



Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas

Universidad Nacional de Rosario

Tesis de Doctorado

Análisis de las vías Wnt/ β -catenina y TGF- β /Smads
en líneas de hepatocarcinoma humano.
Efectos del Interferón- α 2b.

Presentada por María Paula Ceballos Mancini

Rosario, Argentina

2013

Análisis de las vías Wnt/ β -catenina y TGF- β /Smads
en líneas de hepatocarcinoma humano.
Efectos del Interferón- α 2b.

María Paula Ceballos Mancini
Lic. en Biotecnología
Universidad Nacional de Rosario

Esta Tesis es presentada como parte de los requisitos para optar al grado académico de Doctor en Ciencias Biológicas, de la Universidad de Rosario y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta u otra Universidad. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el Instituto de Fisiología Experimental (IFISE-CONICET), Cátedra de Fisiología, Departamento de Ciencias Fisiológicas, dependiente de la Facultad de Cs. Bioquímicas y Farmacéuticas, durante el período comprendido entre el 1 de abril de 2008 y el 14 de diciembre de 2012, bajo la dirección de la Dra. María Cristina Carrillo.

Directora:

Dra. María Cristina Carrillo

Jurado de Tesis:

Dra. María Eugenia Mamprín

Dra. Claudia Lee Malvina Lanari

Dra. Elisa Dora Bal de Kier Joffe

Fecha de la defensa: 20 de Marzo de 2013

*A mis padres, a Sofía y a Ezequiel,
por su amor, su confianza y su apoyo.*

Parte de los resultados que se describen en este trabajo de tesis fueron publicados en los siguientes artículos originales:

- **Ceballos, MP**; Parody, JP; Alvarez M de, L; Ingaramo, PI; Carnovale, CE; Carrillo, MC. (2011) Interferon- α 2b and transforming growth factor- β 1 treatments on HCC cell lines: Are Wnt/ β -catenin pathway and Smads signaling connected in hepatocellular carcinoma?. *Biochem Pharmacol.* 82, 1682-1691.

Parte de los resultados que se describen en este trabajo de tesis fueron presentados en las siguientes reuniones científicas:

- **Ceballos M**, Parody J, Alvarez M, Ingaramo P, Francés D, Carnovale C, Carrillo M. Efectos del Interferón α (IFN) y del Factor de Crecimiento Transformante β 1 (TGF) sobre la vía Wnt/ β -catenina en las líneas de Hepatocarcinoma Celular (HCC) HepG2 y huh7. LV Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica (SAIC). Mar del Plata. 17 al 20 de Noviembre de 2010. (Publicado en *Medicina*, 70 (Supl.II): 183, 2010).
- **Ceballos MP**, Parody JP, Alvarez ML, Ingaramo P, Carnovale CE, CarrilloMC. Evidencias de conexión entre las vías Wnt/ β catenina y TGF/Smads en Hepatocarcinoma Celular (HCC). LVI Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica (SAIC) y Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Fisiología (SAFIS). Mar del Plata. 16 al 19 de noviembre de 2011. (Publicado en *Medicina*, 71 (Supl.III): 126, 2011).

- **Ceballos MP**, Parody JP, Alvarez MDL, Ingaramo PI, Carnovale CE, Carrillo MC. Connection between Wnt/ β -catenin and TGF- β /Smads pathways in Hepatocellular carcinoma (HCC): Interferon- α 2b (IFN) and Transforming growth factor- β 1 (TGF) treatment effects on HCC cell lines. 47th annual meeting of the European Association for the Study of the Liver (EASL). Barcelona, España. 18 al 22 de Abril de 2012. (Publicado en Journal of Hepatology: The Internacional Liver Congress™ 2012 Abstract Book, Suplemento 2 (56): S108, 2012).

Índice General

Abreviaturas y Símbolos	i
Lenguaje Especial	v
1. Resumen	1
2. Introducción	4
2.1. Cáncer	4
2.1.1. Una perspectiva histórica	4
2.1.2. La enfermedad y su desarrollo	5
2.1.3. Hepatocarcinoma celular (HCC)	6
2.1.4. Utilización de líneas de carcinoma humano	8
2.2. Vía de señalización Wnt	9
2.2.1. Los comienzos de la señalización Wnt	9
2.2.2. Ligandos Wnt y sus vías de señalización	10
2.2.3. Vía de señalización Wnt/ β -catenina	11
2.2.4. La vía de señalización Wnt/ β -catenina y su relación con el HCC	13
2.3. Factor de crecimiento transformante beta (TGF- β)	14
2.3.1. Generalidades	14
2.3.2. Señalización de los factores TGF- β	15
2.3.3. Rol de los factores TGF- β en el HCC	17
2.3.4. Interacción entre las vías de TGF- β y Wnt/ β -catenina	18
2.4. Clase O de factores de transcripción <i>forkhead box</i> (FoxO)	19
2.4.1. Generalidades	19

2.4.2. Regulación de los factores FoxO	21
2.4.2.1. Fosforilación de los factores FoxO en respuesta a insulina y a factores de crecimiento	21
2.4.2.2. Fosforilación de los factores FoxO en respuesta a estrés	22
2.4.3. Asociación de FoxOs con otros factores de transcripción	24
2.4.4. Relación entre los factores FoxO y el cáncer	24
2.5. Interferón alfa (IFN- α)	25
2.5.1. Generalidades	25
2.5.2. Uso del IFN- α en el tratamiento y prevención del HCC	27
3. Objetivos	29
3.1. Hipótesis de trabajo	29
3.2. Objetivo general	30
3.3. Objetivos específicos	30
4. Metodología	31
4.1. Líneas celulares y tratamientos	31
4.2. Secreción de TGF- β 1	32
4.3. Preparación de fracciones subcelulares y lisados celulares totales	33
4.4. Determinación de proteínas	34
4.5. <i>Western blot</i>	34
4.6. Ensayo de proliferación celular	36
4.7. Medición de la actividad Caspasa 3	37
4.8. Ensayo de co-inmunoprecipitación	38
4.9. Estudios estadísticos	38

5. Resultados y Discusión	39
Capítulo 1: Evaluación de los efectos antiproliferativos y proapoptóticos de IFN-α2b y de TGF-β1 en las líneas de HCC HepG2/C3A y Huh7	39
5.1.1. Grupos experimentales	39
5.1.2. Secreción de TGF- β 1 endógeno al medio de cultivo	39
5.1.3. Pureza de las fracciones subcelulares	41
5.1.4. Proliferación celular	42
5.1.5. Actividad Caspasa 3 y expresión de Citocromo c	44
5.1.6. Discusión	47
Capítulo 2: Análisis de la regulación de la vía Wnt/β-catenina por las citoquinas IFN-α2b y TGF-β1 en las líneas de HCC HepG2/C3A y Huh7	50
5.2.1. Grupos experimentales	50
5.2.2. Expresión de β -catenina total y de β -catenina activa	50
5.2.3. Análisis de la unión de β -catenina a TCF4	53
5.2.4. Expresión del receptor Frizzled7	54
5.2.5. Discusión	55
Capítulo 3: Estudio de la modulación de los intermediarios Smads y de su asociación con TCF4 mediada por IFN-α2b y por TGF-β1 en las líneas de HCC HepG2/C3A y Huh7	59
5.3.1. Grupos experimentales	59
5.3.2. Expresión de las proteínas Smads	59

5.3.3. Análisis de la unión de Smads a TCF4	63
5.3.4. Tratamiento con Wnt3a: expresión de las proteínas Smads	64
5.3.5. Discusión	64
Capítulo 4: Análisis de la regulación de FoxO3a y de su interacción con β-catenina y con Smads 2 y 3 mediada por IFN-α2b en las líneas de HCC HepG2/C3A y Huh7	69
5.4.1. Grupos experimentales	69
5.4.2. Quinasas que regulan a FoxO3a	69
5.4.3. Localización del factor de transcripción FoxO3a	71
5.4.4. Regulación de FoxO3a mediada por quinasas	72
5.4.5. Análisis de la unión de FoxO3a a β -catenina y a Smads 2 y 3	75
5.4.6. Discusión	75
6. Conclusiones Generales	81
7. Referencias Bibliográficas	86
Agradecimientos	112

Abreviaturas y Símbolos

(en orden alfabético)

AC	Antes de Cristo
ADN	Ácido desoxirribonucleico
Akt/PKB	Proteína quinasa B
ANOVA	Análisis de la variancia
APC	Del inglés <i>adenomatous polyposis coli</i>
Arg	Arginina
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ATCC	Del inglés <i>American Type Culture Collection</i>
CK1	Caseína quinasa 1
Co-Smads	Smads comunes
DC	Después de Cristo
DMEM	Medio de Eagle modificado por Dulbecco
Dvl	Del inglés <i>Dishevelled</i>
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
ELISA	Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas
Erk	Quinasa regulada por señal extracelular
FDA	Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos
Fox	Del inglés <i>forkhead box</i>
FoxO	Clase O de factores de transcripción <i>forkhead box</i>

Grg	Genes relacionados a Groucho
GSK3β	Glucógeno sintasa quinasa 3 beta
Ham F-12	Medio Ham con mezcla de nutrientes F12
HCC	Hepatocarcinoma celular
HEPES	Ácido N-2-hidroietilpiperazina-N'-2-etanosulfónico
HepG2/C3A o C3A	Línea celular derivada de hepatocarcinoma humano
Huh7	Línea celular derivada de hepatocarcinoma humano
IFN	Interferón
IFN-α	Interferón alfa
IKKβ	Quinasa I κ B beta
IMDM	Medio de Dulbecco modificado por Iscove
I-Smads	Smads inhibitorias
JNK	Quinasa c-Jun NH ₂ -terminal
LEF	Factor de unión al potenciador linfoide
LRP5/6	Proteína 5/6 relacionada con el receptor de la lipoproteína de baja densidad
Lys	Lisina
MLS	Medio libre de suero
MMTV	Virus de tumor mamario de ratón
MTS	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio
p-Akt	Akt fosforilada
PBS	<i>Buffer</i> fosfato en solución salina

PCNA	Antígeno nuclear de proliferación celular
PCP	Polaridad celular plana
PD98059	2'-amino-3'-metoxiflavona
p-Erk	Erk fosforilada
p-FoxO3a	FoxO3a fosforilado
p-IKKβ	IKK β fosforilada
p-JNK	JNK fosforilada
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
p-p38	Quinasa p38 fosforilada
PS1145	N-(6-cloro-9H-pirido[3,4-b]indol-8-il)-3-piridinacarboxamida dihidrocloruro
p-Smad2/3	Smads 2 y 3 fosforiladas
PVDF	Polivinilideno difluoruro
RIPA	<i>Buffer</i> de lisis de radioinmunoprecipitación
R-Smads	Smads reguladas por receptor
SB202190	4-(4-fluorofenil)-2-(4-hidroxifenil)-5-(4-piridil)1H-imidazol
SDS	Dodecilsulfato sódico
Ser	Serina
Smads	del inglés <i>Sma and mothers against decapentaplegic</i>
Smad2/3	Smads 2 y 3
TβRI	Receptor de TGF- β tipo I
TβRII	Receptor de TGF- β tipo II

TCF	Factor de transcripción de los linfocitos T
TGF-β	Factor de crecimiento transformante beta
Thr	Treonina
TLE	Potenciador de la división de tipo transducina
Tyr	Tirosina
wg	Del inglés <i>wingless</i>

