

00551
22



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO**



**UNAM
DIRECCION GENERAL DE
ESTUDIOS DE POSGRADO**

**PROGRAMA DE MAESTRIA Y
DOCTORADO EN CIENCIAS
BIOQUIMICAS**

FACULTAD DE QUIMICA

293060

**EL PAPEL DE NF- κ B EN LA VIA DE
TRANSDUCCION DEL TIMP-2**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS
P R E S E N T A:

BIOLOGA FLORIA JOSEFINA LIZARRAGA SANCHEZ



DIRECTOR DE TESIS:
DR. JORGE MELENDEZ ZAJGLA

MEXICO, D. F.

2001



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

PMDCB/278/2001

Biol. Floria Lizárraga Sánchez
Alumno de Maestría en Ciencias Bioquímicas
P r e s e n t e

Los miembros del Subcomité Académico en reunión ordinaria del día 17 de abril del presente, conocieron su solicitud de asignación de JURADO DE EXAMEN para optar por el grado de MAESTRO EN CIENCIAS (BIOQUÍMICAS), con la tesis titulada "El Papel de NF κ B en la vía de transducción del TIMP-2" dirigida por el Dr. Jorge Manuel Meléndez Zajgla.

De su análisis se acordó nombrar el siguiente jurado:

PRESIDENTE	Dr. Marco Antonio Cerbón Cervantes
SECRETARIO	Dra. Patricia Coello Coutiño
VOCAL	Dra. María Teresa Tusie Luna
SUPLENTE	Dr. Enrique Ortega Soto
SUPLENTE	Dr. Felix Recillas Targa

Sin otro particular por el momento, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 18 abril de 2001.
LA COORDINADORA DEL PROGRAMA


DRA. AMELIA FARRÉS GONZÁLEZ-SARAVIA

C.c.p. Archivo

AFGS*lgg.



El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Biología Molecular de la División de Investigación Básica en el Instituto Nacional de Cancerología, bajo la dirección del Dr. Jorge Meléndez Zajgla.

“Con la niebla amarillenta en Southampton Street
de pronto un carro de fruta con una lámpara;
estirando bolsas un vieja muy sucia.

Quedé quieto, callado, como alguien que ve algo
tras lo que iba y se lo acaban de colocar delante.

¡Porque naranjas deberían haber siempre!

Me calenté las manos con el aliento
y me puse a pescar dinero en el bolsillo.

Pero mientras cogía los peniques
y miraba el precio, que en papel de periódico
estaba escrito con carbón pringoso
noté que mi silbido se apagaba,
pues de repente y con amargura me di cuenta
de que tú ni siquiera estabas en aquella ciudad”

Bertolt Brecht

Papá, Mamá
para ustedes con todo mi amor.

"Quiero ir con aquél a quien amo.

No quiero calcular lo que cuesta.

No quiero averiguar si es bueno.

No quiero saber si me ama.

Quiero ir con aquél a quien amo."

B. B.

A mi amado Leonardo.

A mis hermanos, los arquitectos felices y eternos,
los amo mucho.

A mi Mamá-nina, gracias por tu amor,
espérame siempre.

A mi tía Toti, gracias por tu cariño y apoyo,
te quiero muchísimo.

A mis tíos, primos, y sobrinitos,
con todo mi amor.

Al "Club de Tobí", los quiero mucho.

Al laboratorio "M&M's", con mucho amor.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Jorge Meléndez Zajgla, director de esta tesis, por sus enseñanzas, su apoyo y su confianza. Por su interés en las orquídeas y en la investigación científica, muchas gracias.

A la Dra. Vilma Maldonado Lagunas, por sus valiosos comentarios, por su tiempo y por su interés en los seres vivos. Por su amistad y cariño, muchas gracias.

Al jurado que amablemente revisó este trabajo, por sus valiosas sugerencias, gracias.

Al laboratorio "M&M's", a Magali, Ángeles, Karina, Esther, Moisés, Juan Manuel, Gisela, Rubén, por su amistad y apoyo, por el tiempo que pasamos juntos, gracias.

Al Boshó por sus dibujines y a Don John y a Sandía por todo el apoyo "técnico", gracias mil.

A mis profesores, compañeros y amigos, gracias.

A DGEP y a CONACYT, por sus programas de apoyo de becas, muchas gracias.

CONTENIDO

Abreviaturas

I.	Resumen	1
II.	Introducción	3
2.1	Los TIMPs	4
2.2	El TIMP-2	4
2.2.1	La estructura	4
2.2.2	La regulación	7
2.2.3	Las funciones del TIMP-2	8
	a) La inhibición y la activación de la MPM-2	8
	b) La inhibición de la angiogénesis	10
	c) Papel en el cáncer	10
	d) Factor de crecimiento	12
2.3	Posibles vías de transducción de señales de los TIMPs	13
2.4	El crecimiento y la proliferación celular	14
	2.4.1 El ciclo celular	14
	2.4.2 Las vías de transducción de señales para proliferación celular	17
	2.4.3 La vía de señalización del factor de transcripción NF-kB	17
	2.4.4 La familia de I κ B	19
III.	Antecedentes e hipótesis	24
IV.	Objetivo general	27
V.	Objetivos particulares	27
VI.	Material y métodos	28
6.1	Cultivo celular	28
6.2	Ensayos de viabilidad celular	28
6.3	Citometría de flujo	29
6.4	Extracción de proteínas totales	29
6.5	Obtención de proteínas nucleares	30
6.6	Ensayos de retardo en gel	31
6.7	"Western blot"	32

6.8	Transfección estable de las células A549 con el super-represor del factor NF-kB.	32
VII.	Resultados	35
7.1	Efecto del TIMP-2 en el crecimiento de las células A549	35
7.1.1	Viabilidad celular	35
7.1.2	Análisis del ciclo celular por citometría de flujo	37
7.2	La capacidad de unión del factor de transcripción NF-kB en las células A549	39
7.3	Inmunodetección de los IκBs de las células A549	40
7.3.1	Inhibidores totales	40
7.3.2	Inhibidores nucleares	42
7.4	Las ciclinas D y E en las células A549	44
7.5	Viabilidad de las células A549-S32/36 en respuesta al hTIMP-2r	45
7.6	La actividad de unión del factor NF-kB en las células A549-S32/36	46
7.7	Los inhibidores IκBs en las células A549-S32/36	47
VIII.	Discusión	49
IX.	Conclusiones	62
X.	Referencias	63
XI.	Apéndice	68

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN complementario
Ala	Alanina
AMPc	Monofosfato de adenosina cíclico
Amp ^r	Resistencia a ampicilina
ATP	Trifosfato de adenosina
BSA	Albúmina bovina de suero
°C	Grados centígrados
CDK	Cinasa dependiente de ciclina
CO ₂	Bióxido de carbono
dATP	Deoxi- ATP
dI-dC	Acido poli-deoxinosínico-deoxicitidílico
DMEM	Medio mínimo esencial de Dulveco
EDTA	Ácido etilendiaminotetra-acético
EPA	Actividad potenciadora de la eritropoyesis
ERK	Cinasa de respuesta a factores extracelulares
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-píperazinaetano-sulfónico
IgG	Inmunoglobulina G
IκB	Inhibidores κB
IKK	Cinasa de IκB
IL-1	Interleucina 1
JNK	Cinasa del amino del Jun
Kb	Kilobases
KDa	Kilodaltones
M	Molaridad
MAPK	Proteína cinasa activada por mitógenos
MAPKK	Cinasa de MAPK
MEC	Matriz extracelular
MEK	Cinasa Erk de MAPK

MEKK	cinasa de MEK
mg	miligramo
ml	mililitro
μg	microgramo
μl	microlitro
MPMs	Metaloproteinasas de matriz extracelular
MPM-MT	MPM de tipo membranal
NaCl	Cloruro de sodio
Neo ^r	Resistencia a neomicina
NES	Señal de exportación nuclear
NF-kB	Factor nuclear kB
NIK	Cinasa inducida por NF-kB
NLS	Señal de localización nuclear
NP40	Nonidet 40
nm	nanómetros
P	Fósforo
PCMV	Promotor del citomegalovirus
pM	Pico molar
pRB	Proteína del retinoblastoma
r.a.a.	Residuos de aminoácidos
RB	Retinoblastoma
RH	Homología de Rel
SAPK	Proteína cinasa asociada al estrés
SBF	Suero bovino fetal
SDS	Dodecil sulfato de sodio
Ser	Serina
TBE	Amortiguador de Tris-ácido bórico- EDTA
TGFβ	Factor de crecimiento transformante β
TIMPs	Inhibidores tisulares de las metaloproteinasas de matriz extracelular
TPA	12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato
UV	Radiación ultravioleta

I. RESUMEN

Los inhibidores tisulares de las metaloproteinasas de la matriz extracelular, los TIMPs, constituyen una familia de reguladores endógenos de la actividad proteolítica de estas enzimas. Hasta la fecha, se han caracterizado cuatro tipos diferentes. Se sabe que los TIMPs 1 y 2 inducen el crecimiento *in vivo* e *in vitro* de varios tipos celulares normales y transformados; sin embargo, se desconoce la vía de transducción de señales a través de la cual actúan. Se ha observado que el TIMP-2 recombinante humano (hTIMP-2r, 50 pM) promueve la proliferación de las células A549 de carcinoma humano de pulmón en presencia de insulina (5 µg/ml). Asimismo, se sabe que el factor de transcripción NF-κB participa directamente en la regulación de la proliferación celular. El objetivo principal de este trabajo es analizar el efecto del hTIMP-2r en las células de carcinoma humano de pulmón A549 y el papel que tiene el factor NF-κB en este proceso. Las células A549 se cultivaron en monocapa en medio DMEM con SBF al 10%. Se analizó el crecimiento de las líneas A549 y A549-S32/36 a través de ensayos de viabilidad celular y de citometría de flujo. Se realizaron ensayos de retardo en gel para determinar la actividad del factor NF-κB en las células A549-A549-S32/36 durante diferentes tiempos de exposición al hTIMP-2r (50 pM). Por "Western blot" se analizaron los niveles de las proteínas reguladores de la familia IκB en las células A549 y A549-s32/36 tratadas con hTIMP-2r por diferentes tiempos (50 pM). En el laboratorio comprobamos que el hTIMP-2r induce crecimiento celular a las 48 y 120 horas (50 pM) en ausencia de insulina. Para investigar si las células A549 expuestas al hTIMP-2r (50 pM) presentaban una modificación en la progresión del ciclo celular, se analizó el contenido de ADN por citometría de flujo. Se observó que hay un aumento de las células A549 en las fases G1 y G1/S en respuesta al hTIMP-2r. Bajo estas condiciones, la actividad de unión de NF-κB se incrementó significativamente a las

12, 36 y 48 horas. En concordancia con estos resultados, los niveles de los inhibidores de factor NF- κ B disminuyeron en las células A549 expuestas al TIMP-2r. La actividad de NF- κ B inducida por el hTIMP-2r podría deberse a la modulación de estos inhibidores. Con el fin de establecer que los efectos sobre el crecimiento celular del hTIMP2r son debidos a la activación de NF- κ B, las células A549 se transfectaron con un súper-represor para la vía. Las células transgénicas se denominaron "A549-S32/36". Conforme a lo esperado, la línea celular A549-S32/36 no proliferó bajo la acción del hTIMP-2r y la actividad de NF- κ B disminuyó con el tiempo. Los niveles de los inhibidores de factor NF- κ B de las células A549-S32/36 expuestas al TIMP-2r se modificaron de manera distinta a aquellos de las células A549. Lo anterior podría explicar la actividad menor de NF- κ B en las células A549-S32/36. Estos resultados apoyan la idea de que el hTIMP2r promueve el crecimiento de las células A549 de carcinoma humano de pulmón y que la vía de transducción del factor NF- κ B podría estar implicada en este proceso.

II. INTRODUCCIÓN

La matriz extracelular (MEC) tiene una influencia importante en muchos procesos celulares básicos, como la proliferación, la diferenciación y la muerte. Las primeras investigaciones sobre la MEC mostraron que los efectos de son inmediatos. Poco después de que las células establecen contacto con la superficie de las cajas de cultivo, se observa un aumento en la síntesis del ARN y de las proteínas. Es decir, las señales generadas por este contacto, son traducidas rápidamente en cambios en la expresión genómica los cuales favorecen el crecimiento y la diferenciación. Los hallazgos anteriores llevaron a pensar que cuando las células normales pierden el contacto con la MEC y con las células vecinas se induce la muerte celular, particularmente la apoptosis (Tidball y Albrecht, 1998).

La degradación excesiva de la MEC es un característica de algunas condiciones patológicas como el crecimiento tumoral y la metástasis. Las metaloproteinasas de la matriz extracelular (MPMs) son las principales enzimas que se encargan de la degradación de los diferentes componentes de la MEC. Constituyen una familia de endopeptidasas dependientes de zinc, activas a un pH neutro. En los vertebrados se conocen actualmente 18 enzimas diferentes agrupadas en diferentes grupos (Woessner, 2001).

La actividad de las MPMs es regulada a diferentes niveles: transcripcional, traduccional y postraduccional. Un punto de control importante ocurre a través de la inhibición y/o la regulación de la activación de los zimógenos y de las enzimas activas por medio de los inhibidores tisulares de las MPMs (TIMPs, por sus siglas en inglés). La alteración del equilibrio entre las MPMs y sus inhibidores naturales los TIMPs es un factor clave en algunas enfermedades humanas como el cáncer y la angiogénesis asociada a éste (Gomez *et al.*, 1997).

2.1 LOS TIMPs

Los inhibidores tisulares de las metaloproteinasas de matriz extracelular, los TIMPs, producidos por numerosos tipos celulares, tienen un papel muy importante en algunas condiciones fisiológicas y patológicas. Se unen estequiométricamente 1:1 formando complejos no covalentes con las MPMs. Actualmente se han descrito cuatro miembros de esta familia de inhibidores: los TIMPs 1, 2 y 4 que son proteínas solubles y el TIMP-3 que está asociado con la MEC. Las cuatro proteínas poseen pesos moleculares bajos (20 a 30 KDa), doce residuos de cisteína y cuatro de tirosina conservados entre ellas. Además, las regiones NH₃-terminal que presentan la actividad inhibitoria se encuentran altamente conservadas mientras que los extremos COOH-terminal, que proporcionan especificidad de inhibición y eficiencia de unión, son divergentes. Se sabe que son proteínas con recambio bajo en la MEC (Blavier *et al.* 1999).

2.2 EL TIMP-2

2.2.1 LA ESTRUCTURA

El TIMP-2 es una proteína no glicosilada de 194 residuos de aminoácidos (r.a.a.), con un peso molecular de 21 KDa que posee un 40% de identidad con el TIMP-1 (Figura 1). Se describió por tres grupos de investigación independientes (DeClerck *et al.*, 1989, Goldberg *et al.*, 1989 y Stetler-Stevenson *et al.*, 1989). Fue copurificada con la MPM-2 de sobrenadantes de fibroblastos y de células de melanoma humanos (Goldberg *et al.*, 1989 y Steven-Stevenson *et al.*, 1989), pero en los macrófagos alveolares, se purificó sin esta asociación (Shapiro *et al.*, 1992).

El dominio NH₃-terminal que presenta la secuencia consenso "VIRAK" es necesario para inhibir a la MPM-2 a través del dominio hemopexina de la región COOH-terminal de esta enzima. Además, existen algunas asas en el extremo carboxilo que unen a las MPMs, fuera de su sitio catalítico. Se ha determinado que los tres puentes disulfuro amino-terminales son suficientes para la actividad inhibitoria del TIMP-2 (Blavier *et al.* 1999). Sorprendentemente si los TIMPs 1 y 2 se reducen, pierden su capacidad para inhibir a las MPMs, pero no sus funciones independientes a esta actividad (Hayakawa *et al.*,1994) (Figura 1).

