con $p < 0,05$.

Como se observa en la figura 4, células PDV estimuladas con TGF- β 1 o EGF provocan niveles similares de fosforilación en tirosina (equivalente a la activación) de EGFR, lo que indica que, efectivamente, TGF- β 1 podría activar EGFR como parte de una ruta de señalización intracelular.

6.3. TGF- β 1 activa la ruta ERK/MAPK a través de un mecanismo dependiente de la activación de EGFR.

Una vez establecido que TGF- β 1 puede provocar tanto la fosforilación de EGFR como la fosforilación de ERK 1,2, se investigó la participación de la actividad autocatalítica de EGFR en esta señal intracelular, debido a que la autofosforilación de EGFR es, en gran medida, responsable de la activación de la ruta ERK 1,2. Para establecer la participación de EGFR en la activación de rutas corriente abajo de TGF- β 1, se analizó la activación de ERK 1,2 en células PDV estimuladas con TGF- β 1 y EGF incubadas en presencia de AG1478, inhibidor específico de la activación de EGFR inducida por ligando. Para identificar la participación de la actividad T β RI (receptor de membrana de TGF- β 1 tipo I) en los procesos de fosforilación mencionados anteriormente se utilizó el inhibidor de la actividad quinasa de T β RI, SB431542 (Inman y col., 2002). Además, se analizó la activación de la vía canónica de TGF- β 1 (Smad 2,3) para comprobar su autonomía respecto de la activación de EGFR y la posible participación de T β RI fosforilado en la activación de la ruta ERK 1,2.

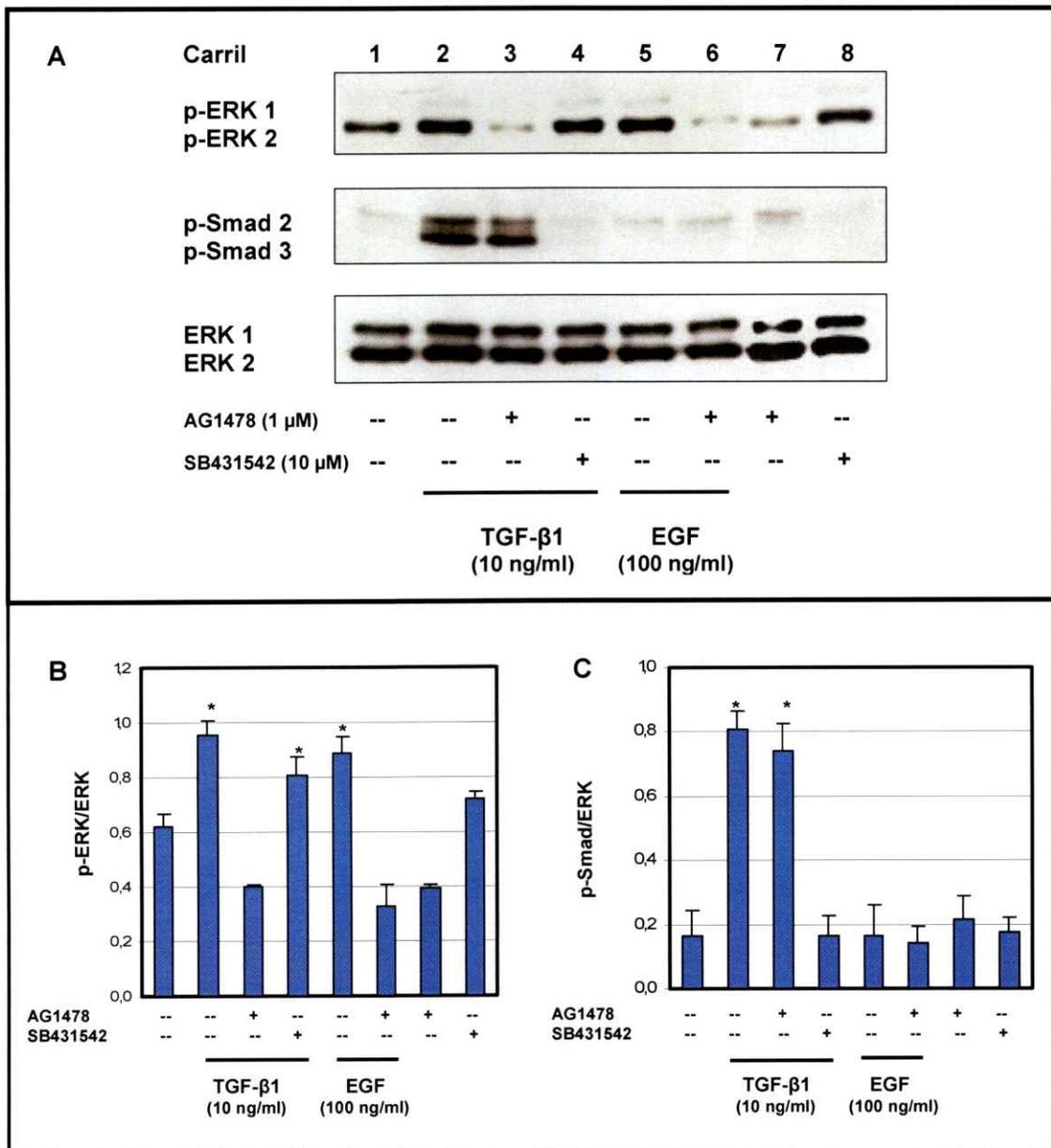


Figura 5. EL receptor de EGF media la activación de la vía de ERK-MAPK por TGF-β1. Western blot de las formas fosforiladas de ERK 1 (43 kDa), ERK 2 (41 kDa), Smad 2 (52 kDa) y Smad 3 (48 kDa). En la fila inferior se muestra un western blot para ERK 1,2 total como control de carga. (A) Las células PDV (cultivadas en ausencia de SFB) fueron tratadas con TGF-β1 por 10 min. (Carriles 2, 3 y 4) y con EGF por 5 min. (Carriles 5 y 6) en presencia (+) o ausencia (-) de: AG1478, inhibidor de EGFR o de SB431542, inhibidor de TβRI, los cuales fueron agregados 30 min. antes de los factores de crecimiento. (B) y (C) Los valores de p-ERK 2 y p-Smad 2 fueron normalizados por ERK 2. Los gráficos representan el valor promedio de 3 experimentos \pm desviación estándar. Los * indican una diferencia significativa respecto al control con $p < 0,05$.

En la figura 5 se observa que - anteriormente mostrado en la figura 3 -, tanto TGF- β 1 como EGF fueron capaces de provocar niveles similares de fosforilación de ERK 1,2 (carriles 2 y 5). Dicha fosforilación fue bloqueada sólo en presencia de AG1478 (carriles 3, 6 y 7), lo que sugiere fuertemente que la participación de EGFR, en la activación de esa ruta, es necesaria. La señalización vía Smad 2,3, opera con total autonomía respecto de la ruta ERK 1,2, dado que la activación de Smad 2,3, mediada por TGF- β 1 (carriles 2 y 3), sólo es inhibida por SB431542 (carril 4) lo que refuerza el concepto de activación autónoma de esta vía respecto de EGFR. Del mismo modo, resulta relevante destacar que la inhibición de la capacidad fosforilante de T β RI por su inhibidor SB431542, no tiene efectos manifiestos en la activación de ERK 1,2 estimulada por TGF- β 1 (Carril 4).

6.4. En células PDV el estímulo migratorio mediado por TGF- β 1 es mediado por EGFR.

Datos previos de nuestro laboratorio y de otros grupos de investigación, han demostrado la importancia de la activación de EGFR en la migración celular (Guerrero y col., 2004; Yarden y Sliwkowski, 2001). Debido a que TGF- β 1 estimula la migración celular (Santibáñez, 2006), y dada la importancia de EGFR en la señalización mediada por TGF- β 1 (Figuras 4 y 5), buscamos analizar si el estímulo migratorio de TGF- β 1, evaluado por experimentos de "cierre de herida", depende de una señalización que

involucre la activación de EGFR. Para ello, se evaluó el efecto de TGF- β 1 y EGF, ligando natural de EGFR, sobre la migración celular utilizando además los inhibidores AG1478 y SB431542.