Lenguaje Especial

Del inglés

buffer: solución tamponada

pellet: precipitado

western blot: inmunoelectrotransferencia

Del latín

in vitro: aplicado al trabajo con células en cultivo

in vivo: que ocurre o tiene lugar dentro de un organismo viviente

Resumen

1. Resumen

La vía Wnt/ β -catenina está frecuentemente activada en el hepatocarcinoma celular (HCC). β -catenina activa se acumula en el citosol y en el núcleo, donde promueve la proliferación celular uniéndose a los factores LEF/TCF, entre ellos TCF4. El factor de crecimiento transformante beta 1 (TGF- β 1) participa en los procesos de arresto celular y apoptosis y actúa a través de las proteínas Smads. Una forma de interacción entre las vías Wnt/ β -catenina y TGF- β 1/Smads es mediante la asociación de Smads con el complejo nuclear TCF4/ β -catenina. Por otra parte, FoxO3a es miembro de la clase O de factores de transcripción *forkhead box* y está implicado en procesos tales como arresto celular y apoptosis. FoxO3a interactúa en el núcleo con β -catenina y con Smads para modular la transcripción génica. La señalización de FoxO3a es regulada negativamente por las quinasas Akt, IKK β y Erk y positivamente por las quinasas JNK y p38. El interferón alfa (IFN- α) presenta propiedades antiproliferativas y proapoptóticas y se sugiere una potencial eficacia de la terapia con esta citoquina para el tratamiento del HCC. En este trabajo de tesis analizamos los efectos de IFN- α 2b y de TGF- β 1 sobre la proliferación celular y la apoptosis y sobre la vía Wnt/ β -catenina, los intermediarios Smads, el factor FoxO3a y su modulación por quinasas y la interacción entre estas señales, en las líneas de HCC HepG2/C3A y Huh7. La respuesta global de las células a los tratamientos con IFN- α 2b y con TGF- β 1 fue la disminución de la proliferación y el incremento de la apoptosis. IFN- α 2b y TGF- β 1 atenuaron la vía Wnt/ β -catenina disminuyendo los niveles proteicos de β -catenina y del receptor de la vía Frizzled7 y la interacción entre β -catenina y TCF4. Los

niveles de la forma truncada de β -catenina presente en HepG2/C3A también se redujeron luego de los tratamientos. Ambas citoquinas disminuyeron el contenido de las proteínas Smads y su asociación con TCF4. En conjunto, estos resultados indicarían la reducción de la formación de complejos Smads/TCF4/ β -catenina en presencia de IFN- α 2b y de TGF- β 1. El tratamiento con Wnt3a, que actúa como ligando de la vía Wnt/ β -catenina, elevó los niveles de la proteína β -catenina y de los intermediarios Smads, indicando que la activación de vía Wnt/ β -catenina genera el incremento de los niveles proteicos de Smads. Por otro lado, el tratamiento con IFN- α 2b disminuyó los niveles proteicos de las formas activas de Akt, IKK β y Erk e incrementó los niveles de las formas activas de JNK y p38. Adicionalmente, IFN- α 2b elevó los niveles nucleares de FoxO3a y este proceso estuvo mediado por la modulación de Akt, IKK β , Erk y p38 por la citoquina. Al mismo tiempo, la estimulación de las células con IFN- α 2b incrementó la asociación de FoxO3a con β -catenina y con Smads, lo cual implicaría un desplazamiento de β -catenina y de Smads desde TCF4 hacia FoxO3a. Esto disminuiría la actividad transcripcional de TCF4 contribuyendo a la atenuación de la vía Wnt/ β -catenina causada por IFN- α 2b y, además, aumentaría la actividad del factor de transcripción FoxO3a. En conclusión, las citoquinas IFN- α 2b y TGF- β 1 mostraron ser efectivas como moduladores de la vía Wnt/ β -catenina en líneas de HCC tanto en presencia de β -catenina salvaje como de su forma truncada. Adicionalmente, el desacoplamiento de los complejos Smads/TCF4/ β -catenina contribuiría a contrarrestar la hepatocarcinogénesis, ya que la acción global de las citoquinas fue disminuir la proliferación celular y aumentar la apoptosis. El aumento nuclear de

FoxO3a, su asociación con Smads y con β -catenina y la regulación de Akt, IKK β , Erk, JNK y p38 mediada por IFN- α 2b, colaborarían en estos eventos. Así, estos hallazgos tendrían relevancia en el futuro diseño de estrategias terapéuticas para pacientes con HCC que dirijan las respuestas celulares hacia la supresión tumoral.

Introducción

2. Introducción

2.1. Cáncer

2.1.1. Una perspectiva histórica

El cáncer no es una enfermedad que se originó en el mundo moderno. La descripción más vieja de un cáncer humano se encontró en un papiro Egipcio escrito entre el 3000 y 1500 AC y se refiere a tumores de mama. Asimismo, el espécimen más antiguo fue encontrado en los restos de un cráneo femenino que se remontan al 1900-1600 AC. Del mismo modo, los restos momificados de los esqueletos de los incas del Perú, que datan de 2400 años atrás, contenían lesiones sugestivas de melanoma maligno. Incluso es posible que los antepasados de nuestra especie hayan desarrollado cáncer. El arqueólogo Louis Leakey encontró un hueso de mandíbula de *Homo erectus* en 1932, que presentaba una estructura propia de un tumor y más tarde se determinó que se debía a un linfoma de Burkitt (1, 2).

La palabra cáncer fue introducida por el físico griego Hipócrates (460-370 AC). Él utilizó los términos de origen griego “*carcinos*” y “*carcinoma*”, en castellano cangrejo, debido a que las proyecciones de un cáncer se parecían a las patas de este animal. A continuación, el físico romano Celso (28-50 AC) tradujo el término griego al latín (“*cáncer*”) y Galeno (130-200 DC), otro físico romano, utilizó la palabra de origen griego “*oncos*” (en castellano hinchazón o protuberancia) para describir a los tumores (1, 2).

En el siglo XIX, se descubrió accidentalmente la quimioterapia, tras

observar que soldados expuestos al gas mostaza durante la Segunda Guerra Mundial, desarrollaban una supresión tóxica de la médula ósea (2).

Finalmente, en el siglo XX se desplegó un mayor conocimiento acerca de la biología del cáncer, al conocerse gran parte de los mecanismos genéticos y moleculares implicados. Además, el cáncer pasó de ser considerado una enfermedad del cuerpo, a una enfermedad de los tejidos, para convertirse posteriormente en una enfermedad a nivel celular (3).

Dado que la esperanza de vida aumentó dramáticamente durante el siglo XX, gracias a los avances en la salud pública y en la medicina moderna, más gente vive lo suficiente como para desarrollar cáncer. Como consecuencia, esta enfermedad ha sido considerada como el mayor problema en cuestiones de salud pública desde mediados del siglo XX.

2.1.2. La enfermedad y su desarrollo

El desarrollo del cáncer es un proceso de múltiples etapas y conduce a la transformación de células normales en sus derivadas malignas (4). Durante esta transformación, se generan alteraciones genéticas progresivas en dos grupos de genes: protooncogenes y genes supresores de tumores. Los productos de los protooncogenes controlan la división y diferenciación celular. Mutaciones en los protooncogenes producen oncogenes con función dominante que causan la división celular descontrolada. Los productos de los genes supresores de tumores antagonizan la acción de los protooncogenes, mediante la activación de puntos de control del ciclo celular, reparación de errores del ADN o inducción de muerte

celular programada o apoptosis. Alteraciones en los genes supresores de tumores con pérdida recesiva de su función favorecen el desarrollo tumoral (5).

Además, existe una serie de alteraciones esenciales en la fisiología celular que conducen al crecimiento maligno de una célula y que representan nuevas habilidades adquiridas por la misma durante su transformación. Estas son: autosuficiencia respecto a señales de crecimiento (produciendo sus propios factores de crecimiento y receptores de membrana), insensibilidad ante señales inhibitorias del crecimiento, evasión a la muerte celular programada, potencial replicativo ilimitado (causado por la desregulación del ciclo celular), angiogénesis sostenida, invasión tisular y metástasis, reprogramación del metabolismo energético (para sostener más efectivamente la proliferación) y escape a la destrucción inmune. A su vez, la inestabilidad genómica (que genera mutaciones) y la inflamación promovida por el tumor (llevada a cabo por las células del sistema inmune), contribuyen a la adquisición de las habilidades mencionadas. Se ha sugerido que todas estas modificaciones son compartidas por la mayoría y tal vez por todos los tipos de tumores humanos (6, 7).

2.1.3. Hepatocarcinoma celular (HCC)

A nivel mundial, el cáncer de hígado es el quinto tipo de cáncer más frecuente en hombres y, debido a su pobre pronóstico, es la segunda causa de muerte por esta enfermedad. En mujeres, es el séptimo tipo de cáncer más frecuentemente diagnosticado y la sexta causa de muerte (8). Se estima que durante el año 2008 se diagnosticaron cerca de 750.000 nuevos casos de cáncer de hígado y ocurrieron cerca de 700.000 muertes a causa del mismo, indicando que la

mayoría de los nuevos casos murieron eventualmente de la enfermedad. En Argentina, la incidencia en el 2008 fue de 4,6/100.000 (1.050 casos) en hombres y 2,5/100.000 (807 casos) en mujeres, mientras que la mortalidad fue de 4,4/100.000 (1.010 casos) en hombres y 2,4/100.000 (781 casos) en mujeres (<http://globocan.iarc.fr/factsheets/cancers/liver.asp>).

Entre los diferentes tipos de cáncer primarios de hígado, el principal subtipo histológico es el hepatocarcinoma celular o carcinoma hepatocelular (HCC, del inglés *hepatocellular carcinoma*) que afecta a los hepatocitos y que representa hasta el 85% del cáncer de hígado total a nivel mundial (9). Generalmente, el HCC se desarrolla en pacientes con enfermedades hepáticas crónicas causadas por hepatitis virales (hepatitis B o C), consumo excesivo de alcohol (cirrosis etílica) o enfermedades metabólicas congénitas (ej: hemocromatosis primaria, enfermedad de Wilson) o adquiridas (ej: esteatohepatitis no alcohólica asociada a la diabetes o la dislipidemia) (10). Además, las dietas poco saludables, el sedentarismo y la obesidad se han asociado con un alto riesgo de HCC (11).

Al desarrollo y progresión del HCC hacia una enfermedad crónica se lo denomina hepatocarcinogénesis. Al igual que para la mayoría de los tipos de cánceres, la hepatocarcinogénesis es un proceso de múltiples etapas que involucra la acumulación de diversas alteraciones genéticas y epigenéticas que, en última instancia, conllevan a la transformación maligna del hepatocito. Este tipo de alteraciones, así como su secuencia de aparición, son muy variables (12, 13). De esta manera, el crecimiento y la progresión de un HCC diferenciado generalmente ocurre a partir de diferentes lesiones microscópicas denominadas “focos de hepatocitos alterados”, cada una de ellas con un perfil génico y epigenético propio.

Esto produce heterogeneidad no sólo entre diferentes HCCs sino también dentro de un mismo tumor (14, 15).

2.1.4. Utilización de líneas de carcinoma humano

Las líneas celulares derivadas de carcinomas humanos han sido cruciales para comprender la biología del cáncer y para el desarrollo de drogas anticancerígenas. En consecuencia, han sido el modelo experimental más utilizado para el estudio del cáncer (16, 17). Más aún, estos cultivos celulares brindan la oportunidad no sólo de evaluar los efectos antitumorales de los nuevos agentes, sino también su citotoxicidad (17-22).

Las líneas celulares presentan varias ventajas sobre otros modelos. En primer lugar, son fáciles de mantener y de manipular y proveen resultados reproducibles al utilizar el mismo protocolo. Además, permiten el estudio de células tumorales en un ambiente simple y controlado. Por otra parte, el uso de líneas celulares con aberraciones genéticas definidas, permite inferir qué pacientes podrían responder a una dada terapia (17, 18, 21). Asimismo, las líneas celulares humanas son muchas veces el modelo de estudio elegido debido a que los mecanismos oncogénicos pueden diferir entre animales y humanos (23).

Por otra parte, las desventajas ligadas al uso de líneas celulares tumorales son que sólo representan una “instantánea” de la evolución de un tumor y que no reproducen la heterogeneidad del microambiente tumoral, ni la naturaleza heterogénea de los tumores en un paciente y entre pacientes. Estas variaciones genéticas y epigenéticas hacen necesario recurrir a la utilización de más de una línea celular en un determinado estudio (17, 20, 21).

2.2. Vía de señalización Wnt

2.2.1. Los comienzos de la señalización Wnt

La vía de señalización Wnt es una ruta altamente conservada entre diversos organismos y es esencial para el desarrollo embrionario temprano de organismos superiores. De hecho, se ha demostrado que diversas alteraciones en la vía conllevan a malformaciones embrionarias (24).

