

2ej



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA,

EFFECTO DE LA TOXINA PERTUSSIS SOBRE LA PROLIFERACION CELULAR DEL HEPATOMA AS-30D

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA
P R E S E N T A :
EMMA LUZ FRANCO ROLDAN



MEXICO, D. F.



EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA

1999

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

270865



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

**JURADO ASIGNADO:**

Presidente      **Prof. María del Carmen Parra González**

Vocal            **Prof. Rogelio Rodríguez Sótres.**

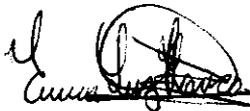
Secretario      **Prof. María Eugenia Torres Márquez**

1er. Suplente    **Prof. Elpidio García Ramírez.**

2o. Suplente     **Prof. Gloria Gutiérrez Venegas**

.El trabajo fue realizado en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la UNAM, apoyado por el Donativo DGAPA 213596.

  
Asesor del tema: **Dra. María Eugenia Torres Márquez.**



Sustentante: **Emma Luz Franco Roldán**

Dedico esta tesis con mucho cariño a todas las personas que participaron directa o indirectamente en la realización de la misma, apoyándome y conviviendo en momentos de alegrías y tristezas que se reflejaron en infinitas satisfacciones y cuyas enseñanzas de cada uno de ellos no siempre fueron fáciles pero me ayudaron a enriquecer mi vida y buscar siempre la felicidad ante cualquier adversidad.

A mis padres Ma. del Carmen Alma y Jesús.

A mi novio Oliver.

A mis hermanos Jesús y Germán.

A mi sobrino y cuñada Eduardo y Wendy.

A mi tía Edith y a mi abuelita Emma.

A los papás de Oli y su familia: Sra. Margarita, Sr. Sergio, May e Ivan, abuelita Ofe, tía Elía, tío Arturo, tía Yolanda y tío Mario.

A mis entrenadores y amigos del Football: Oliver, Rafa, Pedro y Carlos.

A mis compañeras y amigas "Interleucinas": Mayra, Ceci, Laurita, Jaqueline, Ingrid, Araceli, Angeles, Ileana, Laurota, Marcela y Ruth.

A mis entrenadores de Voleibol: Oliver, Juan Manuel, Augusto y Luis.

A mis amiguitas "AKIRAS": Mayra, Vero, Moni, Gaby, Mireya, Marlene, Erika.

A mis amigas Diana y Karla.

A mi asesora de Tesis: Maru.

A mis compañeros de Laboratorio: Alice, Aliesha, Jasso y Marianita

Gracias a todos porque cada uno tiene un lugar especial en mi vida.

# CONTENIDO

# Páginas

## CAPÍTULO 1

### Antecedentes

1.1 Proteínas G	1
1.2 Generalidades de la adenilato ciclasa	5
1.3 Participación de la proteína Gi en la proliferación celular	9
1.4 Participación de la proteína Gi en la invasión y metástasis en otros tejidos	9
1.5 Vías posibles que involucran a las proteínas G en la proliferación celular	11
1.5.1 Proteínas cinasas activadas por mitógenos	12
1.5.2 Vía del AMPc	12
1.6 Toxina pertussis	15
1.7 Ensayos de proliferación celular	17

## CAPÍTULO 2

### Objetivos

2.1 Objetivo General	21
2.2 Objetivos Particulares	21
2.3 Hipótesis	21

### **CAPÍTULO 3**

<b>Material y Métodos</b>	22
3.1 Animales	22
3.2 Tratamiento de las células <i>in vivo</i> con toxina pertussis	22
3.3 Viabilidad celular del hepatoma <i>in vitro</i>	22
3.4 Tratamiento de las células (corto y largo plazo)	23
3.5 Incorporación de Bromodeoxiuridina	24
3.6 Ensayo del número celular y su viabilidad	25
3.7 Obtención de membranas	25
3.8 Determinación de la actividad de la adenilato ciclasa	26

### **CAPÍTULO 4**

<b>Resultados</b>	28
-------------------	----

### **CAPÍTULO 5**

<b>Discusión</b>	42
<b>Conclusiones</b>	45

## **ABREVIATURAS**

<b>AC</b>	Adenilato ciclasa
<b>AMPc</b>	Adenosina monofosfato ciclico
<b>AP</b>	Fosfatasa alcalina
<b>ATP</b>	Adenosina trifosfato
<b>BrdU</b>	Bromodeoxiuridina
<b>BSA</b>	Albúmina de suero de bovino
<b>CREB</b>	Elemento regulatorio del AMPc
<b>DA</b>	Diacilglicerol
<b>DMEM</b>	Medio Modificado Dulbecco
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>GDP</b>	Guanosina difosfato
<b>GEF</b>	Factor de intercambio de nucleótidos de guanina
<b>GPCRs</b>	Receptores acoplados a proteínas G
<b>GTP</b>	Guanosina trifosfato
<b>HLT</b>	Toxina dermonecrotizante
<b>HSF</b>	Factor sensible a histamina
<b>HP</b>	Hepatectomía parcial
<b>IAP o TP</b>	Proteína activadora de islotes o toxina pertussis
<b>IP<sub>3</sub></b>	Inositol 1,4,5-trifosfato
<b>LA</b>	Líquido de ascitis
<b>LPF</b>	Factor promotor de leucocitosis
<b>LPF-HA</b>	Hemaglutinina-LPF
<b>LPS</b>	Endotoxina lipopolisacárida
<b>MAPK</b>	Proteínas cinasas activadas por mitógenos
<b>MEK</b>	Cinasa de MAPK

<b>PH</b>	Dominios de pleckstrina
<b>PKC</b>	Proteína cinasa C
<b>PNP</b>	Paranitrofenol
<b>PNPP</b>	Paranitrofenilfosfato
<b>Proteína Gi</b>	Proteína G inhibitoria
<b>Proteína Gs</b>	Proteína G estimuladora
<b>RNA</b>	Ácido ribonucleico
<b>RTKs</b>	Receptores de tirosina cinasa

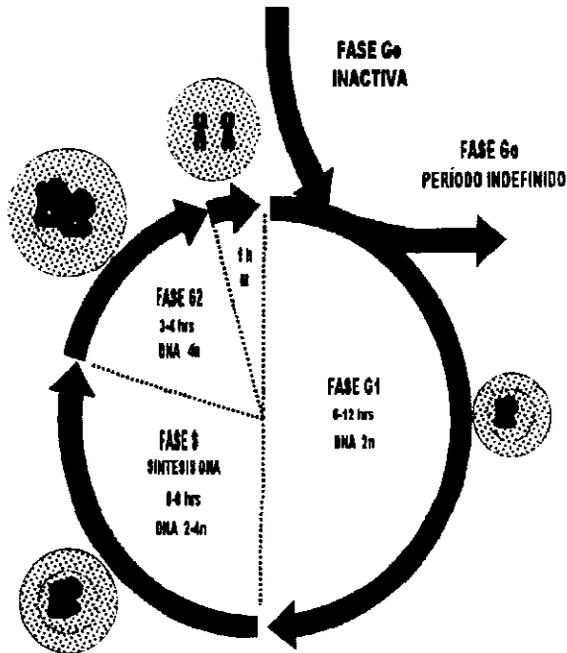
# CAPÍTULO 1. ANTECEDENTES

## ANTECEDENTES

La célula para poder dividirse y proliferar requiere de diversos mecanismos que tienen lugar durante el ciclo celular, el cual consta de 4 periodos como se puede apreciar en el esquema 1.1. En la fase G<sub>1</sub>, las células que acaban de realizar la mitosis, se preparan y sintetizan RNAs y proteínas, que posteriormente se utilizarán a lo largo del ciclo. La siguiente fase es conocida como periodo sintético o fase S, porque se sintetiza DNA. En el intervalo G<sub>2</sub>, termina la síntesis de DNA y el material genético comienza a distenderse y se prepara para la mitosis. Finalmente la fase M es el periodo de mitosis y tiene como propósito la formación de dos células hijas, con la misma cantidad de cromosomas en cada una. El tiempo de duración del ciclo celular es aproximadamente de 18-24 h (Lewin, 1997). Cabe mencionar que si la célula no está preparada para la fase G<sub>1</sub>, al no tener presentes los factores necesarios, entonces, entra a un periodo conocido como G<sub>0</sub>, que se distingue por ser un periodo inactivo en cuanto a procesos involucrados en la duplicación (Dumont, et. al. 1989; Lewin, 1997).

Los mecanismos que conducen al inicio del ciclo celular, están mediados por diversas vías de transducción de señales y estas señales también pueden presentar patrones anormales, como en el caso del cáncer que es una enfermedad caracterizada por el crecimiento acelerado y descontrolado de la célula. Las causas del cáncer pueden ser divididas en: predisposición genética, factores ambientales, factores desconocidos y la interacción de los dos primeros. Entre un 60 y un 90% de todos los tipos de cáncer son debidos a factores ambientales y desconocidos (Hernández, 1995).

## Esquema 1.1 CICLO CELULAR



Tomado de Lewin, 1997.

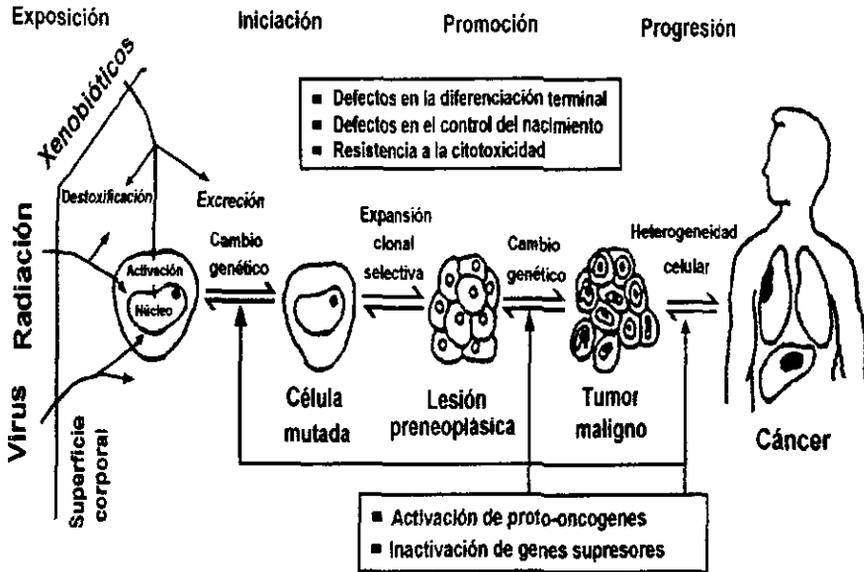
Dentro de la predisposición genética encontramos a los oncogenes que son genes mutados que codifican proteínas anormales implicadas en la transducción de señales, las cuales conducen a una producción incontrolada de señales para la división celular y, a su vez, juegan un papel importante en el desarrollo del cáncer (Lehninger, 1993), tal es el caso de proteínas como: Ras (Bos, 1989), y los productos de los oncogenes *v-src* (Gardner, et. al.1993), *gip* y *gps* (Lyons, et. al. 1990), por mencionar algunas.

Las mutaciones en los codones para los aminoácidos Arg<sup>179</sup> y Glu<sup>205</sup> del gen de la proteína G $\alpha_2$ , convierten a este último en oncogen que induce células malignas con crecimiento anormal. Los productos de este gen se conocen como proto-oncogenes *gip2* y se encargan de transmitir señales que regulan el crecimiento celular. Según reportes de la literatura, existe un 30% de los tumores ováricos y un 27% de los tumores de la corteza adrenal que presentan los oncogenes *gip2* (Lyons, et al. 1990).

Dentro de los factores ambientales, encontramos a agentes físicos, químicos y biológicos. La iniciación, la promoción y la progresión son las tres etapas fundamentales de la carcinogénesis de origen químico. En la etapa de **iniciación**, hay una exposición a agentes químicos, lo cual origina una célula neoplásica latente por la o las alteraciones producidas a nivel de DNA; la etapa de **promoción** es crítica, porque potencia el crecimiento anormal de las células y conduce a un neoplasma diferenciado y; por último, la etapa de **progresión**, es en la que tiene lugar la metástasis e invasión a otros tejidos, debido a que en esta última etapa, las células cancerosas ya no están diferenciadas (Hernández, 1995; ver esquema 1.2).

Las hepatopatías crónicas agrupan a diversos padecimientos, como la hepatitis B, la cirrosis alcohólica, la exposición continua a micotoxinas y a ciertos agentes químicos que provocan una predisposición al cáncer de hígado (Harrison, et al. 1987). El hepatocarcinoma, es uno de los cánceres más comunes en todo el mundo, su incidencia fluctúa alrededor de un millón de nuevos casos cada año. La intervención quirúrgica es la única terapia potencialmente curativa, pero no puede ser aplicada en todos los pacientes (Ain, et al. 1993).

## Esquema 1.2 ETAPAS DEL CÁNCER



Tomado de Hernández, 1995.

Un buen modelo de estudio de este tipo de cáncer se tiene en el hepatoma AS-30D que originalmente fue inducido por tratamiento de ratas machos con el 3-Metil-4-dimetilaminoazobenceno. De la perfusión de este tumor hepático se obtuvieron células que se inocularon intraperitonealmente a otras ratas machos donde proliferaron en el líquido de ascitis (acumulación en la cavidad peritoneal de líquido, debido a la extravasación de elementos provocado por el daño hepático) (Harrison, 1987). Es así como éstas células han sido propagadas (Smith, 1970).

## 1.1 PROTEÍNAS G

Dentro de la superfamilia de proteínas que enlazan GTP, encontramos a la subfamilia de proteínas G, que se localizan en la membrana citoplasmática (Spiegel, et al. 1991). Son proteínas heterotriméricas compuestas de las subunidades alfa, beta y gamma que se asocian de manera independiente a la membrana (Sternweis, 1986). Además dichas subunidades están codificadas por diferentes genes (Wilkie and Yokoyama, 1994; Amatruda, et al. 1988; Gautam, et al. 1989).