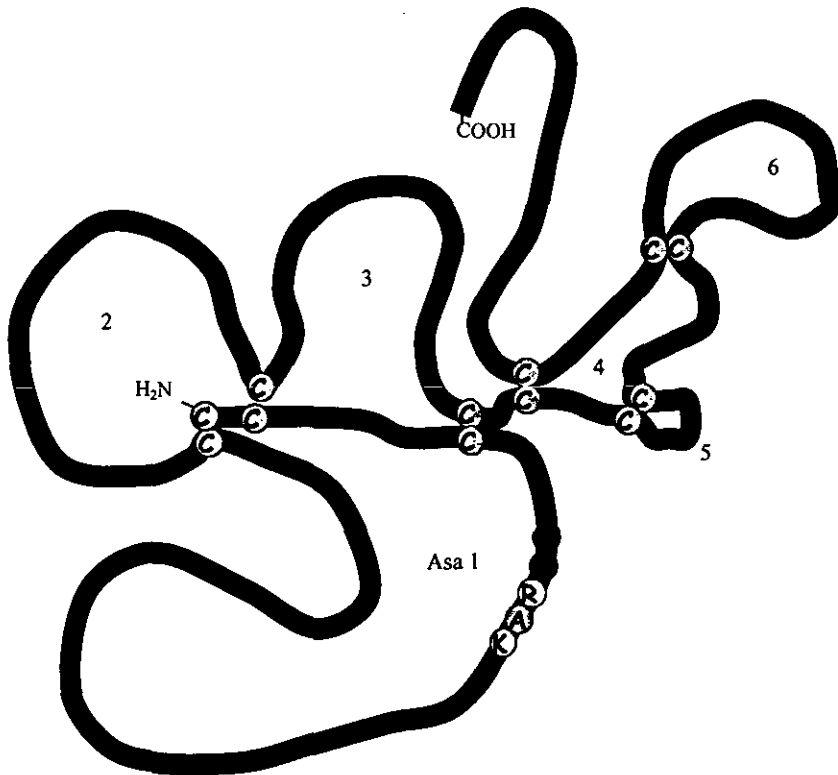


Figura 1. Esquema que muestra un modelo de la estructura secundaria del TIMP-2 (Douglas *et al.*, 1997).

El cDNA correspondiente al TIMP-2 ha sido aislado de diferentes especies como el nemátodo *C. elegans*, la mosca *Drosophila sp.*, el cobayo y algunos vertebrados (Brew *et al.*, 2000 y Meléndez *et al.*, 2000). El gen que codifica para TIMP-2 humano está localizado en el cromosoma 17 (17q23-17q25). Éste posee cinco exones separados por cuatro intrones. Se han encontrado dos transcritos principales: de 1 Kb y de 3.5 Kb, los cuales tienen una vida media de 32 y 24 horas, respectivamente (Gomez *et al.*, 1997).

El promotor para el TIMP-2 humano contiene 3 sitios para el factor de transcripción Sp-1, un sitio para Ap-1, un sitio para Ap-2 y una caja TATA (Figura 2). A través del análisis con deleciones diferentes, se determinó que los sitios importantes para la expresión basal son los Sp-1 y Ap-2 inmediatamente anteriores a la caja TATA (DeClerck *et al.*, 1994 y Hammani *et al.*, 1996).

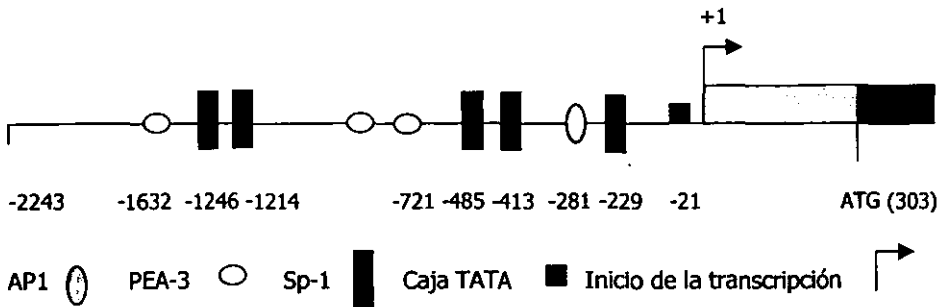


Figura 2. El promotor del gen que codifica para TIMP-2 humano (Hammani *et al.*, 1996).

2.2.2 LA REGULACIÓN

El TIMP-2 se expresa de manera constitutiva; sin embargo, en ocasiones su expresión puede ser modificada. Se ha observado que la modulación de su expresión en respuesta a distintos estímulos es regulada de manera opuesta a la del TIMP-1. El promotor del TIMP-2 no es activado por TPA (12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato) y por citocinas. Es interesante mencionar que esta proteína se produce en varios órganos, pero no se sintetiza en el hígado (Tabla 1) (Gomez *et al.*, 1997).

Características	TIMP-2
Peso molecular	21 KDa
Tejidos (ratón)	Pulmón, corazón, cerebro, músculo, piel, testículos, ovarios, placenta
Inhibición de la invasión tumoral	+
Actividad promotora del crecimiento	+
Inhibición de la apoptosis	No determinada
Inhibición de la angiogénesis	+

Tabla 1. Características del TIMP-2 humano.

Algunos factores pueden regular la expresión del ARNm o de la proteína del TIMP-2. Se ha observado que el 8-Br-AMPC (un análogo de AMPC) provoca un aumento en la expresión del ARNm y de la proteína del TIMP-2 en las células de fibrosarcoma humano HT1080 (Tanaka *et al.*, 1995). Además, se encontró que en la línea celular anterior, en las líneas de melanoma humano A2058 y HT-144 y en la línea de fibroblastos de pulmón humano W1-38, el factor TGF β provoca una disminución en los dos transcritos del TIMP-2 (Stetler- Stevenson *et al.*, 1990). Independientemente, Meléndez *et al.* (2000) encontraron que en los fibroblastos de pulmón del cobayo, el TGF β (10 ng/ml en ausencia de suero) provoca una disminución del ARNm del TIMP-2 después de 18 horas. Por otra parte, se encontró que la progesterona y el estradiol disminuyen los niveles de TIMP-2 aproximadamente en un 50% en células de cáncer de mama (Gomez *et al.*, 1997). En los estudios anteriores, los cambios en los dos ARNm para el TIMP-2 son similares. En contraste, Stetler-Stevenson y su grupo (1990) observaron a través de ensayos de "Northern blot" que el ARNm de 1 Kb está considerablemente reducido en las muestras de pacientes humanos de tumores colorectales. Hasta la fecha, no se conoce la regulación del "splicing" que da origen a estos dos ARNm para el TIMP-2.

2.2.3 LAS FUNCIONES DEL TIMP-2

a) La inhibición y la activación de la MPM-2

Los TIMPs tienen afinidades variables por las diferentes MPMs. Por ejemplo, el TIMP-1 se une a la pro-MPM-9 con mayor afinidad que el TIMP-2. Contrariamente, el TIMP-2 se une con gran afinidad a la forma latente de la MPM-2 (Howard y Banda, 1991 y Wang *et al.*, 2000). La participación del TIMP-2 en la activación de la pro-MPM-2 se describió recientemente. El TIMP-2 se une al sitio activo de una molécula de MPM-MT-1

(MPM de tipo membranal) en la superficie celular, formando una especie de "receptor" para la forma latente de la MPM-2. El extremo carboxilo del TIMP-2 se une al dominio de hemopexina de la pro-MPM-2 constituyendo un complejo ternario. Se requiere de una segunda molécula de MPM-MT-1 que corta el pro-péptido de la pro-MPM-2. De esta manera el TIMP-2 es necesario para la activación de la pro-MPM-2 (Howard y Banda, 1991 y Wang *et al.*, 2000). Sin embargo, las concentraciones elevadas del TIMP-2 ó -3 inhiben a la MPM-MT-1 previniendo la consecuente activación de la forma latente de la MPM-2 (Baker *et al.*, 2000) (Figura 3).

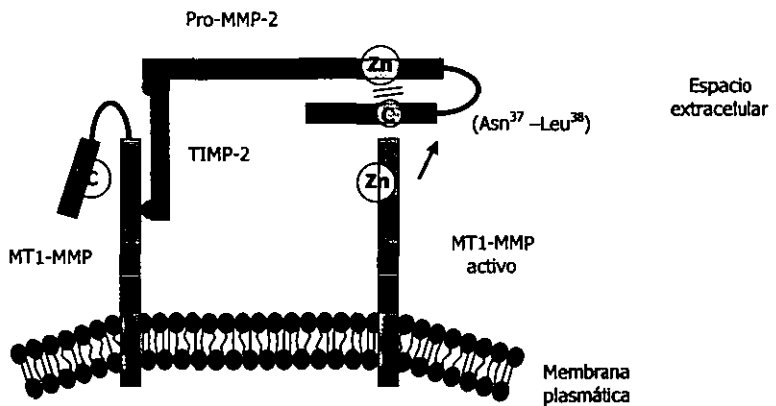


Figura 3. El TIMP-2 y la MPM-MT-1 activan a la pro-MMP-2 (Wang *et al.*, 2000).

b) La inhibición de la angiogénesis

El proceso de angiogénesis (la formación de nuevos vasos sanguíneos) es complejo ya que involucra la movilidad de las células endoteliales, su adhesión y la degradación de la membrana basal subendotelial. Se ha determinado que los TIMPs 1 y 2 inhiben la angiogénesis en algunos ensayos biológicos. Estas proteínas pueden afectar este proceso de varias maneras: inhibiendo la migración de las células endoteliales, previniendo el desprendimiento de las células endoteliales mediado por las MPMs, bloqueando la liberación de factores angiogénicos unidos a la matriz y previniendo la degradación de la MEC. Las investigaciones sobre la inhibición de la formación del tubo endotelial por el TIMP-1 y el 2 en un ensayo *in vitro* en matrigel y el bloqueo de la invasión de las células endoteliales de la membrana amniótica mediado por el TIMP-1, apoyan la idea de que los TIMPs inhiben la angiogénesis en diferentes etapas (Gomez, *et al.*, 1997).

c) Papel en el cáncer

Se sabe que en algunos casos una degradación excesiva de la MEC, debida a una alteración en el balance MPMs/TIMPs, promueve la invasión y la metástasis (Figura 4) (Gomez *et al.*, 1997).

Existe además una gran controversia sobre las funciones del TIMP-2. En algunas investigaciones se propone que la sobre-expresión del TIMP-2, al igual que la del TIMP-1, suprime el crecimiento tumoral, la invasión y la metástasis. Sin embargo, otros estudios han relacionado la expresión del TIMP-2 con la progresión tumoral (Gomez *et al.*, 1997).

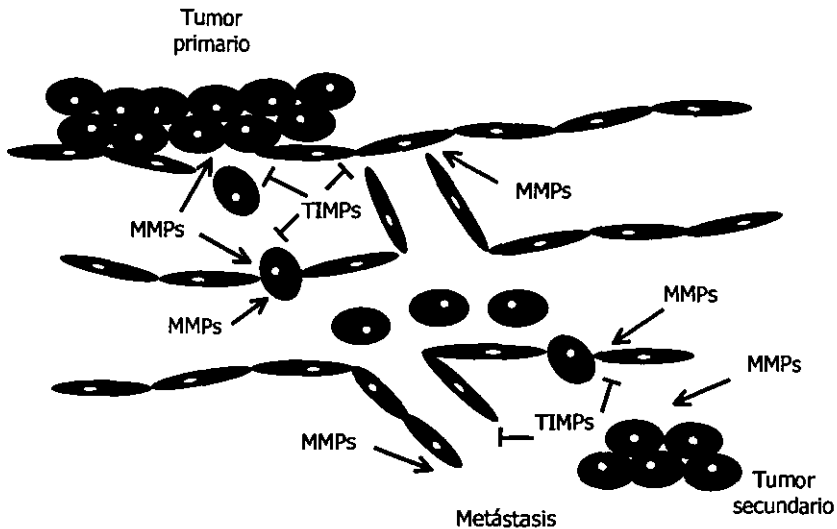


Figura 4. El papel de las MMPs y de los TIMPs en crecimiento tumoral, la invasión y la metástasis. El potencial inhibitorio de los TIMPs se indica en la figura (Baker *et al.*, 2000).

La mayoría de los trabajos en roedores muestra que los TIMPs inhiben el crecimiento tumoral, la invasión y la metástasis. No obstante, en ciertos tipos de tumores malignos humanos se relacionan los niveles altos de estos inhibidores con una conducta agresiva del tumor (Albini *et al.*, 1991, DeClerck *et al.*, 1992, DeClerck *et al.*, 1991, Imren *et al.*, 1996 y Montgomery *et al.*, 1994).

d)Factor de crecimiento

Diferentes evidencias apoyan el hecho de que el TIMP-2 tiene un efecto en la proliferación de muchas líneas celulares, independientemente de su actividad como inhibidor de las MPMs. Sin embargo, el efecto producido por el TIMP-2 es variable, es decir, en algunas líneas celulares promueve el crecimiento, en otras no hay efecto y en algunas otras lo inhibe.

El TIMP-2 posee una "actividad potenciadora de la eritropoyesis" (EPA, por sus siglas en inglés). La EPA fue aislada originalmente del medio condicionado de una línea celular de linfoblastos T infectados con el HTLV-II y se demostró que estimula el crecimiento de las células progenitoras eritropoyéticas tempranas (DeClerck *et al.*, 1989, Golde *et al.*,1980 y Hayakawa *et al.*, 1992). Asimismo, el TIMP-2 también fué aislado como una proteína estimuladora del crecimiento a partir del medio de cultivo carente de suero de los fibroblastos humanos HSF4-T12 transformados con el virus SV40 (Nemeth y Goolsby, 1993).

Por otra parte, el estudio de Hayakawa y sus colaboradores (1994) demostró que el TIMP-2 promueve la proliferación de varias líneas celulares murinas, bovinas y humanas a una concentración de 10 ng/ml (0.46 nM). Independientemente, se determinó que la sobre-expresión del TIMP-2 en las células de músculo vascular liso de rata provoca un aumento en la proliferación celular dependiente de la concentración (Baker, *et.al.*, 1998).

En contraste con los trabajos previos, Valente y su grupo encontraron que las células B16F10 de melanoma murino transfectadas con el TIMP-2 presentaban un potencial invasivo y una capacidad angiogénica menores, con respecto a las células control. Observaron también, que estas células transfectadas eran más resistentes a la apoptosis mientras que la necrosis aumentaba.

Las investigaciones anteriores muestran que existe una fuerte contradicción sobre el efecto del TIMP-2 en el crecimiento celular.

2.3 POSIBLES VÍAS DE TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES DE LOS TIMPs

Hasta la fecha, no se conocen con certeza los mecanismos moleculares y bioquímicos a través de los cuales los TIMPs llevan a cabo sus efectos sobre la proliferación y la muerte celulares.

Los resultados obtenidos por un grupo de investigación italiano, mostraron que las células de carcinoma de mama Bc-16 expresan selectivamente una proteína transmembranal de 80 KDa. Ésta es capaz de unir con alta afinidad al TIMP-1 *in vitro* e *in vivo*. Además, encontraron que si esta línea celular es tratada con una concentración estimuladora de la proliferación de TIMP-1 (0.2, 0.4 y 1 µg/ml), se induce la fosforilación en residuos de tirosina de algunas proteínas (Luparello, *et al.*, 1999).

Por otra parte, se determinó que en la línea celular MG-63 de osteosarcoma humano, los TIMPs 1 y 2 inducen la incorporación de timidina tritiada y el aumento de algunas proteínas fosforiladas en residuos de tirosina. En el estudio anterior se sugiere que las cinasas de tirosina (Erk 2) tienen un papel importante en la vía de transducción de señales de estos TIMPs ya que cuando estas cinasas se inhibieron específicamente, se observó un bloqueo casi total de la incorporación de timidina tritiada (Yamashita *et al.*, 1996).

2.4 EL CRECIMIENTO Y LA PROLIFERACIÓN CELULAR

2.4.1 EL CICLO CELULAR

El balance del crecimiento, la proliferación, la diferenciación y la muerte celulares, es importante para permitir el desarrollo normal y completo de los organismos multicelulares. Los defectos en estos procesos pueden provocar anomalías durante el desarrollo y en algunos casos la progresión del cáncer. Debido a esto es necesario que exista un control estricto en la expresión de los genes involucrados en la regulación de estos procesos (Sherr C. J., 1996).

La progresión a través del ciclo celular en los organismos eucariotes está regulada por la presencia de las proteínas ciclinas y sus cinasas asociadas (CDKs por sus siglas en inglés). Las subunidades CDKs permanecen inactivas y al unirse con las ciclinas forman complejos activos. La actividad de los complejos CDKs/ciclinas es también controlada por los diferentes niveles de fosforilación y por pequeñas proteínas (p15, p16, p18, p19, p27, p57, entre otras), llamadas "inhibidoras de la actividad de CDK", éstas se unen a las ciclinas, a las CDKs o a los complejos de ambas. Los complejos activos ciclinas/CDKs llevan a las células a través de las diferentes fases del ciclo celular, fosforilando sustratos proteicos específicos que son esenciales para alcanzar la transición entre las fases (Sherr C. J., 1996 Hulleman *et al.*, 1999).

La actividad de los complejos ciclinas/CDKs de la fase G1 del ciclo celular es esencial para la progresión de dicha fase y está asociada a la fosforilación de las proteínas Rb (pRbs) y al paso del punto de restricción R. Después de esta fosforilación de las pRbs, el factor de transcripción E2F es liberado y puede entonces activar la expresión de los genes necesarios para replicar el material genético y proseguir a través del ciclo celular (Figura 5) (Sherr C. J., 1996 Hulleman *et al.*, 1999).