Los primeros pasos en la investigación de la señalización Wnt fueron dados en la década de 1970, cuando se identificó una mutación en un gen de *Drosophila melanogaster* que originaba un fenotipo sin alas. Debido a esta morfología particular, al gen se lo denominó *wingless (wg)* (25, 26). Estudios genéticos y bioquímicos posteriores realizados con diversos fenotipos mutantes de *Drosophila melanogaster*, establecieron la existencia de varios genes involucrados en defectos del desarrollo embrionario de la mosca, similares u opuestos a los observados con mutantes *wg* (27-29). Posteriormente, estos genes fueron ordenados para conformar una ruta de señalización y se establecieron relaciones bioquímicas entre sus productos proteicos (30-36).

Por otro lado, Nusse y col. (37) observaron la activación del gen *Int-1* en tumores de mama de ratones infectados con el virus de tumor mamario de ratón (MMTV, del inglés *mouse mammary tumour virus*). Pocos años más tarde, se determinó que *Int-1* era el homólogo en mamíferos del gen *wingless* de *Drosophila melanogaster* (38, 39) y comenzó el estudio de la vía *wingless* en mamíferos. Para unificar el nombre de la vía en las diferentes especies, la misma se denominó Wnt, que resulta de la contracción entre *wingless* e *Int-1* (40).

2.2.2. Ligandos Wnt y sus vías de señalización

Las proteínas Wnt representan una gran familia de proteínas glicosiladas, palmitoiladas y ricas en cisteína, que son secretadas por células eucariotas y que actúan de manera parácrina (41). A nivel celular, las proteínas Wnt regulan diversos procesos como proliferación, apoptosis, diferenciación, generación de polaridad celular y renovación de células madre (24, 42, 43). Hasta el presente, se han identificado y caracterizado 19 genes que expresan proteínas Wnt en el ser humano. Además, han sido descritos más de 100 genes blanco de la señalización Wnt en diversas especies (41, 42).

La señalización Wnt comienza cuando un ligando Wnt se une a su receptor en la membrana plasmática. La señalización más estudiada y mejor caracterizada es la vía Wnt/ β -catenina o Wnt canónica. Además, entre las vías independientes de β -catenina o no canónicas, se encuentran la vía Wnt/polaridad celular plana (PCP) y la vía Wnt/ Ca^{2+} . Estas vías no se conocen en detalle y si bien se han estudiado y dilucidado parcialmente en *Drosophila* y en *Xenopus*, no se comprende muy bien su función biológica en mamíferos. Además, a diferencia del gran interés que despierta la vía Wnt/ β -catenina debido a su relación con la tumorigénesis, es incierto el rol de las vías no canónicas en este proceso (44, 45).

Las proteínas Frizzled son los receptores primarios de los ligandos Wnt (46) y son miembros de la gran familia de receptores acoplados a proteína G de 7 dominios transmembrana (47). En humanos, se han definido 11 isoformas de receptores Frizzled (47, 48). De esta manera, distintas combinaciones de pares de ligandos Wnt y receptores Frizzled pueden activar cada una de las señalizaciones Wnt y conducir así a respuestas celulares únicas (41). En el hígado de ratones

adultos, por ejemplo, se encontró que normalmente son expresados 11 ligandos Wnt y 9 receptores Frizzled, reflejando esto la gran diversidad de funciones que puede desencadenar la señalización Wnt dentro de un único tejido (49, 50).

Finalmente, la proteína Dishevelled (Dvl) interactúa con un dominio citoplasmático de Frizzled, transmitiendo la señal Wnt al interior celular (35, 51, 52).

2.2.3. Vía de señalización Wnt/ β -catenina

La vía Wnt/ β -catenina o Wnt canónica tiene un rol central en el desarrollo embrionario y en la homeostasis del tejido adulto, participando en procesos de proliferación, diferenciación, movilidad, adhesión, regeneración, entre otros (43, 53-55).

La proteína β -catenina se aisló originalmente en células de mamífero como una proteína asociada a E-cadherina, que es una molécula de adhesión de la membrana celular. El nombre “catenina” proviene de la palabra en latín “*catena*” que significa cadena y refleja el rol de esta proteína en asociar a E-cadherina con el citoesqueleto de actina (56, 57).

En la *figura 2.1* se esquematiza la vía Wnt canónica. En ausencia de un ligando Wnt, la mayor parte de β -catenina se encuentra presente en las uniones adherentes celulares. Allí, junto a la proteína α -catenina, conectan a la proteína E-cadherina al citoesqueleto de actina (56). Fuera de las uniones adherentes, los niveles de β -catenina son bajos debido a un proceso de degradación proteica eficientemente regulado. La población de β -catenina libre en el citosol es reconocida y capturada por un “complejo multiproteico de destrucción”

conformado por la proteína supresora de tumores APC (del inglés *adenomatous polyposis coli*), Axina 1/2, Glucógeno sintasa quinasa 3 beta (GSK3 β) y Caseína quinasa 1 (CK1) (58-62). Dentro de este complejo, β -catenina es fosforilada en residuos específicos y conservados del extremo amino terminal, en primer lugar por CK1 (Ser45) y posteriormente por GSK3 β (Ser33, Ser37 y Thr41) (63-66). Una vez fosforilada, β -catenina es reconocida por la proteína E3 ubiquitina ligasa β -TrCP, que la poliubiquitina para su posterior degradación proteosomal (67).

Por el contrario, la activación de la vía se logra mediante la unión de un ligando Wnt a un receptor Frizzled en la membrana plasmática, lo que permite la asociación de este último con el coreceptor LRP5/6 (del inglés *low density lipoprotein (LDL) receptor-related protein 5/6*), específico de la vía Wnt canónica (68-70). El complejo Frizzled-LRP5/6 interactúa con la proteína Dvl, que recluta entonces a axina, GSK3 β y CK1. Las quinasas GSK3 β y CK1 fosforilan a LRP5/6, que atrae a su vez a una mayor cantidad de axina, GSK3 β y CK1 a la membrana plasmática. Este mecanismo conduce al desacoplamiento del complejo multiproteico de destrucción, generándose así la liberación de β -catenina y su posterior estabilización y acumulación en el citosol (71-73). La acumulación citosólica de β -catenina permite su translocación nuclear y su asociación con los factores de transcripción LEF/TCF (del inglés *lymphoid enhancer factor/T cell factor*). β -catenina actúa en el complejo nuclear como un coactivador transcripcional, estimulando la expresión de varios genes involucrados en el crecimiento y en la proliferación celular (53, 54, 74). Cuando β -catenina no tiene acceso al núcleo, los factores LEF/TCF se encuentran unidos a los corepresores Grg/TLE (del inglés *groucho related gene/transducin-like enhancer of split*), lo

cual impide la expresión de los genes blanco de la vía (75-77).

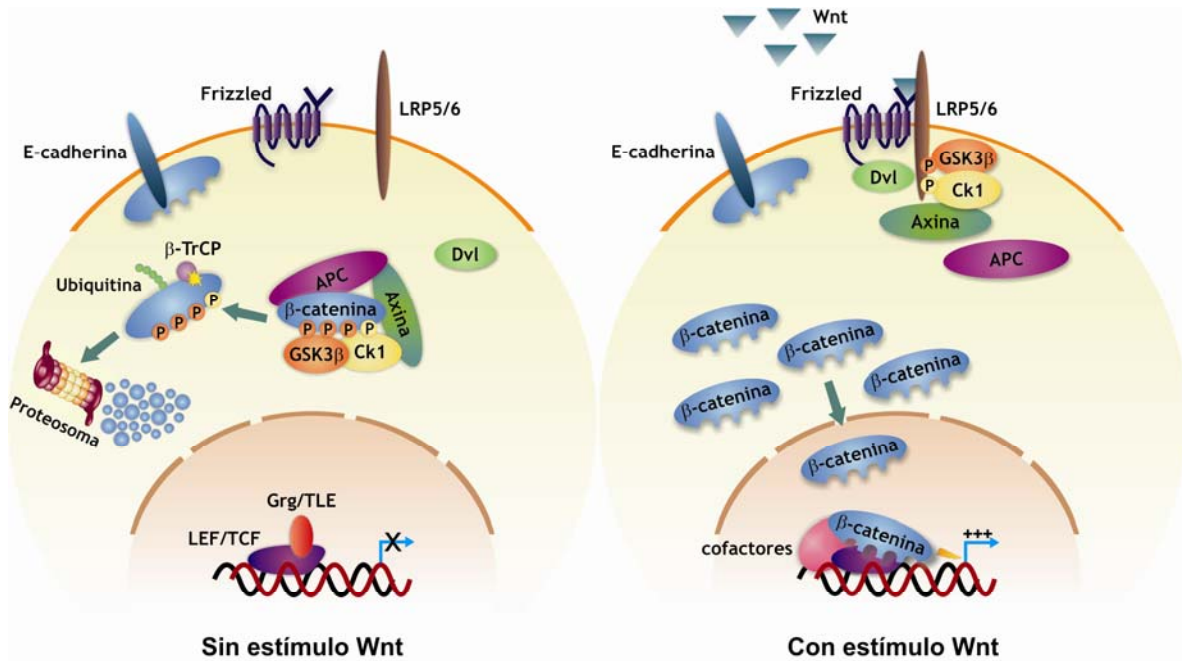


Figura 2.1: Vía de señalización Wnt/β-catenina. Izquierda: en ausencia de un ligando Wnt, los niveles de β-catenina son regulados eficientemente por un complejo multiproteico de destrucción formado por APC, Axina, GSK3β y CK1. β-catenina es fosforilada en este complejo y finalmente degradada en proteosomas. La transcripción de los genes blanco de la vía se mantiene reprimida. Derecha: La unión de un ligando Wnt al complejo Frizzled/LRP5/6 desencadena una serie de señales intracelulares que conducen a la desestabilización del complejo multiproteico de destrucción. Esto permite la acumulación citosólica de β-catenina y su migración al núcleo, donde se une a los factores LEF/TCF. Se produce así la transcripción de los genes blanco de la vía a partir del complejo LEF/TCF/β-catenina.

2.2.4. La vía de señalización Wnt/β-catenina y su relación con el HCC

La señalización Wnt/β-catenina es una de las principales vías que se encuentra desregulada en el HCC (78-81). La primera evidencia de esta desregulación fue la localización anormal de proteínas cadherinas y cateninas en el HCC, mediante inmunohistoquímica (82). Posteriormente, un estudio más exhaustivo identificó la presencia de mutaciones en el exón 3 del gen *CTNNB1* que codifica β-catenina, en un 20-40% de HCCs humanos. Estas mutaciones se

corresponden con los sitios de fosforilación para CK1 y GSK3 β y van a impedir así la fosforilación y subsiguiente degradación proteosomal de β -catenina (83-89). Adicionalmente, se informó la acumulación de β -catenina citosólica y/o nuclear, tanto mutada como salvaje, en un 50-90% de los HCCs humanos (49, 83, 86, 90). También se describieron mutaciones de pérdida de función para los genes que codifican Axina 1 (3-16% de HCCs) y 2 (3-10% de HCCs) (86, 91-93) y la sobreexpresión del receptor Frizzled7 (hasta en un 90% de HCCs) (94-96). Otros mecanismos responsables de la activación de la vía Wnt canónica descritos en HCCs incluyen la disminución de la expresión de E-cadherina (97, 98) y la sobreexpresión del ligando Wnt3 (94, 99) y de una forma inactiva de GSK3 β (100).

En todos los casos, el resultado final de la activación anormal de la señalización Wnt/ β -catenina es la acumulación de β -catenina y su migración al núcleo, donde puede inducir la transcripción de sus genes blanco. Esto tiene un impacto global en el crecimiento y en el desarrollo del tumor (78-81).

2.3. Factor de crecimiento transformante beta (TGF- β)

2.3.1. Generalidades

Si bien existen 6 isoformas del factor de crecimiento transformante beta (TGF- β), solamente las isoformas TGF- β 1, TGF- β 2 y TGF- β 3 se expresan en tejidos de mamíferos (101-103). TGF- β 1 es la isoforma mejor caracterizada y es considerada, además, el prototipo de la familia. Asimismo, fue el primer miembro en aislarse y caracterizarse en 1983, cuando se descubrió debido a su habilidad de inducir (“transformar”) un comportamiento maligno en fibroblastos normales,

capacidad que le dio su nombre (104). Además, TGF- β 1 es la isoforma predominante y es secretada por prácticamente todos los tipos celulares, mientras que TGF- β 2 y TGF- β 3 se expresan en un espectro más limitado de células y tejidos (105).