Existen varios tipos de proteína G (ver tabla 1.1), que son activadas al interactuar con un receptor específico de siete dominios transmembranales, cuando este receptor es estimulado por su agonista. Una vez activada, la proteína G se unirá a su efector correspondiente (ver esquema 1.3). Cada tipo de proteína G está asociada al receptor y al efector que le corresponde y su distribución varía de acuerdo al órgano en el que se expresa (Spiegel, et al. 1992).

La activación de las proteínas G promueve el intercambio de GDP por GTP. Este intercambio se efectúa en la subunidad  $\alpha$  propiciando la liberación del complejo beta-gamma (Gilman, 1987) y de esta forma, tanto la subunidad  $\alpha$ , como el complejo beta-gamma pueden interactuar sobre sus efectores correspondientes. Gracias a la actividad GTPasa intrínseca de la subunidad  $\alpha$ , el GTP es rápidamente hidrolizado a GDP y la subunidad  $\alpha$  retorna a su estado inactivo, es decir, esta subunidad se reasocia nuevamente con el complejo beta-gamma (Neer, 1995).

**TABLA 1.1 DIVERSIDAD DE LAS SUBUNIDADES  $\alpha$  DE LAS PROTEÍNAS G**

PROTEÍNA G. Subunidad- $\alpha$	DISTRIBUCIÓN EN TEJIDO	SISTEMA EFECTOR PRINCIPAL
Gs	Ubicua	Estimula la actividad de la adenilato ciclasa. Estimula canales $Ca^{2+}$ .
Gi	Ubicua	Inhibe Aden. Ciclasa. Estimula los canales de potasio y de calcio.
Gq	Ubicua	Estimula fosfolipasa C. Estimula los canales de calcio.
Go	Cerebro	Inhibe los canales de calcio.
Gt	Fotorreceptores de bastones y conos.	Estimula a la GMPc-fosfodiesterasa.

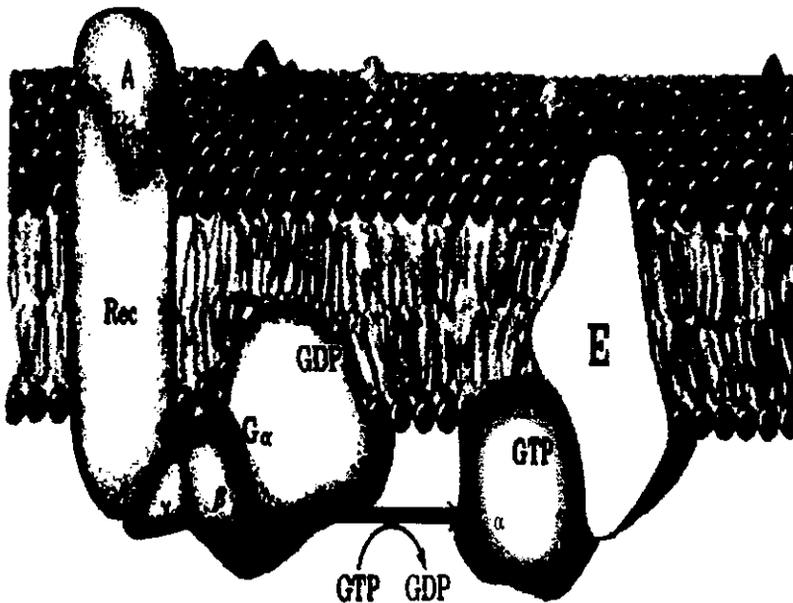
(Spiegel, et al. 1992; Lomasney, et al. 1995)

En general las subunidades  $\alpha$  de las proteínas G contienen regiones altamente conservadas llamadas G1, G2, G3, G4 y G5, que están asociadas a diversas funciones o eventos. La región G1 participa uniendo los fosfatos beta y gamma de los nucleótidos y los iones magnesio; el sitio G2 es el blanco de la ADP-ribosilación producida por toxinas como la del cólera o la pertussis; G3 es la encargada de inducir el cambio conformacional cuando el GDP es reemplazado por el GTP antes de que éste sea hidrolizado; G4 y G5 están involucradas en el enlazamiento del anillo de guanina del nucleótido (Spiegel, et al. 1992).

Enfocaremos nuestra atención a las proteínas Gi, cuya participación en la proliferación celular es de suma importancia (como será descrito más adelante). Se

denominan proteínas Gi (inhibitoria), porque su subunidad  $\alpha$  es capaz de unirse a la adenilato ciclasa e inhibirla (Taussig, et al. 1994). Se han clonado y purificado a tres diferentes tipos de proteínas Gi en diversas líneas celulares, estas son Gi<sub>1</sub>, Gi<sub>2</sub> y Gi<sub>3</sub> (Lester, et al. 1989).

### Esquema 1.3 ACTIVACIÓN DE UNA PROTEÍNA G



A=Agonista, Rec=Receptor, E=Efector.

Tomada de Lehninger 1993 con modificaciones.

Los pesos moleculares de las subunidades  $\alpha$  de Gi<sub>1</sub>, Gi<sub>2</sub> y Gi<sub>3</sub>, son de 41, 40 y 39 kD respectivamente y se han identificado estas subunidades en eritrocitos de pavo (Boyer, et al. 1994), células HL60 (Murphy, et al 1987), cerebro

de bovino y membranas de fibroblastos Balb/c 3T3 (La Morte, et al. 1992). Las subunidades  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  y  $\alpha_3$  tienen una gran homología entre sí y únicamente difieren en ciertos aminoácidos de la región carboxilo-terminal, de ahí que se puedan preparar péptidos sintéticos de dichas regiones específicas y anticuerpos contra las mismas (Murphy, et al. 1987).

Tanto la toxina del cólera como la toxina pertussis pueden inducir cambios en ciertas proteínas G. La toxina pertussis es capaz de llevar a cabo una ADP-ribosilación en una región específica de la región carboxilo-terminal de la subunidad  $\alpha$  de  $G_i$  y  $G_o$ . La toxina del cólera tiene este mismo efecto en la Arg<sup>201</sup> de las proteínas  $G_s$  (Spiegel, et al. 1992). La ADP-ribosilación de la proteína  $G_i$  provoca que la subunidad  $\alpha$  de esta proteína se mantenga disociada del complejo beta-gamma, inhibiendo la actividad GTPasa intrínseca de esta subunidad (Katada, et al. 1986). Más adelante se describirá con detalle la ADP-ribosilación, el efecto que ésta tiene sobre la proteína  $G_i$  y la proliferación celular.

Además de la adenilato ciclasa, existen otras proteínas efectoras como la fosfolipasa  $A_2$ , la fosfolipasa C, la fosfolipasa D y algunos canales de calcio y potasio que se acoplan con las diferentes subunidades  $\alpha$  de las proteínas  $G_i$  (Lester, et al. 1989; Kaziro, et al. 1991); sin embargo, no necesariamente todos los subtipos inhiben con la misma intensidad la actividad de la adenilato ciclasa, ya que depende del tipo de línea celular en donde estén presentes para llevar a cabo este evento (Raymond, et al. 1994; Simonds, et al. 1989).

En cuanto a las subunidades beta-gamma, también se han caracterizado diversos subtipos, en eritrocitos de pavo y cerebro de bovino (Boyer, et al. 1994), cuyo peso molecular es aproximadamente de 45 kD (Milligan and Klee, 1985; Sternweis, 1986). Se ha visto que este complejo está involucrado en la vía de las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK); (Inglese, et al. 1995).

## 1.2 GENERALIDADES DE LA ADENILATO CICLASA

La adenilato ciclasa (AC) es una enzima que se encarga de catalizar la reacción de conversión del ATP intracelular a AMPc. Esta enzima tiene un peso molecular aproximadamente de 120 kD. Contiene una región amino terminal citoplasmática corta, la cual es seguida por 6 asas transmembranales denominadas M1 y un largo dominio citoplasmático designado como C1, otras 6 asas transmembranales denominadas M2 y un segundo dominio citoplasmático C2. Existen diversas isoformas de la adenilato ciclasa que pueden ser reguladas por diferentes moduladores alostéricos (Taussig and Gilman, 1995). Tal es el caso de la proteína Gs, cuya subunidad  $\alpha$  se acopla a los dominios C1a y C2a de dicha enzima, mientras que el diterpeno forskolina, estimula directamente a la adenilato ciclasa sin la necesidad de un proceso de activación de un receptor con su proteína G y el acoplamiento a su efector. Hasta el momento no se ha determinado el sitio de unión de la subunidad  $\alpha$  de la proteína Gi con la adenilato ciclasa, pero se especula que dicha subunidad se une en la región  $\alpha 2/\alpha 3$  de C1a de la adenilato ciclasa, opuesta al sitio de unión de Gs $\alpha$  (Tang and Hurley, 1998).

## 1.3 PARTICIPACIÓN DE LA PROTEÍNA Gi EN LA PROLIFERACIÓN CELULAR

A continuación se describirán algunas evidencias de la participación de la proteína Gi en la proliferación celular. En uno de estos trabajos, por medio de un análisis de Western Blott se determinó el subtipo de proteína Gi presente en las fracciones de membranas de fibroblastos Balb/c3T3 y de cerebro de bovino. Posteriormente, a las células vivas estimuladas para proliferar con suero, se les aplicó una microinyección de anticuerpos contra la región carboxilo-terminal de las proteínas Gi $\alpha_2$  y Gi $\alpha_3$ ; se vió que el bloqueo de la acción de estas proteínas Gi tenía un efecto sobre la síntesis de DNA. Observaron una disminución en la síntesis de

DNA, acrecentándose el efecto cuando inhibieron la proteína  $G_{i\alpha_2}$  que con la  $G_{i\alpha_3}$ . Estos experimentos demostraron que la proteína Gi del subtipo  $G_{i\alpha_2}$  es un componente en la transducción de señal mitogénica (La Morte, et al. 1992).

También se ha observado en fibroblastos, que al ser mutada en dos aminoácidos Arg<sup>179</sup> y Gln<sup>295</sup> una proteína sensible a la toxina pertussis se convierte en un oncogen cuya presencia correlaciona con un incremento en la proliferación celular. Se ha sugerido además, que el factor de crecimiento IGF puede estar acoplado con esta proteína (Nishimoto, et al. 1989).

Otras evidencias sugieren la participación de la proteína Gi en la proliferación, se han obtenido de un modelo de regeneración hepática después de una hepatectomía quirúrgica parcial (HP). Al determinar los subtipos de la proteína Gi, Diehl y cols. observaron que  $G_{i\alpha_2}$  es la más abundante y que los niveles de esta proteína después de una hepatectomía parcial se incrementan a las 24 h, decrecen y luego se mantienen constantes hasta las 72 h. En cambio, los niveles de la proteína Gs, aumentan entre 1 y 2 horas después de la HP y disminuyen progresivamente a las 24, 48 y 72 h. No obstante, los niveles de Gs se conservan más altos que los de Gi. Estas variaciones de las proteínas Gs y Gi las han relacionado con la cantidad de AMPc y la actividad de la adenilato ciclasa y observan que una baja actividad de esta enzima y reducidas concentraciones de AMPc están asociados con el aumento de la proteína Gi; mientras que con el aumento en la proteína Gs sucede exactamente lo contrario; esto es: una actividad elevada de la adenilato ciclasa y un incremento en el AMPc. Por último, para correlacionar la síntesis de DNA con los niveles de AMPc se mantuvieron las células en cultivo con 8-Br-cAMP y, a las 24h, hubo una disminución en la síntesis de DNA tanto del control como de este cultivo, pero, a las 72 h el descenso fue más drástico que a las 48 h, por lo que se pudo concluir que a concentraciones bajas de AMPc y

actividad baja de la adenilato ciclasa existe mayor síntesis de DNA y sugiere que estos eventos son regulados por la proteína Gi (Diehl, et al. 1992).

#### **1.4 PARTICIPACIÓN DE LA PROTEÍNA Gi EN LA INVASIÓN Y METÁSTASIS EN OTROS TEJIDOS**

Durante la metástasis tiene lugar la adhesión, la degradación y la migración de las células tumorales, estos tres eventos ocurren en respuesta a factores quimiotácticos o haptotácticos, o la combinación de estos dos. A las proteínas Gi también las han asociado en la invasión y metástasis del linfoma sobre el hígado, pues es un órgano que puede ser infiltrado fácilmente y se ha visto que en presencia de la toxina pertussis existe una inhibición de estos eventos. Los experimentos demostraron que a las ratas inyectadas intravenosamente en la cola con linfosarcoma MB6A e hibridoma de células T (Linfocitos T activados con antígeno y células de linfoma BW5147) condujeron a la invasión y metástasis de estas células tumorales sobre el hígado, pero al ser tratadas con 1 y 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de toxina pertussis durante 4 horas, se observó una reducción de dichos eventos en el hígado. La reducción en la invasión y metástasis sobre el hígado fue alrededor de 10-25% con el hibridoma de las células T en la concentración de 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , pero en la otra concentración de 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , no se observó decremento alguno. Por otro lado, para el linfosarcoma MB6A la disminución en la metástasis sobre el hígado se observó únicamente con la dosis de toxina pertussis de 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de toxina. La toxina aparentemente interfiere en la infiltración de las células, mientras que la adhesión no se ve afectada por ésta (Ross and Van de Pavert, 1987). Asimismo, han encontrado que las proteínas G participan en la invasión y movilidad de las líneas celulares tumorales B16, de alta y baja metástasis. La proteína Gi es más abundante en la

clona B16 de alta metástasis, mientras que en la clona de baja metástasis se halla principalmente la proteína Gs (Lester, et al. 1989).