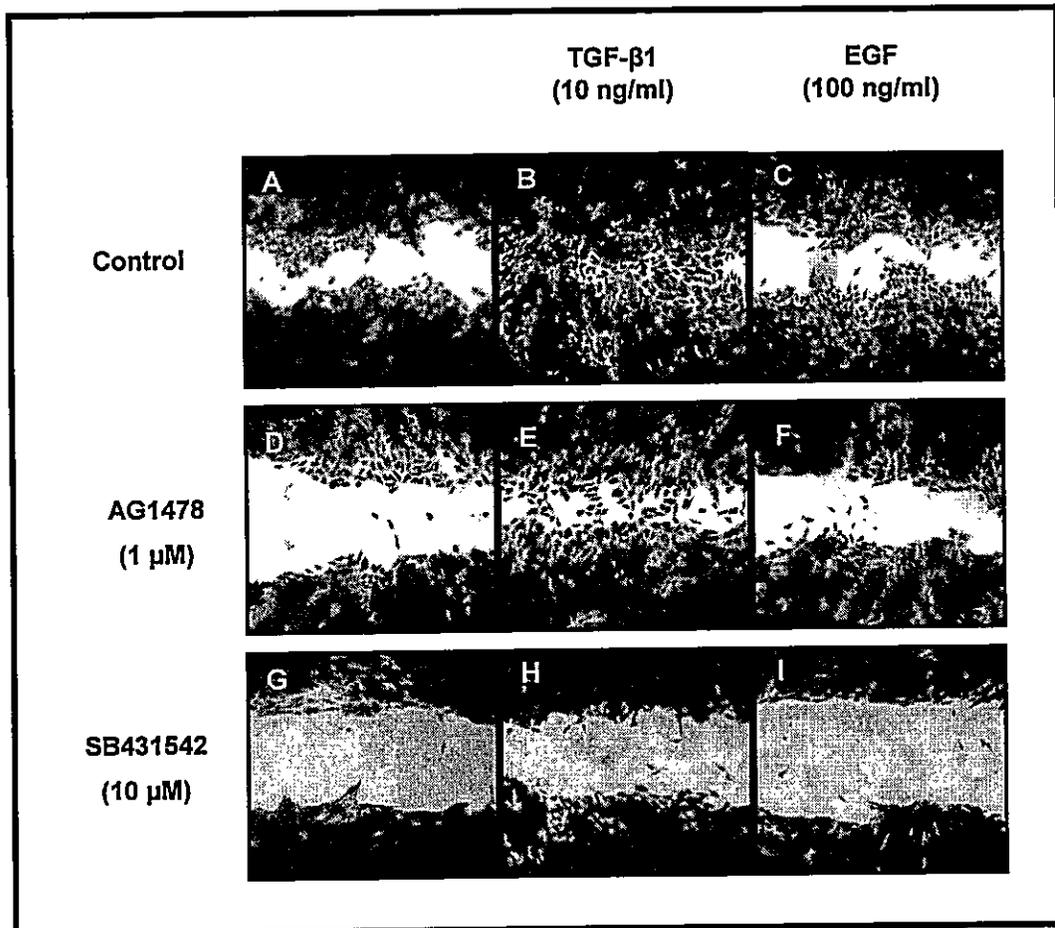


Figura 6. El estímulo de la migración celular por TGF- β 1 involucra la actividad del receptor de EGF. Se realizó un ensayo de "cierre de herida" en cultivos confluentes de células PDV. El área libre de células (herida) fue examinada luego de 30 hr. de cultivo con los estímulos TGF- β 1 o EGF, en presencia o ausencia de los inhibidores de EGFR (AG1478) y de T β RI (SB431542).

Los resultados mostrados en la figura 6 sugieren lo siguiente:

- (i) De la primera fila vertical de microfotografías (A, D y G), se puede deducir que la capacidad migratoria basal de las células PDV está influida por la actividad de EGFR y T β RI pues los inhibidores específicos de ambos receptores bloquean parcialmente la migración basal de estas células.

- (ii) Al comparar las microfotografías de la primera fila horizontal (A, B y C), podemos decir que TGF- β 1 y EGF muestran una capacidad estimuladora de la migración celular de muy diferente magnitud, lo que se observa en el cierre casi total de la herida, en el caso de TGF- β 1, y el estímulo casi imperceptible observado con EGF.

- (iii) El estímulo migratorio de TGF- β 1 (microfotografía B) es inhibido predominantemente por SB431542, un inhibidor específico la actividad quinasa de T β RI (microfotografía H). No obstante y en forma persistente observamos algún nivel de inhibición con AG1478 (microfotografía E) lo que sugiere que, corriente abajo de la activación de ERK 1,2, se activan procesos que sólo parcialmente afectan la migración. Lo anterior puede confirmarse analizando el mínimo efecto

de EGF (que sólo activa ERK 1,2) sobre la migración celular (microfotografía C).

- (iv) Finalmente, al no identificarse un estímulo de EGF sobre la migración celular, se puede atribuir el efecto de los inhibidores al estímulo generado a nivel basal.

6.5. La producción de uPA es estimulada por TGF- β 1 es parcialmente mediado por EGFR y depende de la actividad de T β RI.

La invasividad celular característica del proceso metastásico, depende en gran medida de la capacidad de la célula tumoral de producir una maquinaria enzimática degradativa que facilite el proceso migratorio (Friedl y Wolf, 2003; Murphy y Gavrilovic, 1999). El activador de plasminógeno tipo uroquinasa (uPA), y la generación de plasmina, han sido identificados como uno de los elementos centrales en este proceso degradativo asociado a la malignidad celular (Murphy y Gavrilovic, 1999). Estudios previos de nuestro laboratorio han demostrado que, en células PDV, TGF- β 1 es capaz de potenciar tanto la capacidad invasiva como la producción de uPA (Santibáñez y col., 1999; Santibáñez, 2006) en un fenómeno que requiere la activación de la vía ERK-MAPK (Santibáñez y col., 2000). Con el propósito de estudiar la participación de EGFR

en el estímulo de la producción de uPA, se investigó si EGF y TGF- β 1, factores de crecimiento que activaron tanto al receptor de EGF como la ruta ERK-MAPK, también estimulaban la producción de uPA.

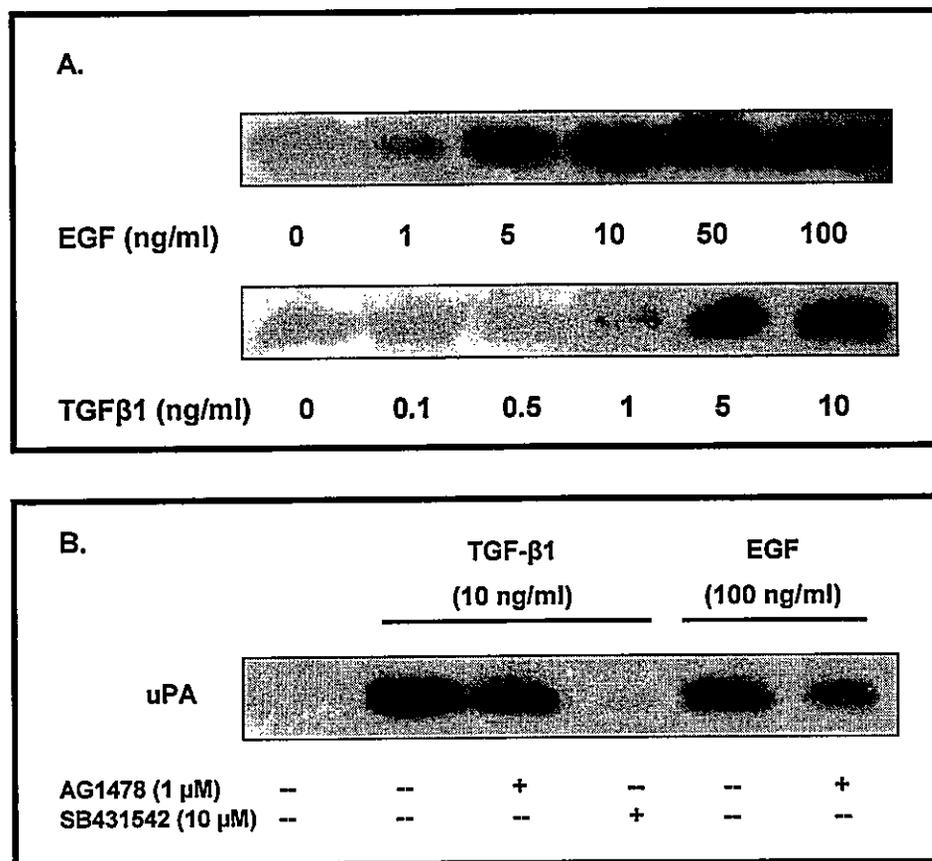


Figura 7. La actividad de los receptores de EGF y TGF- β 1 determina la capacidad estimuladora de TGF- β 1 sobre la producción de uPA. (A) Análisis zimográfico de uPA secretada al medio de cultivo por células PDV estimuladas (durante 24 hr) con concentraciones crecientes de TGF- β 1 y EGF, en ausencia de suero fetal bovino. (B) Efecto de los inhibidores de EGFR (AG1478) y de T β RI (SB431542) sobre la producción de uPA soluble mediada por los factores de crecimiento TGF- β 1 y EGF. Los signos + y - indican presencia o ausencia de los inhibidores.

Los resultados de la figura 7 mostraron que:

- (i) Tanto TGF- β 1 como EGF, aunque a concentraciones muy distintas, estimularon la producción de uPA soluble (Figura 7A).

- (ii) La inhibición de la activación de EGFR por su inhibidor AG1478, (Figura 7B) ejerció un efecto parcial en la producción de uPA estimulada por ambos factores. Tomando en consideración que, en estas condiciones experimentales, la ruta ERK 1,2 se encontraba totalmente bloqueada (Figura 5), se puede deducir que la producción de uPA dependiente de TGF- β 1, depende también de la activación de alguna otra vía de señalización independiente de EGFR.