Los factores TGF- β son citoquinas producidas y secretadas tanto por células del sistema inmune como por células no inmunes y están involucrados en un amplio rango de procesos como diferenciación, desarrollo embrionario, proliferación, angiogénesis, regulación de la inflamación, cicatrización de heridas, producción de matriz extracelular y apoptosis (106, 107). Adicionalmente, estos factores son ampliamente conocidos como supresores tumorales, ya que tienen la capacidad de inhibir la proliferación de la mayoría de las células, incluyendo linfocitos y células epiteliales, endoteliales y hematopoyéticas (108, 109).

Los factores TGF- β se sintetizan y secretan al exterior celular como precursores biológicamente inertes, quedando retenidos en la matriz extracelular como parte de un “complejo latente”. TGF- β puede ser liberado de este complejo, entre otros mecanismos, por proteasas, integrinas y especies reactivas del oxígeno (110, 111).

2.3.2. Señalización de los factores TGF- β

Una vez liberados del complejo latente, los factores TGF- β inician su señalización mediante la unión a su complejo de receptores en la membrana, que está constituido por dos Ser/Thr quinasas (T β RI y T β RII). T β RII se une a TGF- β y forma un complejo con T β RI. Dentro del complejo, T β RII fosforila y activa a T β RI, que recluta entonces a los mediadores citoplasmáticos Smads (del inglés *Smad and*

mothers against decapentaplegic) con el fin de propagar la señal al interior celular (figura 2.2) (112, 113).

Existen un total de 8 proteínas Smads en humanos, que pueden ser divididas en tres grandes grupos basados en sus propiedades funcionales: Smads reguladas por receptor (R-Smads: Smads 1, 2, 3, 5 y 8), Smads comunes (Co-Smads: Smad4) y Smads inhibitorias (I-Smads: Smads 6 y 7). Las R-Smads que median la señalización de TGF- β son las Smads 2 y 3 (114, 115). Al mismo tiempo, Smad6 tiene poca efectividad en inhibir la vía de TGF- β , por lo que Smad7 es la I-Smad que inhibe con más potencia esta señalización (116-118).

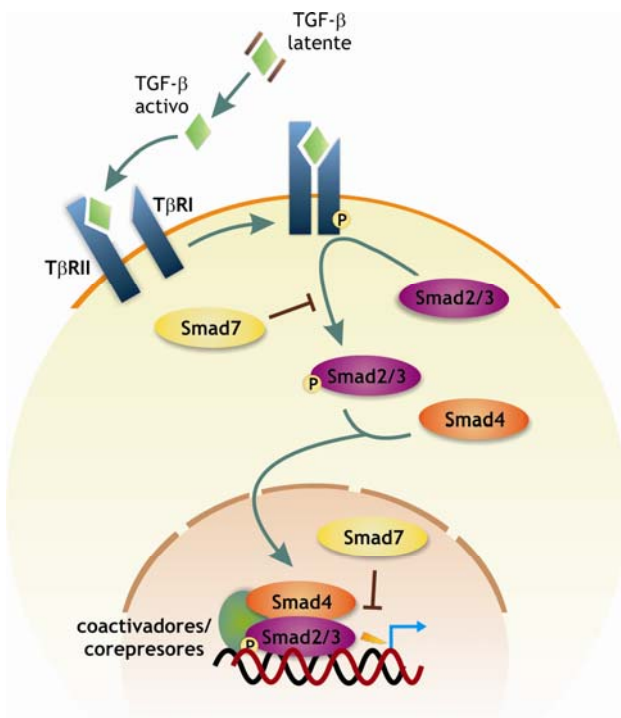


Figura 2.2: Vía de señalización TGF- β /Smads. La unión de TGF- β a T β RII induce su heteromerización con T β RI. T β RII fosforila y activa a T β RI, quien luego fosforila y activa a los mensajeros intracelulares de la señal de TGF- β , Smads 2 y 3 (Smad2/3). Smads 2 y 3 activadas se unen a Smad4 y migran al núcleo, donde se asocian a coactivadores y corepresores para regular la transcripción de los genes blanco de la vía. Smad7 actúa inhibiendo la señalización.

Luego de la activación de T β RI, Smad2 y Smad3 se asocian transitoriamente con el receptor y son directamente fosforiladas por la actividad quinasa de T β RI (106, 112). Una vez fosforiladas, Smads 2 y 3 forman un complejo heteromérico con

Smad4, que migra al núcleo e interactúa con otros factores de transcripción, tanto coactivadores como corepresores, para regular positiva o negativamente la transcripción de los genes blanco de la vía (*figura 2.2*) (114, 119).

En respuesta a TGF- β , Smad7 migra desde el núcleo al citosol para inhibir la vía, uniéndose a los receptores y bloqueando el acceso y fosforilación de R-Smads mediado por T β RI (115, 120, 121). Simultáneamente, Smad7 permanece en el núcleo donde se une a los complejos R-Smads/Co-Smads, interfiriendo con la transcripción génica (122). Asimismo, la señalización de TGF- β estimula la expresión del gen *Smad7*, proveyendo un mecanismo de retroalimentación negativa de la vía (121).

2.3.3. Rol de los factores TGF- β en el HCC

En los hepatocitos, los factores TGF- β son capaces de inhibir la proliferación celular e inducir la apoptosis, tanto *in vitro* como *in vivo*, controlando así el crecimiento excesivo con la finalidad de preservar el tamaño del hígado. De esta manera, TGF- β actúa como un importante regulador de la homeostasis celular (123, 124). Al mismo tiempo, TGF- β actúa como un factor antitumoral al generar arresto celular y apoptosis en hepatocitos de hígados preneoplásicos y en diversas líneas de HCC (125-134).

Sin embargo, modificaciones en los componentes de la vía de señalización de TGF- β pueden hacer que las células tumorales se vuelvan refractarias a los efectos inhibitorios de este factor. Paradójicamente, estas aberraciones genéticas y epigenéticas harán que TGF- β pase de ser un supresor a un promotor tumoral, promoviendo el crecimiento celular, supervivencia y metástasis (109, 135-137).

Adicionalmente, una señalización de TGF- β intacta también es capaz de contribuir a la carcinogénesis (106, 113, 135, 138). De esta manera, la función de TGF- β en el cáncer no es del todo clara y esto podría deberse a que la respuesta celular final sería dependiente del contexto y del tipo celular. De hecho, se sabe que TGF- β interactúa con otras señalizaciones, muchas de las cuales están implicadas en el desarrollo tumoral. Así, la cooperación entre una vía de TGF- β intacta y señalizaciones oncogénicas, modificarían el comportamiento de la señalización de TGF- β explicando, al menos en parte, el papel bidireccional de TGF- β en el cáncer (135, 138).

2.3.4. Interacción entre las vías de TGF- β y Wnt/ β -catenina

La primera interacción caracterizada entre las vías de TGF- β y Wnt/ β -catenina, estuvo dada por la asociación de Smads 2, 3 y 4 al complejo nuclear LEF/TCF/ β -catenina sobre el promotor del gen *twin* de *Xenopus* (139, 140). Desde ese momento, se describió la colaboración entre ambas vías de señalización en numerosos modelos de vertebrados e invertebrados y se sabe que la interacción coordinada de las vías es crítica para el desarrollo embrionario. Además, la cooperación de ambas vías es clave para mantener la homeostasis celular, mientras que su desregulación está vinculada a la carcinogénesis (141-145). Sin embargo, no está del todo claro su rol en la tumorigénesis, ya que los efectos sobre la proliferación y la apoptosis parecen depender del modelo o del tipo celular empleado para el análisis (146-150).

Un modo de interacción descrito es la asociación de Smads 2, 3, 4 y 7 con el complejo LEF/TCF/ β -catenina en el núcleo, que desencadena la regulación

diferencial de distintos genes blanco (147, 148, 150-152). Se ha sugerido que los efectos específicos sobre diferentes promotores están modulados por alteraciones dentro del complejo, en las cantidades de cada Smad, LEF/TCF, β -catenina y de otros coactivadores y corepresores (147). Esto permitiría una regulación de la expresión génica dependiente del contexto y tipo celular.

Otra forma de interacción ocurre mediante la asociación de Smads con diversos componentes de la vía Wnt canónica en el citosol. Así, se informó la asociación de Smads con Axina 1 y 2 (153, 154), con β -catenina (150, 155-160) y con Dvl (145, 161, 162).

Durante la integración de las vías de señalización de TGF- β y Wnt/ β -catenina, el repertorio funcional individual de cada una de ellas se expande aún más mediante la interacción de las señales en múltiples niveles de cada vía. Esto crea la posibilidad de especificidad y versatilidad en la señalización conjunta en diferentes contextos celulares. De esta manera, los genes activados por cada vía o por la interacción de ambas, son diferentes. Además, mientras que la señalización Wnt canónica es claramente prooncogénica, la vía TGF- β es contexto específica, manifestando tanto efectos inhibitorios como proliferativos (140, 142). Finalmente, las proteínas Smads pueden ser inducidas en ausencia de TGF- β por otras vías de señalización, aportando mayor complejidad a la interacción (115, 163, 164).

2.4. Clase O de factores de transcripción *forkhead box* (FoxO)

2.4.1. Generalidades

El gen *forkhead* se descubrió a finales de la década de 1980 en *Drosophila*

melanogaster y se denominó de esta manera debido a que embriones mutantes en este gen eran defectuosos en la formación de estructuras terminales que normalmente dan lugar al intestino anterior y posterior, lo que resultaba en una estructura tipo horquilla (165, 166). Actualmente, se han identificado más de 2.000 genes *forkhead* en 108 especies de animales y hongos (50 genes en humanos) (167, 168). La nomenclatura actual para esta familia de proteínas se introdujo en el año 2000, momento en el cual se adoptó el término “*forkhead box*” (Fox) y las proteínas se agruparon en 19 subfamilias o subclases (representadas por una letra, desde la A a la S: FoxA-FoxS), basándose en el porcentaje de conservación de la secuencia de aminoácidos (169).

Las proteínas Fox funcionan como factores de transcripción tanto para inhibir o activar la expresión de sus genes blanco (170) y cumplen múltiples funciones durante el desarrollo embrionario y en el organismo adulto (171).

La clase O de factores de transcripción Fox (FoxO, del inglés *forkhead box O class*) se encuentra altamente conservada entre especies. En mamíferos, está constituida por los miembros FoxO1 (FKHR), FoxO3a (FKHRL1), FoxO4 (AFX) y FoxO6 (171). Mientras que los ARNm de FoxO1, FoxO3a, y FoxO4 están expresados en diferentes grados en todos los tejidos (172-174), el ARNm de FoxO6 se encuentra predominantemente expresado en cerebro (175).

Los factores de transcripción FoxO participan en diversos procesos como diferenciación celular, reparación del ADN, metabolismo, arresto del ciclo celular, muerte celular y protección contra el estrés oxidativo, entre otros (176).

2.4.2. Regulación de los factores FoxO

Debido a que los factores FoxO son un punto de convergencia de varias rutas de señalización, su actividad está cuidadosamente controlada a múltiples niveles, incluyendo la iniciación de su expresión génica, su localización subcelular y su degradación proteica (177). Entre los mecanismos responsables de estos procesos se encuentran la fosforilación en residuos de Ser/Thr/Tyr, la acetilación y desacetilación de Lys, la metilación de Arg y la conjugación con ubiquitina (178).

Las modificaciones en FoxOs se producen predominantemente en el contexto de dos modelos de señalización celular: 1) señales de insulina y factores de crecimiento y 2) señales de estrés celular, especialmente estrés oxidativo (167, 176).

2.4.2.1. Fosforilación de los factores FoxO en respuesta a insulina y a factores de crecimiento

Las quinasas Akt (también llamada PKB, del inglés *protein kinase B*), IKK β (del inglés *I κ B kinase β*) y Erk (del inglés *extracellular-signal-regulated kinase*) fosforilan a las proteínas FoxO en diferentes sitios conservados, en respuesta a la insulina o a factores de crecimiento (*figura 2.3*) (179-182).