El mecanismo de acción de la subunidad  $\alpha$  de la proteína Gi no es bien conocido, pero a continuación se mencionan algunas posibles vías en donde la proteína Gi puede estar involucrada, ya sea por medio de su complejo beta-gamma, o quizá mediante una intercomunicación (crosstalking) de esta proteína y otras vías que conducen a la proliferación celular.

## **1.5 VÍAS POSIBLES QUE INVOLUCRAN A LAS PROTEÍNAS G EN LA PROLIFERACIÓN CELULAR**

### **1.5.1 PROTEÍNAS CINASAS ACTIVADAS POR MITÓGENOS (MAPK)**

Las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK) son un grupo de proteínas muy importantes en la inducción de una serie de reacciones en cascada, que tienen como fin el inicio del ciclo celular. Existen dos mecanismos en la comunicación intracelular que pueden estimular a esta vía: *los mediados por los receptores acoplados a proteínas G (GPCRs) localizados en la membrana plasmática y los llevados a cabo por receptores de tirosina cinasa (RTKs) (Lewin, 1997).*

En la vía de GPCRs, es el complejo beta-gamma de las proteínas Gi, él que con sus dominios de pleckstrina (PH) interactúa con la proteína Ras y la activa mediante el intercambio de GDP por GTP. Ras-GTP se une a Raf-1 y a su vez activa a la cinasa de MAPK (MEK) y ésta fosforila a MAPK, la cual estimula a los genes *c-fos*, *c-myc* y *c-jun*, activadores transcripcionales asociados con la mitogénesis (Inglese, et al. 1995).

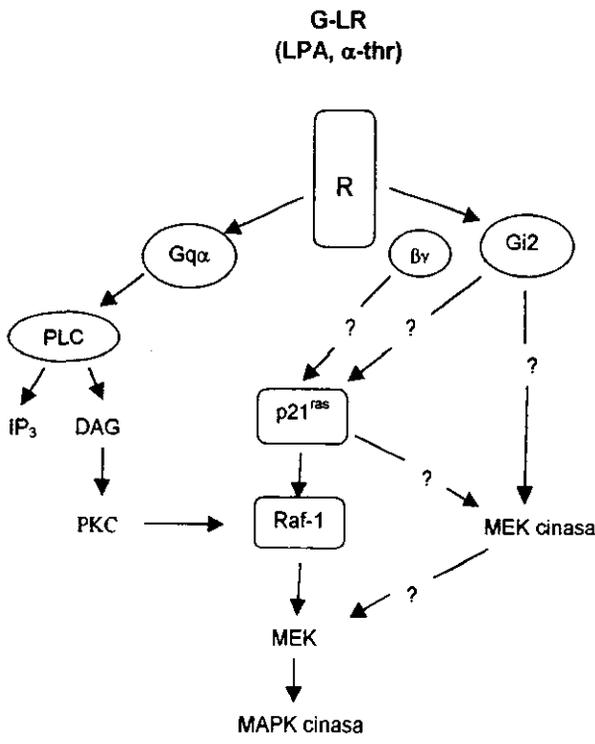
La activación de los receptores de tirosina cinasa comienza con la unión específica de un factor de crecimiento al dominio extracelular del receptor de membrana. Éste induce una dimerización, que ocurre gracias a una autofosforilación sobre los residuos intracelulares de tirosina; permitiendo la interacción de los dominios SH2 de Ras de las proteínas adaptadoras Grb2 y promoviendo la interacción entre el dominio SH3 de Grb2 y la región Sos 1 del factor de intercambio de nucleótidos de guanina (GEF). Esta última proteína interactúa con Ras, se activa y sigue el mismo mecanismo que la vía de los GPCRs (Inglese, et al. 1995).

Otra vía que activa la proliferación celular es la que involucra a la proteína Gq, que se activa de igual forma que todas las proteínas G, es decir, por el intercambio de GDP por GTP y promueve la disociación de la subunidad  $\alpha$  del compuesto heterotrimérico. Esta subunidad  $\alpha$ q también está asociada a la vía de las MAPK (Hawes, et al. 1995).

Una vez activada, la proteína Gq estimula a la fosfolipasa C (esquema 1.4) que se halla en la membrana plasmática, dando lugar a la formación de inositol-1,4,5-trifosfato ( $IP_3$ ) y diacilglicerol (DAG), que son considerados segundos mensajeros. Este último actúa sobre una enzima dependiente de calcio, la proteína cinasa C (PKC); (Torres-Márquez, 1996). Asimismo, la proteína ras es el blanco para la PKC y para las moléculas de fosfolípidos que conducen a la vía de las MAPK. Pero también se ha visto que pueden haber mecanismos independientes de Ras y de Raf; como es el caso de la PKC que fosforila residuos de serina y treonina y directamente puede activar a la proteína MEK sin necesidad de estimular a *c-raf-1*; mientras que los fosfolípidos, al unirse a dominios que enlazan lípidos de la PKC, pueden seguir un mecanismo independiente de  $p21^{ras}$  que finalmente conduce a la activación de la vía de la MAPK (Malarkey, 1995). Algunos resultados demuestran que la subunidad  $\alpha$  y el complejo beta-gamma pueden estar acoplados a diferentes

isoformas de fosfolipasa C (Boyer, et al. 1994). En diversas líneas celulares, se ha visto que la supresión de  $G_{i2}$  mejora la señalización de la vía de fosfolipasa C, porque puede haber una posible unión entre esta proteína y los reguladores de la MAPK (Gao and Malbon, 1996).

**Esquema 1. 4 DIFERENTES PROTEÍNAS G QUE CONDUCEN A LA VÍA DE LAS MAPK**



Tomada de Malarkey, et al. 1995.

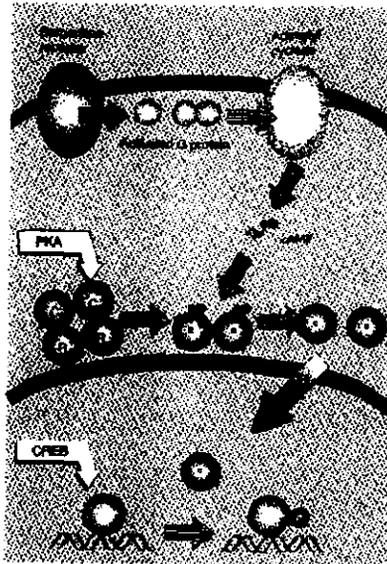
### 1.5.2 VÍA DEL AMPc

En lo que respecta a la vía de AMPc, existe una relación entre esta vía y la proliferación celular, ya que algunos estudios reportados en la literatura sugieren que los niveles incrementados en ciertas líneas celulares conducen a la proliferación celular (Dumont, et al 1989). Tal es el caso de las células neuronales PC-12, en las que inhibe a ciertas proteínas Raf (c-Raf-1 y B-Raf), pero la actividad de MEK y MAPK no se ve alterada (Vaillancourt, et al. 1994). En cambio en fibroblastos NIH 3T3 y Rat-1, los niveles elevados de AMPc provocan la anulación de la vía de la MAPK en respuesta a factores de crecimiento (Burgering, et al. 1993; Cook and McCormick, 1993). También, se ha visto en hepatocitos, que elevaciones transitorias de AMPc mejoran la inducción del EGF sobre la síntesis de DNA, mientras que incrementos sostenidos la inhiben (Diehl, et al. 1992).

Se ha sugerido que los niveles elevados de AMPc provocan un efecto sobre la regeneración del hígado. Una vez que la adenilato ciclasa es estimulada, ésta cataliza la conversión del ATP citosólico a AMPc el cual interactúa con la proteína cinasa A (PKA, ver esquema 1.5). La PKA consta de dos subunidades C y R, el AMPc se une a R y provoca la disociación de C, que se transloca al núcleo por difusión pasiva y permite que el promotor CREB (elemento regulador del AMPc) se fosforile (Lewin, et al. 1997) lo que a su vez induce la expresión de otros factores de transcripción regulados por AMPc que favorecen la proliferación. Por ejemplo, el AMPc estimula la transcripción del gen de la fosfoenolpiruvato carboxicinasa, enzima que participa en la gluconeogénesis y, por tanto, favorece el proceso regenerativo; dado el gran requerimiento de glucosa como fuente energética para llevar a cabo todos los eventos necesarios para la proliferación durante la regeneración hepática (Diehl and Rai, 1996).

La síntesis de AMPc estimulada por agonistas en la célula es controlada mediante dos proteínas G; es decir, la adenilato ciclasa puede ser estimulada por la proteína Gs o inhibida por la proteína Gi para incrementar o disminuir los niveles de AMPc respectivamente, ya que estos eventos pueden ocurrir simultáneamente dependiendo del tipo de receptores que presente la célula (Spiegel, et al. 1992). Cabe mencionar que las proteínas G son activadas como ya se mencionó anteriormente por receptores de siete dominios transmembranales; uno de éstos es el receptor  $\alpha_2$ -adrenérgico que se acopla selectivamente a las proteínas Gi. Estas una vez activadas se unen a su efector, la adenilato ciclasa, a la que inhiben (Lomasney, et. al. 1995). En el hepatoma AS-30D, se encontró una disminución de los receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos y un aumento considerable en el nivel de la proteína Gi en comparación con hepatocitos. Sin embargo, la respuesta  $\alpha_2$ -adrenérgica es de la misma magnitud en hígado y en hepatoma lo que sugiere que los niveles de AMPc modulados por el receptor  $\alpha_2$ -adrenérgico no tienen participación directa en el proceso proliferativo del hepatoma (Torres-Márquez y Piña, 1997).

## Esquema 1.5 VÍA DEL AMPc



Tomada de (Lewin, 1997).

## 1.6 TOXINA PERTUSSIS

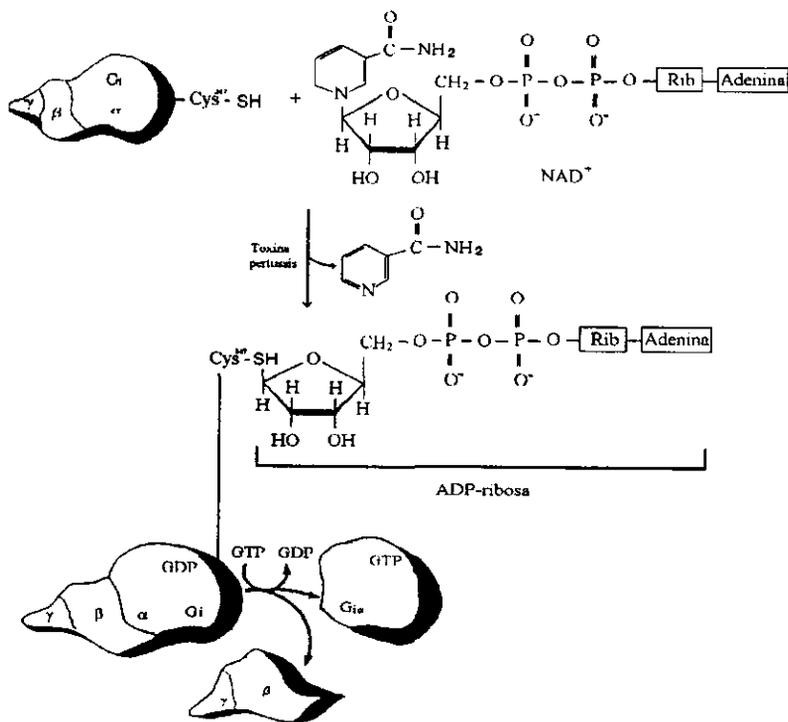
Se han aislado tres tipos de toxinas del microorganismo Bordetella pertussis, la sensible al calor o toxina dermonecrotizante (HLT), la endotoxina lipopolisacárida (LPS) y una tercera que es conocida como factor sensible a histamina (HSF), factor promotor de leucocitosis (LPF), Hemaglutinina-LPF (LPF-HA), proteína activadora de islotes (IAP) o toxina pertussis (Wardlaw and Parton, 1983).

La proteína IAP también conocida como toxina pertussis, es la de mayor importancia a nivel clínico, pues es la causante de la "tos-ferina" (Lenhinger, 1993). Se ha reportado que esta toxina tiene un peso molecular de 67-73 kD (Morse and Morse, 1976).

Se ha visto que la toxina Pertussis lleva a cabo una ADP-ribosilación en la cisteína 347 de la región carboxilo-terminal de la subunidad  $\alpha$  de la proteína Gi (West, et al. 1985; Ui, 1984 ver esquema 1.6), es decir, la toxina IAP cataliza la transferencia de una ADP-ribosa proveniente del NAD<sup>+</sup> al sitio específico de la subunidad  $\alpha$  (Stryer, 1989), conduce a un desacoplamiento de la proteína Gi del receptor transmembranal, modifica el intercambio de GDP por GTP, inhibe la actividad GTPasa (Katada, et al. 1986) y mantiene constantemente a la subunidad  $\alpha$  disociada del complejo beta-gamma. Como consecuencia, los niveles de AMPc podrían quedarse igual o incrementarse al prevenir la inhibición de la adenilato ciclasa, porque la subunidad  $\alpha$  de la proteína Gi ya no puede unirse a su efector (Murayama and Ui, 1987). Por otro lado Gi $\alpha$  se encuentra encendida y queda libre del complejo beta-gamma el cual puede estimular diferentes vías que conducen a la proliferación celular.

Diversos estudios de la incorporación con timidina tritiada demuestran que esta toxina es capaz de inhibir la síntesis de DNA en las células 3T3 estimuladas previamente con diversos factores de crecimiento (Murayama and Ui, 1987).

## Esquema 1.6 ADP-RIBOSILACIÓN DE LA TOXINA PERTUSSIS SOBRE Gi



Tomada de Lehninger, 1993 y Stryer, 1989.