Las ciclinas A, B, D y E son sintetizadas y degradadas periódicamente y de manera específica durante el curso del ciclo celular, proporcionando así un mecanismo para regular la actividad de los complejos de las cinasas. Los niveles de cada ciclina en particular son controlados a nivel transcripcional y por la degradación a través de la vía de ubiquitinación. Las ciclinas D y E son expresadas durante las fases G₀/G₁ y son llamadas ciclinas "start" (por el nombre del "checkpoint" de levaduras). "Start", también conocido como punto de restricción @ en las células de los mamíferos, es el punto en la fase G₁ tardía en el que las células se comprometen a la siguiente replicación de su ADN (cuando se fosforila a la proteína pRB). Las ciclinas D (1, 2 y 3) se expresan en respuesta a factores de crecimiento o mitógenos y se degradan rápidamente cuando éstos disminuyen. En las células que proliferan continuamente, sus niveles son menos variables que los de las ciclinas A, B y E. La expresión particular de las ciclinas D es específica de cada tejido. La aparición de las ciclinas D, promueve la transición de la fase G₀ a la G₁ y la velocidad de la progresión de G₁. En general, la expresión de la ciclina E es inducida en la fase G₁ tardía. Por otra parte, las ciclinas A y B son las llamadas ciclinas "mitóticas". La ciclina A es sintetizada durante la fase S y se degrada en la anafase de la mitosis. La ciclina B se expresa en la fase S tardía, sus niveles son máximos durante la transición de G₂ a M y se degrada durante la anafase (Sherr C. J., 1996 Hulleman *et al.*, 1999).

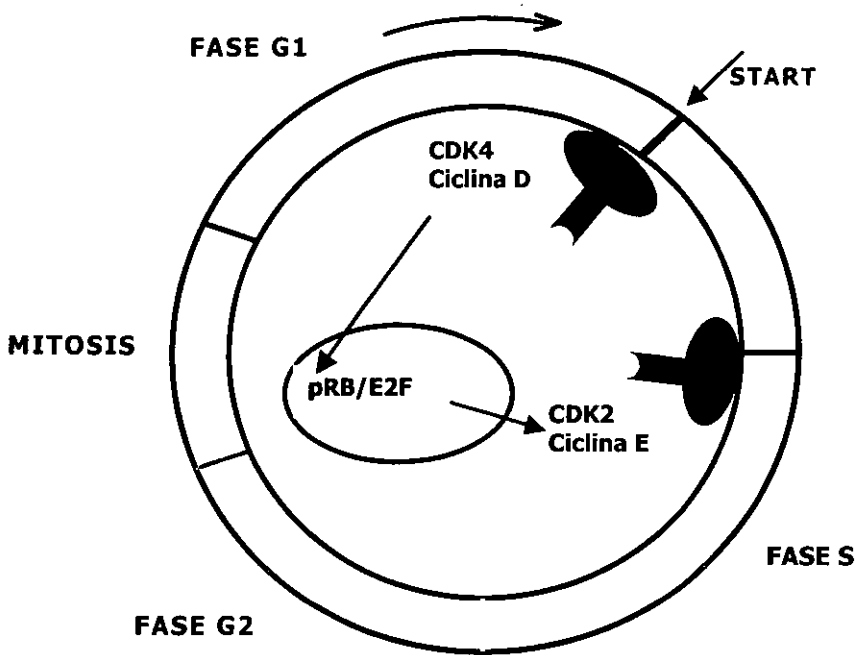


Figura 5. Esquema que representa el ciclo celular de los mamíferos.

2.4.2 LAS VÍAS DE TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES

PARA PROLIFERACIÓN CELULAR

Las células reciben e interpretan la información del medio ambiente intra- y extra-celular de una manera definida y apropiada. Las vías de transducción de señales son las rutas bioquímicas y moleculares que se encargan de propagar los diversos estímulos y proporcionar las respuestas específicas. A partir de los componentes que conforman determinada vía es posible conocer la naturaleza y la duración de las repuestas celulares específicas (Dedrick, J. e Iyengar, R, 1998).

2.4.3 LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN DEL FACTOR DE

TRANSCRIPCIÓN NF-KB

Los factores de transcripción controlan eventos cruciales durante el crecimiento celular en la mayoría de los seres vivos. Los factores transcripcionales NF-kB/Rel comprenden un grupo de proteínas conservadas en el reino animal (Gilmore, 1999). Estos factores fueron descritos por primera vez por Sen y Baltimore (1986) como proteínas que se unen fuertemente a una secuencia decamérica específica de ADN (5'-GGGACTTCC-3', llamado "sitio kB"), dentro un potenciador (enhancer) de la cadena ligera kappa de las inmunoglobulinas. Inicialmente, se encontró en linfocitos B maduros, pero ahora se sabe que NF-kB está presente en la mayoría de los tipos celulares. Así mismo, se han encontrado sitios kB (con la secuencia consenso 5'-GGGRNYYCC3', donde R es una purina y Y una pirimidina) en los promotores de una lista creciente de genes (Gilmore, 1999).

Las proteínas NF-kB/Rel están relacionadas por la presencia de un dominio conservado de unión al DNA y de dimerización, denominado "dominio de homología Rel"

(RH, por sus siglas en inglés). Además, pueden dividirse en dos clases de acuerdo con la secuencia carboxilo terminal adyacente al dominio RH (Figura 6). Los miembros p105, p100, y *Drosophila* Relish, tienen una secuencia larga en este extremo que contiene varias copias de secuencias repetidas de ankyrina que inhiben su actividad. Los miembros de este grupo se activan (p105 se convierte en p50 y p100 en p52) cuando se detiene la traducción o cuando hay una proteólisis limitada. Por lo anterior, estas proteínas como tales no son activadoras de la transcripción, excepto cuando forman dímeros con los miembros de la segunda clase. Las subunidades c-Rel, RelB, RelA (p65), Dorsal y Dif, contienen dominios de activación en el extremo carboxilo, los cuales son variables entre las diferentes especies (Gilmore, 1999).

Los factores NF- κ B/Rel se unen a los sitios κ B formando dímeros. Todos las proteínas Rel de los vertebrados pueden formar homodímeros o heterodímeros, con excepción de la proteína RelB que sólo puede formar heterodímeros. Esta diversidad contribuye a la regulación de grupos de genes distintos ya que los diferentes dímeros tienen especificidades variables para la colección de los sitios κ B. El nombre NF- κ B comúnmente se refiere al heterodímero p50/p65(RelA) debido a que es el complejo Rel principal en la mayoría de las células (Figura 6) (Gilmore, 1999).

Los dímeros NF- κ B están en forma latente e inactiva en las células formando complejos en el citoplasma con las subunidades regulatorias denominadas I κ Bs (Inhibidores κ B). Cuando las células reciben diferentes señales extra- e intra-celulares, se inician diferentes cascadas de cinasas las cuales finalmente fosforilan a los inhibidores I κ Bs y activan a NF- κ B, éste entra al núcleo, se une a los sitios κ B en el ADN y promueve la expresión de ciertos genes (Figura 8) (Karin, 1999).

Las IκBs se unen a los dímeros NF-κB y bloquean estéricamente la función de su señal de localización nuclear (NLS) provocando así su secuestro en el citoplasma. Para que NF-κB entre al núcleo es necesario romper la interacción con IκB por lo que la mayoría de los estímulos que activan a este factor transcripcional, utilizan una vía común basada en la degradación inducida por fosforilación de las IκBs. La proteína IκBα es la principal de este grupo y la mejor estudiada (Karin, 1999).

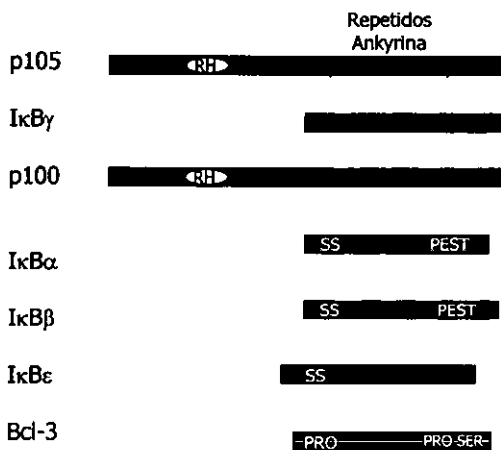


Figura 7. Las proteínas de la familia IκB de vertebrados. "PRO" y "SER" se refieren a los r.a.a. prolina y serina, respectivamente. El dominio "PEST" es rico en r.a.a. prolina, glutamato, aspártico, serina y treonina. Esta región contiene sitios de fosforilación y ha sido implicada en la regulación de la estabilidad de los IκBs. También se ha sugerido que regulan la habilidad de los IκBs para inhibir la unión de NF-κB al sitio κB, a través de la interacción directa con el dominio de unión al ADN (Whiteside e Israel, 1997 y Karin, 1999).

Algunos de estos inhibidores, como I κ B α , poseen una NLS así como una señal de exportación nuclear (NES). De esta manera la señal puede ser interrumpida por I κ B α recién sintetizado que entra al núcleo, remueve a los dímeros NF- κ B del ADN y provoca el transporte desde éstos hacia el citoplasma a través de las exportinas (Karin, 1999).

Los activadores potentes de NF- κ B, como el TNF- κ B y la IL-1, provocan la degradación prácticamente completa de los I κ Bs (especialmente de I κ B α) en cuestión de minutos. Este proceso, mediado por el proteosoma 26S, depende de la fosforilación de dos residuos de serina conservados (S32 y S36 en el I κ B α del humano) dentro del dominio regulatorio amino-terminal de los I κ Bs. Las sustituciones que reemplazan a una o ambos de estos residuos son suficientes para inhibir considerablemente la degradación de los I κ Bs. Si se inhibe el proteosoma, los I κ Bs fosforilados en su extremo amino se acumulan rápidamente lo cual indica que la degradación ocurre posteriormente a la fosforilación y que esta última no permite la disociación de los complejos NF- κ B/I κ B. Cuando los I κ Bs han sido fosforilados llevan a cabo una segunda modificación postraducciona: la poliubiquitinación. Los sitios de poli-ubiquitinación principales en el I κ B α del humano son las lisinas 21 y 22 (Karin, 1999).

Existen algunas excepciones a la vía común para la activación de NF- κ B. La primera es la activación por radiación UV que depende de la degradación de I κ B, pero no implica la fosforilación de los residuos de serinas del extremo amino. La segunda excepción es la anoxia que estimula la fosforilación de I κ B α en el residuo de tirosina 42. Se ha sugerido que la I κ B α fosforilada en este residuo se une al dominio SH2 de la PI3 cinasa y de esta manera se separa de NF- κ B. Sin embargo, el residuo de tirosina en la posición 42 no está conservado en las otras proteínas I κ Bs (Imbert *et al.*1996 y Karin, 1999) (Figura 7).

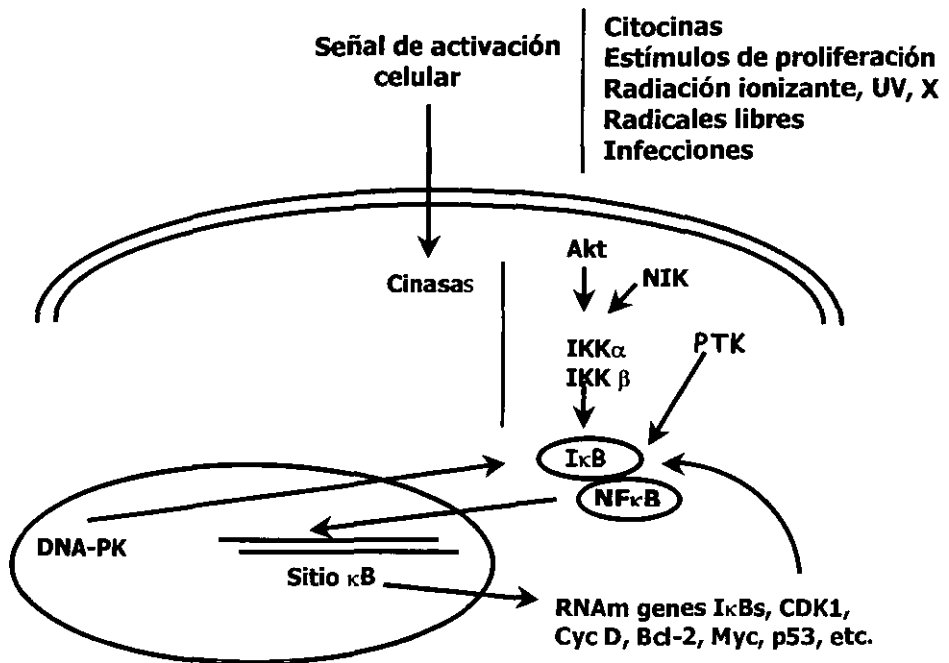


Figura 8. Representación de la vía de señalización del factor de transcripción NF-κB.

El control de la fosforilación de IκB en respuesta a la mayoría de los otros estímulos de NF-κB está a cargo del complejo de cinasas de IκB (IKKs por sus siglas en inglés) (Figura 8). La actividad de este complejo de cinasas es específico para los residuos de serina. Actualmente se sabe que el complejo está formado por tres polipéptidos diferentes los: IKKα, IKKβ e IKKγ. En las células de mamíferos los complejos nativos purificados son aparentemente heterodímeros de IKKα/IKKβ junto con una cantidad no determinada de subunidades IKKγ. La subunidad IKKβ es el blanco para las señales activadoras, la activación del complejo IKK depende de la fosforilación de esta subunidad. Los activadores son reclutados al complejo a través de la subunidad IKKγ, a través de las interacciones con el extremo carboxilo (Karin, 1999).

Los IκBs difieren en sus respuestas a los inductores de NF-κB. IκBα se degrada rápidamente como consecuencia de la activación de NF-κB por la mayoría de los estímulos probados hasta ahora. Además IκBα es capaz de remover a los dímeros de este factor de transcripción unidos a sus sitios κB en el ADN, por lo que se piensa que este inhibidor puede asegurar la naturaleza transitoria de la respuesta (Whiteside e Israel, 1997).

En contraste, generalmente IκBβ e IκBε se degradan de manera tardía. Se ha propuesto que IκBβ regula la respuesta persistente a un determinado grupo de inductores de NF-κB. Las moléculas de NF-κB reguladas por IκBβ pueden escapar el control por IκBα por un nuevo mecanismo: en las células sin estimulación, NF-κB se encuentra asociado con formas hiperfosforiladas de IκBβ mientras que en las células estimuladas, se une a los IκBβ hipofosforilados. Estos complejos tienen la NLS expuesta y son insesibles a la inhibición por IκBα. Además, las agrupaciones NF-κB/ IκBβ se pueden encontrar en los núcleos de las células estimuladas y se pueden unir al ADN. Por lo anterior, se ha propuesto que la forma hipofosforilada de IκBβ funciona como una "chaperona" para proteger a NF-κB de IκBα, permitiendo que NF-κB se transloque al núcleo donde IκBβ es degradado o disociado del complejo (Whiteside e Israel, 1997).

IκBε es degradada de manera lenta, pero se sintetiza nuevamente poco tiempo después. Se piensa que controla una respuesta a NF-κB que es lenta y transitoria. Se han encontrado varias isoformas fosforiladas de esta proteína en las células sin estimulación, pero no se ha detectado en el núcleo y aparentemente no contiene una NES (Whiteside e Israel, 1997).

III. ANTECEDENTES E HIPÓTESIS

Las células de carcinoma humano de pulmón A549

Esta línea celular fue aislada por D. J. Giard y colaboradores (1973) a través del cultivo de tejido carcinomatoso de pulmón de un hombre caucásico de 58 años. Los estudios posteriores de M. Lieber *et al.* (Int. J. Cancer, 17:62-70, 1976) revelaron que las células A549 podían utilizar lectina con un alto porcentaje de ácidos grasos desnaturalizados empleando la vía de la citidina difosfolina. Se localizaron cuerpos multilamelares incluidos bajo el microscopio electrónico de transmisión.

Las células A549 presentan una morfología de tipo epitelial y la frecuencia de distribución cromosómica es de $2n=46$ (ATTC Cell lines and hybridomas, 1994).

Se sabe que en las células A549 de carcinoma de pulmón el TIMP-2 recombinante de humano (hTIMP-2r), a una concentración de 50 pM en presencia de insulina (5 $\mu\text{g/ml}$), provoca un aumento en la incorporación de timidina tritiada (Nemeth *et al.*, 1996). Lo anterior se ha asociado con una proliferación aumentada en estas células. Sin embargo, se desconoce la(s) vía(s) de transducción de señales a través de la(s) cual(es) el TIMP-2 regula la proliferación celular.