Ante un estímulo, la enzima Akt fosforila a los factores FoxO1, FoxO3a y FoxO4 en tres sitios regulatorios claves (Thr32, Ser253 y Ser315 en la secuencia de FoxO3a). Estas fosforilaciones incrementan la asociación de FoxOs con las proteínas chaperonas 14-3-3, lo que promueve su salida del núcleo y de esta manera, el secuestro de estos factores en el citosol. Como resultado, la actividad transcripcional de FoxOs se mantiene reprimida (176, 179, 183, 184). Además, una vez en el citosol, los factores FoxO son marcados mediante ubiquitinación y

degradados en proteosomas (185-187).

Adicionalmente, IKK β fosforila a FoxO3a en la Ser644 (188), mientras que la quinasa Erk lo hace en las serinas 294, 344 y 425 (189). FoxO1 también es fosforilada por Erk en 9 residuos de Ser (190). Al igual que en el caso de Akt, la fosforilación de FoxOs por IKK β y Erk resulta en la translocación de FoxOs desde el núcleo al citoplasma y su posterior ubiquitinación y degradación proteosomal (189, 191, 192).

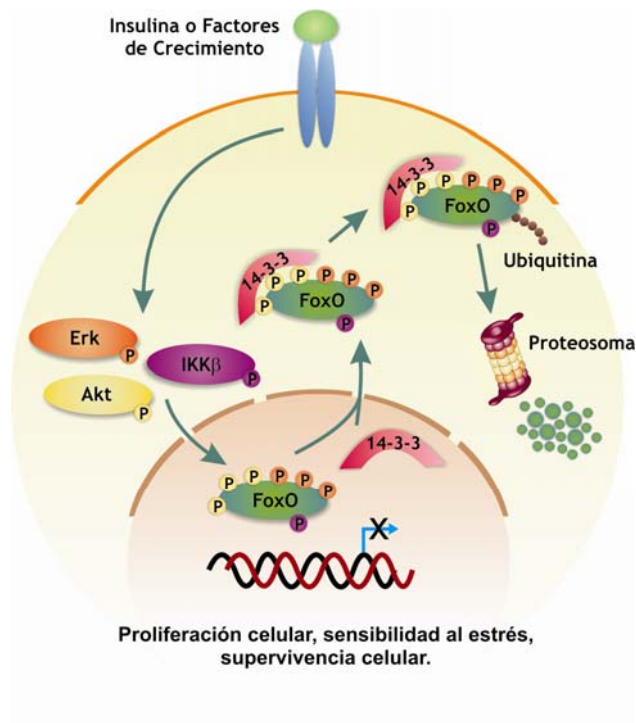


Figura 2.3: Regulación de los factores de transcripción FoxO por insulina y factores de crecimiento.

En presencia de insulina o de factores de crecimiento, se transmiten señales al interior celular que conducen a la fosforilación y activación de las quinazas Akt, IKK β y Erk. Una vez activadas, estas quinazas migran al núcleo y fosforilan a los factores FoxO, que se translocan entonces al citosol asociados a las chaperonas 14-3-3. Así, FoxO permanece secuestrado en el citosol. Además, FoxO es marcado mediante ubiquitinación y degradado en proteosomas. Como resultado de esta modulación, la transcripción génica dependiente de FoxO se encuentra inhibida y se ven favorecidos procesos como proliferación celular, sensibilidad al estrés y supervivencia celular.

2.4.2.2. Fosforilación de los factores FoxO en respuesta a estrés

Distintos tipos de estrés tales como el estrés oxidativo, el golpe térmico o la radiación UV, inducen la fosforilación de los factores FoxO en varios sitios conservados (190, 193). Las quinazas c-Jun NH₂-terminal (JNK) y p38 son las encargadas de efectuar estas fosforilaciones, cuyo efecto es la localización de FoxOs en el núcleo (*figura 2.4*) (190, 194-197).

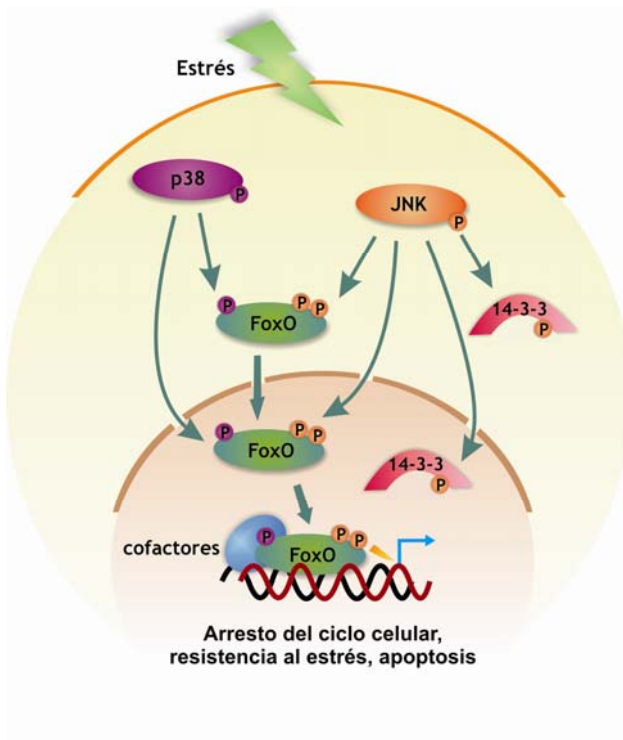


Figura 2.4: Regulación de los factores de transcripción FoxO por estrés. En respuesta a un estímulo de estrés, se transmiten señales al interior celular que conducen a la fosforilación y activación de las quinasas JNK y p38. Una vez activadas, estas quinasas fosforilan a los factores FoxO permitiendo su localización nuclear. De esta manera, FoxO puede unirse al ADN y regular la transcripción de genes involucrados en el arresto del ciclo celular, resistencia al estrés y apoptosis, entre otros procesos. Aunque la fosforilación de FoxO por JNK no inhibe la unión de las chaperonas 14-3-3 a este factor, JNK puede fosforilar directamente a estas proteínas logrando que libere a FoxO.

La quinasa JNK fosforila a FoxO4 en las Thr447 y Thr451 generando la acumulación de FoxO4 en el núcleo, con la consiguiente activación transcripcional de sus genes blanco (194). No se conocen los residuos de FoxO3a que son fosforilados por JNK (193). Por otra parte, JNK no es capaz de fosforilar a FoxO1 (190).

Adicionalmente, JNK fosforila a las chaperonas 14-3-3, permitiendo la disociación de FoxOs de estas proteínas y la localización nuclear de estos factores (198, 199).

Por otro lado, p38 fosforila a FoxO3a en la Ser7 y a FoxO1 en 5 residuos de Ser, permitiendo el incremento nuclear de FoxOs (190, 195). Además, si bien otros trabajos no describen la fosforilación de FoxOs mediada por p38 sí muestran la asociación entre ambas proteínas y el aumento de FoxOs en el núcleo (200, 201).

2.4.3. Asociación de FoxOs con otros factores de transcripción

La interacción de las proteínas FoxO con otras proteínas accesorias o cofactores puede modular su actividad transcripcional, así como también determinar los genes blanco que son regulados por una proteína FoxO específica (202, 203).

β -catenina tiene afinidad por los factores de transcripción FoxO1, FoxO3a y FoxO4 (204-206). Esta interacción es evolutivamente conservada e incrementa notablemente la actividad transcripcional de los factores FoxO. La asociación β -catenina/FoxOs está aumentada en células expuestas a estrés oxidativo y genera el desplazamiento de β -catenina desde LEF/TCF a FoxOs. Este desplazamiento aumenta la expresión de los genes blanco de FoxOs mientras que disminuye la expresión de los genes blanco de la vía Wnt/ β -catenina. Así, los factores FoxO antagonizan la vía Wnt canónica (204-206). Asimismo, la unión β -catenina/FoxOs induce el arresto del ciclo celular (205).

Por otra parte, FoxO1, FoxO3a y FoxO4 interactúan con Smads 2, 3 y 4, desencadenando el arresto del ciclo celular (207-209).

2.4.4. Relación entre los factores FoxO y el cáncer

Los genes para FoxO1, FoxO3a y FoxO4 se descubrieron inicialmente en translocaciones cromosómicas en tumores humanos y como resultado de estos hallazgos, estos factores fueron implicados en el desarrollo del cáncer (210). Sin embargo, estudios posteriores plantearon la posibilidad de que en realidad era la interrupción de los alelos funcionales de FoxOs lo que estaba contribuyendo a la progresión tumoral, con lo cual se describió a estas proteínas como supresores

tumorales (211, 212).

La capacidad de los factores FoxO de inducir el arresto del ciclo celular, la reparación del ADN y la apoptosis, reforzó aún más la idea de que funcionarían como supresores de tumores (176). De hecho, tanto la expresión como la actividad de los factores FoxO están reducidas en varios tipos tumorales como cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de colon, cáncer de endometrio, cáncer de ovario, linfoma de timo, hemangioma, glioblastoma, rhabdomyosarcoma y leucemia (170, 182, 213).

Sumado a esto, Akt, IKK β y Erk funcionan como quinasas oncogénicas y se encuentran comúnmente activadas en el HCC y en otros tipos de tumores (214-220). Además, se observó en tumores humanos y en líneas celulares tumorales que la fosforilación de FoxOs por estas quinasas favorece la transformación celular, la proliferación y la supervivencia (176, 179, 188, 189, 221, 222). Por el contrario, se mostró en estos modelos que la activación de la señalización de FoxOs y de sus genes blanco, mediada por JNK u otros mecanismos, conduce al arresto celular y/o apoptosis (170, 182, 213, 223-228). En conjunto, estas evidencias corroboran la función de FoxOs como supresores tumorales.

2.5. Interferón alfa (IFN- α)

2.5.1. Generalidades

El primer interferón (IFN) fue descubierto de manera accidental por Isaacs y Lindenmann en 1957, cuando observaron que un virus inactivo estimulaba a las células de un tejido a producir y liberar una sustancia no viral capaz de “interferir”

con la replicación de otro virus activo en el mismo tejido, haciendo a las células resistentes a la infección (229).

Los IFNs son una familia de citoquinas producidas por células del sistema inmune en respuesta a una amplia variedad de estímulos, tales como infecciones por virus, bacterias y micoplasmas o procesos inflamatorios (230).

Además de sus propiedades antivirales, los IFNs tienen diversas funciones biológicas que incluyen la inhibición de la proliferación de células normales y transformadas, la regulación de la diferenciación celular, la mediación en respuestas del huésped frente a diferentes agentes patógenos y la modulación del sistema inmune (231, 232).

Los IFNs fueron las primeras citoquinas naturales utilizadas con propósitos terapéuticos (233) y, en la actualidad, los IFNs utilizados en la clínica son producidos por ingeniería genética (234).

Los IFNs se clasifican en tres grupos. Los IFNs tipo I incluyen a IFN- α , - β , - ϵ , - κ , - ω , - δ y - τ y son sintetizados por prácticamente todos los tipos celulares del organismo. Los IFNs tipo II están conformados solamente por el IFN- γ y su expresión se induce principalmente en células del sistema inmune, tales como células T y células asesinas naturales. Finalmente, los IFNs tipo III incluyen a los recientemente identificados IFN- λ_1 , - λ_2 y - λ_3 , que son producidos por células infectadas por virus (235).

De todos los miembros de la familia de IFNs tipo I, IFN- α e IFN- β son los más expresados y mejor caracterizados (236). En el ser humano, IFN- α está compuesto por una familia de 13 subtipos proteicos codificados por 13 genes diferentes. Se considera a todos los miembros de la familia de IFN- α con un perfil

único de actividades biológicas, entre las que se encuentran la actividad antiviral, antiproliferativa, antiangiogénica, antitumoral, estimulación de la actividad citotóxica de diversas células del sistema inmune, inducción y/o activación de genes y proteínas proapoptóticas, represión de genes antiapoptóticos, modulación de la diferenciación celular, entre otras. Todas estas funciones convierten a IFN- α en un agente muy prometedor para el tratamiento de diversas enfermedades (230, 232, 237).

2.5.2. Uso del IFN- α en el tratamiento y prevención del HCC

La Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos (FDA, del inglés *Food and Drug Administration*) aprobó el uso de IFN- α en los protocolos de tratamiento de algunos tumores sólidos y ciertos tipos de leucemia (234, 235, 238-240).