## 1.7 ENSAYOS DE PROLIFERACIÓN CELULAR

El DNA y el RNA están constituidos por bases púricas o pirimídicas, monosacáridos de cinco carbonos y iones fosfato, que en conjunto se denominan nucleótidos. La adenina y la guanina se encuentran dentro de las bases púricas, mientras que a las bases pirimídicas pertenecen la citosina, la timidina y el uracilo; este último está presente sólo en el RNA.

Los ensayos clásicos de proliferación celular se basan en la incorporación de la timidina o de su análogo sintético, la bromodeoxiuridina, que contiene un bromo en lugar de un grupo metilo en la posición cinco de la base pirimídica (Stryer, 1989). El uso de éste último análogo puede hacerse por medio de una técnica colorimétrica que además, nos permite medir la síntesis de DNA con una alta sensibilidad pues emplea anticuerpos que reconocen a la BrdU en diferentes regiones antigénicas. Al introducir un segundo anticuerpo, se amplifica la señal del primero ya que contiene conjugada a la enzima fosfatasa alcalina (AP) cuya actividad genera una señal amplificada cuantitativa de la reacción del segundo anticuerpo (Harlow and Lane, 1988; Boehringer, 1996).

Basados en los antecedentes anteriores que indican la participación de la proteína Gi en la regulación de la proliferación celular y considerando la acción de la toxina pertussis sobre esta proteína, nosotros planteamos los objetivos descritos en el siguiente capítulo.

## **CAPÍTULO 2.**

### **OBJETIVOS E HIPÓTESIS**

#### **2.1 OBJETIVO GENERAL**

Determinar el efecto de la toxina pertussis sobre la incorporación de la bromodeoxiuridina y/o la proliferación celular del hepatoma AS-30D.

#### **2.2 OBJETIVOS PARTICULARES**

Cuantificar la síntesis de DNA y la proliferación celular en las siguientes condiciones:

- "*In vivo*": en las células obtenidas de ratas tratadas por 72 horas o no con la toxina pertussis.
- "*In vitro*": tras la exposición de la células a corto (4 h) o largo plazo (24 h) con toxina pertussis, o en las células control.
- Cuantificar la acción de la toxina pertussis sobre la proteína Gi y la actividad de la adenilato ciclasa en las membranas extraídas de células tratadas con y sin toxina pertussis.

#### **2.3 HIPÓTESIS**

La síntesis de DNA en el hepatoma AS-30D, se reducirá cuando las células sean tratadas con toxina pertussis.

## **CAPÍTULO 3. MATERIAL Y MÉTODOS**

### **MATERIAL Y MÉTODOS**

#### **3.1 ANIMALES**

Las células de hepatoma AS-30D fueron propagadas en ratas Wistar hembras de 250-300g de peso. Las ratas se inocularon vía intraperitoneal con 1.5 y 2 mL del líquido de ascitis (LA) donde se encuentra contenido el hepatoma y se sacrificaron por dislocación cervical, obteniendo por semana de cada una de ellas de 25 a 30 mL de líquido de ascitis con aproximadamente  $10^8$  células.

#### **3.2 TRATAMIENTO DE LAS CÉLULAS "IN VIVO" CON TOXINA PERTUSSIS**

Siete ratas fueron inoculadas con 2 mL de hepatoma y al tercer día a su sacrificio a 4 de estas ratas se les inocularon de 10-15  $\mu$ g de toxina pertussis por cada 100g de peso (García-Sáinz, et al. 1987; Pushpendran, et al. 1983). Las otras 3 ratas sirvieron como control. Al séptimo día las 7 ratas se sacrificaron por dislocación cervical. Las células se contaron y se procedió a hacer el ensayo de la incorporación de bromodeoxiuridina, como se describirá más adelante.

#### **3.3 VIABILIDAD CELULAR DEL HEPATOMA "IN VITRO"**

Para estudiar el efecto que la toxina pertussis tiene en el hepatoma *in vitro*, se buscaron primero las condiciones adecuadas para mantener a las células en cultivo por 72 horas. Se probaron diferentes concentraciones de líquido de ascitis: 0,

10, 20, 50 y 100%, en medio modificado de Dulbecco (DMEM) por varios periodos de incubación. Para lo cual, se extrajeron las células de la rata con una jeringa estéril, se contaron y se puso la cantidad correspondiente a  $1 \times 10^6$  células/pozo de una caja de cultivo de 16 pozos preparadas con las diferentes cantidades en líquido de ascitis. Todo esto se llevó a cabo bajo condiciones que preservaran la esterilidad de las células y de su medio. Se incubaron a  $37^\circ\text{C}$  en un incubador que mantiene las condiciones de  $\text{O}_2/\text{CO}_2$ , humedad y temperatura controlada durante 24, 48 y 72 horas, se tomaron muestras en los diferentes tiempos y se contaron las células. Finalmente, se graficó el porcentaje de células vivas contra las horas de incubación y se determinó en que porcentaje de líquido de ascitis se podría mantener vivas a las células.

### 3.4 TRATAMIENTO DE LAS CÉLULAS (CORTO Y LARGO PLAZO)

Las células se extrajeron de las ratas, se contaron y se repartieron  $1 \times 10^7$  células en 2 tubos bajo condiciones que preservan la esterilidad. A los dos tubos que contenían las células, se les adicionaron  $100 \mu\text{L}$  de DMEM, a uno de ellos se le agregaron  $60 \mu\text{g}$  de toxina pertussis (Crouch and Simson, 1997) mientras que el otro tubo sirvió como control. Los tubos se incubaron durante 4 h a  $37^\circ\text{C}$  con agitación para los ensayos *in vitro* a corto plazo y se les tomaron muestras para el ensayo de incorporación de la bromodeoxiuridina (BrdU). Para los ensayos de proliferación celular, una muestra de  $10^6$  células provenientes de los tubos tratados o no con toxina pertussis por 4 h se pusieron en cajas de cultivo y se les añadieron  $450 \mu\text{L}$  medio DMEM y  $50 \mu\text{L}$  de LA, luego se incubaron durante 24 y 48 h.

Para los ensayos *in vitro* a largo plazo, se obtuvieron las células en condiciones de esterilidad, se pusieron en cajas de cultivo de 24 pozos,  $10^6$  células en  $450 \mu\text{L}$  de DMEM y  $50 \mu\text{L}$  de líquido de ascitis. A 4 pozos por experimento se les

añadieron también 5  $\mu\text{L}$  de toxina pertussis (20 ng/mL) y se incubaron a 37°C durante 24 h. De estas células se tomaron muestras a las 24 h para el ensayo de la incorporación de la BrdU y a las 24 y 72 h para los ensayos de proliferación celular.

### 3.5 INCORPORACIÓN DE BROMODEOXIURIDINA

La determinación de la incorporación de BrdU se realizó según lo descrito por Wilson (1994) con algunas modificaciones como se describe a continuación: se tomaron de cada rata diferentes cantidades de células (1, 2, 3 y 5  $\times 10^6$  células) y se transfirieron a tubos Eppendorf con sus respectivos duplicados. Se añadieron 50  $\mu\text{L}$  de bromodeoxiuridina (BrdU) 100  $\mu\text{M}$  y se llevó a 1 mL. Los tubos se agitaron, se incubaron aproximadamente de 45 min - 1 h, se centrifugó durante 2 minutos en una microfuga Costar, las muestras se lavaron con solución salina 1, SS1: (NaCl 14 mM, KCl 3 mM,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  10 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.4 mM,  $\text{H}_2\text{O}$ ) pH 7.2, se centrifugaron de nuevo por 1 min, se adicionó 1 mL de HCl 2.5 N, se agitaron y se dejaron a temperatura ambiente toda la noche. Luego, las muestras se pusieron a hervir de 20 a 30 min, se lavaron con SS1 pH 7.8 y después con SS1 pH 7.2, se dejaron de hacer los lavados hasta tener un pH neutro, se agitó y se centrifugó 1min (se cuidó que no se resuspendiera el pellet). Se agregaron 50  $\mu\text{L}$  del primer anticuerpo anti-BrdU diluido 1:1000 en SS1 conteniendo albúmina de suero de bovino (BSA) al 1 % y Tween 20 al 0.5%, se agitaron suavemente y se incubaron durante 1 hora a 37°C, posteriormente se hicieron 3 lavados con SS1 pH 7.2, se adicionaron 100 $\mu\text{L}$  del segundo anticuerpo conjugado con fosfatasa alcalina diluido 1:3000 también en SS1 con BSA y Tween 20 al 1 y 0.5% respectivamente. Se incubaron durante 1 hora a 37°C, y se lavaron 2 veces con SS1 y el tercer lavado con Buffer D (dietanolamina (DEA) 10mM,  $\text{MgCl}_2$  0.5M, pH 9.5). Una vez lavado el pellet, se agregaron 1 mL de sustrato (paranitrofenilfosfato (PNPP) 10mM disuelto en buffer D), y se incubaron a 37°C. Aproximadamente a los 20 min se paró la reacción al

añadir 100  $\mu\text{L}$  de NaOH 1N. Se centrifugó por 4 min y la densidad óptica de los sobrenadantes se leyó a 405 nm. La concentración se obtuvo utilizando un coeficiente de extinción molar ( $\epsilon$ ) de  $1.62 \times 10^4 \text{ Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$  del paranitrofenol (PNP).

### **3.6 ENSAYO DEL NÚMERO CELULAR Y SU VIABILIDAD**

Se tomaron de 20 a 50  $\mu\text{L}$  de las células tratadas con y sin toxina a corto (4 h) y largo plazo (24 y 48 h), se le adicionó azul de tripano (1:1 v/v) y se contaron las células viables y no viables en una cámara de Neubauer, para determinar el porcentaje de viabilidad con respecto al total de las células tomadas. Mientras que para la proliferación celular se hizo el cálculo de células totales por caja.

### **3.7 OBTENCIÓN DE MEMBRANAS CELULARES**

Al líquido de ascitis obtenido de la rata, se le adicionaron aproximadamente 25 mL de solución salina isotónica (SSI), se centrifugó a 271 X g durante 1 minuto, se repitió el procedimiento de 2 a 3 veces, se agregaron 10 mL de BSA al 10%, se centrifugó a la misma velocidad y tiempo. Finalmente, se añadieron 25 mL de SSI y se centrifugó en las mismas condiciones. Estos lavados se dejaron de hacer hasta que las células presentaran un color rosa que significa que se encuentran libres de eritrocitos. Éstas fueron resuspendidas en SSI, en el menor volumen y una vez lavadas, se le adicionó aproximadamente de 10 a 15 mL de solución de Sacarosa 250 mM-MOPS o Hepes 20 mM-EDTA 1mM y se homogeneizó con un homogenizador Potter-Elvehjem durante 15 min. Luego se centrifugó a 1100 X g durante 5 min. Esto se repitió hasta que ya no hubiera formación de una pastilla o ésta fuera muy pequeña. Según la cantidad de sobrenadante, una tercera parte del volumen de éste, se adicionó con percoll

tomando en cuenta el volumen total del mismo. Se homogeneizó, a cada tubo de centrifugado se le añadieron 0.5 mL de sacarosa 2.2 M, se centrifugó a 31000 X g durante 40 min. Luego se tomó la interfase, se adicionaron 10 mL de tris 50 mM,  $MgCl_2$  10 mM y se centrifugó a 24000 X g durante 10 min. Por último, se resuspendieron las pastillas en el menor volumen posible, se separó una alícuota para la determinación de proteína y se congelaron para después medir la actividad de la adenilato ciclasa. La determinación de proteínas se realizó por el método de Lowry utilizando albúmina como estándar (Lowry, et al. 1951).

### 3.8 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA ADENILATO CICLASA

La actividad de la adenilato ciclasa se midió de acuerdo al método descrito por Salomon et al (1975). La activación de la adenilato ciclasa por forskolina  $10\mu M$  y forskolina  $10\mu M$  más  $GTP-\gamma S$   $10^{-4}$  M se determinó, en grupos de tubos por duplicado que contenían membranas del hepatoma con o sin pretratamiento con toxina pertussis. Al primer grupo se le determinó la actividad basal, al segundo y tercer grupo se les añadió  $10\mu M$  de forskolina y al tercer grupo se le adicionó además  $GTP-\gamma S$   $10^{-4}$  M; después se adicionaron  $50\mu L$  de **mezcla de reacción** que contenía 10 mM Teofilina, 7.4 mg/mL, Fosfocreatina y 1 mg/mL de Creatin cinasa todo esto se disolvió en buffer Tris-HCl 25 mM,  $MgCl_2$  5mM y se le agregó ATP 0.2 mM,  $[\alpha^{32}P]$  ATP 1  $\mu Ci$  y se agitó lentamente. La reacción se inició al agregar las membranas, aproximadamente 200  $\mu g$  de proteína. Se incubaron por 20 min a  $30^\circ C$  con agitación. Se paró la reacción con 990  $\mu L$  de SDS al 1% y se agitó. Se adicionó el  $[^3H]$  AMPc (aproximadamente 12000 cpm) y se agitó. El contenido de los tubos se transfirió a las columnas de Dowex AX8 y se desechó el eluato. Se lavó con 2 mL más de agua y posteriormente éstas columnas de Dowex se colocaron sobre las columnas de alúmina. Se agregaron 3 mL de  $H_2O$ , y se desechó el eluato. Se colocaron las columnas de alúmina sobre los viales y

se eluyeron con 4 mL de amortiguador de imidazol 0.1M, pH 7.5 conteniendo 0.1 mM de  $\text{NaN}_3$ , a los viales se les añadió líquido de centelleo y se cuantificó el  $[^3\text{H}]$  y el  $[\alpha^{32}\text{P}]$  en un contador de centelleo.