- (iii) En concordancia con lo anterior, es posible deducir que la actividad de T β RI parece jugar un papel central en la producción de uPA, lo que podría atribuir a la activación de la ruta de señalización Smad 2,3 un papel fundamental en el estímulo de la producción de uPA.

6.6. TGF- β 1 induce la pérdida de adhesión célula-célula y la reorganización del citoesqueleto de actina.

6.6.1. Estímulo de TGF- β 1 sobre la pérdida de adhesión célula-célula.

Los mecanismos de adhesión celular juegan un papel vital en la mantención de la arquitectura y funcionalidad de órganos y tejidos (Gumbiner, 2000; Savagner, 2001; Thiery, 2002). Durante la progresión tumoral ocurren alteraciones en los contactos intercelulares, lo que es particularmente evidente en los tumores epiteliales (Hugo y col., 2007; Woodhouse y col., 1997). En este caso, las células tumorales pierden capacidad de interacción con sus vecinas mediante un mecanismo que incluye la inhibición de proteínas de adhesión celular. En el caso de las células epiteliales, se ha identificado a Cadherina E como una proteína de adhesión célula-célula que juega un papel determinante en la capacidad de movilización celular.

La disminución de la expresión de Cadherina E se relaciona con el nivel de malignidad celular (Navarro y col., 1991). Estudios previos han demostrado que TGF- β 1 induce la disminución de la expresión de Cadherina E (Caulín y col., 1995; Peinado y col., 2003; Santibáñez, 2006). Dado que se ha observado que en células tumorales TGF- β 1 afecta de modo importante la motilidad celular (Figura 4) y que EGFR participa en este fenómeno, se decidió estudiar el efecto de TGF- β 1 sobre la estabilidad de los contactos intercelulares mediados por Cadherina E, mediante experimentos de

inmunofluorescencia para esta proteína, en células estimuladas con TGF- β 1 o EGF, en presencia o ausencia de los inhibidores de sus receptores: SB431542 y AG1478, respectivamente.

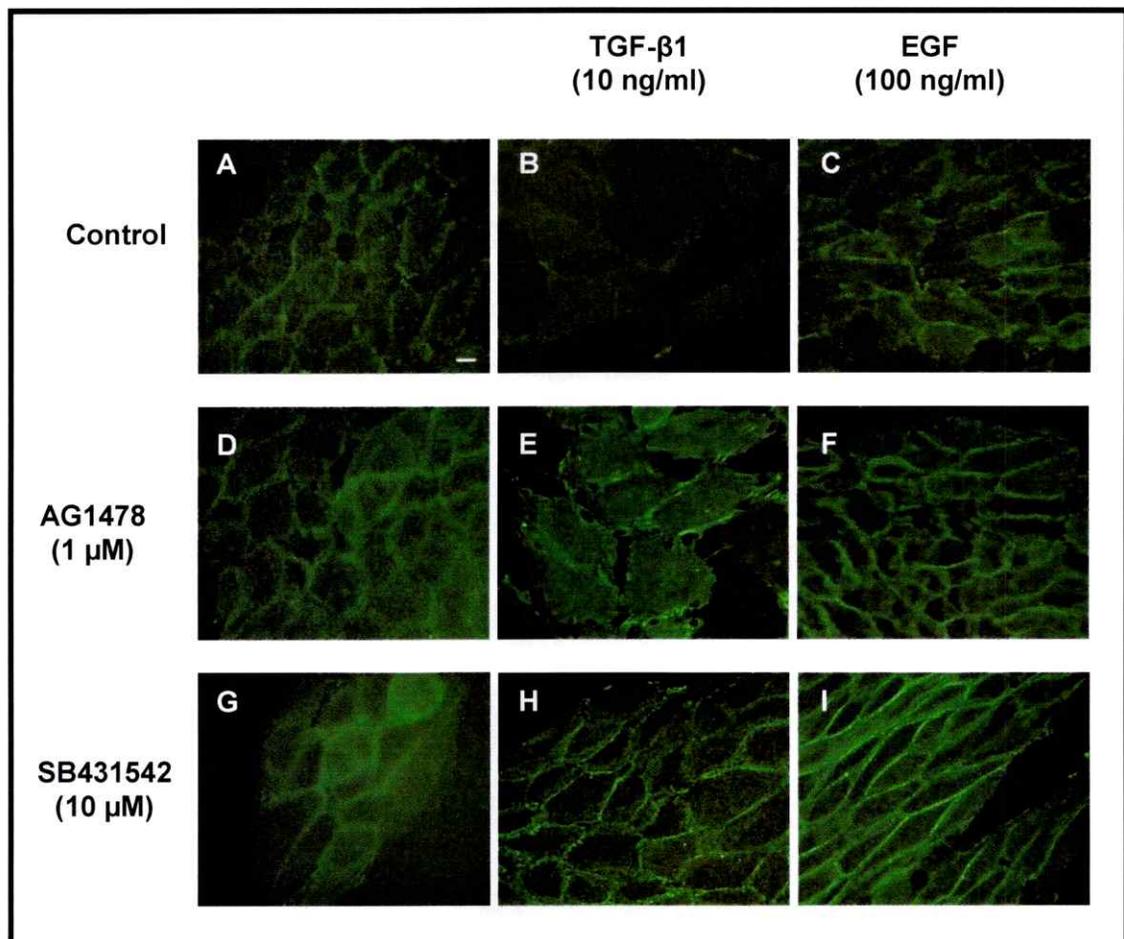


Figura 8. TGF- β 1 estimula la pérdida de adhesión célula-célula mediada por Cadherina E. Células PDV sembradas sobre cubreobjetos fueron inmunomarcadas para Cadherina E. Las células fueron estimuladas con TGF- β 1 o EGF durante 48 hr en presencia o ausencia de los inhibidores de EGFR (AG1478) y T β RI (SB431542), los cuales se agregaron 30 minutos antes de la incubación con los factores de crecimiento. En la figura se observa que TGF- β 1 provocó la disminución Cadherina E en los contactos célula-célula (microfotografía B). La barra representa 15 μ m.

En la figura 8 se observa que el efecto más drástico sobre la localización de Cadherina E lo produce TGF- β 1, que provocó la ruptura de los contactos intercelulares (microfotografía B), mientras que el tratamiento de las células con EGF no provocó el mismo efecto (microfotografía C). La adición de los inhibidores de T β RI y EGFR impidieron, en distinto grado, la disociación de los contactos intercelulares mediada por TGF- β 1, siendo mucho más evidente el efecto de SB431542 (microfotografía E y H). Estos resultados ponen de manifiesto la importancia de T β RI en la adhesión intercelular, lo que se aprecia en el papel de su inhibidor específico cuya actividad no altera las uniones intercelulares. Estos datos coinciden con los resultados obtenidos en el estímulo de TGF- β 1 sobre la producción de uPA.

6.6.2. Estímulo de TGF- β 1 sobre la reorganización del citoesqueleto de actina.

Como se observó en los resultados de la figura 5, TGF- β 1 constituye un importante estímulo de la motilidad celular. Una célula epitelial tumoral en movimiento reorganiza su citoesqueleto de actina de modo de favorecer el desplazamiento a través de la matriz extracelular. En algunos de estos casos, el citoesqueleto de actina se organiza formando fibras de estrés que favorecen la movilidad celular (Friedl y Wolf, 2003). Con el propósito de estudiar si TGF- β 1 ejerce un rol en la reorganización del citoesqueleto de actina promoviendo la motilidad celular, se realizaron observaciones por marcación fluorescente de actina en células PDV estimuladas con TGF- β 1 o EGF,

en presencia o ausencia de los inhibidores específicos de EGFR y T β RI (AG1478 y SB431542, respectivamente).