El factor NF- κ B

Los factores de transcripción Rel/NF- κ B regulan la respuesta inflamatoria e inmune y han sido implicados directamente en la regulación de la proliferación y la muerte celulares. Se han estudiado las vías de transducción de señales que llevan a la activación de los factores Rel/NF- κ B y la consecuente inducción de la expresión de genes. Recientemente se ha relacionado a la actividad alterada de Rel/NF- κ B con la carcinogénesis en los mamíferos debido a la capacidad oncogénica de la proteína viral v-Rel en los modelos animales. La amplificación cromosómica, la sobre-expresión y el re-

arreglo de los genes que codifican para los factores Rel/NF- κ B se ha relacionado con muchos tumores humanos hematopoyéticos y sólidos (Tabla 2). También se ha descrito una actividad nuclear persistente del factor Rel/NF- κ B en varios tipos celulares de cáncer humano, como resultado de una activación constitutiva de distintas cinasas de las vías de señalización o por las diversas mutaciones que inactivan a las subunidades inhibitorias I κ Bs. Los estudios anteriores señalan una relación entre la activación de la expresión génica por parte de los factores Rel/NF- κ B y su participación en el proceso de transformación. También, las investigaciones que implican al factor NF- κ B en la apoptosis apoyan su participación en la oncogénesis y en la resistencia de las células tumorales a la quimioterapia (Rayet y Gélinas, 1999).

Debido a lo anterior, el interés del presente estudio fue analizar el efecto del hTIMP-2r en el crecimiento de las células A549 e investigar si este efecto está relacionado con la actividad del factor de transcripción NF- κ B.

Hipótesis

El hTIMP-2r induce la proliferación de las células de carcinoma de pulmón A549. El efecto del hTIMP-2r en estas células depende de la activación de la vía de transducción del factor de transcripción NF- κ B.

Gen	Alteración	Tipo de cáncer
<i>c-rel</i>	sobre-expresión	carcinoma de pulmón de células no pequeñas
<i>relA</i>	amplificación	carcinoma escamoso de cabeza y cuello
	amplificación	adenocarcinoma de mama
	amplificación	adenocarcinoma de estómago
	sobre-expresión "splicing" alternativo	líneas celulares de carcinoma de tiroides carcinoma de pulmón de células no pequeñas
<i>nfkb1</i>	sobre-expresión	carcinoma de pulmón de células no pequeñas
	sobre-expresión	líneas celulares de cáncer de colon
	sobre-expresión	líneas celulares de cáncer de próstata
	sobre-expresión	líneas celulares de cáncer de mama
	sobre-expresión	líneas celulares de cáncer de hueso
	sobre-expresión	líneas celulares de cáncer de cerebro
<i>nfkb2</i>	sobre-expresión	carcinoma de mama
	sobre-expresión	carcinoma de colon
<i>ikba</i>	sobre-expresión	líneas celulares de cáncer de ovario

Tabla 2. Implicación de los genes humanos *rel*, *nfkb* e *ikb* en tumores sólidos (Rayet y Gélinas, 1999)

IV. OBJETIVO GENERAL

Investigar el efecto del hTIMP-2r en el crecimiento de las células de carcinoma de pulmón A549 así como la participación de la actividad del factor NF-kB durante este proceso.

V. OBJETIVOS PARTICULARES

- 1.** Observar el efecto del hTIMP-2r (50 pM) en el crecimiento de las células A549 y en la nueva línea estable A549-S32/S36.
- 2.** Determinar la actividad de unión del factor de transcripción NF-kB en las células A549 y A549-S32/S36 durante diferentes tiempos de tratamiento con el hTIMP-2r (50 pM).
- 3.** Analizar los niveles de las proteínas de la familia IκB en las células A549 y A549-S32/S36 expuestas al hTIMP-2r (50 pM) por diferentes tiempos, para relacionarlas con la actividad del factor de transcripción NF-kB.

VI. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 CULTIVO CELULAR

Las células A549 y A549-S32/36 crecieron en monocapa con medio de cultivo DMEM con 10% de suero fetal bovino (SBF), en una atmósfera húmeda con 5% de CO₂.

6.2 ENSAYOS DE VIABILIDAD CELULAR

Se empleó la técnica de cristal violeta para determinar el porcentaje de viabilidad celular. Se consideró el término "viabilidad celular" para designar a las células vivas adheridas a la superficie de la caja de cultivo. El cristal violeta es un colorante monocromático que tiñe el núcleo de las células vivas de azul oscuro y el citoplasma de azul claro. Brevemente, en cajas de cultivo de 24 pozos, se sembraron aproximadamente 100 000 células A549 y A549-S32/36 y se cultivaron bajo las condiciones anteriores durante 24 horas. Posteriormente, se lavaron y se les incubó con medio de cultivo DMEM sin SBF por 24 horas con el objetivo de sincronizarlas al iniciar el tratamiento. Se realizó un curso temporal de exposición al hTIMP-2r (50 pM) que incluyó los siguientes tiempos: 24, 48 y 120 horas. Las células se lavaron y se fijaron con etanol al 70% durante 10 minutos (-20° C). Posteriormente, a cada pozo se le agregó 500 µl de la solución de Cristal Violeta (Violeta de Genciana 0.1%) por 10 minutos y se enjuagó con agua común. Las células teñidas de cada pozo se lisaron con 100 µl de ácido acético al 33% y se obtuvieron las absorbancias a 570 nm en un lector de ELISA. Se realizaron por lo menos 3 experimentos independientes para cada tiempo y con los promedios obtenidos se calculó el porcentaje de viabilidad (con respecto al control) y el porcentaje de desviación estándar. Para determinar si existía diferencia entre las diferentes condiciones, se empleó la prueba estadística de "t-student" pareada ($P < 0.05$).

6.3 CITOMETRÍA DE FLUJO

Para analizar la progresión en el ciclo celular de las células A549 expuestas al hTIMP-2r (50 pM) se utilizó el citómetro de flujo (Becton-Dickinson). Se determinó el contenido de ADN de las células A549 durante el siguiente curso temporal: 12, 24, 36 y 48 horas, con controles específicos para cada tiempo. Se analizaron de acuerdo al protocolo descrito por Vindelov y Chrsitensen (1994). Brevemente, las células A549 se fijaron con etanol al 80% y se lavaron 2 veces con un amortiguador de fosfatos ("PBS" 1X). Se aislaron los núcleos de aproximadamente 1 millón de células por cada condición y su ADN se incubó con Ioduro de propidio durante 10 minutos en la oscuridad a 4° C.

La obtención de datos se realizó con el programa de cómputo "Cell Quest" y su análisis se llevó a cabo con el programa "Mod Fit".

6.4 EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES

Las células A549 y A549-S32/36 (1.5 millones) se sembraron en cajas de cultivo de 25 cm² y se trataron con hTIMP-2r (50 pM) durante 12, 24, 36 y 48 horas conforma el protocolo anterior (con controles específicos para cada tiempo) (Figura 9). Se lavaron con PBS y se lisaron con "Buffer Laemli" e inhibidores de proteasas. Se centrifugó a 15,000 g por 30 minutos. Las proteínas totales se cuantificaron con el método de Bradford (1976).

6.5 OBTENCIÓN DE PROTEÍNAS NUCLEARES

Las células A549 y A549-S32/36 (1.5 millones) se sembraron en cajas de cultivo de 25 cm² y se cultivaron bajo las condiciones anteriores. Después de 24 horas sin SBF, se incubaron con hTIMP-2r (50 pM) por 12, 24, 36 y 48 horas y se obtuvieron extractos proteicos nucleares con controles particulares para cada tiempo. Brevemente, las células se lavaron con PBS, se resuspendieron en 300 µl de Buffer A (10 mM de HEPES (pH=7.5), 2 mM de MgCl₂, 15 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM EGTA, 1 mM de DTT, 0.5 mM PMSF, 2 µg/ml de leupeptina y 2 µg/ml de aprotinina) y se incubaron por 15 minutos en hielo. Se agregaron 15 µl de Nonidet P 40 (NP40) al 10% y se centrifugaron a velocidad alta en la microfuga. Se separó el sobrenadante y se estabilizó con 60 µl de glicerol al 50% (fracción citosólica). El botón nuclear se resuspendió con 100 µl de Buffer C (25 mM de HEPES (pH=7.5), 400 mM de NaCl, 1mM de EDTA, 20% de glicerol, 1 mM de DTT, 0.1% de NP40, 0.5 mM PMSF, 2 µg/ml de leupeptina y 2 µg/ml de aprotinina) pipeteando vigorosamente y con agitación suave por 30 minutos a 4° C. Se removieron los núcleos centrifugando a altas velocidades por 5 minutos. Este sobrenadante se denominó "extracto nuclear" (Meléndez-Zajgla, *et al.*, 1996). Las proteínas se cuantificaron con el método de Bradford (1976).

6.6 ENSAYOS DE RETARDO EN GEL

Con los extractos nucleares obtenidos anteriormente, se llevaron a cabo reacciones de unión proteína-ADN para visualizar los complejos NF- κ B-sitios κ B. Brevemente, 20 μ l de Buffer B (20 mM de HEPES, pH=7.9, 60 mM KCl, 20% de glicerol, 0.25 mM de EDTA, 0.125 mM de EGTA, 1 mM de DTT, 4 mM MgCl₂, 4 mM de espermidina, 200 mM de NaCl, 25 mg/ml de BSA, 2 μ g poli(dI-dC) y 8 μ g del extracto nuclear) se incubaron en hielo por 10 minutos. Se agregaron 100 pg del oligonucleótido de doble hebra marcado correspondiente a la secuencia κ B (de las cadenas kappa de la inmunoglobulina) marcado y se incubó durante 30 minutos a 4° C.

La secuencia del oligonucleótido fue:

5'-AGTTGAGGGGACTTTCCAGGC-3'

El oligonucleótido se marcó en los extremos con [α -P³²]dATP (3000Ci/mmol; Amersham) con la cinasa T4 de polinucleótidos (Roche).

Los complejos proteína-ADN se resolvieron en electroforesis de poliacrilamida al 5% en buffer TBE 0.5X. Los geles se secaron con vacío sobre papeles filtro y se expusieron a películas fotográficas sensibles de 12 a 24 horas a -80° C (Hyperfilm MP, Amersham).

Se realizaron análisis densitométricos de las bandas de los diferentes geles. Los promedios de los experimentos independientes para cada condición se representan como porcentajes. Se consideró que los controles temporales respectivos a cada condición tienen el 100% en intensidad y en referencia a ellos se infirió un aumento o disminución en la intensidad de las bandas (Apéndice).

6.7 "WESTERN BLOT"

En geles de poliacrilamida-SDS (12%) se separaron cantidades iguales de las proteínas totales o nucleares anteriormente extraídas (10 μ g) y se transfirieron a membranas de nylon. Después de bloquear, se incubó con el anticuerpo primario policlonal para las proteínas I κ B α , I κ B β , I κ B ϵ , Bcl-3 y las ciclinas D y E (Sta. Cruz Biotechnology). Las membranas se lavaron y se incubaron nuevamente con el anticuerpo secundario anti-conejo IgG-HRP (Amersham). La unión del anticuerpo se determinó empleando quimioluminiscencia elevada (Amersham) con películas fotosensibles (Hyperfilm MP, Amersham).

Se realizaron análisis densitométricos para cuantificar la intensidad de las bandas de los diferentes geles. Los promedios de los experimentos independientes para cada condición se representan como porcentajes. Se tomó como el 100% de intensidad a aquella de los controles temporales respectivos a cada condición y en base a ellos se determinó un aumento o una disminución en la intensidad de las bandas (Apéndice).

6.8 TRANSFECCIÓN ESTABLE DE LAS CÉLULAS A549 CON EL SUPERREPRESOR DEL FACTOR NF-KB.

El vector eucariote pRcCMV fue amablemente donado por el grupo de investigación del Dr. Patrick Baeuerle (Traencker, *et al.*, 1995). Este contiene la secuencia que codifica para el super-represor del factor NF-kB: un I κ B α con los residuos de serinas 32 y 36 mutadas por alaninas. Debido a estas mutaciones, el inhibidor I κ B α no puede fosforilarse en estos residuos y por consiguiente no se degrada, de tal manera que mantiene al factor de transcripción NF-kB inactivo en el citoplasma de las células (Figura 9).

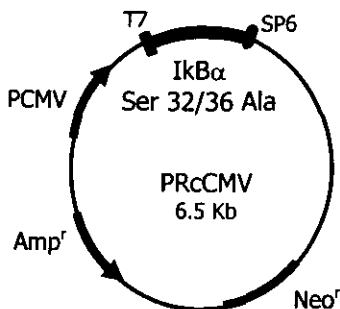


Figura 9. Mapa del vector en el que se subclonó el gen IκBα Ser 32/36 Ala

Las células A549 en cultivo se transfectaron con el vector pRcCMV con el lípido catiónico {N- [1-(2,3-dioleoyl)propyl]-N,N,N- metilsulfato de trimetilamonio} (DOTAP, Roche), de acuerdo a las instrucciones sugeridas por el proveedor. Las células se seleccionaron con geneticina (G418) a una concentración de 400 μg/ml durante 4 semanas. La sobre-expresión la proteína IκBα mutada en las células transfectadas se corroboró a través del "Western blot" (Figura 10). La nueva línea celular estable se denominó "A549-S32/36". En ellas, la mayoría del factor de transcripción NF-κB está secuestrado en el citoplasma (Traencker, *et al.*, 1995).

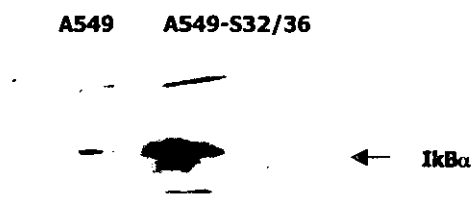


FIGURA 10. "Western blot" en el que se muestra la sobre-expresión de la proteína IκBα (super-represor para el factor NF-κB) en las células A549-S32/36.

VII. RESULTADOS

7.1 EFECTO DEL TIMP-2 EN EL CRECIMIENTO DE LAS CÉLULAS A549

7.1.1 VIABILIDAD CELULAR

A través de estos ensayos se determinó que el hTIMP-2r (50 pM), es capaz de provocar un aumento en el porcentaje de viabilidad de las células de carcinoma de pulmón A549, independientemente de la presencia de insulina. El tiempo de duplicación de las células A549 es de 48 horas aproximadamente (Nemeth *et al.*, 1996). En estos experimentos, el efecto positivo del hTIMP-2r sobre el crecimiento de las células A549 es evidente desde las 48 horas de tratamiento (Figura 11). La prueba estadística de "t-student" pareada mostró que los valores son estadísticamente significativos para cada condición experimental con respecto a su control: para 48 horas $P=0.025$ y para 120 horas $P=0.003$. Cuando las células A549 fueron expuestas al hTIMP-2r (50 pM) en conjunto con la insulina (5 $\mu\text{g/ml}$) se observó que el efecto sobre el porcentaje de viabilidad de las células A549 es probablemente sinérgico.

Se realizaron 5 cursos temporales independientes de exposición al hTIMP-2r para los ensayos de viabilidad celular. Para cada condición de cada uno de los experimentos se realizaron 3 réplicas. La figura 11 muestra un curso temporal representativo con el promedio de 3 experimentos independientes.

% VIABILIDAD CELULAR

- A549 control
- c/insulina (5 µg/ml)
- c/hTIMP-2r (50 pM)
- c/Insulina y hTIMP-2r

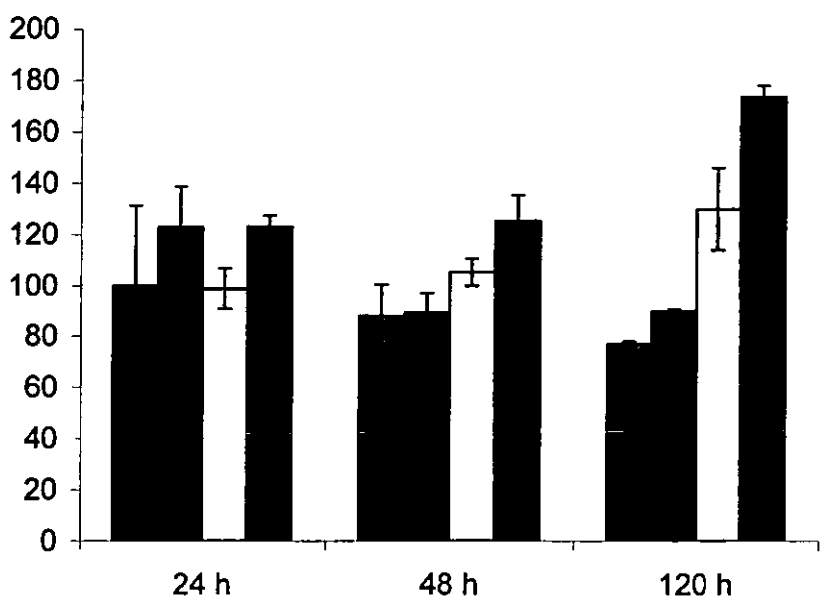


Figura 11. Porcentaje de viabilidad de las células A549 expuestas al hTIMP-2r durante el tiempo indicado en horas.