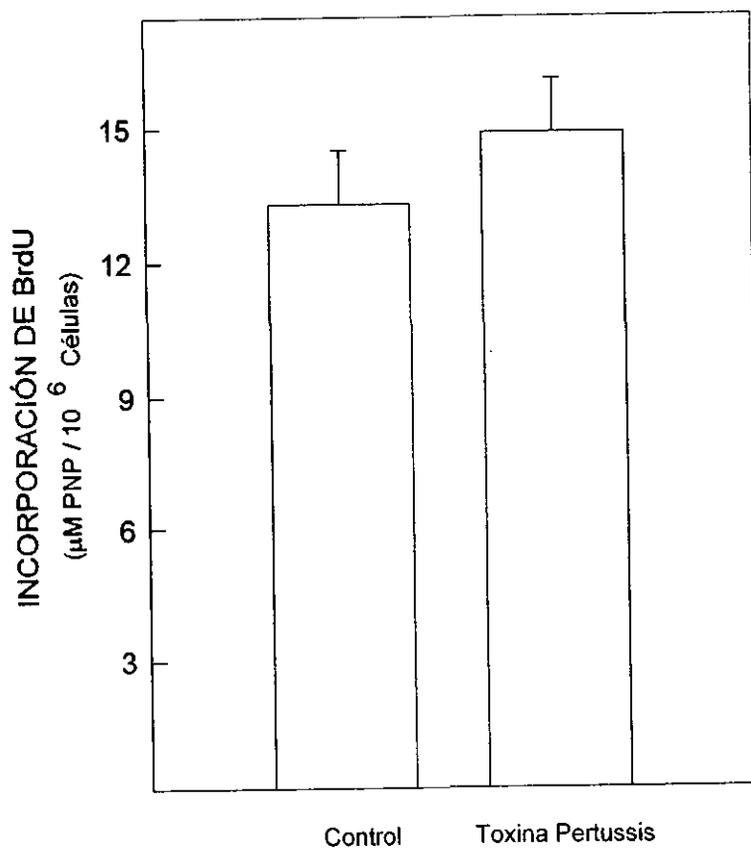
## CAPÍTULO 4. RESULTADOS

### RESULTADOS

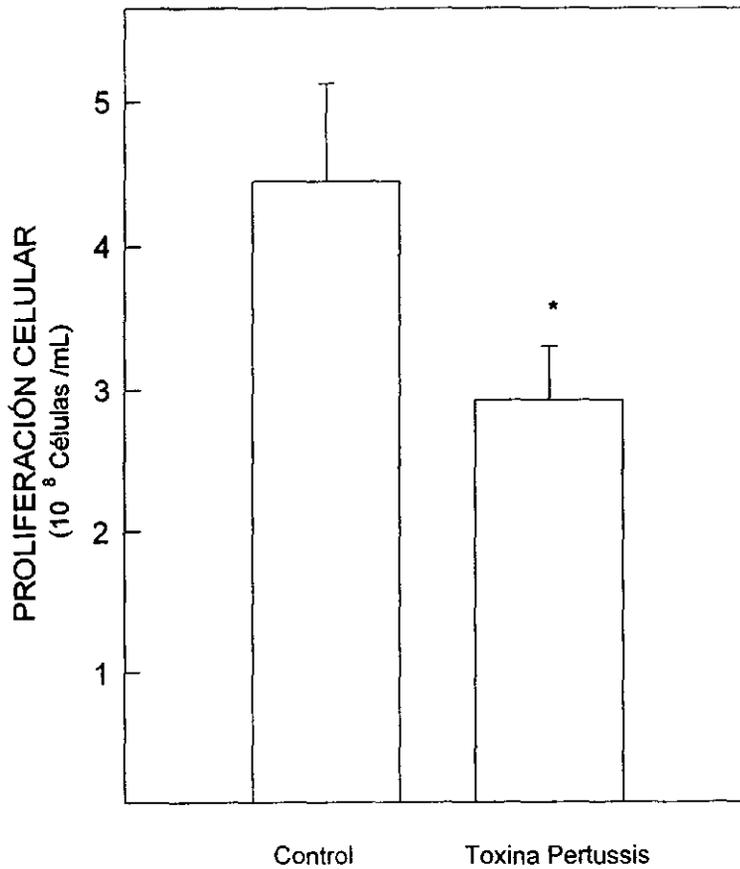
Se intentó primeramente estudiar el efecto de la toxina pertussis sobre el hepatoma *in vivo*, es decir, en su medio de desarrollo normal que es el líquido de ascitis que se forma en la rata.

Los experimentos de la síntesis de DNA y la proliferación celular *in vivo* se muestran en las figuras 4.1 y 4.2 respectivamente. La síntesis de DNA de las células que estuvieron en presencia de toxina pertussis ( $14.88 \pm 1.2 \mu\text{M PNP}/10^6$  células) fue semejante a la de los controles ( $13.30 \pm 1.2 \mu\text{M PNP}/10^6$  células). Mientras que la densidad celular de las células que estuvieron en contacto con la toxina pertussis es 15.2 % menor ( $2.93 \pm 0.38/10^8$  células) en comparación al control ( $4.45 \pm 0.68/10^8$  células). Lo que sugiere que proliferan menos.

Para asegurarnos que la toxina pertussis está en contacto con las células el tiempo suficiente, quisimos efectuar los ensayos de incorporación de BrdU y proliferación celular *in vitro*. Entonces, surgió un primer problema, ¿cómo mantener viables a estas células en cultivo?, para ello se mantuvieron a las células extraídas directamente de la rata en una solución de HEPES, glucosa y pH controlado, bajo condiciones de esterilidad. Estas células fueron incubadas durante 24 h a 37°C, en un incubador que mantiene las condiciones de  $\text{O}_2/\text{CO}_2$ , humedad y temperatura controladas. Pero a las 24 h se observó que las células no eran viables, según el criterio de exclusión de azul de tripano. Entonces, se intentó mantenerlas en medio modificado Dulbecco



**Fig. 4.1 Efecto de la toxina pertussis *in vivo* sobre la síntesis de DNA.** Las células recién obtenidas de la rata, se incubaron con bromodeoxiuridina y se siguió el procedimiento descrito en métodos. Los valores representan la media  $\bar{X} \pm$  el error estándar de la media (ESM) de 3 ó 4 experimentos realizados por cuadruplicado.



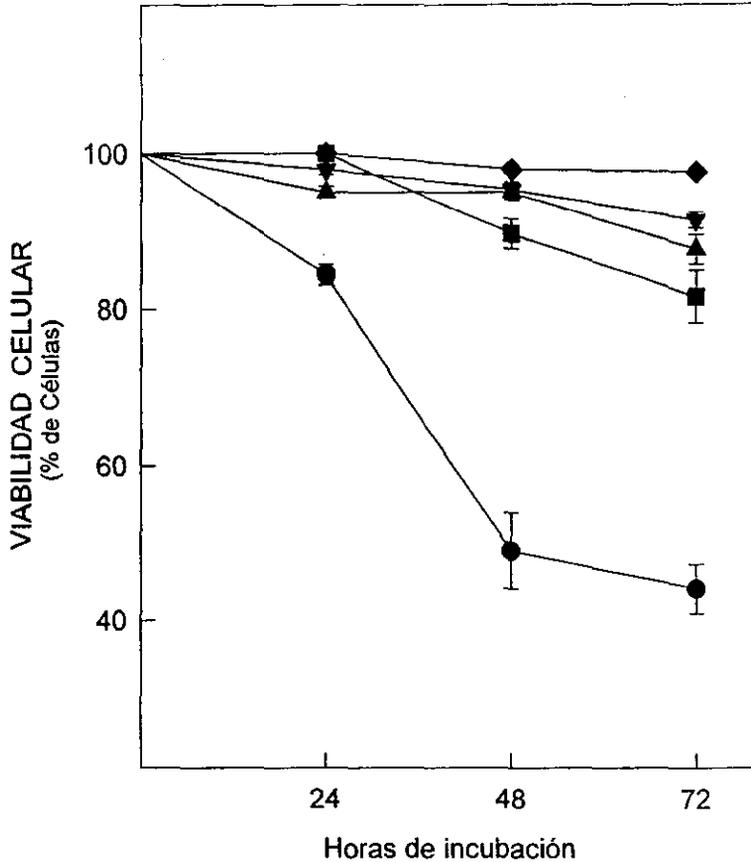
**Fig. 4.2 Efecto de la toxina pertussis *in vivo* sobre la proliferación celular.** Las células recién obtenidas fueron contadas en una cámara de Neubauer y se calculó el número de células totales. Los valores representan la  $\bar{X} \pm \text{ESM}$  de 4 experimentos realizados por duplicado.

\* Estadísticamente significativo con  $p \leq 0.05$ .

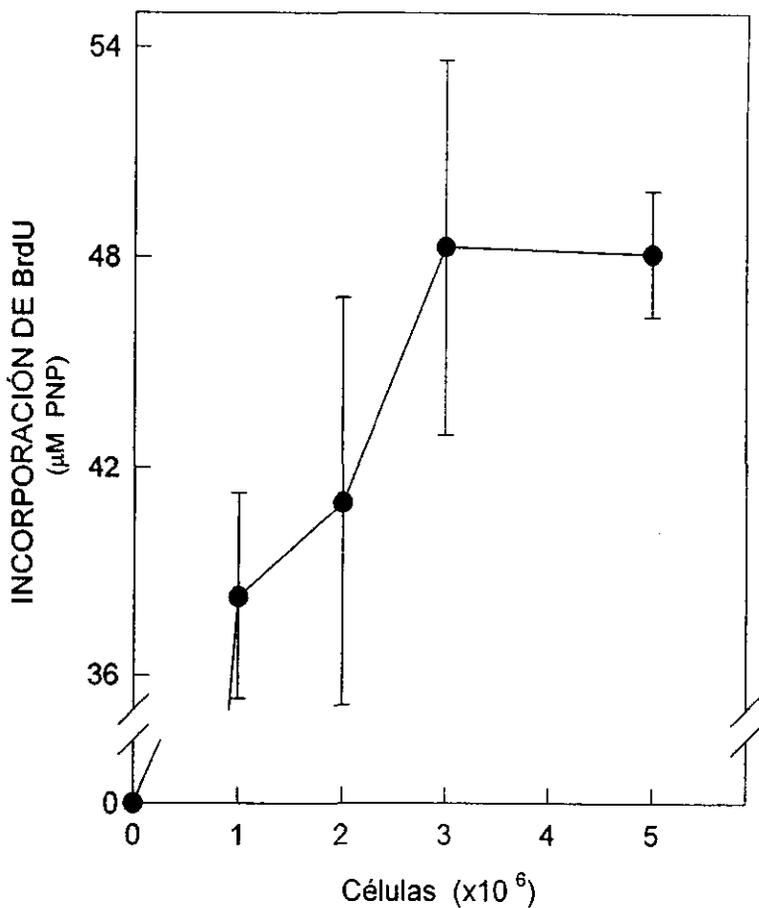
(DMEM), con diferentes concentraciones de líquido de ascitis (0, 10, 20, 50 y 100%). Las células nuevamente se incubaron por 24, 48 y 72 h en el incubador de temperatura, humedad y  $O_2/CO_2$  controlado. Como se puede ver en la figura 4.3, al adicionar únicamente el DMEM la viabilidad celular a 24 h disminuye aproximadamente un 15%, pero a las 48 y 72 h se observa un decremento más drástico entre 40 y 55%. Cuando las células se desarrollaron sólo en líquido de ascitis se ve una pequeña disminución de la viabilidad a las 48 y 72 h de 10 y 15% respectivamente. Finalmente a diferentes porcentajes de LA de 10, 20 y 50 % se observa una viabilidad del 95-98% a 24 y 48 h, a las 72 h existe una ligera disminución que no tiene diferencia estadísticamente significativa. Para los siguientes experimentos fue seleccionado el menor porcentaje de LA (10%), para evitar que interfiriera en los resultados pues, es adicionado por contener elementos no identificados que mantienen viables a estas células.

Una vez que se conocían las condiciones para mantener a las células viables hasta por 72 h, se pensó en diseñar 2 experimentos *in vitro*, uno a corto plazo (4 h) y otro a largo plazo (24 h) como se describió en la sección de métodos.

Dado que *in vitro* se podía manipular el número de células para determinar la densidad adecuada para los estudios de incorporación de BrdU, quisimos obtener el rango de células en que la incorporación del nucleótido fuera lineal. En la figura 4.4 se puede apreciar que la cantidad de BrdU incorporada va aumentando consecutivamente para  $1$  y  $2 \times 10^6$  células, pero para las poblaciones de  $3 \times 10^6$  células hasta  $5 \times 10^6$  células, esta incorporación se mantiene casi constante lo que nos indica que el sistema para medir la incorporación de BrdU en las células llega a ser limitante; por lo que se decidió trabajar con densidades celulares de  $1 \times 10^6$  células.