Además, el IFN- α es el tratamiento de elección para pacientes infectados con el virus de la hepatitis B o C (235, 239, 240) y mostró ser útil para retrasar la progresión de la falla hepática, reducir la tasa de aparición de cirrosis y prevenir el HCC en pacientes con hepatitis B o C crónicas (241-250). Sin embargo, también existen algunos ensayos con resultados menos alentadores al respecto (251-255), con lo cual el efecto del tratamiento a largo plazo con IFN- α en la prevención del desarrollo de cirrosis y de HCC aún resulta controversial.

Por otro lado, en diversos estudios realizados por nuestro grupo de trabajo, mostramos un efecto favorable del tratamiento con IFN- α en un estadio previo al HCC. En estos trabajos, se demostró que la administración de IFN- α 2b a ratas con preneoplasia hepática reduce tanto el número como el tamaño de los focos de

hepatocitos alterados a través de un incremento de la apoptosis celular (256). Además, este proceso apoptótico está mediado por el factor TGF- β 1, el cual es producido y secretado por los propios hepatocitos bajo el estímulo con IFN- α 2b (257). Adicionalmente, se observó la atenuación de la vía Wnt/ β -catenina, la cual se encuentra activada en la preneoplasia hepática (258).

En el caso de pacientes con HCCs ya establecidos, ciertos estudios clínicos muestran poco éxito tras la administración de IFN- α como única droga y pocas ventajas respecto de su uso en combinación con otros agentes quimioterapéuticos (ej: cisplatino, antraciclinas, 5-fluorouracilo, doxorubicina) (259-261). A pesar de estos resultados, actualmente numerosos trabajos sugieren una potencial eficacia de la terapia con IFN- α para el tratamiento del HCC, ya sea solo (262-266) o combinado con otras drogas (267-271).

Finalmente, estudios tanto *in vivo* como *in vitro* revelaron efectos beneficiosos de IFN- α al emplear líneas humanas de HCC, ya que la citoquina fue capaz de inhibir la proliferación celular y favorecer la apoptosis (272-281).

Objetivos

3. Objetivos

3.1. Hipótesis de trabajo

De acuerdo a lo informado en la Introducción, surgen las siguientes evidencias:

- ✓ La vía Wnt/ β -catenina está frecuentemente activada en el HCC e involucra la acumulación de β -catenina y su migración al núcleo, donde promueve la proliferación uniéndose a los factores LEF/TCF.
- ✓ El factor TGF- β participa en procesos de arresto celular y apoptosis y actúa a través de las proteínas Smads. Una forma de interacción entre las vías Wnt/ β -catenina y TGF- β /Smads es mediante la asociación de Smads con el complejo nuclear LEF/TCF/ β -catenina.
- ✓ Los factores FoxO median procesos como arresto celular y apoptosis y son capaces de interactuar en el núcleo con β -catenina y con Smads para regular la transcripción génica. La señalización de los factores FoxO es regulada negativamente por las quinasas Akt, IKK β y Erk y positivamente por las quinasas JNK y p38.
- ✓ IFN- α presenta propiedades antiproliferativas y proapoptóticas y se sugiere una potencial eficacia de la terapia con IFN- α para el tratamiento del HCC.

De acuerdo a tales evidencias hipotetizamos que IFN- α 2b y TGF- β 1 atenúan la vía Wnt/ β -catenina mientras que incrementan la señalización de FoxO3a en líneas celulares de HCC. Esto disminuye la proliferación celular y aumenta la apoptosis. Las interacciones entre las señales de Wnt/ β -catenina, TGF- β /Smads y FoxO3a, contribuyen a la respuesta celular final obtenida con los tratamientos.

3.2. Objetivo general

Para probar nuestra hipótesis, estudiamos los efectos de IFN- α 2b y de TGF- β 1 sobre la vía Wnt/ β -catenina, los intermediarios Smads, el factor FoxO3a y la interacción entre estas señales, en las líneas de HCC HepG2/C3A y Huh7. De esta manera, ampliaremos el conocimiento general sobre los procesos implicados en el desarrollo del hepatocarcinoma celular y su modulación por citoquinas.

3.3. Objetivos específicos

- I. Investigar las consecuencias de los tratamientos con IFN- α 2b y con TGF- β 1 sobre la proliferación celular y la muerte celular por apoptosis.
- II. Analizar los efectos de IFN- α 2b y de TGF- β 1 sobre la vía Wnt/ β -catenina.
- III. Explorar las acciones de IFN- α 2b y de TGF- β 1 sobre los niveles proteicos de Smads y la interacción entre Smads y la vía Wnt/ β -catenina.
- IV. Evaluar los efectos de IFN- α 2b sobre los niveles proteicos de FoxO3a, su regulación por quinasas y la interacción de FoxO3a con β -catenina y con Smads.

Metodología

4. Metodología

4.1. Líneas celulares y tratamientos

Para realizar este trabajo de tesis se utilizaron las líneas celulares de hepatocarcinoma humano HepG2/C3A y Huh7, obtenidas de la *American Type Culture Collection* (ATCC; Rockville, MD, USA). La línea celular HepG2/C3A, también llamada C3A, deriva clonalmente de la línea celular HepG2. Las células fueron mantenidas en medio DMEM (del inglés *Dulbecco's modified Eagle's medium*) con L-glutamina suplementado con 10% de suero fetal bovino, 100 U/mL de penicilina y 100 mg/mL de estreptomina, e incubadas a 37°C en una atmósfera húmeda de 95% O₂ y 5% CO₂. Para realizar los tratamientos, se sembraron las células en presencia del medio de mantenimiento y se incubaron toda la noche. Al día siguiente, se reemplazó el medio DMEM por medio libre de suero (MLS) conteniendo IMDM (del inglés *Iscove's modified Dulbecco's medium*) y medio Ham con mezcla de nutrientes F12 (Ham F-12) en relación 1:1, 20 IU/mL de penicilina, 20 µg/mL de estreptomina y suplemento insulina-selenio-transferrina (Gibco, Carlsbad, CA, USA). Luego de incubar las células durante una hora en MLS, se reemplazó el mismo por MLS conteniendo las drogas de los tratamientos.

Las células fueron tratadas con 100.000 U/mL de IFN-α2b (cedido generosamente por PC-Gen, Buenos Aires, Argentina), con 2 ng/mL de TGF-β1 recombinante (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), con ambas citoquinas, o dejadas sin tratar.

Para estimular la vía de señalización Wnt/β-catenina, se trató a las células

con 20 ng/mL de Wnt3a recombinante (R&D Systems).

Finalmente, para evaluar el rol de las quinasas IKK β , Erk y p38 en la modulación de FoxO3a mediada por IFN- α 2b, se trataron previamente las células con inhibidores de las quinasas y, manteniéndose a los inhibidores durante el experimento, se realizó el tratamiento con 100.000 U/mL de IFN- α 2b. Para este estudio se utilizaron 10 μ M de N-(6-cloro-9H-pirido[3,4-b]indol-8-il)-3-piridinacarboxamida dihidrocloruro (PS1145: inhibidor de IKK β ; Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA), 5 μ M de 2'-amino-3'-metoxiflavona (PD98059: inhibidor de MEK, que es la quinasa encargada de activar a Erk; Calbiochem, San Diego, CA, USA) y 1 μ M de 4-(4-fluorofenil)-2-(4-hidroxifenil)-5-(4-piridil)1H-imidazol (SB202190: inhibidor de p38; Calbiochem).

4.2. Secreción de TGF- β 1

Los niveles de TGF- β 1 endógeno liberados al medio de cultivo fueron determinados utilizando un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) específico para TGF- β 1 (Assay Designs Inc., Ann Arbor, MI, USA). Para esto se sembraron las células en placas de 6 pocillos y se trataron las mismas en presencia o ausencia de IFN- α 2b, durante diferentes tiempos. Luego del tratamiento, se recolectaron los sobrenadantes de los cultivos celulares (medios condicionados) y se procedió a determinar los niveles de TGF- β 1 luego de activar los medios condicionados con 1 N de HCl y de neutralizarlos con 1,2 N de NaOH/0,5 M de HEPES (del inglés *4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid*). El tratamiento de activación se realizó debido a que el factor TGF- β 1 es secretado mayoritariamente de manera latente al medio y el ensayo sólo detecta TGF- β 1

activo. La forma latente del factor puede ser convertida a una forma biológicamente activa mediante la exposición a pH extremos, calor o proteasas (282).

4.3. Preparación de fracciones subcelulares y lisados celulares totales

A partir de las células tratadas o sin tratar, se prepararon extractos citosólicos y nucleares y lisados totales. Antes de levantar las células de las placas, se lavaron las mismas dos veces con *buffer* fosfato en solución salina (PBS: 80 mmol/L de Na₂HPO₄, 20 mmol/L de NaH₂PO₄ y 100 mmol/L de NaCl; pH 7,5) frío.

Las fracciones subcelulares enriquecidas en citosoles y núcleos fueron obtenidas según el método descrito por De Duve y col. (283). Brevemente, las células se levantaron de las placas con 300 mmol/L de sacarosa conteniendo inhibidores de fosfatasas (1 mmol/L de NaF, 1 mmol/L de Na₃VO₄ y 1,5 nmol/L de caliculina A; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) e inhibidores de proteasas [1 mmol/L de fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF), 10 µg/mL de leupeptina y 1 µg/mL de aprotinina; Sigma Chemical Co.] y posteriormente se sonicaron. A continuación, las células se centrifugaron a 1.000 *g* durante 10 min a 4°C. Los *pellets*, enriquecidos en núcleos celulares, fueron lavados dos veces con 300 mmol/L de sacarosa conteniendo inhibidores, resuspendidos en *buffer* de lisis de radioinmunoprecipitación [RIPA: 1% (v/v) de Tritón X-100, 1% (p/v) de deoxicolato sódico, 0,1% (p/v) de dodecilsulfato sódico (SDS), 20 mmol/L de Tris, 5 mmol/L de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) y 200 mmol/L de NaCl; pH 8] con inhibidores de fosfatasas y de proteasas, incubados en hielo durante 1 h y centrifugados a 8.000 *g* durante 15 min a 4°C. Los sobrenadantes obtenidos se

utilizaron como fracciones nucleares. Por otra parte, los sobrenadantes generados en la centrifugación inicial se centrifugaron a 160.000 *g* durante 1 h a 4°C, para obtener la fracción citosólica.

Para la obtención de lisados celulares totales se levantaron las células de las placas con PBS frío conteniendo inhibidores de fosfatasa y de proteasa y se centrifugaron a 1.000 *g* durante 5 min. Posteriormente, el *pellet* celular se resuspendió en *buffer* RIPA conteniendo inhibidores de fosfatasa y de proteasa y fue incubado por 30 min a 4°C. Luego las células fueron sonicadas.

Los lisados utilizados para experimentos de co-inmunoprecipitación fueron obtenidos en *buffer* de lisis no desnaturante conteniendo 20 mM de Tris (pH 8), 137 mM de NaCl, 10% de glicerol, 1% de Tritón X-100, 2 mM de EDTA e inhibidores de fosfatasa y de proteasa.

Las fracciones y los lisados se congelaron a -70°C hasta su utilización.

4.4. Determinación de proteínas

La concentración de proteínas fue determinada por el método de Lowry, usando albúmina bovina como estándar (284).

4.5. Western blot

Alícuotas conteniendo cantidades iguales de proteínas (15-25 µg/calle) se sembraron en mini-geles de SDS-poliacrilamida al 12% (p/v) y se sometieron a electroforesis (285). Los mini-geles se corrieron utilizando un equipo comercial (Mini-PROTEAN 3 Cell; Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Luego, las proteínas se transfirieron eléctricamente a membranas de polivinilideno difluoruro (PVDF;

PerkinElmer Life Sciences, Boston, MA, USA) durante 1 h a un voltaje constante de 360 mV, utilizando un equipo comercial (Mini Trans-Blot Cell, Bio-Rad). Después de ser bloqueadas durante 1 h con leche al 10% en *buffer* PBS conteniendo 0,1% (v/v) de Tween 20 (*buffer* PBS-Tween), las membranas se incubaron toda la noche con el anticuerpo primario correspondiente diluido en *buffer* PBS-Tween con un 3% de albúmina. Posteriormente, las membranas fueron lavadas con *buffer* PBS-Tween e incubadas con el anticuerpo secundario correspondiente durante 1 h a temperatura ambiente. La proteína inmovilizada fue detectada luego por quimioluminiscencia utilizando un equipo comercial y siguiendo las recomendaciones del fabricante (Pierce® ECL-Western Blotting Substrate; Thermo Scientific, Rockford, IL, USA). Para la detección, las membranas de PVDF se expusieron a films radiográficos (Amersham Hyperfilm™ ECL; GE Healthcare Limited, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK) y las bandas resultantes se cuantificaron por densitometría utilizando el programa *Gel-Pro Analyzer* (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA). La uniformidad de carga de las proteínas se realizó determinando la cantidad de β -actina (anti- β -actina; dilución 1:5.000; Sigma Chemical Co.). Al mismo tiempo, en todos los experimentos, el control de carga se chequeó además mediante la tinción de la membrana con rojo de Ponceau (dato no mostrado). La pureza de las fracciones citosólicas y nucleares se confirmó detectando α -tubulina (Sigma Chemical Co.) e Histona H1 (Santa Cruz Biotechnology Inc.).