7.1.2 ANÁLISIS DEL CICLO CELULAR POR CITOMETRÍA DE FLUJO

Para investigar si las células A549 expuestas al hTIMP-2r (50 pM) presentaban una modificación en la progresión del ciclo celular, se analizó el contenido de ADN por medio de citometría de flujo. Los porcentajes del número de células A549 en las diferentes fases

Condición	% G ₀ /G ₁	% S	% G ₂ /M
Control 0 horas	71.32	18.01	10.67
Control 12 horas	68.34	14.27	17.4
Control 24 horas	77.08	11.3	11.63
Control 36 horas	81.02	6.8	12.17
Control 48 horas	81.51	7.21	11.28
12 horas con hTIMP-2r	75.85	16.65	7.51
24 horas con hTIMP-2r	79.04	13.56	7.4
36 horas con hTIMP-2r	91.76	8.24	0
48 horas con hTIMP-2r	89.65	7.83	2.53

del ciclo celular se muestran en la tabla 3.

Tabla 3. Porcentajes del número de células A549 en las fases del ciclo celular. Este experimento es representativo de 3 cursos temporales independientes de exposición al hTIMP-2r.

A las 12 horas de incubación con el hTIMP-2r se encontró un incremento en el porcentaje de células A549 en las fases G1/S del ciclo celular, con respecto a las células control. Este aumento se mantiene a las 24 horas de tratamiento. Después de 36 horas, prácticamente todas las células A549 expuestas al hTIMP-2r se encuentran en las fases G1/S del ciclo celular. El efecto del hTIMP-2r continua hasta las 48 horas con respecto a las células A549 no tratadas, a pesar de que se observa un poco disminuido en comparación a las 36 horas. En las células control se observó que aparentemente un porcentaje mayor se encontraban detenidas en las fases G2 o G2/M (Figura 12).

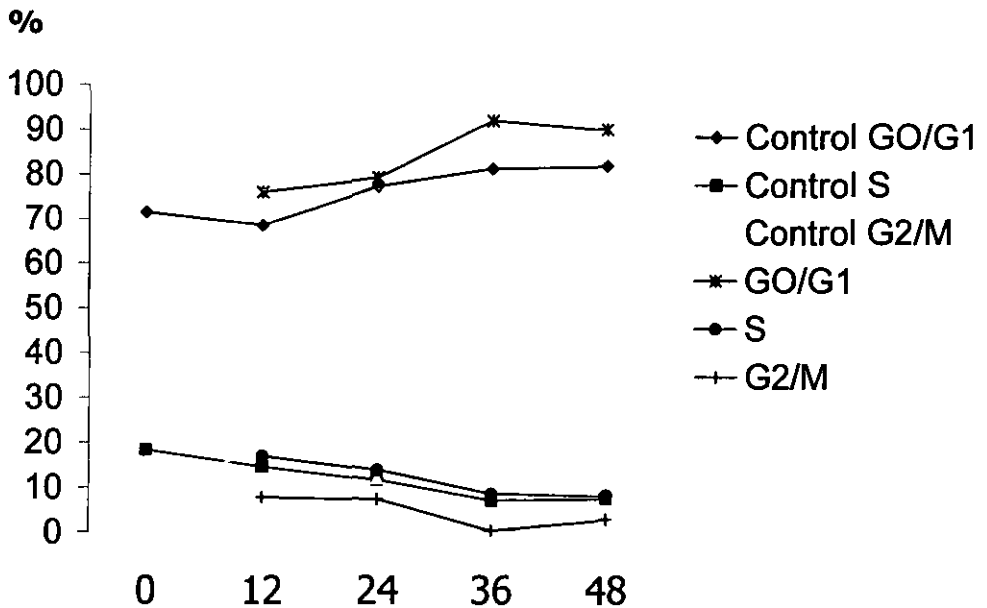


Figura 12. Cambios en los porcentajes de las diferentes fases del ciclo en las células A549 durante el tratamiento con el hTIMP-2r (50 pM). "Control" se refiere a las células A549 creciendo sin SBF y las líneas que únicamente indican las fases del ciclo celular corresponden a las células A549 expuestas al hTIMP-2r.

7.2 LA CAPACIDAD DE UNIÓN DEL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN NF-KB EN LAS CÉLULAS A549

Al medir la capacidad de unión del factor NF κ B, en las células A549 tratadas con TIMP-2r (50 pM) en los geles de retardo, se observó una disminución en ésta a tiempos cortos (hasta 6 horas) con respecto al control de 0 horas (datos no mostrados). Debido a lo anterior, se analizó la activación de NF-kB a tiempos mayores. La capacidad de unión de NF-kB presenta un curso bifásico, aumentando a las 12 y 36 horas. En el curso temporal de las células A549 controles se observa que sólo se presenta la modulación de la capacidad de unión del factor NF-kB a las 36 horas, aunque menor que en el caso de las células expuestas al TIMP-2 (Figura 12).

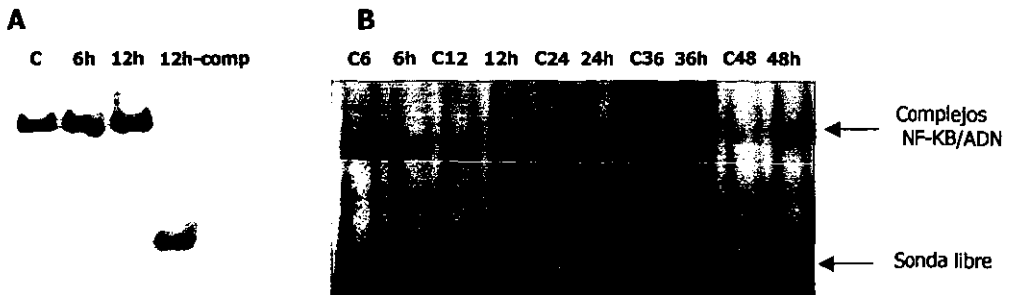


Figura 13. Ensayos de retardo en gel para el factor NF-kB en las células A549 expuestas al hTIMP-2r durante los tiempos señalados. La letra "C" corresponde a las células control. En el inciso A se muestra un control de 12 horas con hTIMP-2r en el que se incubó previamente con el oligonucleótido que contiene el sitio κ B no marcado radioactivamente.

Los ensayos de retardo en gel se realizaron por lo menos tres veces con extractos nucleares independientemente obtenidos, a partir de tres cursos temporales distintos de las células A549 expuestas al hTIMP-2r (50 pM). En algunos de los geles se incluyó la reacción de competencia con el oligonucleótido específico que lleva el sitio κ B no marcado radioactivamente (Figura 13 A). Así mismo, para cuantificar las diferencias observadas en las distintas bandas de los geles, se realizaron densitometrías con el programa "NIH Image" (Apéndice).

7.3 INMUNODETECCIÓN DE LOS IKBS DE LAS CÉLULAS A549

7.3.1 INHIBIDORES TOTALES

El tratamiento de las células con hTIMP-2r induce un aumento en los niveles del inhibidor $I\kappa B\alpha$ a las 12 y 48 horas (Figura 14 y Apéndice). Sin embargo, se observó una disminución significativa en la cantidad de esta proteína, con respecto a los controles para cada tiempo, a las 24 y 36 horas de exposición al hTIMP-2r (50 pM).

Por otra parte, $I\kappa B\beta$ posee un comportamiento bifásico: disminuye con respecto al control a las 12 horas y aumenta a partir de las 24 horas de exposición al hTIMP-2r en referencia a las células control (Figura 14 y Apéndice).

En el caso del inhibidor $I\kappa B\epsilon$, su expresión disminuye a partir de las 12 horas de tratamiento con el hTIMP-2r, es semejante a la observada en las células control a las 24 horas y disminuye considerablemente a las 36 horas. Posteriormente, aumenta a las 48 horas con respecto a las células control (Figura 14 y Apéndice).

Los niveles de la subunidad reguladora de la familia de IκBs, Bcl-3, disminuyen a las 12 horas con respecto a las células control, pero a partir de las 24 horas su expresión se mantiene con diferencias muy pequeñas con respecto a las células A549 no expuestas al hTIMP-2r (Figura 14 y Apéndice).

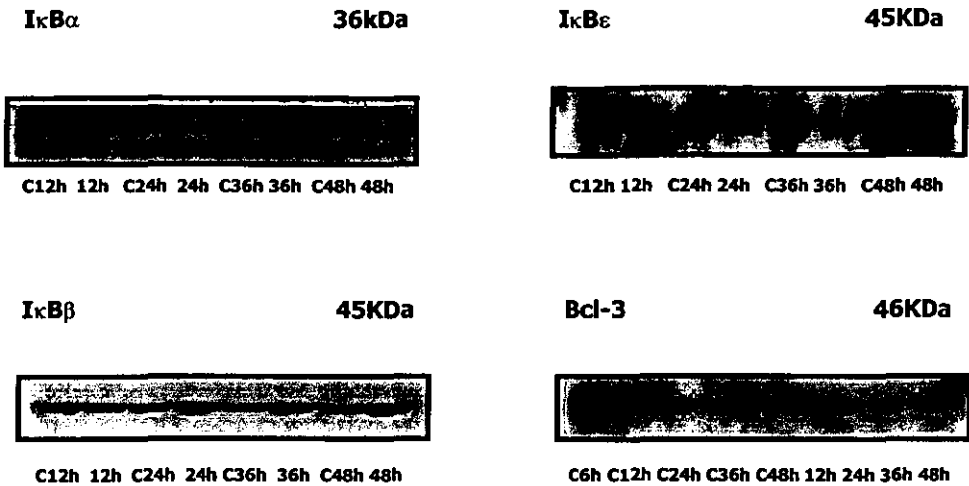


Figura 14. Inmuno-detección de los inhibidores totales de NF-κB en las células A549 expuestas al hTIMP-2r durante las horas indicadas. La letra "C" se refiere a los controles.

7.3.2 INHIBIDORES NUCLEARES

Dado a que los inhibidores $I\kappa B\alpha$ e $I\kappa B\beta$ y Bcl-3 son capaces de translocarse al núcleo e inhibir o favorecer la transcripción, analizamos su presencia en los núcleos de las células A549 en cursos temporales de exposición al hTIMP-2r, similares a los descritos anteriormente.

El inhibidor $I\kappa B\alpha$ mantiene un nivel constante en los núcleos de las células A549 tratadas con el hTIMP-2r, con respecto a las células control hasta las 36 horas. A las 48 horas de exposición al hTIMP-2r, la cantidad de proteína detectada disminuye de manera importante (Figura 15 y Apéndice).

Los niveles nucleares de la subunidad inhibitoria $I\kappa B\beta$ en las células A549 expuestas al hTIMP-2r son menores a las 12 horas con respecto al control; sin embargo aumentan a partir de las 24 horas, en referencia a las células A549 no tratadas. A las 48 horas de exposición al hTIMP-2r se observan niveles similares a los de las células control (Figura 15 y Apéndice).

Los resultados obtenidos para la subunidad regulatoria de NF- κ B, Bcl-3, muestran que sus niveles nucleares son semejantes a los de las células no tratadas; sin embargo, disminuyen las 24 y 36 horas de exposición al hTIMP-2r con respecto a los controles. A partir de las 48 horas hay un aumento en la cantidad de Bcl-3 nuclear (Figura 15 y Apéndice), lo cual podría favorecer la transcripción de algunos genes que responden a NF- κ B (Bundy y McKeithan, 1997).

I κ B α



C12h 12h C24h 24h C36h 36h C48h 48h

I κ B β



C12h C24h C36h C48h 12h 24h 36h 48h

Bcl-3



C12h C24h C36h C48h 12h 24h 36h 48h

Figura 15. Inmuno-detección de los inhibidores I κ Bs nucleares de las células A549 expuestas al hTIMP-2r durante las horas señaladas. La letra "C" se refiere a los controles.

7.4 LAS CICLINAS D Y E EN LAS CÉLULAS A549

Se analizó la presencia de las ciclinas D y E (proteínas reguladoras de la fase G1 y G1/S del ciclo celular) en extractos de proteínas nucleares de células A549 tratadas con hTIMP-2r (50 pM).

A partir de las 12 horas de exposición al hTIMP-2r, el nivel de ciclina D disminuye considerablemente con respecto a los controles. A las 24 y 36 horas las diferencias con las células A549 controles son menores. Finalmente a las 48 horas, se observa un aumento en la cantidad de ciclina D detectada en las células A549 tratadas con el hTIMP-2r, en contraste a las células controles (Figura 16 y Apéndice).

La ciclina E disminuye a las 12 horas de tratamiento con el hTIMP-2r, pero sus niveles se mantienen hasta las 48 horas con respecto a las células control (Figura 16 y Apéndice).



Figura 16. Inmunodetección de las ciclinas D y E en extractos nucleares de las células A549 expuestas al hTIMP-2r en los tiempos indicados.

7.5 VIABILIDAD DE LAS CÉLULAS A549-S32/36 EN RESPUESTA AL hTIMP-2r

Como se mencionó anteriormente, las células A549-S32/36 se generaron a través de la lipo-transfección con un vector que contenía la secuencia que codifica para el super-represor del factor NF- κ B. Es decir, estas células sobre-expresan un inhibidor I κ B α que no puede ser fosforilado en los residuos de serinas 32 y 36, de tal manera que no se induce su degradación (Figuras 9 y 10). Como consecuencia, la mayoría del factor transcripcional NF- κ B se encuentra secuestrado en el citoplasma de las células A549-S32/36 y por lo tanto, se inhibe prácticamente toda su actividad (Baeuerle *et al.*, 1998).

El porcentaje de viabilidad en las células A549-S32/36 disminuye considerablemente al tratarlas con el hTIMP-2r (50 pM) a partir de las 48 horas y ésta decrece aún más hacia las 120 horas de exposición (Figura 17).

% VIABILIDAD CELULAR

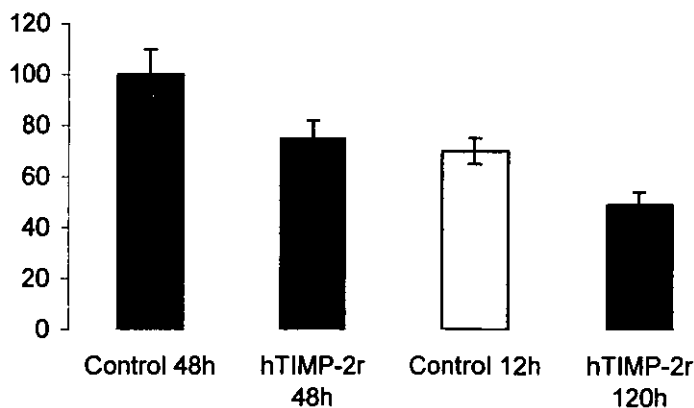


Figura 17. Porcentajes de viabilidad de las células A549-S32/36 expuestas al hTIMP-2r (50 pM).

7.6 LA ACTIVIDAD DE UNIÓN DEL FACTOR NF-KB EN LAS CÉLULAS A549-S32/36

Se determinó que en las células A549-S32/36 el factor NF-kB aumenta a las 12 horas de exposición al hTIMP-2r con respecto a las células control; sin embargo, disminuye de manera considerable a partir de las 24 horas de tratamiento con el hTIMP-2r. De manera interesante, en el curso temporal de las células A549-S32/36 que se mantuvieron sin SBF, se presentó un incremento de actividad del factor NF-kB a las 24 y 36 horas (Figura 18 y Apéndice).

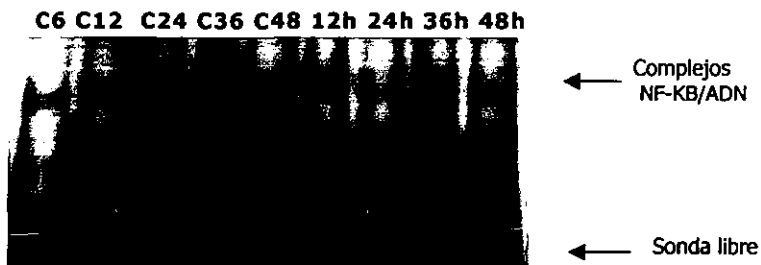


Figura 18. Ensayo de retardo en gel para el factor NF-kB en las células A549-S32/36 tratadas con hTIMP-2r durante los tiempos señalados. La letra "C" señala las células control.