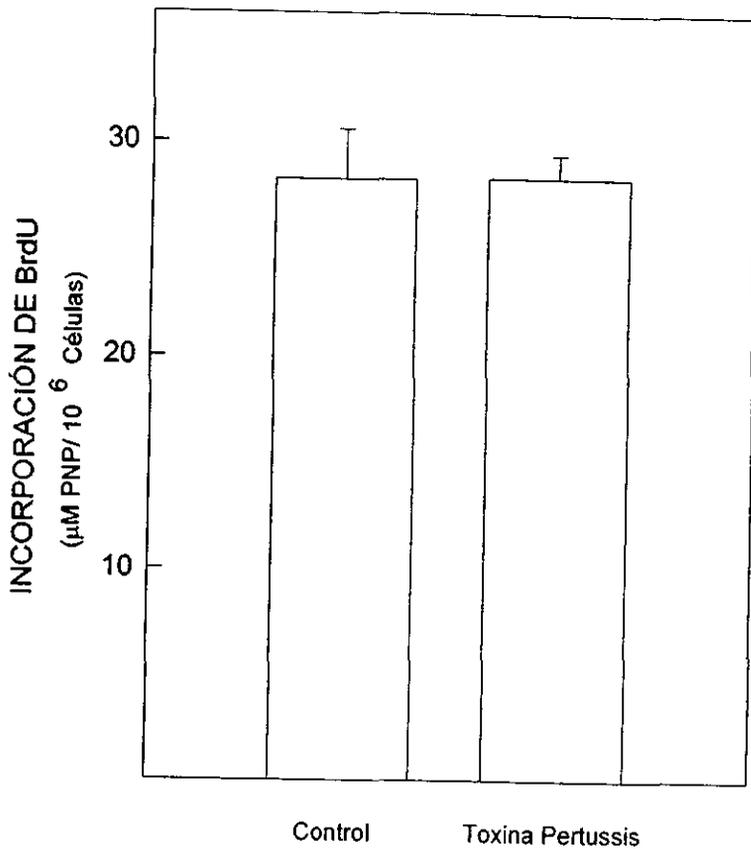
**Fig. 4.3 Efecto del líquido de ascitis sobre la viabilidad celular del hepatoma AS-30D.** Las células de hepatoma AS-30D se incubaron a las concentraciones de líquido de ascitis (LA) en DMEM representadas como se indica: (●) 0 % de LA; (▲) 10% de LA; (▼) 20% de LA; (◆) 50% de LA; (■) 100% de LA. Los puntos representan la  $X \pm$  ESM de 3 experimentos realizados por triplicado.



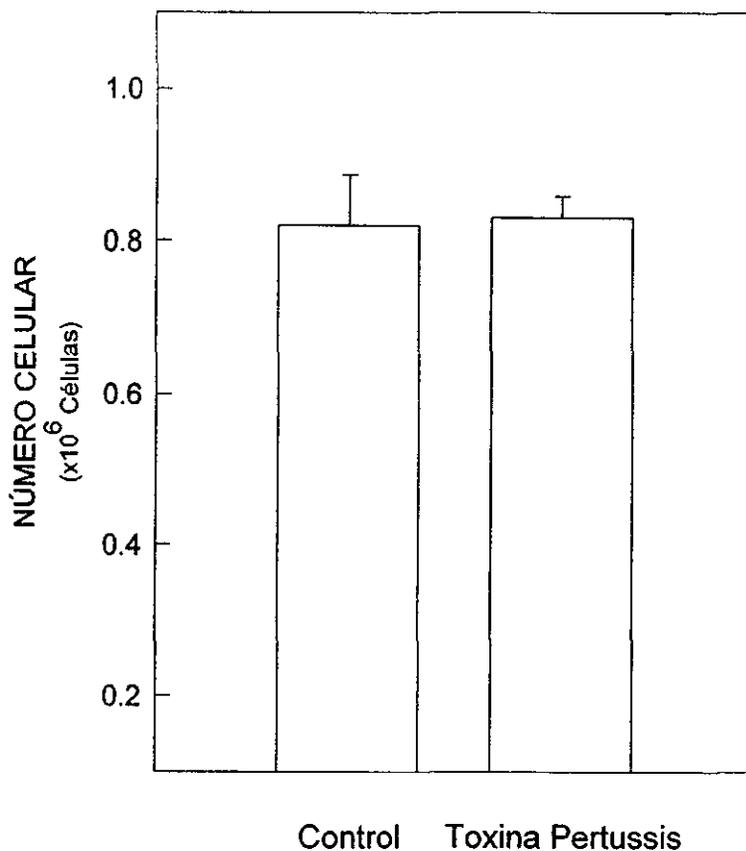
**Fig. 4.4 Dependencia del número celular de la incorporación de BrdU *in vitro*.** El ensayo de la incorporación de BrdU se realizó como se describe en métodos con el número de células indicado. Los valores representan la  $\bar{X} \pm \text{ESM}$  de 3 experimentos realizados por triplicado.

Con las condiciones establecidas para la incorporación de BrdU, se realizó este experimento en células cultivadas a corto plazo (4 h). Como se puede ver en la figura 4.5, ésta es la misma para las células tratadas o no con toxina pertussis ( $28.33 \pm 1.09 \mu\text{M PNP}/10^6$  células vs  $28.25 \pm 2.32 \mu\text{M PNP}/10^6$  células, respectivamente). El número celular representado en la figura 4.6 se puede apreciar que también es el mismo en presencia o ausencia de toxina pertussis ( $0.83 \pm 0.029/10^6$  células vs  $0.82 \pm 0.067/10^6$  células, respectivamente). Estos resultados no correlacionan con el efecto que la toxina pertussis tuvo sobre la síntesis de DNA en el hepatoma *in vivo*. Entonces, para ver si el efecto de la toxina dependía del tiempo de incubación con las células, se hicieron los experimento a largo plazo. En la figura 4.7 podemos observar un 11.2% de disminución en la síntesis de DNA en las células tratadas con toxina pertussis en relación a las células control ( $35.06 \pm 1.64 \mu\text{M PNP}/10^6$  células vs  $39.25 \pm 2.20 \mu\text{M PNP}/10^6$  células, respectivamente). La toxina pertussis no tuvo un efecto apreciable sobre el número celular a largo plazo (24 h, figura 4.8) ya que se registraron  $1.08 \pm 0.061/10^6$  células vs  $1.13 \pm 0.054/10^6$  células, en las células control y tratadas con toxina pertussis respectivamente. En los experimentos de proliferación celular en presencia de toxina, la viabilidad de las células a corto y largo plazo se encuentra arriba del 95%.

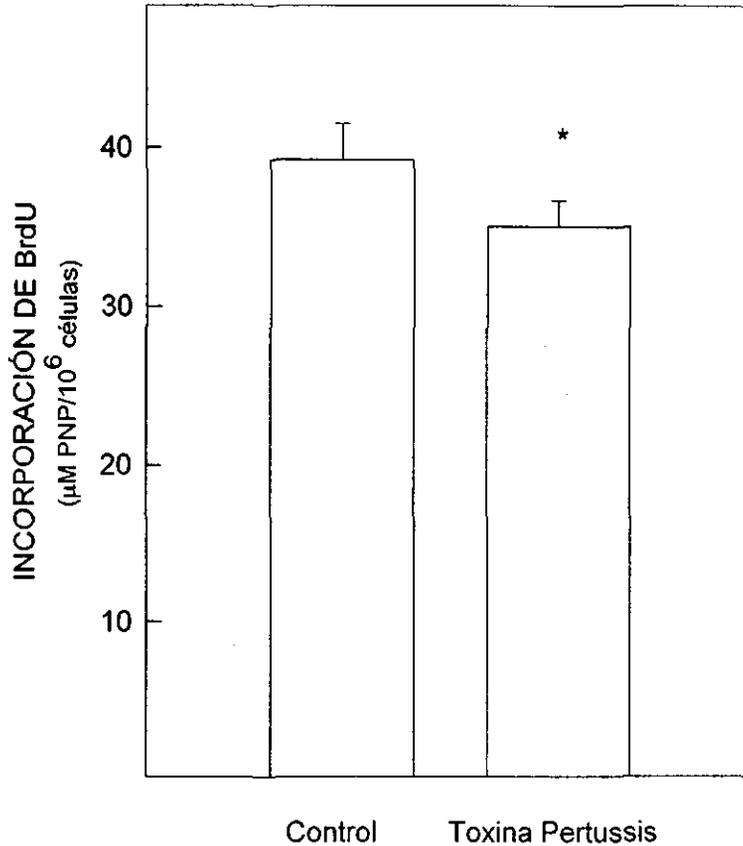
Dado que las células del hepatoma no están sincronizadas y el efecto de la toxina pertussis podría reflejarse tardíamente en el crecimiento celular, se determinó el número celular a las 48 h de haberse sembrado. En estas condiciones, en la figura 4.9, se aprecia un 11.3% de disminución en la proliferación celular de las células expuestas a la toxina pertussis en comparación a las células control ( $1.08 \pm 0.054/10^6$  células vs  $1.22 \pm 0.078/10^6$  células, respectivamente). Aquí si se puede pensar que el efecto es sobre la proliferación celular pues la población celular es mayor a la inicial y a la presente a 24 h (ver figuras 4.8 y 4.9).



**Fig. 4.5 Efecto de la toxina pertussis sobre la síntesis de DNA *in vitro* (Corto plazo).** Las células de hepatoma AS-30D se incubaron a 37 °C con o sin toxina pertussis (20 ng/mL) durante 4 h. La determinación de la incorporación de BrdU se realizó como se describe en métodos. Los valores representan la  $X \pm \text{ESM}$  de 2 experimentos realizados por cuadruplicado.

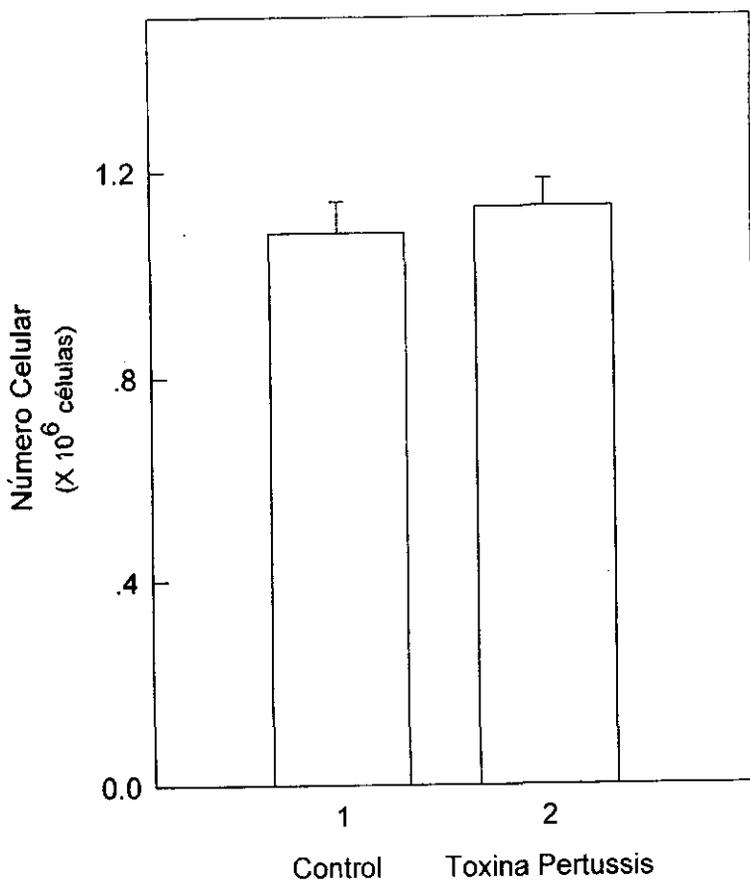


**Fig. 4.6 Efecto de la toxina pertussis sobre la proliferación celular *in vitro* (Corto plazo).** Las células de hepatoma se incubaron a 37 °C por 4 h con y sin toxina Pertussis (20 ng/mL). Posteriormente se transfirieron a DMEM con 10 % de líquido de ascitis bajo condiciones de temperatura, humedad y O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> controlados, como se describe en métodos. Se contaron las células en una cámara de Newbauer y los resultados representan la X ± ESM de 4 experimentos realizados por cuadruplicado.

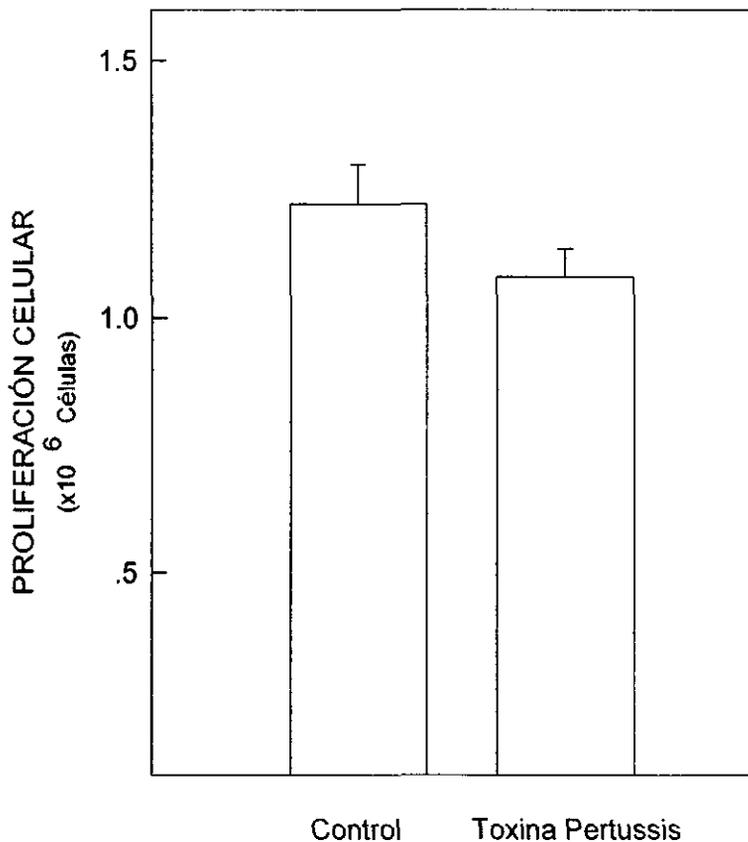


**Fig. 4.7 Efecto de la toxina pertussis sobre la síntesis de DNA *in vitro* (Largo plazo).** Las células de hepatoma AS-30D se incubaron a 37 °C con o sin toxina Pertussis (20 ng/mL) durante 24 h. La determinación de la incorporación de BrdU se realizó como se describe en materiales y métodos. Las barras representan la  $\bar{X} \pm \text{ESM}$  de 4 experimentos realizados por cuadruplicado.

\* Estadísticamente significativo con  $p \leq 0.05$ .