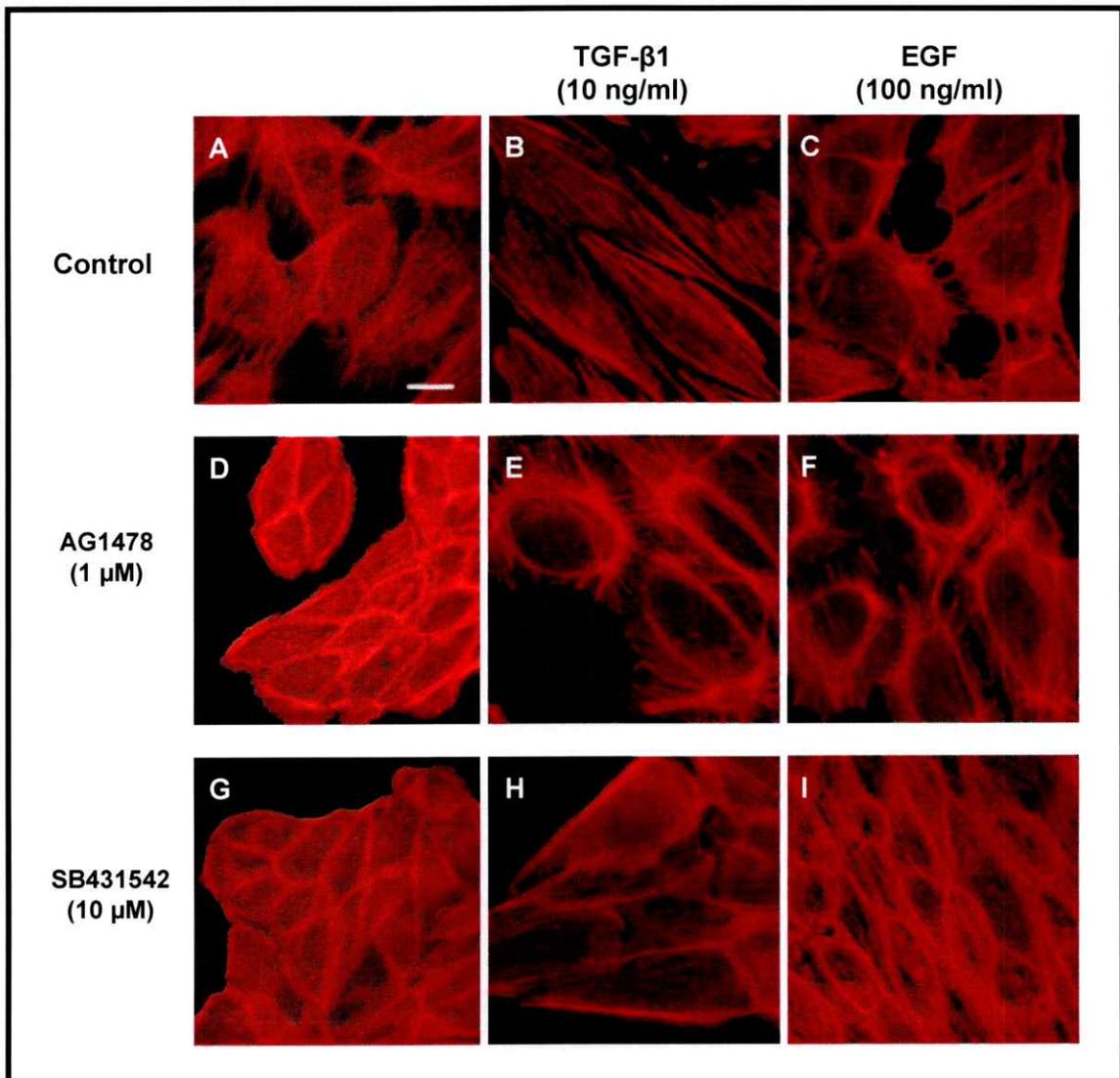


Figura 9. Efecto de TGF- β 1 sobre la reorganización del citoesqueleto de actina. Marcaje fluorescente del citoesqueleto de actina en células PDV permeabilizadas, estimuladas con TGF- β 1 o EGF durante 48 hr, en presencia o ausencia de los inhibidores de los receptores de EGF (AG1478) y TGF- β 1 (SB431542) los cuales se agregaron 30 min. antes de la incubación con los factores de crecimiento. En la figura se observa que TGF- β 1 estimula la formación de fibras de estrés (microfotografía B). Barra = 15 μ m.

Como se observa en la figura 9, el tratamiento con TGF- β 1 (microfotografía B) cambió notoriamente la distribución de actina polimérica estimulando la formación de fibras de estrés, propias de un fenotipo más móvil (Kaibuchi y col., 1999; Santibañez, 2006) y reminiscentes del inicio de una transición epitelio-mesénquima (Miettinen y col., 1994; Hugo, 2007; Piek y col., 1999). Del mismo modo, las células adquirieron una morfología más alargada, similar al fenotipo fibroblastoide. La incubación con EGF no provocó cambios significativos en el citoesqueleto de actina (microfotografía C). La adición de AG1478 así como SB431542 en las células estimuladas con TGF- β 1 (microfotografías E y H respectivamente), impidió tanto la elongación de las células como la aparición de fibras de estrés lo que permite sugerir la importancia ambos receptores en la adquisición de un fenotipo móvil estimulado por TGF- β 1. Estos datos concuerdan tanto con los datos obtenidos con Cadherina E y los obtenidos para la migración.

6.7. TGF- β 1 estimula la transcripción de uPA, PAI-1 y vimentina.

La malignización celular en epitelios implica la puesta en marcha de un proceso conocido como transición epitelio-mesénquima, que incluye la regulación negativa de marcadores epiteliales como Cadherina E y la expresión de proteínas características del fenotipo fibroblastoide, como Vimentina (Thiery, 2002).

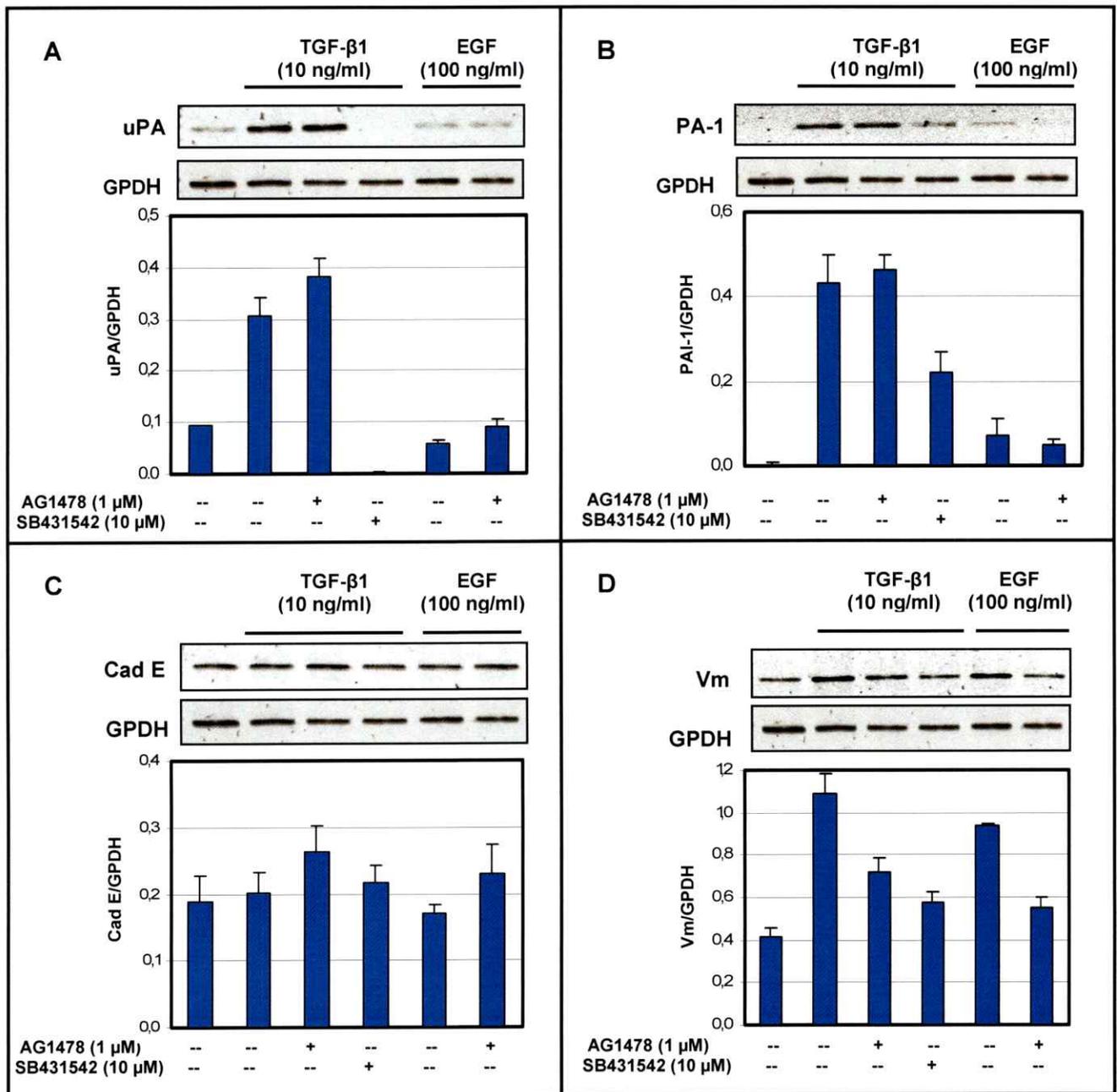


Figura 10. EGFR media el aumento de la expresión de uPA, Vimentina y PAI-1 estimulada por TGF-β1 en células PDV. Las células PDV fueron estimuladas con TGF-β1 o EGF en presencia (+) o ausencia (-) de los inhibidores de EGFR (AG1478) y TβRI (SB431542). Luego de 24 hr se extrajo el RNA y se realizó un RT-PCR de los transcritos de: (A) uPA; (B) PAI-1; (C) Cadherina E (Cad E); y (D) Vimentina (Vm) utilizando como control GPDH. Los valores fueron normalizados por GPDH y el promedio de 2 experimentos ± desviación estándar fue graficado.