7.7 LOS INHIBIDORES IKBS EN LAS CÉLULAS A549-S32/36

Debido a que la activación del factor de transcripción NF- κ B es consecuencia de la degradación de sus inhibidores, los IkBs, se analizaron los niveles de éstos en las células A549-S32/36 tratadas con hTIMP-2r (50 pM).

Los resultados muestran que los niveles de los inhibidores $I\kappa B\alpha$ e $I\kappa B\beta$ de estas células tratadas con el hTIMP-2r, no presentan cambios hasta las 48 horas, en que ambos se incrementan (Figura 19 y Apéndice).

La proteína $I\kappa B\beta$ presenta un aumento a las 12 horas de tratamiento con el hTIMP-2r con respecto a las células control, pero sus niveles se mantienen a las 24 horas. Después de 36 horas de exposición al hTIMP-2r, la cantidad de $I\kappa B\beta$ en las células A549-S32/36 disminuye y las 48 horas sus niveles aumentan nuevamente (Figura 19 y Apéndice).

Los niveles de la subunidad regulatoria Bcl-3 se mantiene a las 12 horas de exposición al hTIMP-2r con respecto al control; sin embargo, disminuyen a las 24 y 36 horas de tratamiento. A las 48 horas, la cantidad de proteína observada es comparable a la de las células control (Figura 19 y Apéndice).

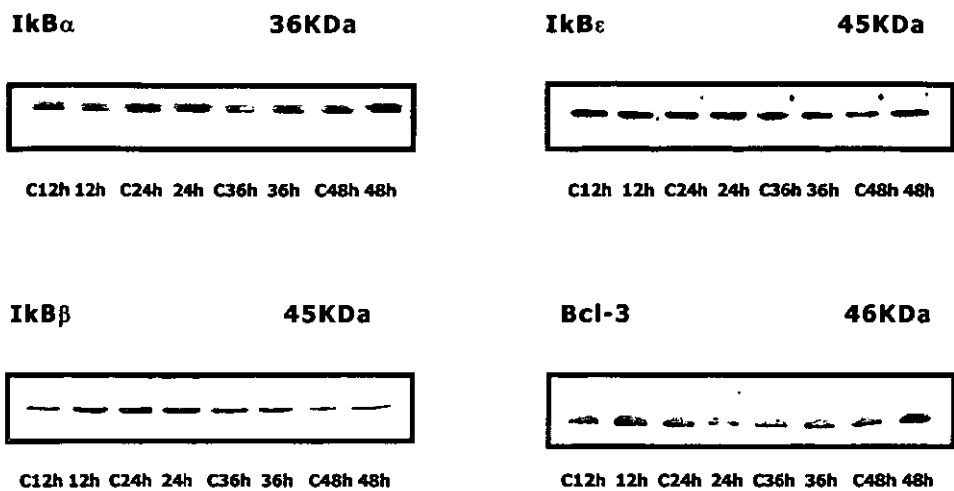


Figura 19. Inmuno-detección de los inhibidores totales de NF-κB en las células A549-S32/36 tratadas con hTIMP-2r durante las horas señaladas. La letra "C" indica los controles.

VIII. DISCUSIÓN

Muchas investigaciones apoyan la idea de que los TIMPs podrían actuar como supresores tumorales debido a su actividad "anti-metaloproteinasas" y a su papel como protectores de la MEC. Asimismo se ha demostrado que los TIMPs inhiben el desarrollo de la metástasis en modelos animales y que su sobre-expresión en las células transformadas inhibe la invasión y el crecimiento tumoral (Blavier *et al.*, 1999).

De manera contradictoria se ha demostrado que los TIMPs promueven la proliferación celular y la progresión tumoral. Por ejemplo, se ha observado un pronóstico desfavorable de los pacientes con cáncer de vejiga y de mama que tienen niveles elevados del TIMP-2 (Visscher *et al.*, 1994 y Gringnon *et al.*, 1996).

Se desconocen los mecanismos responsables del efecto positivo de los TIMPs en la progresión tumoral. Ahora se sabe que además de inhibir a las MMPs, los TIMPs participan incrementando la degradación proteolítica de la MEC o directamente afectando la sobrevivencia y el crecimiento celulares (Blavier *et al.*, 1999).

Hasta la fecha, tampoco se han elucidado completamente los procesos moleculares a través de los cuales los TIMPs afectan las funciones celulares esenciales, como la proliferación y la muerte.

Por otra parte, dos estudios independientes sugieren que el TIMP-2 puede inhibir o promover la proliferación celular, dependiendo de la línea celular, a través de una vía de transducción celular que implica al AMPc. Sin embargo, las concentraciones utilizadas en estas investigaciones fueron de 500 a 1000 veces mayores que las fisiológicas para estos TIMPs (Corcoran y Stetler-Stevenson, 1995 y Hoegy *et al.*, 2000).

En este trabajo se estudió el efecto del hTIMP-2r en el crecimiento de las células de carcinoma humano de pulmón A549 utilizando la concentración fisiológica de 50 pM. Asimismo, se investigó si la activación del factor de transcripción NF-kB está implicada en el proceso de proliferación celular, en respuesta al hTIMP-2r, por parte de esta línea celular.

El efecto del hTIMP-2r en el crecimiento de las células A549

Se sabe que en las células A549 de carcinoma de pulmón el hTIMP-2r (50pM) en presencia de la insulina (5 µg/ml), provoca un aumento en la incorporación de timidina tritiada (Nemeth *et al.*, 1996). En el presente estudio se observó un efecto sinérgico del hTIMP-2r (50 pM) en conjunto con la insulina (5 µg/ml). Sin embargo, se demostró que el hTIMP-2r (50pM), independientemente de la insulina, produce un aumento en el porcentaje de viabilidad (considerado como "número de células vivas adheridas al sustrato de la caja de cultivo") de las células A549 estadísticamente significativo a partir de las 48 horas de tratamiento (Figura 11).

Para analizar si las células A549 avanzan en el ciclo celular en respuesta al hTIMP-2r o si éstas son más resistentes a la muerte celular, se determinó el contenido de ADN por medio de citometría de flujo. Los resultados obtenidos mostraron que un mayor porcentaje de las células tratadas con el hTIMP-2 (50 pM) se encuentran en las fases G1 y S desde las 12 hasta las 48 horas. En contraste, se observó que un mayor porcentaje de las células control se encuentran detenidas en las fases G2 o G2/M. Se sabe que la pérdida de la actividad del complejo Ciclina D1/CDK antes de que las células alcancen el punto de restricción (conocido como "Start" en los mamíferos), impide que muchas líneas celulares en cultivo avancen a la fase S del ciclo. Después de que ha ocurrido la

replicación del ADN, la ausencia del complejo Ciclina D1/CDK no provoca ningún efecto sobre la progresión en el ciclo celular (Sherr, 1996). Los resultados obtenidos sugieren que es posible que, en presencia del hTIMP-2r (%50 pM), el ciclo celular de las células A549 sea más rápido, con respecto a las células A549 que crecen en ausencia de factores de crecimiento.

La activación del factor NF-kB en las células A549 expuestas al hTIMP-2r

Como se mencionó, el factor de transcripción NF-kB participa en la regulación de la proliferación y la muerte celulares, así como en el proceso oncogénico y en la progresión de varios tipos de cáncer (Grumont *et al.*, 1998, Guttridge *et al.*, 1999, Hinz *et al.* 1999, y Kaltschmidt *et al.*, 1999, Rayet y Célinas, 1999 y Ryan *et al.*, 2000). Para iniciar la investigación sobre la(s) vía(s) de transducción de señales que utiliza el hTIMP-2r para ejercer un efecto sobre el crecimiento de las células A549, se analizó si la actividad del factor NF-kB se incrementaba al exponer a las células A549 al hTIMP-2r (50 pM). Actualmente, se conocen con detalle las diferentes cascadas o redes de cinasas, activadas por diversos estímulos intra- y extra-celulares, que específicamente participan en la(s) vía(s) de señalización del factor NF-kB (Karin, 1999).

Se observó, por medio de ensayos de retardo en gel, que la actividad de unión de NF-kB aumenta en las células A549 tratadas con hTIMP-2r a las 12 horas, se mantiene a las 24 horas, incrementando de nuevo a las 36 y 48 horas, con respecto a los controles (Figura 13). Es interesante resaltar el hecho de que en las células A549 control que crecieron en ausencia de factores de crecimiento, la capacidad de unión de NF-kB está presente y que varía temporalmente. Se ha mostrado una actividad nuclear persistente del factor Rel/NF-kB en varios tipos celulares de cáncer humano, como resultado de una

activación constitutiva de las diversas cinasas de las vías de señalización del factor NF-kB, o por algunas mutaciones que inactivan a las subunidades inhibitorias Ikb β s. También se ha sugerido una relación entre la activación de la expresión génica por parte de los factores Rel/NF-kB y su participación en el proceso de transformación (Rayet y Célinas, 1999).

La mayoría de los estímulos que activan la(s) vía(s) de transducción del factor NF-kB provocan un incremento en la actividad de éste generalmente a tiempos cortos. Sin embargo, se han descrito diversos estímulos que propician la actividad del factor NF-kB de manera tardía (Gilmore, 1999). Ryan y colaboradores (2000), encontraron que en las células Saos-2 de osteosarcoma la proteína p53 induce un aumento en la capacidad de NF-kB para unirse al ADN después de 24 horas. En nuestro laboratorio (Bandala *et al.*, 1998) se encontró que en las células A549 tratadas con el fármaco Gemcitabina (el cual provoca daño al ADN), la actividad de NF-kB se incrementó después de 24 horas.

Guedez y sus colaboradores (1998) encontraron que la sobre-expresión del TIMP-1 confiere resistencia a la apoptosis a algunas líneas celulares del linfoma de Burkitt provocada por diversos estímulos (el choque frío, la privación del suero y la radiación γ). Sin embargo, esta sobre-expresión provocó una disminución de la actividad del factor transcripcional NF-kB y un aumento en los niveles de su inhibidor Ikb α .

La actividad incrementada del factor NF-kB en las células A549 podría relacionarse con las observaciones de su contenido de ADN. Mientras que en las células A549 en medio sin SBF se observa una única activación de NF-kB hasta las 36 horas, en las células A549 expuestas al hTIMP-2r, se induce la actividad de este factor transcripcional dos veces: a las 12 y a las 36 horas. Debido a que el punto de control del ciclo celular en los mamíferos está ubicado fisiológicamente en las fases G1 y G1/S (Hulleman *et al.*, 1999 y

Sherr, 1996), se podría pensar que las células A549 en presencia del hTIMP-2r inician el ciclo celular una vez más en comparación con las células control. Estos resultados también son congruentes con el aumento en el porcentaje de viabilidad de las células A549 tratadas con el hTIMP-2r.

Por otra parte, como continuación de esta investigación se pretenden identificar, por medio de ensayos de "super-retardo", a las diferentes subunidades que conforman a los dímeros del factor NF-kB, activadas en las células A549 en respuesta al hTIMP-2r.

Los inhibidores IκBs en las células A549 tratadas con el hTIMP-2r

Se sabe que los inductores del factor NF-kB provocan la activación de diversas cinasas que fosforilan a las distintas moléculas IκBs en diferentes residuos de aminoácidos induciendo así su degradación (Whiteside e Israel, 1997). Por lo tanto, la liberación y la consecuente activación del factor transcripcional NF-kB está regulada por la fosforilación y la degradación de las subunidades inhibitorias IκBs. Debido a lo anterior, se determinó si los niveles de los IκBs se modificaban en las células A549 tratadas con el hTIMP-2r (50 pM).

Inhibidores totales

Se observó que el inhibidor IκBα, el cual es expresado sólo en respuesta al factor NF-kB, aumenta en los tiempos en que este factor de transcripción es más activo (a las 12 y 48 horas de exposición al hTIMP-2r) (Figura 14). Estos resultados son consistentes con aquellos reportados ya que IκBα es rápidamente degradado como consecuencia de la activación de NF-kB por diversos estímulos y es re-sintetizado de manera dependiente del mismo NF-kB, de tal manera que se establece un asa de regulación para esta vía de

transducción de señales (Figura 8) (Brown *et al.*, 1993). Sin embargo, sólo sería posible afirmar los hechos anteriormente sugeridos, demostrando a través de ensayos de inmunoprecipitación, la relación entre $I\kappa B\alpha$ (así como de las otras subunidades inhibitorias estudiadas) y los diferentes dímeros que constituyen a NF- κB y si existe alguna modificación de ésta al tratar a las células A549 con el hTIMP-2r.

En contraste, el inhibidor $I\kappa B\beta$ disminuye rápido a las 12 horas, pero aumenta después de 24 horas de exposición al hTIMP-2r (Figura 14). Se ha propuesto que $I\kappa B\beta$ regula la respuesta persistente de algunos estímulos de NF- κB . Las moléculas de este factor transcripcional escapan la regulación por $I\kappa B\alpha$ debido a que $I\kappa B\beta$ actúa como una "chaperona". Es decir, cuando $I\kappa B\beta$ está hipofosforilado y unido a NF- κB , desplaza a $I\kappa B\alpha$ y permite que NF- κB induzca la transcripción de ciertos genes (Whiteside e Israel, 1997). En este sentido, sería interesante analizar los niveles de fosforilación y los sitios de la misma, en las diferentes subunidades regulatorias $I\kappa Bs$ cuando las células A549 son expuestas al hTIMP-2r.

El inhibidor $I\kappa B\epsilon$ se degrada tardíamente en respuesta a estímulos diversos y se ha propuesto que controla otro tipo de respuesta del factor NF- κB la cual es transitoria y lenta (Whiteside e Israel, 1997). Sin embargo, en las células A549 expuestas al hTIMP-2r se encontró que sus niveles decrecen a las 12 horas. Por otro lado, se sabe que los niveles de $I\kappa B\epsilon$ aumentan cuando se activa NF- κB (Whiteside e Israel, 1997) por lo que se los niveles incrementados después de 24 horas de tratamiento con el hTIMP-2r podrían considerarse consecuencia de la activación de este factor de transcripción (Figura 14).

Se sabe que la subunidad regulatoria de la familia de $I\kappa B$, Bcl-3, es un proteína nuclear asociada preferencialmente a los homo- o hetero-dímeros de las subunidades p50 y p52. Puede activar o Inhibir al factor NF- κB en función de la cantidad y de su estado de

fosforilación (Bundy y McKeithan, 1997). En este trabajo se encontró que la proteína Bcl-3 disminuye a las 12 horas de exposición al hTIMP-2r, pero a partir de las 24 horas aumenta y mantienen el mismo nivel que las células control (Figura 14). Posteriormente, se pretende investigar si Bcl-3, se encuentra asociada con los dímeros mencionados o con otros componentes de la maquinaria de transcripción para analizar su papel en la activación de la transcripción de algunos genes que responden a NF- κ B.

Los resultados obtenidos en esta investigación sugieren que la activación de NF- κ B en las células A549 tratadas con el hTIMP-2r durante 12 horas, puede deberse a la degradación alternada y/o consecutiva de los inhibidores I κ Bs: I κ B β , Bcl-3 e I κ B ϵ . Por otra parte, sería interesante investigar, a través de ensayos de inmuno-precipitación, la asociación de las subunidades a los dímeros de NF- κ B a tiempos cortos de exposición al hTIMP-2r, así como su activación por las diferentes cinasas IKKs. Así mismo, la activación secundaria de NF- κ B a las 36 horas de exposición al hTIMP-2r puede explicarse por la disminución de los inhibidores I κ B α e I κ B ϵ . Los resultados anteriores llevan a pensar que las distintas subunidades inhibitorias I κ Bs podrían ser reguladas a diferentes tiempos por diversas cinasas.

Inhibidores nucleares

Algunos de los inhibidores de NF- κ B son capaces de entrar al núcleo de las células y de secuestrar a los dímeros de este factor de transcripción, deteniendo así su acción. Por esta razón, se investigaron los niveles nucleares de estas proteínas inhibitorias después de exposición al hTIMP-2r.

Los niveles nucleares de I κ B α no presentan modificaciones considerables con respecto a sus controles hasta las 24 horas de exposición al hTIMP-2r; sin embargo,

disminuyen a partir de las 36 horas (Figura 15). Este último decremento en la I κ B α nuclear podría explicar, parcialmente, la actividad incrementada de NF- κ B en las células A549 a las 48 horas de tratamiento con el hTIMP-2r. La suposición anterior podría afirmarse demostrando la falta de asociación de la I κ B α nuclear con los dímeros de NF- κ B.