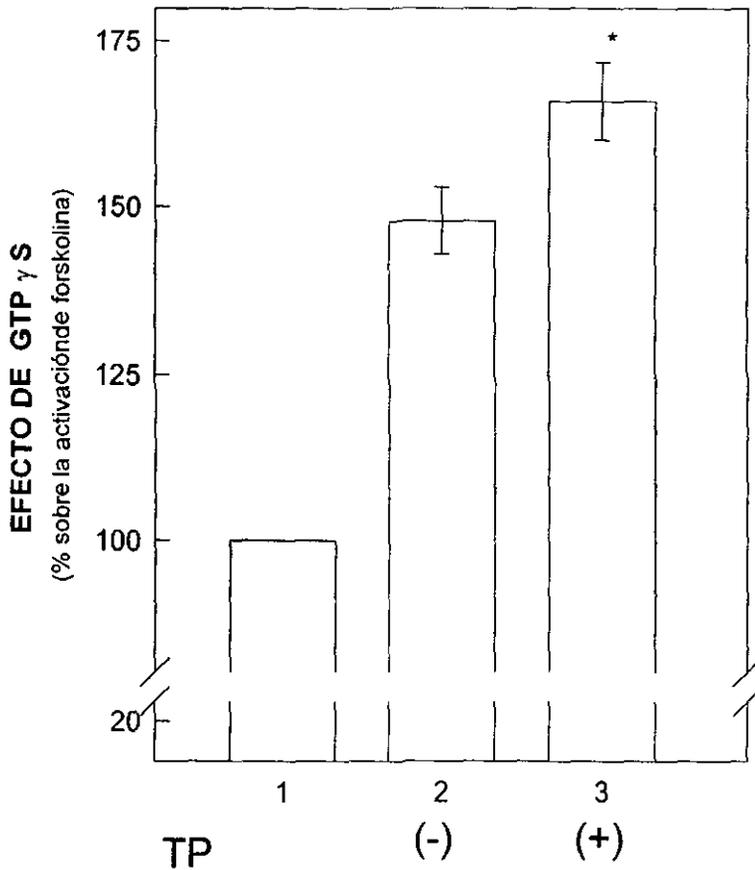


**Fig. 4.8 Efecto de la toxina pertussis sobre la proliferación celular *in vitro* (Largo plazo).** Las células de hepatoma incubadas a 37°C por 24 h con o sin toxina pertussis, en DMEM conteniendo 10 % de líquido de ascitis, Bajo condiciones de esterilidad. Se contaron las células en una cámara de Newbauer y los resultados se expresan como la  $X \pm \text{ESM}$  de 2 experimentos realizados por cuadruplicado.



**Fig. 4.9 Efecto de la toxina pertussis sobre la proliferación celular *in vitro* (Largo plazo, 48 hrs).** Las células de hepatoma se incubaron a 37°C en DMEM con 10% de LA, con o sin toxina pertussis por 24 h y se dejaron incubando otras 24 h, en ausencia de toxina pertussis, se contaron en una cámara de Newbauer y los resultados se expresan como la  $X \pm$  ESM de 4 experimentos realizados por cuadruplicado.

Finalmente comprobamos que la toxina pertussis ejerció su efecto sobre la proteína Gi al desacoplarla de su efector. En la figura 4.10 se observan 3 barras que representan la activación de la adenilato ciclasa en membranas tratadas con y sin toxina *in vivo*. En la primera de ellas, se aprecia la activación con forskolina de las membranas con o sin pretratamiento con toxina pertussis, siendo éste el valor que nos proporciona el 100% de activación de esta enzima. La segunda barra, refleja la activación de la adenilato ciclasa en las membranas tratadas sin toxina o controles, con forskolina pero, además, con GTP- $\gamma$ S un análogo no hidrolizable del GTP y se observa un aumento en la activación de la enzima del 70% aproximadamente sobre el efecto de forskolina. La tercera columna muestra que en las membranas tratadas con toxina pertussis el porcentaje de estimulación por GTP- $\gamma$ S sobre el de forskolina es alrededor de un 20% menor con respecto a las membranas sin toxina ( $166 \pm 5.8\%$ ).



**Fig. 4.10 Efecto del pretratamiento del hepatoma AS-30D con toxina pertussis *in vivo* sobre la activación de la adenilato ciclasa por GTP $\gamma$ S.** La reacción de la adenilato ciclasa se midió en membranas control o pretratadas con toxina pertussis. La columna 1 representa el porcentaje de activación por forskolina 10 mM. Las columnas 2 y 3 expresan la actividad de la adenilato ciclasa de las membranas provenientes del hepatoma control (2) y pretratadas con toxina pertussis (3) activadas con forskolina 10 mM + GTP $\gamma$ S 100 mM. Los valores representan la  $X \pm$  ESM de 2 ó 4 experimentos realizados por triplicado.

\* Estadísticamente significativo  $p \leq 0.01$ .

## CAPÍTULO 5. DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN

### DISCUSIÓN

Nosotros esperábamos un efecto inhibitorio de la toxina Pertussis, sobre la síntesis de DNA y por ende en la proliferación celular, porque esta toxina al llevar a cabo una ADP-ribosilación en la cadena lateral de una cisteína de la subunidad  $\alpha$  de la proteína Gi (Spiegel, et al. 1992) la mantiene disociada del complejo beta-gamma (Katada, et al. 1986) y queda desacoplada tanto del receptor (Spiegel, et al. 1992) como del efector, la adenilato ciclasa (Katada, et al. 1986) y, según resultados en la literatura (La Morte, et al. 1992;) esta subunidad participa en la proliferación celular, aunque el mecanismo no es bien conocido. Cabe señalar que la subunidad  $\alpha$  de la proteína Gi no es la única que participa en la vía de proliferación celular, el complejo beta-gamma al quedar libre después de la ADP-ribosilación mediada por la toxina, puede estar involucrado en la proliferación vía de las MAPK (Inglese, et al. 1995).

En lo que se refiere a las células tratadas con toxina *in vivo*, se observó un decremento en la proliferación celular, aunque la síntesis de DNA no se vio afectada. Lo que sugiere que la proteína Gi podría estar afectando la proliferación celular en un evento posterior a la síntesis de DNA. En éste sentido, Crouch y Simson (1997) encontraron en fibroblastos que la toxina pertussis no afectó la síntesis de DNA, pero sí la mitosis. Ellos observaron que: a) la estimulación de las células con agonistas que llevan a la síntesis de DNA, inducen la migración de la proteína Gi heterotrimérica al núcleo, lo cual no se ha explicado aún, puesto que la acción de las hormonas normalmente induce la disociación del trímero: b) además, estos agonistas estimulaban la unión de  $\alpha$ Gi a la cromatina durante la mitosis. Este último efecto fue el que se afectó, en su sistema por la presencia de la toxina pertussis. Desafortunadamente, no pudimos constatar un efecto similar en nuestro

sistema por no contar con un método suficientemente sensible para la detección de  $\alpha$ Gi. Otro factor que posiblemente estuviera afectando la proliferación del hepatoma, sería el efecto que la toxina misma tuviera sobre el metabolismo (García-Sáinz et al, 1987) de las ratas portadoras del hepatoma, sin embargo, creemos que de ser este el caso; los eventos a afectarse serían los de la fase S, que requieren mayor aporte energético, sin embargo, al menos la síntesis de DNA es semejante al de las ratas no tratadas con la toxina.

Al comparar los resultados de los ensayos *in vivo* e *in vitro* de la incorporación de BrdU (Fig. 4.1 y 4.7) ésta es más del doble en el ensayo *in vitro* que en el ensayo *in vivo*, lo que probablemente se deba a que la toxina no esté ejerciendo su efecto de activación al mismo tiempo y a la misma concentración sobre las células de hepatoma cuando este se encuentra *in vivo*, pues quizá se absorba y llegue a diferentes tejidos y ahí esté provocando un efecto que no fue medido. Algunos experimentos revisados en la literatura del efecto de la toxina pertussis en la proliferación celular en diferentes líneas celulares fueron hechos *in vitro* y realmente se aprecia un efecto inhibitorio sobre la síntesis de DNA (Lester, et al. 1989; La Morte, et al. 1992) pero, en nuestros ensayos de la incorporación de BrdU *in vivo* no se observa tal efecto inhibitorio en presencia de la toxina pertussis.

En cuanto al ensayo de la incorporación de BrdU y del número celular *in vitro* a corto plazo los resultados son iguales en ambos casos (Fig. 4.5 y 4.6) pero con respecto a la síntesis de DNA a largo plazo, se observa mayor incorporación de las células control que de las células tratadas con toxina pertussis (Fig. 4.7) y esto coincide con lo que esperábamos, aunque en el ensayo del número celular se aprecian prácticamente iguales (Fig. 4.8).

Por otro lado, sí podemos decir que se detectó proliferación celular a las 48 h *in vitro*, porque al comparar los resultados de las células tratadas sin toxina

(control) a las 24 h (Fig. 4.8) y posteriormente a las 48 h (Fig. 4.9) se puede observar un aumento en el número celular. En las células tratadas con toxina se aprecia una disminución del número celular en comparación a las células control, lo cual sugiere que la toxina probablemente si esté produciendo un efecto sobre la proliferación celular y quizá el tiempo de incubación con toxina juegue un papel importante en dicho evento.

En lo que se refiere a la medición de forma indirecta del efecto de la toxina pertussis sobre la proteína  $G_i$ , ésta fue hecha mediante la cuantificación de la actividad de la adenilato ciclasa. Primeramente, las membranas del hepatoma de las ratas tratadas con y sin toxina se les adicionó forskolina, la cual estimula de manera directa a la adenilato ciclasa y así se obtiene una estandarización de esta actividad para los demás experimentos. Posteriormente, en las membranas tratadas sin toxina al añadirles un análogo no hidrolizable del GTP ( $GTP-\gamma S$ ), se observa un efecto sinérgico ya que dicho análogo activa a las proteínas G. La activación de  $G_s$  y  $G_i$  que estimulan e inhiben respectivamente a la adenilato ciclasa, nos proporcionan un efecto de los dos eventos que se llevan a cabo en las células no tratadas con la toxina pertussis ( $148 \pm 5.0\%$ ). Pero cuando los experimentos se realizaron con membranas tratadas con toxina pertussis, nos pudimos percatar de que la toxina pertussis probablemente sí modificó a la proteína  $G_i$ , al observarse que esta no disminuyó la actividad de la adenilato ciclasa y, por tanto, se observa un incremento de  $166 \pm 5.8\%$  de la actividad de la adenilato ciclasa, atribuible a la acción de  $G_s$ .

De acuerdo a los antecedentes reportados en hepatocitos, las elevaciones transitorias de AMPc conducen a la proliferación celular y ésta se inhibe por elevaciones sostenidas de AMPc. Así, la acción de  $G_i$  se asocia con una actividad baja de la adenilato ciclasa y concentraciones bajas de AMPc (Diehl, et al. 1992). Nuestros resultados pudieran ser explicados por los efectos del AMPc, esto es, en

presencia de toxina pertussis los niveles de AMPc deben estar aumentados y, por lo tanto, conducirían a una disminución en la síntesis de DNA. Cabe mencionar que en trabajos previos se encontró que la proteína Gi en el hepatoma AS-30D se halla 9 veces más abundante en relación al hígado, lo que sugiere que esta proteína podría estar involucrada en diferentes vías de transducción de señales, aunque no sabemos qué receptor la estimula o la inhibe, debido a que la respuesta  $\alpha$ 2-adrenérgica es de la misma magnitud en el hepatoma que en el hígado (Torres-Márquez y Piña, 1997).

Y tampoco sabemos en realidad, si la subunidad  $\alpha$  de Gi ejerza una mayor contribución en la proliferación celular o el complejo beta-gamma, pues existen evidencias de la disminución en la síntesis de DNA por medio de la inhibición con anticuerpos sobre la región carboxilo-terminal de la subunidad  $\alpha$  (La Morte, et al. 1992). El bloqueo del complejo beta-gamma por algún anticuerpo, podría ser de utilidad para responder esta pregunta. De esta manera podríamos saber si una subunidad es dependiente de la otra para llevar a cabo su efecto en la proliferación o si solas lo hacen de igual forma. Esta proteína Gi, además de estar ejerciendo un efecto sobre esta vía, también, podría estar actuando como un modulador de otras vías relacionadas con la proliferación, como la descrita para Gq, debido al entrecruzamiento (crosstalk) que existe entre diferentes vías.

## CONCLUSIÓN

Nuestros resultados sugieren un efecto inhibitorio de la toxina pertussis sobre la proliferación celular del hepatoma *in vivo*, mediado por la proteína Gi.