Se utilizaron los siguientes anticuerpos primarios: anti-PCNA (del inglés *proliferating cell nuclear antigen*; dilución 1:500; Santa Cruz Biotechnology Inc.), anti-citocromo c (dilución 1:3.000; Santa Cruz Biotechnology Inc.), anti- β -catenina

total (dilución 1:2.000; BD Transduction Labs, San Jose, CA, USA), anti- β -catenina activa (desfosforilada en Ser37/Thr41; dilución 1:2.000; Millipore, Temecula, CA, USA), anti-Frizzled7 (dilución 1:3.000; Abcam, Cambridge, MA, USA), anti-p-Smad2/3 (fosforilada en Ser433/435; dilución 1:500; Santa Cruz Biotechnology Inc.), anti-Smad4 (dilución 1:1.000; Cell Signaling Inc., Danvers, MA, USA), anti-Smad7 (dilución 1:500; R&D Systems), anti-Akt (dilución 1:500; Santa Cruz Biotechnology Inc.), anti-p-Akt (fosforilada en Ser473; dilución 1:1.000; Cell Signaling Inc.), anti-IKK β (dilución 1:1.000; Cell Signaling Inc.), anti-p-IKK β (fosforilada en Ser177/181; dilución 1:1.000; Cell Signaling Inc.), anti-Erk1/2 (reconoce las isoformas 1 y 2 de Erk; dilución 1:1.000; Cell Signaling Inc.), anti-p-Erk1/2 (fosforilada en Thr202/Tyr204; dilución 1:1.000; Cell Signaling Inc.), anti-JNK1/2/3 (reconoce las isoformas 1, 2 y 3 de JNK; dilución 1:1.000; Cell Signaling Inc.), anti-p-JNK1/2/3 (fosforilada en Thr183/Tyr185; dilución 1:500; Santa Cruz Biotechnology Inc.), anti-p38 (dilución 1:1.000; Cell Signaling Inc.), anti-p-p38 (fosforilada en Tyr182; dilución 1:500; Santa Cruz Biotechnology Inc.), anti-FoxO3a/FKHRL1 (dilución 1:2.000; Santa Cruz Biotechnology Inc.) y anti-p-FoxO3a/FKHRL1 (fosforilada en Ser253; dilución 1:1.000; Santa Cruz Biotechnology Inc.).

4.6. Ensayo de proliferación celular

La sensibilidad de las líneas de HCC al IFN- α 2b, TGF- β 1 o a la combinación de ambos factores, se determinó utilizando el ensayo de proliferación celular *CellTiter 96* (*CellTiter 96[®] Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay*; Promega, Madison, WI, USA) basado en el compuesto tetrazolio 3-(4,5-

dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio (MTS). MTS es bio-reducido por las células metabólicamente activas a un producto formazan coloreado que es soluble en el medio de cultivo. Para realizar este ensayo se sembraron las células en placas de 96 pocillos y se trataron las mismas en presencia o ausencia de IFN- α 2b, TGF- β 1 o ambos factores, durante varios días. Al finalizar cada día de tratamiento se adicionó reactivo de proliferación a cada pocillo, se incubó la placa correspondiente durante 2 hs a 37°C en una atmósfera húmeda de 95% O₂ y 5% CO₂ y se registró la absorbancia a 490 nm en un espectrofotómetro LD400 (Beckman Coulter Inc., Fullerton, CA, USA).

4.7. Medición de la actividad Caspasa 3

Se determinó la actividad Caspasa 3 como medida de muerte celular programada utilizando *EnzChek® Caspase-3 Assay Kit #1* (Molecular Probes Inc., Eugene, OR, USA). Para realizar este ensayo, las células se sembraron en placas de 10 cm de diámetro y se trataron en presencia o ausencia de IFN- α 2b, TGF- β 1 o ambos factores. Al finalizar el tratamiento, se levantaron las células en el *buffer* de lisis del ensayo, se dejaron 30 min en hielo, se sonicaron y finalmente se centrifugaron a 2.000 *g* durante 5 min. Posteriormente, se determinó la concentración de proteínas en el sobrenadante y se colocaron 4 mg/mL de cada muestra en una placa negra de 96 pocillos, en presencia o ausencia de un inhibidor específico de la enzima Caspasa 3. Finalmente, se midió la fluorescencia (excitación/emisión ~342/441 nm) utilizando un lector de microplaca (DTX 880 multimode detector; Beckman Coulter Inc.), luego de agregar el sustrato específico de la enzima.

4.8. Ensayo de co-inmunoprecipitación

Lisados celulares totales conteniendo cantidades iguales de proteínas (500 μg), fueron inmunoprecipitados usando anticuerpos específicos (3 μg). Para ello, las proteínas de interés se incubaron con los anticuerpos primarios durante toda la noche a 4°C con agitación. Posteriormente, se agregaron 4 mg/mL de Proteína A-Sepharosa (Sigma Chemical Co.) preparada en PBS con inhibidores de fosfatasa y de proteasas y se incubaron las muestras 4 hs a 4°C con agitación. Al finalizar la incubación, se centrifugaron las muestras 5 min a 2.000 g y se lavaron los *pellets* tres veces con *buffer* no desnaturizante conteniendo inhibidores de fosfatasa y de proteasas. Finalmente, se resuspendieron los *pellets* en *buffer* de muestra para *western blot* y se calentaron 10 min a 90°C. Las muestras resultantes se sembraron en mini-geles de poliacrilamida al 12% (p/v) y se sometieron a electroforesis de acuerdo a lo descrito en la *sección 4.5*.

4.9. Estudios estadísticos

Los resultados fueron expresados como la media aritmética \pm el error estándar. Los datos se analizaron utilizando la prueba de la t de Student para comparar dos grupos entre sí y el análisis de la variancia (ANOVA) seguido por el método de Tukey, para comparar entre varios grupos. Se consideraron estadísticamente significativos valores de $p < 0,05$.

Resultados y Discusión

Capítulo 1:

Evaluación de los efectos antiproliferativos y proapoptóticos de IFN- α 2b y de TGF- β 1 en las líneas de HCC HepG2/C3A y Huh7

5. Resultados y Discusión

Capítulo 1: Evaluación de los efectos antiproliferativos y proapoptóticos de IFN- α 2b y de TGF- β 1 en las líneas de HCC HepG2/C3A y Huh7

5.1.1. Grupos experimentales

Para la realización de estos estudios se trataron las células HepG2/C3A y Huh7 con IFN- α 2b, con TGF- β 1 o con la combinación de ambos factores, o se dejaron sin tratar, durante los siguientes tiempos: a) 96 hs para evaluar la secreción de TGF- β 1, b) 6 días para realizar el ensayo de proliferación celular y c) 48 hs para el resto de los experimentos.

HepG2 y Huh7 presentan los receptores para IFN- α y TGF- β en la superficie celular y señalizaciones íntegras y funcionales para ambas citoquinas (126, 276, 286, 287).

5.1.2. Secreción de TGF- β 1 endógeno al medio de cultivo

En trabajos previos de nuestro grupo, demostramos que la administración *in vivo* de IFN- α 2b a ratas con preneoplasia hepática induce apoptosis a través de un mecanismo que involucra la producción y secreción de TGF- β 1 por los propios hepatocitos (257, 288).

De esta manera, nos propusimos determinar si ocurría lo mismo en las líneas de HCC C3A y Huh7 tratadas con IFN- α 2b (*figura 5.1.1*).

La secreción de TGF- β 1 al medio de cultivo de las células C3A no tratadas fue prácticamente constante a lo largo del tiempo estudiado (0 a 96 hs) y la misma

no se modificó al tratar a las células con IFN- α 2b. En el caso de las células Huh7 no tratadas, la secreción de TGF- β 1 fue aumentando hasta las 48 hs de cultivo y se mantuvo hasta las 96 hs. Al igual que para C3A, la secreción de TGF- β 1 no fue afectada por la presencia de IFN- α 2b.

Este resultado indica que ambas líneas de HCC son capaces de producir y de secretar TGF- β 1 de manera independiente de IFN- α 2b.

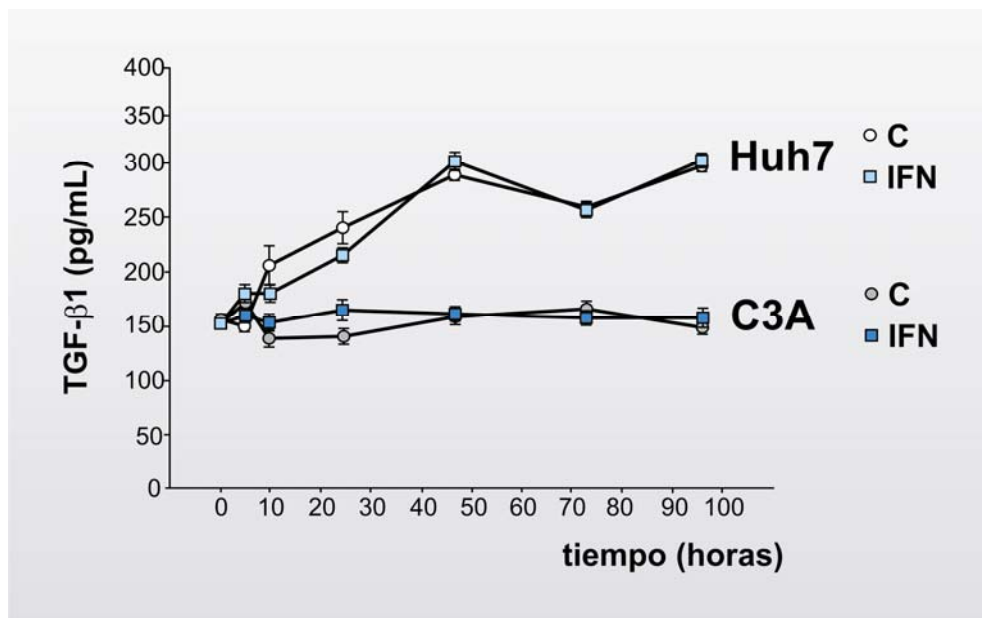


Figura 5.1.1: Secreción de TGF- β 1 al medio de cultivo en presencia y ausencia de IFN- α 2b. Las células C3A (5×10^5 /pocillo) y Huh7 (2×10^5 /pocillo) se sembraron en placas de 6 pocillos en presencia o ausencia de IFN- α 2b (100.000 U/mL), durante diferentes tiempos. La concentración de TGF- β 1 fue determinada en los medios condicionados activados. Los resultados se representan como la media \pm el error estándar de tres experimentos independientes. C: células control (sin tratar), IFN: células tratadas con IFN- α 2b.

Si bien se ha informado la producción y secreción de TGF- β por líneas de HCC como HepG2 y Huh7 (137, 245, 289), se vió que dicho factor permanece mayoritariamente en una forma latente en el medio de cultivo (290). De hecho, medimos la secreción de TGF- β 1 en medios condicionados no activados y no

podimos detectar dicho factor (dato no mostrado).

Con este resultado, nos planteamos la necesidad de incorporar TGF- β 1 recombinante a los experimentos, ya que probablemente el TGF- β 1 endógeno no esté disponible para ser utilizado por las células (o lo esté en muy baja cantidad).