La subunidad I κ B β muestra un patrón de expresión similar al de I κ B α . Sin embargo, se observó un aumento a las 36 horas de tratamiento con el hTIMP-2r con respecto al control y una disminución muy clara a las 48 horas (Figura 15). Es interesante mencionar que en todas las condiciones se observa dos bandas, la más intensa tiene de un peso molecular ligeramente menor. Para corroborar que ésta corresponde probablemente a un I κ B β hipofosforilado que puede permitir la actividad de NF- κ B se realizarán ensayos de inmunoprecipitación así como el análisis de los sitios de fosforilación.

Por otro lado, la proteína Bcl-3 es capaz de secuestrar a los dímeros de NF- κ B; sin embargo, se ha observado que Bcl-3 puede favorecer la transcripción o inhibirla. Los resultados obtenidos muestran que los niveles de esta proteína disminuyen a las 24 horas de exposición al hTIMP-2r con respecto a los controles. Sin embargo, a partir de las 36 horas hay un aumento en la cantidad de Bcl-3 nuclear (Figura 15). Los resultados anteriores, complementados con ensayos de inmunoprecipitación, podrían explicar en parte la actividad incrementada de NF- κ B a las 36 y 48 horas.

Las ciclinas D y E en las células A549 expuestas al hTIMP-2r

El factor transcripcional NF- κ B promueve la expresión de más de 150 genes. Sin embargo, diferentes mecanismos confieren selectividad a la respuesta transcripcional por parte de la activación de NF- κ B. Éstos incluyen una respuesta combinatoria de diferentes

regiones promotoras/potenciadoras y de la activación y la unión selectivas de los diferentes miembros de la familia de factores de transcripción (Karin, 1999). Así mismo, el factor de transcripción NF- κ B participa directamente en la regulación de la expresión de la ciclina D1 y por lo tanto en la regulación del ciclo celular y la proliferación (Grumont *et al.*, 1998, Guttridge *et al.*, 1999, Hinz *et al.* 1999, y Kaltschmidt *et al.*, 1999).

En este trabajo se estudió la expresión de las ciclinas D y E en las células A549 tratadas con el hTIMP-2r. Los resultados obtenidos indican que la expresión de ciclina D no puede relacionarse con la actividad del factor transcripcional NF- κ B como se esperaba, ya que cuando esta última aumenta, los niveles de la ciclina D son menores. Dada la importancia que tiene la ciclina D en la determinación de la progresión del ciclo celular, su expresión es finamente regulada por otros factores, como respuesta a una integración completa de las señales de proliferación (Hulleman *et al.*, 1999 y Sherr, 1996). Debido a lo anterior, sería interesante investigar si su expresión, a nivel del ARNm así como de la proteína, aumenta a tiempos cortos después de tratar a las células A549 con el hTIMP-2r. Por otra parte, las diferencias en la movilidad electroforética observadas posiblemente estén asociadas a los distintos niveles de fosforilación de estas proteínas (Hulleman *et al.*, 1999) (Figura 14). Por otra parte, también es importante determinar la asociación con y la consecuente activación de las subunidades catalíticas CDKs, asociadas a la ciclina D para determinar su participación en el proceso de proliferación de las células A549 expuestas al hTIMP-2r.

Con respecto a la expresión de la ciclina E en las células A549 expuestas al hTIMP-2r, se encontró que sus niveles tampoco están relacionados con la actividad incrementada en el tiempo del factor NF- κ B (Figura 14). La expresión de la ciclina E es inducida principalmente por la fosforilación de la proteína pRB, por parte del complejo ciclina

D/Cdk4, lo cual ocasiona la activación del factor transcripcional E2F/DP1 y la progresión hacia las siguientes fases del ciclo celular (Hulleman *et al.*, 1999 y Sherr, 1996). Sin embargo, los resultados obtenidos para la ciclina E son congruentes si se relacionan con el crecimiento de las células A549 expuestas al hTIMP-2r. En las células que proliferan, la expresión de la ciclina E es máxima en la transición G1 hacia S y durante este intervalo, la ciclina E forma complejos nuevos con la subunidad catalítica CDK2 (Sherr, 1996).

La viabilidad de las células A549-S32/36 tratadas con el hTIMP-2r

Para investigar si el hTIMP-2r induce la proliferación de las células A549 a través de alguna vía de transducción de señales que activa al factor NF- κ B, se generó un línea celular que sobre-expresa el super-represor para el factor transcripcional NF- κ B. Estas células, denominadas A549-S32/36, mostraron una disminución notable en el porcentaje de viabilidad al exponerlas al hTIMP-2r (50 pM), a partir de las 48 horas (Figura 17). Los resultados sobre los cambios en el porcentaje de viabilidad de las células A549 y A549-S32/36 apoyan la idea de que el factor de transcripción NF- κ B está implicado en la vía de transducción de señales proliferativas del hTIMP-2r.

La capacidad de unión del factor NF- κ B en las células A549-S32/36 expuestas al hTIMP-2r

Se determinó que en las células A549-S32/36 la capacidad de unión del factor NF κ B disminuye a partir de las 24 horas de exposición al hTIMP-2r con respecto a los controles (Figura 18). El resultado esperado era que la capacidad de unión en las condiciones experimentales fuera semejante a aquella de los controles. Al respecto podría pensarse que en las células A549-S32/36, la presencia del hTIMP-2r induce alguna vía de

transducción que inhibe la activación de NF- κ B. Otra explicación al fenómeno de inhibición del crecimiento celular podría ser que al bloquear al factor NF- κ B, no se induce la expresión de ciertos genes que promueven la proliferación celular.

Los Inhibidores I κ Bs en las células A549-S32/36 tratadas con el hTIMP-2r

La variación encontrada en los niveles de los I κ Bs de las células A549 sugiere que algunas cinasas deben fosforilarlos e inducir su degradación. Por ello, se investigó si en las células A549-S32/36 tratadas con el hTIMP-2r, el patrón de variación en los I κ Bs se mantenía o se modificaba debido a la presencia del super-represor.

Los resultados obtenidos mostraron que las modificaciones en los niveles de los inhibidores I κ Bs en las células A549-S32/36 son pequeñas en algunos casos y en general muestran un patrón de modulación distinto al observado en los I κ Bs totales de las células A549 expuestas al hTIMP-2r (Figuras 14 y 19).

En las células A549-S32/36 se sobre-expresa un I κ B α que no puede fosforilarse en los residuos de Serina 32 y 36 por lo que se esperaba que no hubiera cambios en los niveles de proteína con respecto a las células control. Sin embargo, se observó un pequeño aumento dependiente del tiempo de exposición al hTIMP-2r, el cual podría explicar en parte la disminución de la actividad de NF- κ B. Las células transfectadas sobre-expresan la proteína recombinante que no se puede fosforilar, pero debe existir cierta cantidad de la proteína silvestre. Como consecuencia, sería interesante determinar la presencia de ambos inhibidores, el silvestre y el recombinante, e investigar su regulación en estas células.

Los inhibidores $I\kappa B\epsilon$, $I\kappa B\beta$ y Bcl-3 se modificaron en referencia a sus controles. ES posible que la disminución de la cantidad de estas subunidades regulatorias dímeros de pueda explicar en parte la pequeña actividad de NF- κ B encontrada. En este sentido, sería muy interesante, determinar cuales subunidades conforman los dímeros de NF- κ B bajo estas condiciones.

En esta investigación se observó que el hTIMP-2r (50 μ M) promueve el crecimiento de las células de carcinoma de pulmón A549. Los resultados obtenidos en las células A549-S32/36 sugieren que la actividad del factor de transcripción NF- κ B es importante durante el crecimiento celular. Posiblemente, la activación de algunas cinasas por parte del hTIMP-2r, como las IKKs, induce la degradación de los I κ Bs en estas células. Como probable consecuencia de lo anterior, los niveles de los inhibidores de NF- κ B, los I κ Bs, son modulados en estas células. El estudio realizado por Yamashita y colaboradores (1996) mostró que los TIMPs 1 y 2 (0.71 nM y 46 μ M, respectivamente) estimulan la incorporación de timidina tritiada a través de la activación de la cinasa ERK2, en las células de osteosarcoma humano MG-63. Sin embargo, la inducción de esta cinasa se observó después de 10 minutos de tratamiento y no se analizaron los efectos de estos TIMPs en tiempos posteriores. Por lo tanto, es interesante continuar esta investigación analizando la activación de algunas cinasas de las I κ Bs por parte del hTIMP-2r. Así mismo, se pretenden obtener líneas celulares que expresen el TIMP-2 de manera estable y regulable para analizar el efecto de éste sobre el crecimiento de algunas líneas celulares de cáncer humano (Figura 19).

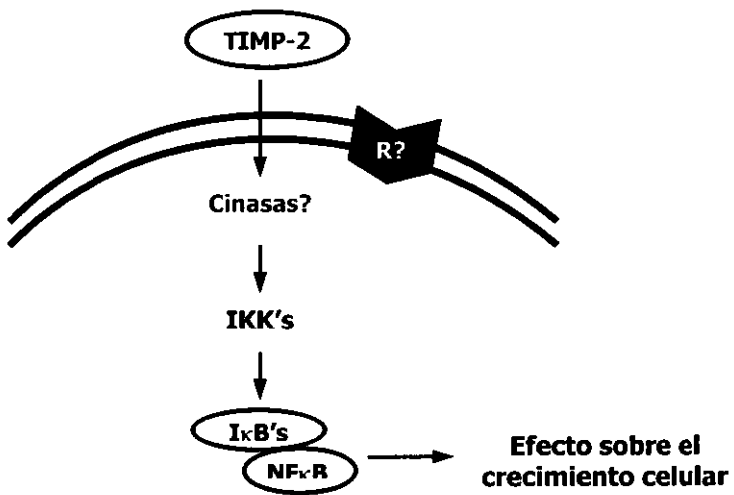


Figura 20. Modelo de la(s) vía(s) de transducción del TIMP-2.

IX. CONCLUSIONES

1. El hTIMP-2r induce el crecimiento de las células de carcinoma humano de pulmón A549 a una concentración fisiológica (50 pM). Este efecto aumenta con el tiempo de exposición.
2. En esta línea celular, el hTIMP-2r induce la activación del factor transcripcional NF- κ B a las 12 horas y a las 36 y 48 horas.
3. Los niveles de los diferentes inhibidores del factor NF- κ B, los I κ Bs, son modulados en respuesta al hTIMP-2r de manera diversa con respecto al tiempo de exposición al hTIMP-2r (50 pM), lo cual podría explicar la inducción del factor NF- κ B.
4. El factor de transcripción NF- κ B es de capital importancia ya que al bloquear su activación, a través de la expresión heteróloga de un dominante negativo de I κ B α , se inhibe el crecimiento celular en respuesta al hTIMP-2r, así como la activación de NF- κ B.

Los resultados anteriores sugieren que una forma por la cual el TIMP-2 regula el crecimiento de las células A549 involucra al factor de transcripción NF- κ B.

X. REFERENCIAS

- Almes, R.T., Li, L., Weaver, B., Hawkes, S., Hahn-Dantona, E.A. y Quigley, J.P. 1998. Cloning, expresión, and characterization of chicken tissue inhibitor of metalloproteinase-2 (TIMP-2) in normal and transformed chicken embryo fibroblasts. *J Cell Physiol.* 174:342-352
- ATTC Cell lines and hybridomas, 1994.
- Baker, A., Zaltsman, A.B., George, S.J. y A. C. Newby. 1998. Divergent effects of tissue inhibitor of metalloproteinase-1, -2, or -3 overexpression on rat vascular smooth muscle cell Invasion, proliferation and Death *in vivo*. *J Clin Invest.* 101:1478-1487.
- Baker, A., Ahonen, M. y Kahari, V. 2000. Potential applications of tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP) overexpression for cancer gene therapy. *Cancer Gene Ther.* C.41:469-483
- Bandala-Sánchez, E. 1998. Efecto de la gemcitabina 2',2'-difluorodeoxicitidina en las células de cáncer de pulmón A549. Tesis de Licenciatura. BUAP.
- Blavier, L., Henriet, P., Imren, S. y DeClerck, Y.A. 1999. Tissue inhibitors of matrix metalloproteinases in Cancer. *Ann NY Acad Sci.* 878:108-119.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- Brew, K., Dinakarandian, D. y Nagase, H. 2000. Tissue Inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. *B B Acta.* 1477:267-283.
- Brown, K., Park, Su., Kanno, T., Franzoso, G. y Siebenlist, U. 1993. Mutual regulation of the transcriptional activator NF- κ B and its inhibitor, I κ B- α . *Proc Natl Acad Sci, USA.* 90:2532-2536.
- Bond, M., Murphy, G., Bennett, M.R., Amour, A., Knauper, V., Newby, A.C. y A.H. Baker. 2000. Localization of the death domain of tissue inhibitor of metalloproteinase-3 to the N Terminus. *J Biol Chem.* 275:41358-41363.
- Bundy, D.L. y Mckeithan, T.W. 1997. Diverse effects of BCL3 phosphorylation on its modulation of NF- κ B p52 homodimer binding to DNA. *J Biol Chem.* 272(52):33132-33139.
- Corcoran, M.L., Stetler-Stevenson, W.G. 1995. Tissue inhibitor of metalloproteinase-2 stimulates fibroblast proliferation via a cAMP-dependent mechanism. *J Biol Chem.* 270:13453-13459.
- DeClerck, Y.A., Yean, T.D., Ratzkin, B.J., Lu, H.S., Langley, K.E. 1989. Purification and characterization of two related but distinct metalloproteinase inhibitors secreted by bovine aortic endothelial cells. *J Biol Chem.* 264:17435-17453.
- DeClerck, Y.A., Perez, N., Shimada, H., Boone, T.C., Langley, K.E. y Taylor, S.M. 1992. Inhibition of invasion and metastasis in cells transfected with an inhibitor of metalloproteinases. *Cancer Res.* 52:701-708.

- DeClerck, Y.A., Darville, M.I., Eeckhout, Y. y Rousseau, G.G. 1994. Characterization of the promoter of the gene encoding human tissue inhibitor of metalloproteinases-2 (TIMP-2). *Gene*. 139:185-191.
- Dedrick, J.J. y Iyengar, R. 1998. Modes of interactions between signaling pathways. *Biochem Pharmacol*. 55:1347-1352.
- Douglas, D.A., Shi, Y.E. y Sang, Q.,A. 1997. Computational sequence analysis of the Tissue inhibitor of metalloproteinase family. *J Prot Chem*. 4:237-255.
- Douziech, N., Calvo, E., Lainé J. y Morisset, J. 1999. Activation of MAP kinases in growth responsive pancreatic cancer cells. *Cell Signal*. 11(8): 591-602.
- Giard, D.J., Aaronson, S.A., Todaro, G.J., Amstein, P., Kersey, J.H., Dosik, H. y Parks, W.P. 1973. In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *J Natl Cancer Inst, Bethesda*. 51:1417-1423.
- Gilmore, T. 1999. The Rel/NF- κ B signal transduction pathway: introduction. *Oncogene*. 18:6842-6844.
- Goldberg, G.I., Marmer, B.L., Grant, G.A., Eisen, A.Z., Wilhelm, S. y C. He. 1989. Human 72-kilodalton type IV collagenase forms a complex with a tissue inhibitor of metalloproteinases designated TIMP-2. *Proc Natl Acad Sci USA*. 86:8207-8211.
- Gómez, D.E., D.F., Alonso, H. Yoshiji y U. P. Thorgeirsson. 1997. Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions. *Eur J Cell Biol*. 74:11-122.
- Grignon, D.J., Sakr, W.,Toth, M., Ravery, V., Angulo, J., Shamsa, F., Pontes, J.E., Crissman, J.C. y R Fridman. 1996. High levels of tissue inhibitor of metalloproteinase-2 (TIMP-2) expression are associated with poor outcome in invasive bladder cancer. *Cancer Res*. 56:1654-1659.
- Grumont, R.J., Rourke, I.J., O'Reilly, L.A., Strasser, A., Miyake, K., Sha, W. y S. Gerondakis. 1998. B lymphocytes differentially use the Rel and Nuclear Factor κ B1 (NF- κ B1) transcription factors to regulate cell cycle progression and apoptosis in Quiescent and mitogen-activated cells. *J Exp Med*. 187:663-674.
- Guedez, L., Stetler-Stevensen, W.G., Wolff, L., Wang, J., Fukushima, P., Mansoor, A. y Stetler-Stevensen, M. 1998. *In vitro* suppression of programmed cell death of B cells by tissue inhibitor of metalloproteinases-1. *J Clin Invest*. 102 (11):2002-2010
- Guttridge, D.C., Albanese, C.,Reuther, J.Y., Pestell,R.G. y A.S. Baldwin, Jr. 1999. NF- κ B controls cell growth and differentiation through transcriptional regulation of *cidyn* D1. *Mol Cell Biol*. 19:5785-5799.
- Hammani, K., Blakis, A., Morsette, D., Bowcock, Shumutte, C., Henriet, P. y DeClerck, Y.A. 1996. Structure and Characterization of the human Tissue Inhibitor of metalloproteinases-2 Gene. *J Biol Chem*. 271:25498-25505.