## APÉNDICE A

### ***Esquemas y Figuras***

	<b>Págs.</b>
<b>Esquema 1.1</b> Ciclo celular	2
<b>Esquema 1.2</b> Etapas del cáncer	4
<b>Esquema 1.3</b> Activación de una proteína G	7
<b>Esquema 1.4</b> Diferentes vías que conducen a la vía de las MAPK	14
<b>Esquema 1.5</b> Vía del AMPc	17
<b>Esquema 1.6</b> ADP-ribosilación de la toxina pertussis sobre la proteína Gi	19
<b>Figura 4.1</b> Efecto de toxina pertussis <i>in vivo</i> sobre la síntesis de DNA	29
<b>Figura 4.2</b> Efecto de toxina pertussis <i>in vivo</i> sobre la proliferación celular	30
<b>Figura 4.3</b> Efecto del líquido de ascitis sobre la viabilidad celular del hepatoma AS-30D	32
<b>Figura 4.4</b> Dependencia del número celular de la incorporación de BrdU <i>in vitro</i>	33
<b>Figura 4.5.</b> Efecto de toxina pertussis sobre la síntesis de DNA <i>in vitro</i> corto plazo (4 h)	35
<b>Figura 4.6</b> Efecto de la toxina pertussis sobre la proliferación celular <i>in vitro</i> corto plazo (4 h)	36
<b>Figura 4.7</b> Efecto de la toxina pertussis sobre la síntesis de DNA <i>in vitro</i> largo plazo (24 h)	37
<b>Figura 4.8</b> Efecto de la toxina pertussis sobre la proliferación celular <i>in vitro</i> largo plazo (24 h)	38

<b>Figura 4.9</b> Efecto de la toxina pertussis sobre la proliferación celular <i>in vitro</i> largo plazo (48 h)	39
<b>Figura 4.10</b> Efecto del pretratamiento del hepatoma AS-30D con toxina pertussis <i>in vivo</i> sobre la activación de la adenilato ciclasa por GTP- $\gamma$ S	41

## BIBLIOGRAFÍA

- Ain, J.F., Gouillat, Ch., Bertrand, S., Fourel, I., Guillaud, M., Sagier, G y Trepo, Ch. (1993) Histopathological assessment of tumoral destruction by alcoholization in an experimental model of human hepato-cellular carcinoma transplanted in nude mice. *Eur. J. Surg. Onc.* 19: 561-566.
- Amatruda, T.T., Gautam, N., Fong, H.K, Northup, J.K., y Simon, M.I. (1988) The 35- and 36-kDa beta subunits of GTP-binding regulatory proteins are products of separate genes. *J. Biol. Chem.* 263: 5008-11.
- Bos, J.L. (1989) *ras* Oncogenes in Human Cancer: A Review. *Cancer Res.* 49: 4682-4689.
- Boyer, J.L., Graber, S.G., Waldo, G.L., Harden, K. y Garrison, J.C. (1994) Selective activation of phospholipase C by recombinant G-protein  $\alpha$ - and  $\beta\gamma$ - subunits. *J. Biol. Chem.* 269: 2814-2819.
- Boehringer-Mannheim. Cell Proliferation (1996) Biochemicals Catalog. Lakeside Germany. pp. 210.
- Burgering, B.M.T., Pronk, G.J., Van Weeren, P.C., Chardin, P. y Bos, J.L. (1993) cAMP antagonizes p21 super(*ras*)-directed activation of extracellular signal-regulated kinase 2 and phosphorylation of mSos nucleotide exchange factor. *EMBO J.* 12: 4211-4220.
- Cook, S.J. y McCormick, F. (1993) Inhibition by cAMP of *ras*-dependent activation of rat. *Science* 262:1069-1072

- Crouch, M.F., y Simson, L. (1997) The G-protein Gi regulates mitosis but not DNA synthesis in growth factor-activated fibroblasts: a role for the nuclear translocation of Gi. *FASEB J.* 11:189-198.
  
- Diehl, A.M., Yang, S.Q., Wolfgang, D., y Wand, G. (1992) Differential expression of guanine nucleotide binding proteins enhances cAMP synthesis in regenerating rat liver. *J. Clin. Invest.* 89: 1706-1712.
  
- Diehl, A.M., y Rai, R.M. (1996) Regulation of signal transduction during liver regeneration. *FASEB J.* 10: 215-227.
  
- Dumont, J.E., Jauniaux, J.C. y Roger, P.P. (1989) The cyclic AMP-mediated stimulation of cell proliferation. *TIBS* 14: 67-71.
  
- Gao, P., y Malbon, C.C. (1996) Morphogen-induced decline in Gi $\alpha_2$  triggers F9 teratocarcinoma stem cell progression via phospholipase C and mitogen-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.* 271: 9002-9008.
  
- García-Sáinz, J.A., Juárez-Ayala, J. y Valles, V.E. (1987) Pertussis toxin induces fatty liver, hyperlipemia and ketosis in hamsters. *Toxicol* 25: 603-609.
  
- Gardner, A.M., Vaillancourt, R.R., y Johnson, G.L. (1993) Activation of mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase by G protein and tyrosine kinase oncoproteins. *J. Biol. Chem.* 268: 17896-17901.
  
- Gautam, N., Baetscher, M., Aebersold, R., y Simon, M.I. (1989) A G-protein gamma subunit shares homology with *ras* proteins. *Science* 244: 971-974.

- Gilman, A.G. (1987). G Proteins: transducers of receptor-generated signals. *Annu. Rev. Biochem.* 56: 615-649.
  
- Harlow, E. and Lane, D. (1988) Antibody-antigen interactions. In: *Antibodies*, Harlow y Lane Eds. Cold Spring Harbord, USA. pp 23-33
  
- Harrison: Isselbacher, K.J., Braunwald, E., Wilson, J.D. Martin, J.B., Fauci, A.S., Kasper, D.L. "PRINCIPIOS DE MEDICINA INTERNA" Vol. II. Edit. Interamericana-McGraw Hill. 11<sup>a</sup> Edición. México, (1987). pp. 1651-1652.
  
- Hawes, B.E., Van Biesen, T., Koch, W.J., Lutrell, L.M., y Lefkowitz, R.J. (1995) Distinct pathways of Gi- and Gq- mediated mitogen-activated protein kinase activation. *J. Biol. Chem.* 270: 17148-17153.
  
- Hernández, L. (1995). Curso de Toxicología. Fac. Química. UNAM.
  
- Inglese, J., Koch, W.J., Kazushige, T., y Lefkowitz, R.J. (1995). G $\beta$  interactions with PH domains and *ras*-MAPK signaling pathways. *TIBS* 20: 151-156.
  
- Katada, T., Oinuma, M., y Ui, M. (1986). Mechanisms for inhibition of the catalytic activity of adenylate cyclase by the guanine nucleotide-binding proteins serving as the substrate of islet-activating protein, pertussis toxin. *J. Biol. Chem.* 261: 5215-5221.
  
- Kaziro, Y., Itoh, H., Kozasa, T., Nakafuku, M. y Satoh, T. (1991) Structure and function of signal-transducing GTP-binding proteins. *Annu. Rev. Biochem.* 60: 349-400.

- La Morte, V.K., Goldsmith, P.K., Spiegel, A.M., Meinkoth, J.L., y Feramisco, J.R. (1992) Inhibition of DNA synthesis in living cells by microinjection of Gi<sub>2</sub> antibodies. *J. Biol. Chem.* 267: 691-694.
- Lehninger, A.L., Nelson, D.I., y Cox, M.M. "PRINCIPIOS DE BIOQUÍMICA". Edit. OMEGA, S.A. 2a edición. Barcelona, (1993). pp. 773-776.
- Lester, B.R., McCarthy, J.B., Sun, Z., Smith, R.S., Furcht, L.T. y Spiegel, A.M. (1989) G-protein involvement in matrix-mediated motility and invasion of high and low experimental metastatic B16 melanoma clones. *Cancer Res.* 49: 5940-5948.
- Lewin, B. GENES VI. Edit. Oxford University Press. 1a edición. New York, (1997). Pp. 1070-1080, 1089-1091.
- Lomasney, J.W., Allen, F.L., y Lefkowitz, R.J. Molecular Endocrinology: Basic Concepts and Clinical correlations, edited by Bruce D. Weintraub. Raven Press. Ltd., New York. (1995). Capítulo. 10. 1198-1209.
- Lowry, OH, Rosebrough, NJ, Lewis-Farr, A y Randall R.J (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem* 193: 265-275.
- Lyons, J., Landis, C.A., Harsh, G., Vallar, L., Grünewald, K., Feichtinger, H., Duh, Q.Y., Clark, O.H., Kawasaki, E., Bourne, H.R., y McCormick, F. (1990) Two G protein oncogenes in human endocrin tumors. *Science.* 249: 655-659.
- Malarkey, K., Belham, Ch. M., Paul, A., Graham, A., McLees, A., Scott, P.H., y Plevin, R. (1995) The regulation of tyrosine kinase signalling pathways by growth factor and G-protein-coupled receptors. *Biochem. J.* 309: 361-375.

- Milligan, G., y Klee, W.A. (1985) The inhibitory guanine nucleotide-binding protein (Ni) purified from bovine brain is a high affinity GTPase. *J. Biol. Chem* 260: 2057-2063.
  
- Morse, S.I., y Morse, J.H. (1976) Isolation and properties of the leukocytosis and lymphocytosis-promoting factor of Bordetella pertussis. *J. Exp. Med.* 143: 1483-1502.
  
- Murayama, T., y Ui, M. (1987) Possible involvement of a GTP-binding protein, the substrate of islet activating protein in receptor-mediated signaling responsible for cell proliferation. *J. Biol. Chem.* 262: 12463-12467.
  
- Murphy, P.H., Eide, B., Goldsmith, P., Brann, M., Gierschik, P., Spiegel, A., y Malech, H.L. (1987) Detection of multiple forms of  $G_{i\alpha}$  in HL60 cells. *FEBS Lett.* 221:81-86.
  
- Neer, E.J. (1995) Heterotrimeric G proteins: organizers of transmembrane signals. *Review. Cell.* 80: 249-258.
  
- Nishimoto, I., Murayama, Y., Katada, T., Ui, M., y Ogata, E. (1989) Possible direct linkage of insulin-like growth factor-II receptor with guanine nucleotide-binding proteins. *J. Biol. Chem.* 264: 14029-14038.
  
- Pushpendran, C.K., Corvera, S., y García-Sáinz, J.A. (1983) Effect of pertussis toxin on hormonal responsiveness of rat hepatocytes. *FEBS Lett.* 160: 198-202.
  
- Raymond, J.R., Arthur, J.M., Casañas, S.J., Olsen, C.L., Gettys, T.W., y Mortensen, R.M. (1994)  $\alpha_{2A}$  Adrenergic receptors inhibit-AMP accumulation in embryonic stem cells which lack  $G_{i\alpha_2}$ . *J. Biol. Chem.* 269: 13073-13075.

- Roos, E., y Van de Pavert, I.V. (1987) Inhibition of lymphoma invasion and liver metastasis. *Cancer Res.* 47: 5439-5444.
- Salomon, Y., Londos, C., y Rodbell, M. (1975) A highly sensitive adenylate cyclase assay. *Anal. Biochem.* 58: 541-548.
- Simonds, W.F., Goldsmith, P.K., Codina, J., Unson, C.G., y Spiegel, A.M. (1989) Gi mediates  $\alpha_2$ -adrenergic inhibition of adenylyl cyclase in platelet membranes: *In situ* identification with G $\alpha$ C-terminal antibodies. *Biochem.* 86: 7809-7813.
- Smith, D.F., Walborg Jr. E.F., y Chang, J.P. (1970) Establishment of transplantable ascites variant of a rat hepatoma induced by 3'-Methyl-4-dimethylaminoazobenzene. *Cancer Res.* 30: 2306-2309.
- Spiegel, A.M., Backlund, Jr. P.S., Butrynski, J.E., Jones, y T.L.Z., Simonds, W.F. (1991) The G protein connection: molecular basis of membranes association. *Trends Biochem. Sci.* 16: 338-341.
- Spiegel, A.M., Shenker, A., y Weinstein, L.S. (1992) Receptor-effector coupling by G proteins: implications for normal and abnormal signal transduction. *Endocrine Rev.* 13: 536-565.
- Sternweis, P.C. (1986) The purified  $\alpha$  subunits of G $\alpha$ o and G $\alpha$ i from bovine brain require  $\beta\gamma$  for association with phospholipid vesicles. *J. Biol. Chem.* 261: 631-637.
- Stryer, L. "Bioquímica". Edit. REVERTÉ, S.A. 3a. Edición. Barcelona, (1989). pp. 988-991.

- Tang, W.J., y Hurley, J.H. (1998) Catalytic mechanism and regulation of mammalian adenylyl cyclase. Review. *Mol. Pharmacol.* 54: 231-240.
  
- Taussig, R., y Gilman, A.G. (1995) Mammalian membrane-bound adenylyl cyclase. *J. Biol. Chem.* 270: 1-4.
  
- Taussig, R., Tang, W.J., Hepler, J.R., y Gilman, A.G. (1994) Distinct patterns of bidirectional regulation of mammalian adenylyl cyclase. *J. Biol. Chem.* 269: 6093-6100.
  
- Torres-Márquez, ME y Piña, E. (1997) Comparison of  $\alpha$ -2 adrenergic response of AS-30D hepatoma cells and hepatocytes. *BEB.* 16:138.
  
- Torres Márquez, M.E. Mensaje Bioquímico. Editores: M.A. Juárez Oropeza, S. Morales López y F. Martínez Montes. Depto. de Bioquímica. Fac. Medicina, UNAM. Vol. XX. México, D.F. (1996). pp. 99-118.
  
- Ui, M. (1984) Islet-activating protein, pertussis toxin: a probe for functions of the inhibitory component of adenylate cyclase. *Trends Pharmacol. Sci.* 5: 277.
  
- Vaillancourt, R.R., Gardner, A.M., y Jonhson, GL. (1994) B-raf- dependent regulation of the MEK-1/mitogen activated protein kinase pathway in PC12 cells and regulation by cyclic AMP. *Mol. Cell Biol.* 14, 6522-6530.
  
- Wardlaw, A.C., y Parton, R. (1983) Bordetella pertussis toxins. *Pharmac. Ther.* 19: 1-53.
  
- West Jr. R.E., Moss, J., Vaughan, M., Liu, T., y Liu, T.Y. (1985) Pertussis toxin-catalyzed ADP-ribosylation of transducin:cysteine 347 is the ADP-ribose acceptor site. *J. Biol. Chem.* 260: 14428.

- Wilkie, T.M., y Yokoyama, S. (1994) Evolution of the G protein alpha subunit multigene family. *Soc. Gen. Physiol Ser.* 49: 249-70.

- Wilson, G. (Ormerod, MG.). BrdU Incorporation in Flow Citometry, A Practical Approach. 2a. edición. USA, (1994) pp.137.