El sistema activador de plasminógeno - que incluye a uPA, su receptor uPAR y PAI-1 (inhibidor del activador de plasminógeno) - juega un rol importante en proteólisis, migración e invasión celular (Andreasen y col., 2000). Por otro lado, es sabido que TGF- β 1 induce la expresión de PAI-1 (Dennler y col., 1998; Itoh y col., 2003; Massagué y Gomis, 2006). Con el propósito de dilucidar si los cambios observados en los experimentos anteriores eran atribuibles a un cambio en la expresión génica, se analizó los niveles de mRNA de algunas proteínas que presumiblemente responden al estímulo de los factores estudiados.

Los principales hallazgos de este conjunto de experimentos mostrados en la figura 10 los podemos resumir del siguiente modo:

- (i) Los niveles del transcrito de uPA y PAI-1 aumentan significativamente al estímulo de TGF- β 1 (figura 10A y 10B); sin embargo, dicho efecto no fue inhibido por AG1478 lo que supone que, la disminución (modesta) observada a las 24 horas de estímulo en la determinación de actividad uPA con el inhibidor (Figura 7) no correspondería a un efecto a nivel transcripcional. La ausencia de efecto inhibitorio en la expresión de PAI-1 refleja la importancia de la ruta canónica de señalización de TGF- β 1 en la expresión del inhibidor. Para la expresión de ambas proteínas SB431542 mostró gran poder inhibitorio.

- (ii) EGF no tuvo ningún efecto sobre la expresión de mRNA para uPA y PAI-1.

- (iii) La expresión del mRNA para Cadherina E no se modificó con ninguno de los factores utilizados lo que permite suponer que los resultados obtenidos en los experimentos de inmunofluorescencia son atribuibles más a un cambio en la localización de la proteína que a cambios en su expresión.

- (iv) TGF- β 1 y EGF provocaron, en menor grado, un aumento en los niveles de transcrito de vimentina, efecto que fue bloqueado por AG1478 y por SB431542.

6.8. Evolución temporal de la inhibición por AG1478 del estímulo a la expresión de mRNA para uPA por TGF- β 1.

El análisis de los datos de la figura 10 permite concluir que AG1478 (inhibidor de EGFR) no produjo una inhibición en la expresión del mensajero para uPA

estimulada con TGF- β 1. Este dato no concuerda con el efecto observado por el mismo inhibidor en la producción de uPA soluble evaluada como actividad enzimática. Por ello, se realizó un análisis del desarrollo temporal de esta inhibición considerando tiempos más largos de incubación con el inhibidor. De este modo, buscamos que la expresión del mRNA para uPA se asocie más eficientemente con la determinación de actividad observada en la figura 7.

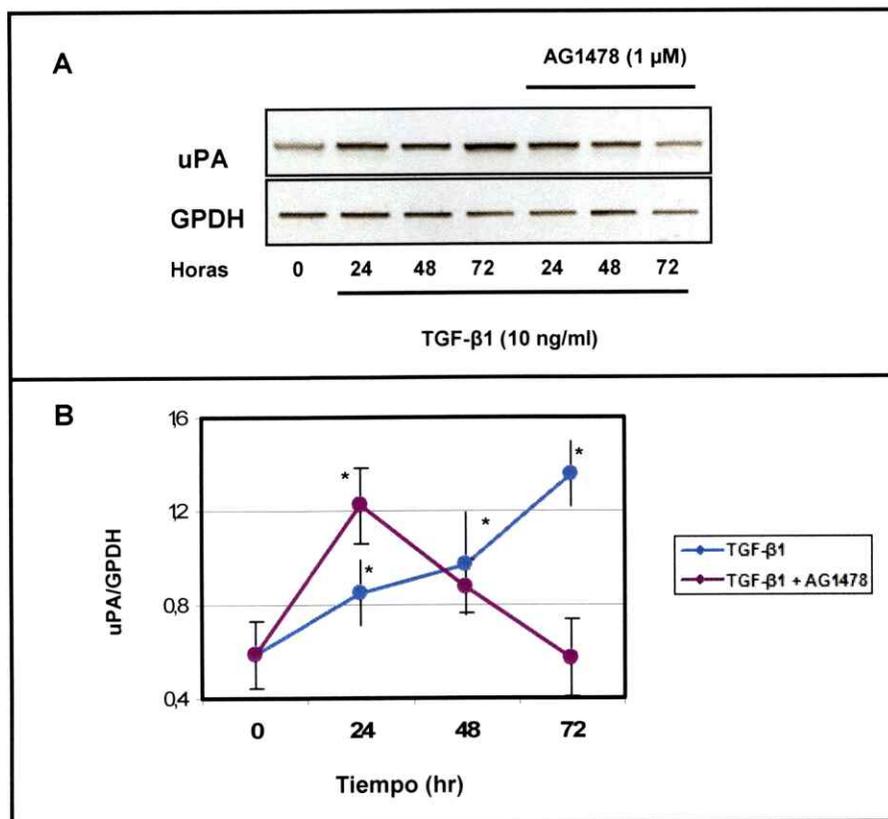


Figura 11. Curva de progreso temporal del efecto de AG1478 sobre el estímulo de TGF- β 1 en la expresión del mRNA para uPA en células PDV. Las células PDV fueron estimuladas con TGF- β 1 por 24, 48 y 72 hr, en presencia o ausencia del inhibidor de EGFR (AG1478). Transcurridos los tiempos, se extrajo el RNA para realizar un RT-PCR para el transcrito de uPA y GPDH. (A) RT-PCR de mRNA uPA y mRNA GPDH. (B) Los valores de uPA fueron normalizados por GPDH. El gráfico representa el valor promedio de 3 experimentos \pm desviación estándar. Los * indican una diferencia significativa respecto al control con $p < 0,05$.

De acuerdo a los datos de la figura 11, efectivamente a las 24 hr, la expresión de mRNA para uPA en células cultivadas, en presencia de TGF- β 1 y AG1478, sigue el mismo curso temporal de la expresión del mRNA para uPA estimulada por TGF- β 1 en ausencia del inhibidor. A tiempos mayores, la inhibición de la expresión del mRNA para uPA se hace evidente.

7. DISCUSIÓN

Los datos del presente trabajo sugieren que la activación del Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico (EGFR), juega un papel menor en el proceso de señalización que permite la adquisición de propiedades invasivas en queratinocitos transformados de ratón estimulados por TGF- β 1. La participación de EGFR se manifiesta en forma parcial en algunas propiedades específicas dependientes de TGF- β 1, como la expresión de uPA, la activación de la vía de señalización ERK 1,2, la localización de Cadherina E, la reorganización del citoesqueleto de actina, la migración celular y la expresión de marcadores mesenquimales.

La transactivación de EGFR es un mecanismo ampliamente reportado en la literatura (Docherty y col., 2006; Fischer y col., 2003) que se asocia a la posibilidad de canalizar diferentes estímulos en una vía prioritaria que, además, se expresa abundantemente en células tumorales (Gschwind y col., 2001). Diversos estímulos extracelulares utilizan la fosforilación en tirosina de EGFR como un mecanismo común de señalización. Entre ellos, destacan ligandos de receptores asociados a proteínas G, luz UV y stress oxidativo entre otros (Ullrich y Schlessinger, 1990; Fischer y col., 2003).

En nuestro laboratorio se ha descrito que en células tumorales mamarias humanas, uPA, actuando como ligando de su receptor, es capaz de incrementar la invasividad celular en un proceso que incluye la activación de la ruta ERK 1,2 y que

depende de la transactivación de EGFR por uPA (Guerrero y col., 2004). Los mecanismos propuestos, que median el "encendido" de EGFR, son variados y van desde la inhibición de la tirosina fosfatasa específica para EGFR, por el incremento del potencial redox intracelular, al procesamiento proteolítico de ligandos similares a EGF, por proteasas específicas (Fischer y col., 2003). En el caso de la transactivación de EGFR por uPA, éste último parece ser específicamente el caso, como se demostró al inhibir una actividad metaloproteásica y anulando la transactivación (Guerrero y col., 2004). En células fuertemente invasivas, la mantención del receptor en un estado activado se logra predominantemente a través de la producción autocrina de ligandos (Cáceres y col., 2005).

El factor de crecimiento transformante- $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) es un polipéptido que juega un papel destacado en la adquisición de propiedades malignas en células epiteliales (Akhurst y Derynck, 2001; Caulín y col., 1995; Gotzmann y col., 2002; Janda y col., 2002). En general, las células invasivas producen una cantidad de TGF- $\beta 1$, en forma autocrina, que permite suponer que las vías de señalización dependientes del factor se encuentran activas sostenidamente (Cui y col., 1996). Muchas de las propiedades invasivas de estas células se pueden explicar por la activación de rutas de señalización activadas por TGF- $\beta 1$ (Janda y col., 2002; Lee y col., 2007; Mulder, 2000). Dentro de estas propiedades invasivas moduladas por TGF- $\beta 1$ destacan la motilidad, los cambios en el citoesqueleto de actina y la secreción de proteasas tumorales. En nuestro laboratorio se ha demostrado que TGF- $\beta 1$ es capaz de estimular la invasividad celular y la producción basal de uPA en queratinocitos transformados de ratón (Santibáñez y col., 1999). Quizá el rasgo más interesante de este proceso de activación es que en

lugar de provocar la activación de las llamadas proteínas Smad 2,3 (ruta canónica), supone la activación de la ruta ERK 1,2 (Mulder, 2000). Este antecedente sirvió de sustrato para nuestra propuesta que la activación de EGFR, que señala predominantemente vía ERK 1,2, podría estar involucrada en la ruta de señalización dependiente de TGF- β 1.

Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren un mecanismo molecular que permita explicar la activación de la ruta de las ERK-MAPK por TGF- β 1. Efectivamente, como se ha indicado en este trabajo, TGF- β 1 es capaz de transactivar el receptor de EGF, fenómeno detectado por la fosforilación en tirosina del receptor y la activación de la ruta ERK 1,2. La fosforilación de ERK 1,2 por TGF- β 1 pareciera ser un hecho secundario a la activación de EGFR, pues la preincubación de las células expuestas al factor con AG1478, inhibidor específico de EGFR, anula totalmente la activación. Por su parte, la activación por TGF- β 1 de la ruta Smad 2,3 es totalmente autónoma de la activación de EGFR y pareciera ocurrir en forma simultánea a la activación de ERK 1,2, pues las mismas condiciones experimentales expuestas en el párrafo anterior no producen cambios en la activación de Smad 2,3. Siguiendo este raciocinio, los cambios de activación de EGFR por incubación de su ligando natural o por inhibición de su actividad fosforilante intrínseca, no trajeron consecuencias en la fosforilación de Smad 2,3. Esto se interpretó como que EGFR no constituye una etapa obligada en la activación de Smad 2,3, o dicho de otra manera, no es un evento obligado corriente abajo de T β RI/T β RII.

Por su parte, el nivel basal de activación de ERK 1,2 parece ser propiedad prioritaria de EGFR y no de T β RI como lo demuestra la activación basal de ERK 1,2 de células tratadas con los correspondientes inhibidores de los respectivos receptores. Estos datos permiten suponer que TGF- β 1 se une a su receptor y puede activar simultáneamente al menos dos rutas de señalización: las ERK-MAPK y las Smad. La activación de la ruta ERK 1,2 por TGF- β 1, en condiciones en las que la actividad serina/treonina quinasa de T β RI está inhibida, se podría explicar por la posible interacción de T β RI con EGFR (independiente de capacidad de T β RI de fosforilar Smad 2,3). Así, para analizar este resultado se debe considerar la posibilidad que interacción del complejo T β RI/T β RII (cargado con su ligando) con EGFR provoque la activación de ERK 1,2, vía que es autónoma de Smad 2,3. En ese sentido, es importante destacar que, datos de la literatura, muestran que mutaciones en el loop 45 de T β RI, que bloquean la capacidad de activar Smad 2,3, no modifican la potencialidad de T β RI de activar la vía MAPK (Itoh y col., 2003). De estos datos se puede concluir que, la activación de la vía de las MAPK por TGF- β 1 no depende directamente de la capacidad fosforilante de T β RI pero, al parecer sí depende de la activación de EGFR.

Los resultados del efecto de TGF- β 1 sobre la migración celular también pueden analizarse de forma similar a lo anterior, dado que el efecto estimulador de TGF- β 1 sobre la migración celular se ve más potentemente inhibido por SB431542 que por AG1478. Ello sugiere que la transactivación del receptor de EGF juega un papel menor en el fenómeno global que determina la migración celular. Algo similar ocurre con el estímulo de TGF- β 1 sobre la producción de uPA. En este caso, también la inhibición de T β RI pareciera dar cuenta de la totalidad del estímulo, mientras que la transactivación

de EGFR sólo influye en forma parcial. Es interesante notar que, en las condiciones experimentales en las que la producción de uPA se evalúa en presencia de AG1478, estimulada por ambos factores de crecimiento (TGF- β 1 y EGF), la disminución de la producción de uPA es sólo parcial. Ello, en condiciones en las que la vía de señalización ERK 1,2 está totalmente bloqueada. De este modo, pareciera ser que el estímulo de TGF- β 1 sobre la migración celular y la producción de uPA, dependen directamente de la actividad de T β RI y sólo parcialmente de la de EGFR.

El análisis de la capacidad de TGF- β 1 de desestabilizar las interacciones intercelulares mediadas por Cadherina E también sugiere un mecanismo similar a los anteriores. La inmunofluorescencia para Cadherina E, muestran que la inmunorreactividad para Cadherina E se ve fuertemente disminuida al incubar las células PDV con TGF- β 1. La pre-incubación de las células con AG1478 logra retener parcialmente algunas de estas interacciones. Sin embargo, el tratamiento con SB431542 tiene un efecto mucho más manifiesto. Un resultado muy similar se puede observar en la aparición de fibras de estrés estimuladas por TGF- β 1.

Finalmente, el análisis del efecto de TGF- β 1 sobre la expresión de transcritos propiamente epiteliales (Cadherina-E) o característicamente mesenquimales (Vimentina) entrega resultados sugerentes. En ambos casos, se aprecian sutiles cambios de expresión –hacia la estimulación en el caso de Vimentina y la inhibición en el caso de Cadherina E- que son parcialmente revertidos por los inhibidores. En este caso, es necesario aclarar que en nuestra experiencia tratamientos cortos con TGF- β 1

no provocan cambios a nivel transcripcional en la expresión de Cadherina E por lo que la disminución a nivel de proteína observada por inmunofluorescencia se puede deber, con toda probabilidad, a cambios en la estabilidad y/o localización de la proteína intercelular. Un análisis similar es posible hacer en el caso de la inhibición de la expresión de mRNA para uPA por AG1478. En este caso, el nivel de mensajero se modifica al preincubar las células con inhibidor sólo en tiempos mayores, lo que no coincide con la determinación de actividad enzimática a las 24 horas. En nuestra experiencia, la determinación de actividad por zimografía reversa es un método muy sensible que da cuenta de una masa enzimática activa que no siempre es posible identificar por métodos convencionales como western-blot.

Tomando estos resultados en su conjunto, se puede sugerir que la transactivación de EGFR constituye un mecanismo al que la célula tumoral recurre para activar rutas de señalización y que permite canalizar formas muy variadas de estímulo extracelular hacia la obtención del fenotipo invasivo.

8. CONCLUSIONES

En este trabajo se muestran evidencias que indican que la transactivación del receptor de EGF forma parte del proceso de señalización de TGF- β 1 que permite la adquisición y mantención del fenotipo maligno en queratinocitos transformados de ratón.

La participación de EGFR se manifiesta en algunas propiedades específicas dependientes de TGF- β 1 como:

- El estímulo por TGF- β 1 provoca la transactivación de EGFR y la activación de la ruta ERK 1,2, hecho que parece ser posterior a la activación del receptor, pues la inactivación de EGFR, por su inhibidor específico AG1478, anula totalmente la activación de la ruta ERK 1,2.
- La activación por TGF- β 1 de la ruta Smad 2,3 es totalmente autónoma de la activación de EGFR y pareciera ocurrir en forma simultánea a la activación de ERK 1,2, pues la inactivación de EGFR no produce cambios en la activación de Smad 2,3. Por lo tanto, EGFR no constituye una etapa obligatoria en la activación de Smad 2,3 por TGF- β 1.
- El efecto estimulador de TGF- β 1 sobre la migración celular se ve más disminuido por el agente que bloquea T β RI que por el inhibidor de EGFR, lo que sugiere que ambas rutas activadas por TGF- β 1 cumplen un papel en el fenómeno de adquisición de motilidad celular, y que la transactivación del receptor de EGF sería responsable de una parte de este proceso.

- La estimulación de la producción de uPA por TGF- β 1 es regulada de un modo muy similar al propuesto en el punto anterior, en el sentido de que el estímulo por TGF- β 1 depende totalmente de la activación de T β RI y sólo parcialmente de EGFR. Algo similar se aprecia en la expresión del transcrito para uPA.
- El estímulo de células PDV con TGF- β 1 desestabiliza las interacciones intercelulares mediadas por Cadherina E, fenómeno que depende parcialmente de la actividad de EGFR y más directamente de la actividad de T β RI.
- También se observó que TGF- β 1 provoca un cambio en la reorganización del citoesqueleto de actina, estimulando la formación de fibras de estrés propias de un fenotipo más mótil y reminiscentes del inicio de una transición epitelio-mesénquima. Este fenómeno también parece depender directamente de la activación de ambos receptores.