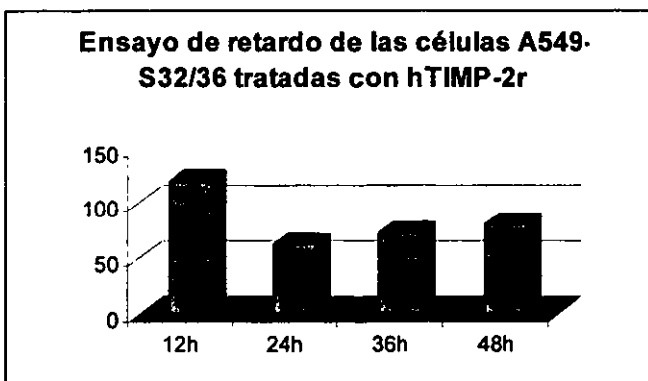
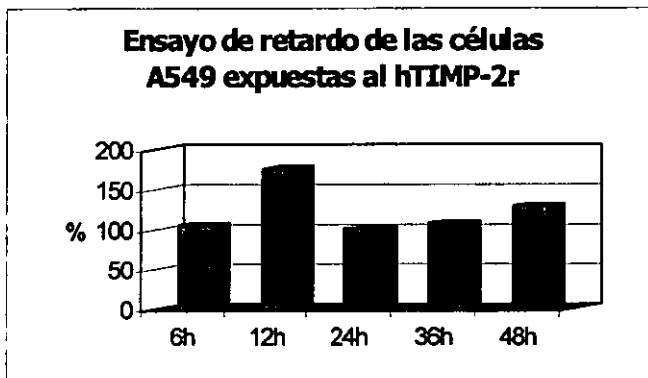
- Hayakawa, T., Yamashita, K., Ohuchi, E. y Shinagawa, A. 1994. Cell growth-promoting activity of tissue inhibitor of metalloproteinases-2. *J Cell Science*. 107:2373-79.
- Hinz, M., Krappmann, D., Eichten, A., Heder, A., Sheidereit, C. y M. Strauss. 1999. NF- κ B functions in growth control: Regulation of Cyclin D1 expression and G0/G1-to-S-phase transition. *Mol Cell Biol*. 19:2690-2698.
- Hoegy, S.E., Oh, H.R., Corcoran, M.L. y Stetler-Stevenson, W. 2000. Tissue inhibitor of metalloproteinases-2 (TIMP-2) suppresses TKT-Growth Factor signaling independent of metalloproteinase inhibition. *J Biol Chem*. En prensa.
- Howard, E.W. y Banda, M.J. 1991. Binding of tissue inhibitor of metalloproteinases 2 to two distinct sites on human 72-KDa Gelatinase. *J Biol Chem*. 266:17972-17977.
- Hulleman, E., Bijvelt, J.J.M., Verkleij, A.J., Verrips, C.T. y Boonstra, J. 1999. Integrin signaling at the M/G1 transition induces expression of Cyclin E. *Exp Cell Res*. 253:422-431.
- Imbert, V., Rupec, R.A., Livolsi, A., Pahl, H., I., Traenckner, E.B., Mueller-Dieckmann, C., Farahifar, Dariush., Rossi, B., Auberger, P., Baeuerle, P y Peyron, JF. 1996. Tyrosine phosphorylation of I κ B- α activates NF- κ B without proteolytic degradation of I κ B- α . *Cell*. 86:787-798.
- Imren, S., Kohn, D.B., Shimada, H., Blavier, L. y DeClerck, Y.A. 1996. Overexpression of the tissue inhibitor of metalloproteinases-2 by retroviral-mediated gene transfer *in vivo* inhibits tumor growth and invasion. *Cancer Res*. 56:2891-2895.
- Itho, Y., Ito, A., Iwata, K., Tanzawa, K., Mori, Y., Nagase, H., 1998. Plasma membrane-bound tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP)-2 specifically inhibits matrix metalloproteinase 2 (Gelatinase A) activated on the cell surface. *J Biol Chem*. 273:24360-24367.
- Kaltschmidt, B., Kaltschmidt, C., Hehner, S.P., Dröge, W. y M.L. Schmitz. 1999. Repression of NF- κ B impairs HeLa cell proliferation by functional interference with cell cycle checkpoints regulators. *Oncogene*. 18:3213-3224.
- Karin, M. 1999. How NF- κ B is activated: the role of the I κ B kinase (IKK) complex. *Oncogene*. 18:6867-6874.
- Lieber, M. 1976. A continuous tumor cell line from human lung carcinoma with properties of type II alveolar epithelial cells. *Int. J. Cancer*. 17:62-70.
- Luparello, C., Avanzato, G., Carella, C. y Pucci-Minafra, I. 1999. Tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-1 and proliferative behaviour. *Br Can Res Treat*. 54:235-244.
- May, M.Y. y S. Ghosh. 1997. Rel/NF- κ B and I κ B proteins: an overview. *Sem In Cancer Biol*. 8:63-73.
- Meléndez-Zajgla, J., García C. y Maldonado, V. 1996. Subcellular redistribución of Hsp27 protein during cisplatin-induced apoptosis in HeLa cells. *Biochem Mol Biol Inter*. 40:253-261.

- Meléndez, J., Maldonado, V., Bingle, C.D., Selmán, M. y Pardo, A. 2000. Cloning and expresión of guinea pig TIMP-2. Expression in normal and hyperoxic lung injury. *Am J Physiol LungCell Physiol.* 278:L737-L743.
- Montgomery, A.M.P., Mueller, B.M., Reisfeld, R.A., Taylor, S.M. y DeClerk, Y.A. 1994. Effect of tissue inhibitor of the matrix metalloproteinases-2 expression on the growth and spontaneous metastasis of a human melanoma cell line. *Cancer Res.* 54:5467-5473.
- Nemeth, J.A. y C.L. Goolsby. 1993. TIMP-2, a growth-stimulatory protein from SV40-transformed human fibroblasts. *Exp Cell Res.* 207:376-382.
- Nemeth, J.A., Rafe, A., Steiner, M. y Goolsby, C.L. 1996. TIMP-2 Growth-stimulatory activity: A concentration- and cell type specific response in the presence of insulin. *Exp Cell Res.* 224:110-115.
- Rayet, B. y C. Gélinas. 1999. Aberrant *rel/nfkb* genes and activity in human cancer. *Oncogene.* 18:6938-6947.
- Ryan, K.M., Ernst, M.Y., Rice, N.R. y K.H. Vousden, 2000. Role of NF- κ B in p53-mediated programmed cell death. *Nature.* 404:892-896.
- Sen, R. y Baltimore, D. 1986. Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. *Cell.* 46:705-716.
- Shapiro, S.D., Kobayashi, D.K. y Welgus, H.G. 1992. Identification of TIMP-2 in human alveolar macrophages. *J Biol Chem.* 267:13890-13894.
- Sherr, C.J. 1996. Cancer cell cycles. *Science.* 274:1672-1677.
- Stetler-Stevenson, W.G., Krutzsch, H.C. y Liotta, L.A. 1989. Tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP-2). A new member of the metalloproteinase inhibitor family. *J Biol Chem.* 264:17374-17378.
- Stetler-Stevenson, W.G., Brown, P.D., Onisto, M., Levy, A.T. y Liotta, L.A. 1990. Tissue inhibitor of metalloproteinases-2 (TIMP-2) mRNA expression in tumor cell lines and human tumor tissues. *J Biol Chem.* 265:13933-13938.
- Tanaka, K., Iwamoto, Y., Ito, Y., Ishibashi, T., Nakabeppu, Y., Sekiguchi, M. y Sugioka, Y. 1995. Cyclic MP-regulated synthesis of the tissue inhibitors of metalloproteinases suppresses the invasive potential of the human fibrosarcoma cell line HT1080. *Cancer Res.* 55:2927-2935.
- Tidball, J.G. y Albrecht, D.E. 1998. C.15. When Cells Die. A comprehensive evaluation of apoptosis and programmed cell death. Ed. Lockshin, R.A., Zakeri, Z. y Tilly, J.L. N.Y. Wiley-Liss.
- Traenckner, E. B.M., Pahl, H.L., Henkel, T., Schmidt, K.N., Wilk, S. y Baeuerle, P.A. 1995. Phosphorylation of human I κ B- α on serines 32 and 36 controls I κ B- α proteolysis and NF- κ B activation in response to diverse stimuli *EMBO J.* 14:2876-2883.

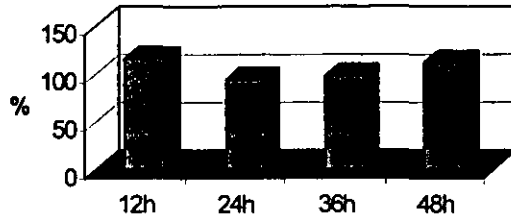
- Valente, P., Fassina, G., Melchiori, A., Masiello, L., Cilli, M., Vacca, A., Onisto, M., Santi, L., Stetter-Stevenson, W.G., y Albini, A. 1998. TIMP-2 over-expression reduces invasion and angiogenesis and protects B16F10 melanoma cells from apoptosis. *Int J Cancer*. 75:246-253.
- Vindelov L.L. y Chrsitensen I.J.. 1994. Detergent and Proteolytic enzyme-based techniques for nuclear isolation and DNA content analysis. *Met Cell Biol*. 41:219.229.
- Visscher, D.W., Hoythya, M., Ottosen, S.K., Llang. C.M., Sarkar, F.H., Crissman, J.D. y Fridman, R. 1994. Enhanced expression of tissue inhibitor of metalloproteinase-2 (TIMP-2) in the stroma of breast carcinomas correlates with tumor recurrence. *Int J Cancer*. 59:339-344.
- Wang, Z., Juttermann, R. y Soloway, P.D. 2000. TIMP-2 is required for efficient activation of proMMP-2 *in vivo*. *J Biol Chem*. 275:26411-26415.
- Whiteside, S.T. y A. Israel. 1997. IκB proteins: structure, function and regulation. *Sem Cancer Biol*. 8:75-82.
- Woessner, J.F.J. 2001. MMPs and TIMPs. *Methods in Molecular Biology*. Vol. 51: Matrix Metalloproteinases Protocols. Humana Press Inc.
- Yamashita, K., Suzuki, M., Iwata, H., Koike, T., Hamaguchi, M., Shinagawa, A., Noguchi, T. y Hayakawa, T. 1996. Tyrosine phosphorylation is crucial for growth signaling by tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP-1 and TIMP-2). *FEBS Lett*. 396:103-107.
- Yoshiji, H., Harris, S.R., Raso, E., Gomez, D.E., Lindsay, C.K., Shibuya, M., Sinha, C.C. y Thorgeirsson, U.P. 1998. Mammary carcinoma cells over-expressing tissue inhibitor of metalloproteinases-1 show enhanced vascular endothelial growth factor expression. *Int J Cancer*. 75:81-87.
- Zhao, W., Li, H., Yamashita, K., Guo, X., Hoshino, T., Yoshida, S., Shinya, T. y Hayakawa, T. 1998. Cell cycle-associated accumulation of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) in the nuclei of human gingival fibroblasts. *J Cell Sci*. 111:1147-1153.

XI. APÉNDICE

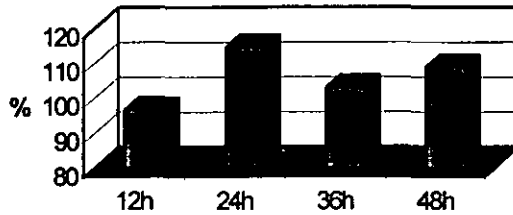
Se realizaron análisis densitométricos con el programa "NIH Image" para cuantificar la intensidad de las bandas de los diferentes geles. Los promedios de los experimentos independientes para cada condición se representan como porcentajes. Se consideró el 100% a la intensidad de los controles temporales respectivos a cada condición y en base a ellos se determinó un aumento o una disminución en la intensidad de las bandas.



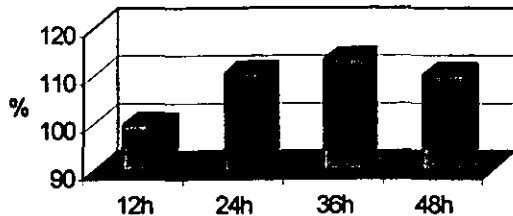
Western blot para I κ Balfa total en las células A549



Western blot para I κ Bbeta total en las células A549

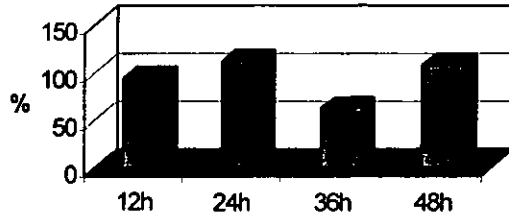


Western blot para Bcl-3 en las células A549

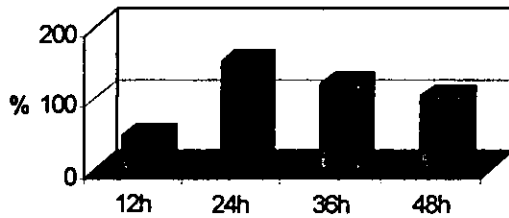


ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

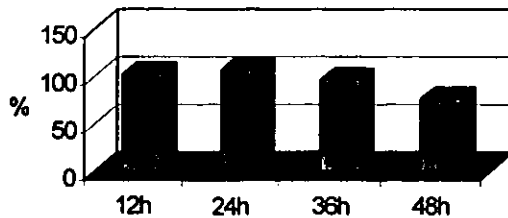
Western blot para I κ Bepsilon total en las células A549



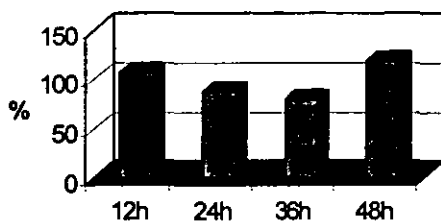
Western blot para I κ Bbeta nuclear en las células A549



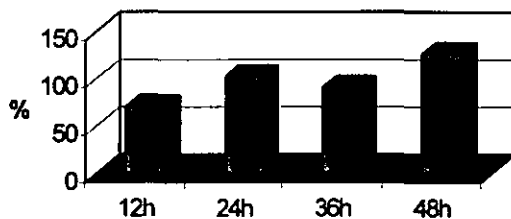
Western blot para I κ Balfa nuclear de las células A549



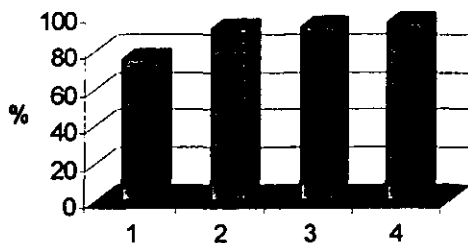
Western blot para Bcl-3 nuclear en las células A549



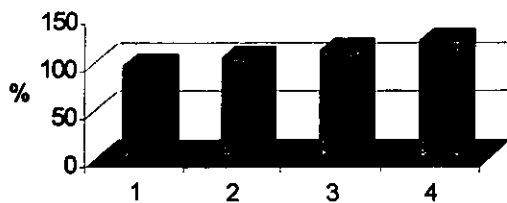
Western blot para la CICLINA D en las células A549



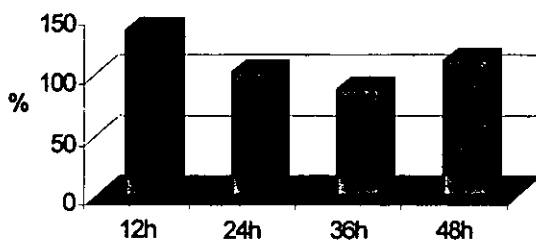
Western blot para la Ciclina E en las células A549



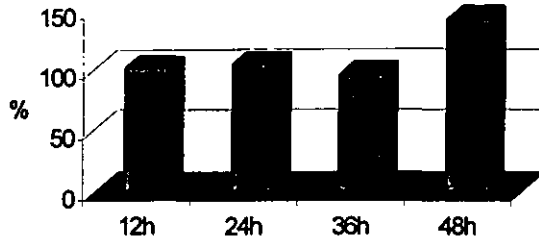
Western blot para I κ B α en las células A549-S32/36



Western blot para I κ B β en las células A549-S32/36



Western blot para I κ Bepsilon en las células A549-S32/36



Western blot para Bcl-3 en las células A549-S32/36