Los resultados obtenidos muestran que EGFR forma parte de la vía de señalización de TGF- β 1 que involucra la activación la vía de señalización ERK-MAPK, que estimula la migración celular, aumenta la actividad uPA y estimula una transición epitelio mesénquima. En el cáncer es conocido que la vía ERK-MAPK estimulada por TGF- β 1, está relacionada con la progresión tumoral a través de la inducción de migración celular, sin embargo era desconocido el papel desempeñado por EGFR en este proceso.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Akhurst, R.J. and Balmain, A. (1999) Genetic events and the role of TGF β in epithelial tumour progression The Journal of Pathology 187(1):82-90.
2. Akhurst, R.J. and Derynck, R. (2001) TGF- β signaling in cancer – a double-edge sword Trends in Cell Biology 11(11):S44-S51.
3. Aguirre-Ghiso, J.A., Kovalski, K. and Ossowski, L. (1999) Tumor dormancy induced by downregulation of urokinase receptor in human carcinoma involves integrin and MAPK signaling The Journal of Cell Biology 147(1):89-104.
4. Andreasen, P.A., Egelund, R. and Petersen, H.H. (2000) The plasminogen activation system in tumor growth, invasion, and metastasis Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS 57(1):25-40.
5. Blasi, F. and Carmeliet, P. (2002) uPAR: a versatile signalling orchestrator Nature Reviews. Molecular Cell Biology 3(12):932-943.
6. Boyer, B., Vallés, A.M. and Edme, N. (2000) Induction and regulation of epithelial-mesenchymal transitions Biochemical Pharmacology 60(8):1091-1099.
7. Bremner, R. and Balmain, A. (1990) Genetic changes in skin tumor progression: correlation between presence of a mutant ras gene and loss of heterozygosity on mouse chromosome 7 Cell 61(3):407-417.
8. Buchmann, A., Ruggeri, B., Klein-Szanto, A.J.P. and Balmain, A. (1991) Progression of squamous carcinoma cells to spindle carcinomas of mouse skin is associated with an imbalance of H-ras alleles on chromosome 7 Cancer Research 51(15):4097-4101.

9. Cáceres, M., Guerrero, J. and Martínez, J. (2005) Overexpression of RhoA-GTP induces activation of the epidermal growth factor receptor, dephosphorylation of focal adhesion kinase and increased motility in breast cancer cells Experimental Cell Research 309(1):229-238.
10. Caulín, C., Scholl, F.G., Frontelo, P., Gamallo, C. and Quintanilla, M. (1995) Chronic exposure of cultured transformed mouse epidermal cells to transforming growth factor- β 1 induces an epithelial-mesenchymal transdifferentiation and spindle tumoral phenotype Cell Growth and Differentiation 6(8):1027-1035.
11. Chen, Y.G., Hata, A., Lo, R.S., Wotton, D., Shi, Y., Pavletich, N. and Massagué, J. (1998) Determinants of specificity in TGF- β signal transduction Genes and Development 12(14):2144-2152.
12. Cui, W., Fowles, D.J., Bryson, S., Duffie, E., Ireland, H., Balmain, A. and Akhurst, R.J. (1996) TGF β 1 inhibits the formation of benign skin tumors, but enhances progression to invasive spindle carcinomas in transgenic mice Cell 86(4):531-542.
13. Dhanasekaran, D.H., Kashef, K., Lee, C.M., Xu, H. and Reddy, E.P. (2007) Scaffold proteins of MAP-kinase modules Oncogene 26(22):3185-3202.
14. Dennler, S., Itoh, S., Vivien, D., ten Dijke, P., Huet, S. and Gauthier, J.M. (1998) Direct binding of Smad3 and Smad4 to critical TGF β -inducible elements in the promoter of human plasminogen activator inhibitor-type 1 gene EMBO Journal 17(11):3091-100.
15. Derynck, R. and Zhang, Y.E. (2003) Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF- β family signalling Nature 425(6958):577-584.
16. Dhillon, A.S., Hagan, S., Rath, O. and Kolch, W. (2007) MAP kinase signalling pathways in cancer Oncogene 26(22):3279-3290.

17. Díaz-Guerra, M., Haddow, S., Bauluz, C., Jorcano, J.L., Cano, A., Balmain, A. and Quintanilla, M. (1992) Expression of simple epithelial cytokeratins in mouse epidermal keratinocytes harboring Harvey ras gene alterations Cancer Research 52(3):680-687.
18. Docherty, N.G., O'Sullivan, O.E., Healy, D.A., Murphy, M., O'Neill, A.J., Fitzpatrick, J.M. and Watson, R.W. (2006) TGF- β 1-induced EMT can occur independently of its proapoptotic effects and is aided by EGF receptor activation American Journal of Physiology. Renal Physiology 290(5):F1202-F1212.
19. Dumont, N. and Arteaga, C.L. (2000) Transforming growth factor-beta and breast cancer: Tumor promoting effects of transforming growth factor-beta Breast Cancer Research: BCR 2(2):125-132.
20. Dumont, N. and Arteaga, C.L. (2003) Targeting the TGF beta signaling network in human neoplasia Cancer Cell 3(6):531-536.
21. Fisher, O.M., Hart, S., Gschwind, A. and Ullrich, A. (2003) EGFR signal transactivation in cancer cells Biochemical Society Transactions 31(Pt 6):1203-1208.
22. Friedl, P. and Wolf, K. (2003) Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms Nature Reviews. Cancer 3(5):362-374.
23. Fusenig, N.E., Amer, S.M., Boukamp, P. and Worst, P.K. (1978) Characteristics of chemically transformed mouse epidermal cells in vitro and in vivo Bulletin du Cancer 65(3):271-279.
24. Gotzmann, J., Huber, H., Thallinger, C., Wolschek, M., Jansen, B., Schulte-Hermann, R., Beug, H. and Mikulits, W. (2002) Hepatocytes convert to a fibroblastoid phenotype through the cooperation of TGF-beta1 and Ha-Ras: steps towards invasiveness Journal of Cell Science 115(Pt 6):1189-1202.
25. Grady, W.M., Nyeroff, L.L., Swinler, S.E., Rajput, A., Thiagalingam, S., Lutterbaugh, J.D., Neumann, A., Brattain, M.G., Chang, J., Kim, S.J., Kinzler, K.W., Vogelstein, B., Willson,

- J.K. and Markowitz, S. (1999) Mutational inactivation of transforming growth factor beta receptor type II in microsatellite stable colon cancers Cancer Research 59(2):320-324.
26. Gschwind, A. (2001) Cell communication networks: epidermal growth factor receptor transactivation as the paradigm for interreceptor signal transmission Oncogene 20(13):1594-1600.
27. Guerrero, J., Santibañez, J.F., González, A. and Martínez, J. (2004) EGF receptor transactivation by urokinase receptor stimulus through a mechanism involving Src and matrix metalloproteinases Experimental Cell Research 292(1):201-208.
28. Gumbiner, B.M. (2000) Regulation of cadherin adhesive activity The Journal of Cell Biology 148(3):399-403.
29. Hanahan, D. and Weinberg, R.A. (2000) The hallmarks of cancer Cell 100(1):57-70.
30. Hugo, H., Ackland, M.L., Blick, T., Lawrence, M.G., Clements, J.A., Williams, E.D. and Thompson, E.W. (2007) Epithelial-mesenchymal and mesenchymal-epithelial transitions in carcinoma progression Journal of Cellular Physiology 213(2):374-383.
31. Inman, G.J., Nicolás, F.J., Callahan, J.F., Harling, J.D., Gaster, L.M., Reith, A.D., Laping, N.J. and Hill, C.S. (2002) SB-431542 is a potent and specific inhibitor of transforming growth factor- β receptors ALK4, ALK5, and ALK7 Molecular Pharmacology 62(1):65-74.
32. Irigoyen, J.P., Muñoz-Cánoves, P., Montero, L., Koziczak, M. and Nagamine, Y. (1999) The plasminogen activator system: biology and regulation Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS 56(1-2):104-132.
33. Itoh, S., Thorikay, M., Kowanetz, M., Moustakas, A., Itoh, F., Heldin, C.H. and ten Dijke, P. (2003) Elucidation of Smad requirement in Transforming Growth Factor- β type I Receptor-induced responses The Journal Biological Chemistry 278(6):3751-3761.

34. Jayaraman, L. and Massagué, J. (2000) Distinct oligomeric states of SMAD proteins in the transforming growth factor- β pathway The Journal Biological Chemistry 275(52):40710-40717.
35. Janda, E., Lehmann, K., Killisch, I., Jechlinger, M., Herzig, M., Downward, J., Beug, H. and Grünert, S. (2002) Ras and TGF(beta) cooperatively regulate epithelial cell plasticity and metastasis: dissection of Ras signaling pathways The Journal of Cell Biology 156(2):299-313.
36. Kaibuchi, K., Kuroda, S., Fukata, M. and Nakagawa, M. (1999) Regulation of cadherin-mediated cell-cell adhesion by the Rho family GTPases Current Opinion in Cell Biology 11(5):591-6.
37. Kretzchmar, M., Doody, J., Timokhina, I. and Massagué, J. (1999) A mechanism of repression of TGF β /Smad signaling by oncogenic Ras Genes and Development 13(7):804-816.
38. Lee, M.K., Pardoux, C., Hall, M.C., Lee, P.S., Warburton, D., Qing, J., Smith, S.M. and Derynck, R. (2007) TGF-beta activates Erk MAP kinase signalling through direct phosphorylation of ShcA The EMBO Journal 26(17):3957-3967.
39. Lin, H.Y., Wang, X.F., Ng-Eaton, E., Weinberg, R.A. and Lodish, H.F. (1992) Expression cloning of the TGF- β type II receptor, a functional transmembrane serine/threonine kinase Cell 68(4):775-785.
40. Liu, J-F., Crépin, M., Liu, J-M., Barritault, D. and Ledoux, D. (2002) FGF-2 and TPA induce matrix metalloproteinase-9 secretion in MCF-7cells through PKC activation of the Ras/ERK pathway Biochemical and Biophysical Research Communications 293(4):1174-1182.

41. Maheshwari, G., Wiley, H.S. and Lauffenburger, D.A. (2001) Autocrine epidermal growth factor signaling stimulates directionally persistent mammary epithelial cell migration The Journal of Cell Biology 155(7):1123–1128.
42. Markowitz, S.J., Wang, J., Myeroff, L., Parsons, R., Sun, L., Lutterbaugh, J., Fan, R.S., Zborowska, E., Kinzler, K.W. and Vogelstein, B. (1995) Inactivation of the type II TGF- β receptor in colon cancer cells with microsatellite instability Science 268(5215):1336-1338.
43. Massgué, J. (1998) TGF β signal transduction Annual Review of Biochemistry 67:753-791.
44. Massagué, J. and Chen, Y.G. (2000) Controlling TGF- β signaling Genes and Development 14(6):627-644.
45. Massagué, J. and Gomis, R.R. (2006) The logic of TGF β signaling FEBS Letters 580(12):2811-2820.
46. Miettinen, P.J., Ebner, R., Lopez, A.R. and Derynck, R. (1994) TGF- β induced transdifferentiation of mammary epithelial cells to mesenchymal cells: involvement of type I receptors The Journal of Cell Biology 127(6 Pt 2):2021-36.
47. Mulder, K.M. (2000) Role of Ras and Mapks in TGF β signaling Cytokine and Growth Factor Reviews 11(1-2):23-35.
48. Muraoka, R.S., Koh, Y., Roebuck, L.R., Sanders, M.E., Brantley-Sieders, D., Gorska, A.E., Moses, H.L. and Arteaga, C.L. (2003) Increased malignancy of Neu-induced mammary tumors overexpressing active transforming growth factor beta1 Molecular and Cellular Biology 23(23):8691–8703.
49. Muraoka-Cook, R.S., Kurokawa, H., Koh, Y., Forbes, J.T., Roebuck, L.R., Barcellos-Hoff, M.H., Moody, S.E., Chodosh, L.A. and Arteaga, C.L. (2004) Conditional overexpression

- of active transforming growth factor beta1 in vivo accelerates metastases of transgenic mammary tumors Cancer Research 64(24):9002-9011.
50. Murphy, G and Gavrilovic, J. (1999) Proteolysis and cell migration: creating a path? Current Opinion in Cell Biology 11(5):614-621.
 51. Navarro, P., Gómez, M., Pizarro, A., Gamallo, C., Quintanilla, M. and Cano, A. (1991) A role for the E-Cadherin cell-cell adhesion molecule during tumor progression of mouse epidermal carcinogenesis The Journal of Cell Biology 115(2): 517-533.
 52. Newman, M.J. (1993) Transforming growth factor- β and the cell surface in tumor progression Cancer Metastasis Reviews 12(3-4):239-254.
 53. Nguyen, D.X. and Massagué, J. (2007) Genetic determinants of cancer metastasis Nature Reviews. Genetics 8(5):341-352.
 54. Oft, M., Peli, J., Rudaz, C., Schwarz, H., Beug, H. and Reichmann, E. (1996) TGF- β 1 and Ha-Ras collaborate in modulating the phenotypic plasticity and invasiveness of epithelial tumor cells Genes and Development 10(19):2462-2477.
 55. Peinado, H., Quintanilla, M and Cano, A. (2003) Transforming growth factor β 1 induces Snail transcription factor in epithelial cell lines: mechanisms for epithelial mesenchymal transitions The Journal of Biological Chemistry 278(23):21113-21123.
 56. Piek, E., Moustakas, A., Kurisaki, A., Heldin, C.H. and ten Dijke, P. (1999) TGF-(beta) type I receptor/ALK-5 and Smad proteins mediate epithelial to mesenchymal transdifferentiation in NMuMG breast epithelial cells Journal of Cell Science 112(Pt 24):4557-68.
 57. Pierce, D.F., Gorska, A.E., Chytil, A., Meise, K.S., Page, D.L., Coffey, R.J. and Moses, H.L. (1995) Mammary tumor suppression by transforming growth factor β 1 transgene expression Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 92(10):4254-4258.

58. Prenzel, N., Zwick, E., Daub, H., Leserer, M., Abraham, R., Wallasch, C. and Ullrich, A. (1999) EGF receptor transactivation by G-protein-coupled receptors requires metalloproteinase cleavage of proHB-EGF Nature 402(6764):884-888.
59. Prenzel, N., Zwick, E., Leserer, M. and Ullrich, A. (2000) Tyrosine kinase signalling in breast cancer. Epidermal growth factor receptor: convergence point for signal integration and diversification Breast Cancer Research: BCR 2(3):184-190.
60. Quintanilla, M., Brown, K., Ramsden, M. and Balmain, A. (1986) Carcinogen-specific mutation and amplification of Ha-ras during mouse skin carcinogenesis Nature 322(6074):78-80.
61. Quintanilla, M., Haddow, S., Jonas, D., Jaffe, D., Bowden, G.T. and Balmain, A. (1991) Comparison of ras activation of during epidermal carcinogenesis in vitro and in vivo Carcinogenesis 12(10):1875-1881.
62. Rossmanith, W. and Schulte-Hermann, R. (2001) Biology of transforming growth factor beta in hepatocarcinogenesis Microscopy Research and Technique 52(4):430-436.
63. Salomon, D.S., Brandt, R., Ciardiello, F. and Normanno, N. (1995) Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies Critical Reviews in Oncology/Hematology 19(3):183-232.
64. Santibañez, J.F., Frontelo, P., Iglesias, M., Martínez, J. and Quintanilla, M. (1999) Urokinase expression and binding activity associated with the transforming growth factor β 1-induced migratory and invasive phenotype of mouse epidermal keratinocytes Journal of Cellular Biochemistry 74(1):61-73.
65. Santibañez, J.F., Iglesias, M., Frontelo, P., Martínez, J. and Quintanilla, M. (2000) Involvement of the Ras/MAPK signaling pathway in the modulation of urokinase production and cellular invasiveness by transforming growth factor-beta(1) in transformed keratinocytes Biochemical and Biophysical Research Communications 273(2):521-527.

66. Santibañez, J.F., Guerrero, J., Quintanilla, M., Fabra, A. and Martínez, J. (2002) Transforming growth factor- β 1 modulates matrix metalloproteinase-9 production through the Ras/MAPK signaling pathway in transformed keratinocytes Biochemical and Biophysical Research Communications 296(2):267-273.
67. Santibañez, J.F. (2006) JNK mediates TGF- β 1-induced epithelial mesenchymal transdifferentiation of mouse transformed keratinocytes FEBS Letters 580(22):5385-5391.
68. Savagner, P. (2001) Leaving the neighborhood: molecular mechanisms involved during epithelial-mesenchymal transition BioEssays 23(10):912-923.
69. Shi, Y. and Massagué, J. (2003) Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus Cell 113(6):685-700.
70. Siegel, P.M., Shu, W., Cardiff, R.D., Muller, W.J. and Massagué, J. (2003) Transforming growth factor beta signaling impairs Neu-induced mammary tumorigenesis while promoting pulmonary metastasis Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 100(14):8430-8435.
71. Sporn, M.B. and Roberts, A.B. (1992) Transforming growth factor- β : recent progress and new challenges The Journal of Cell Biology 119(5):1017-1021.
72. Stetler-Stevenson, W.G., Aznavoorian, S. and Liotta, L.A. (1993) Tumor cell interactions with the extracellular matrix during invasion and metastasis Annual Review of Cell Biology 9:541-573.
73. Thiery, J.P. and Chopin, D. (1999). Epithelial cell plasticity in development and tumor progression Cancer Metastasis Reviews 18(1):31-42.
74. Thiery, J.P. (2002) Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression Nature Reviews. Cancer 2(6):442-454.

75. Tian, Y-C., Chen, Y.C., Chang, C.T., Hung, C.C., Wu, M.S., Phillips, A. and Yang, C.W. (2007) Epidermal growth factor and transforming growth factor- β 1 enhance HK-2 cell migration through a synergistic increase of matrix metalloproteinase and sustained activation of ERK signaling pathway Experimental Cell Research 313(11):2367-2377.
76. Ullrich, A. and Schlessinger, J (1990) Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity Cell 61(2):203-212.
77. Valdés, F., Murillo, M.M., Valverde, A.M., Herrera, B., Sánchez, A., Benito, M., Fernández, M. and Fabregat, I. (2004) Transforming growth factor-beta activates both pro-apoptotic and survival signals in fetal rat hepatocytes Experimental Cell Research 292(1):209-218.
78. Woodhouse, E.C., Chuaqui, R.F. and Liotta, L.A. (1997) General mechanisms of metastasis Cancer 80(8 suppl):1529-1537.
79. Yarden, Y. (2001) The EGFR family and its ligands in human cancer signalling mechanisms and therapeutic opportunities European Journal of Cancer 37(suppl 4):S3-S8.
80. Yarden, Y. and Sliwkowski, M.X. (2001) Untangling the ErbB signalling network Nature Reviews. Molecular Cell Biology 2(2):127-137.