5.1.3. Pureza de las fracciones subcelulares

Cuando se comenzó a utilizar el protocolo de obtención de fracciones citosólicas y nucleares, se confirmó la pureza de las mismas mediante la detección de α -tubulina e Histona H1 (*western blot*).

Como se aprecia en la *figura 5.1.2*, la proteína α -tubulina sólo se detectó en la fracción citosólica, mientras que la proteína Histona H1 sólo pudo observarse en la fracción nuclear. Este resultado validó la pureza de las fracciones, ya que α -tubulina se localiza en el citosol mientras que Histona H1 se encuentra en el núcleo.

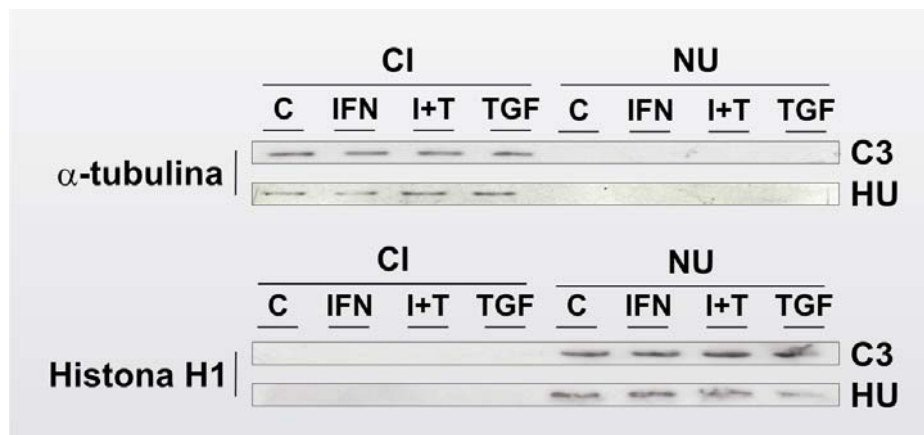


Figura 5.1.2: Pureza de las fracciones citosólicas y nucleares. Las células C3A (4×10^6 /placa) y Huh7 (2×10^6 /placa) fueron incubadas en placas de 10 cm de diámetro con medio libre de suero y tratadas durante 48 hs con IFN- α 2b (100.000 U/mL), con TGF- β 1 (2 ng/mL) o con una combinación de ambos factores, o dejadas sin tratar. Luego de obtener las fracciones citosólicas y nucleares, se determinó la pureza de las mismas mediante *western blot* utilizando anticuerpos anti- α -tubulina y anti-Histona H1. C: células control (sin tratar), IFN: células tratadas con IFN- α 2b, I+T: células tratadas con IFN- α 2b más TGF- β 1, TGF: células tratadas con TGF- β 1, CI: extracto citosólico, NU: extracto nuclear, C3: línea celular C3A, HU: línea celular Huh7.

5.1.4. Proliferación celular

En el caso de HepG2/C3A (*figura 5.1.3 A, B*) los tratamientos con IFN- α 2b, con TGF- β 1 y con la combinación de ambos factores, redujeron significativamente la proliferación celular respecto de las células sin tratar, a partir del tercer día de tratamiento. Además, se observaron diferencias significativas sobre la proliferación celular entre los diferentes tratamientos a partir de ese mismo día. En la *figura 5.1.3 B* se muestra el efecto de los tratamientos sobre la proliferación de las células C3A en el día 6. Como se puede observar, la menor proliferación se obtuvo luego del tratamiento combinado con IFN- α 2b y TGF- β 1 (el mismo redujo la proliferación en un 93% respecto de las células sin tratar), seguida de los tratamientos con TGF- β 1 solo que disminuyó la proliferación en un 85% y con IFN- α 2b solo, el cual redujo la proliferación en un 39%.

En la línea celular Huh7 (*figura 5.1.3 C, D*) los tratamientos con IFN- α 2b combinado con TGF- β 1 y con TGF- β 1 solo, disminuyeron significativamente la proliferación a partir del segundo día respecto de las células sin tratar, mientras que el tratamiento con IFN- α 2b solo disminuyó la proliferación a partir del tercer día. Al sexto día de cultivo se obtuvieron diferencias significativas sobre la proliferación celular entre todos los grupos (*figura 5.1.3 D*). Al igual que para la línea C3A, la menor proliferación se obtuvo luego del tratamiento combinado con IFN- α 2b y TGF- β 1 (que disminuyó la proliferación en un 80% respecto de las células sin tratar), seguida de los tratamientos con TGF- β 1 solo que redujo la proliferación en un 62% y con IFN- α 2b solo, el cual disminuyó la proliferación en un 46%.

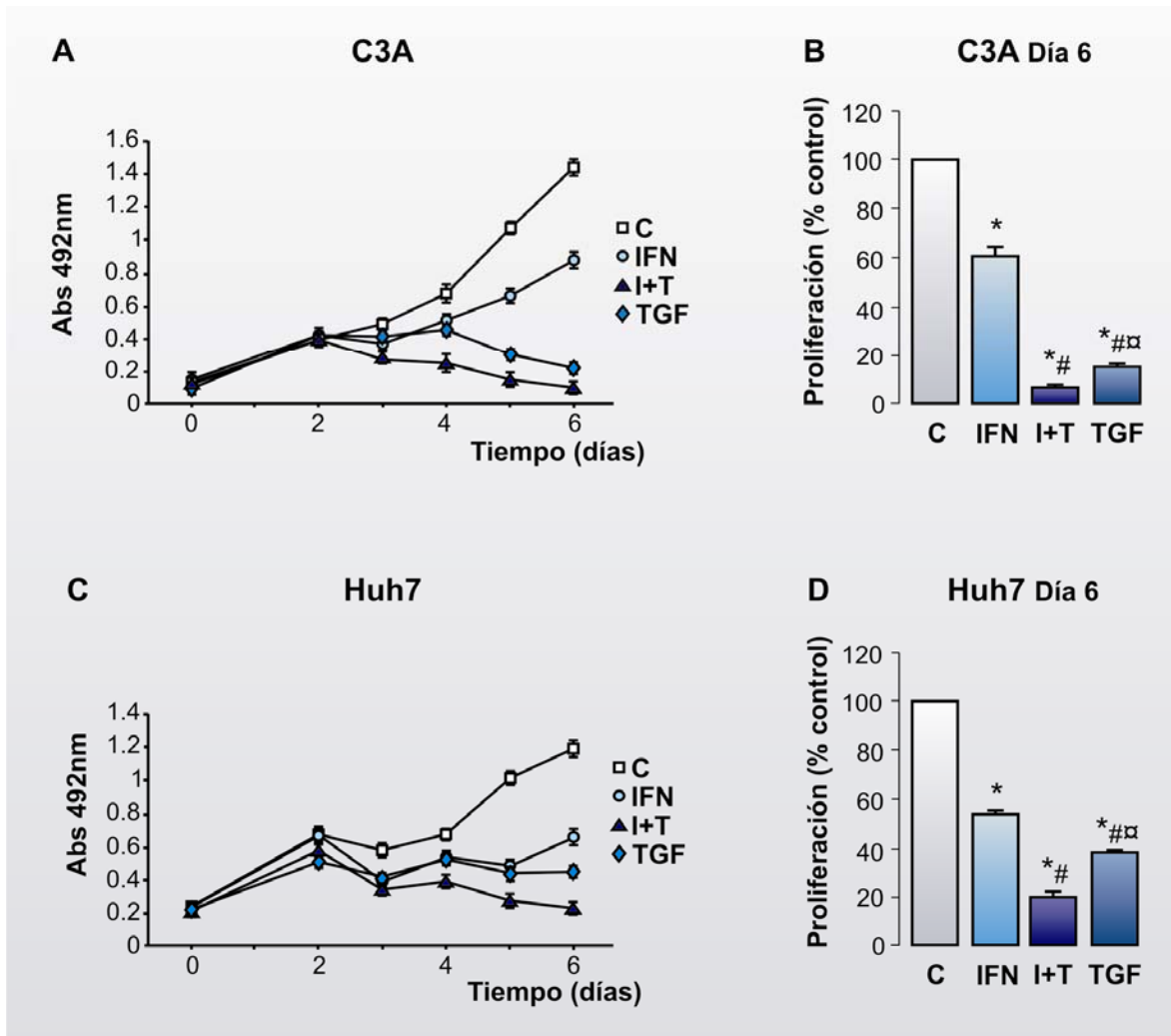


Figura 5.1.3: Efectos antiproliferativos de IFN- α 2b y de TGF- β 1. Las células C3A (6×10^3 /pocillo) y Huh7 (2×10^3 /pocillo) fueron incubadas en placas de 96 pocillos con medio libre de suero durante 6 días en presencia de IFN- α 2b (100.000 U/mL), de TGF- β 1 (2 ng/mL) o de una combinación de ambas citoquinas, o se dejaron sin tratar. Se evaluó la proliferación celular cada 24 hs, midiendo la absorbancia a 490 nm mediante un ensayo colorimétrico (**A**: C3A, **C**: Huh7). Los resultados también fueron mostrados en valores porcentuales al sexto día, considerando arbitrariamente a las células control (sin tratar) como 100% (**B**: C3A, **D**: Huh7) y se expresaron como la media \pm el error estándar de al menos cuatro experimentos independientes. En las figuras **A** y **C** se omitieron los símbolos de significancia estadística para evitar confusión. C: células control, IFN: células tratadas con IFN- α 2b, I+T: células tratadas con IFN- α 2b más TGF- β 1, TGF: células tratadas con TGF- β 1. * $p < 0,05$ vs. C, # $p < 0,05$ vs. IFN, $\square p < 0,05$ vs. I+T.

Por otra parte, se cuantificaron los niveles proteicos de PCNA en extractos nucleares mediante *western blot*. PCNA es una proteína auxiliar de la ADN polimerasa δ que es esencial para la replicación del ADN durante la fase S del ciclo

celular (291). Como se muestra en la *figura 5.1.4*, los tratamientos con IFN- α 2b y/o TGF- β 1 durante 48 hs disminuyeron significativamente los niveles proteicos de PCNA en las células C3A (IFN -65%, I+T -78%, TGF -66%) y Huh7 (IFN -77%, I+T -81%, TGF -84%), respecto de las células sin tratar.

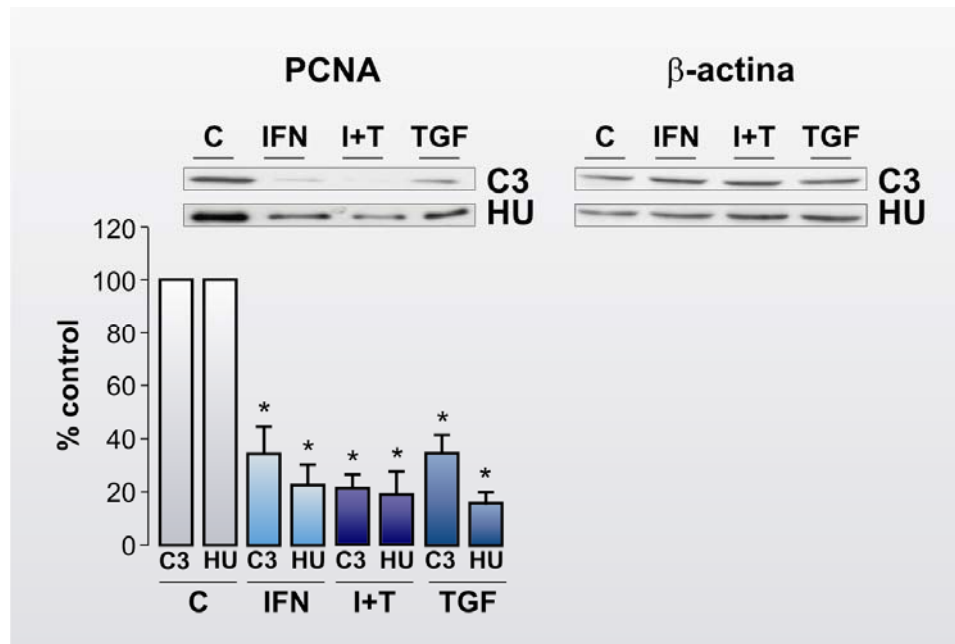


Figura 5.1.4: Disminución de los niveles proteicos de PCNA mediada por IFN- α 2b y por TGF- β 1. Las células C3A (4×10^6 /placa) y Huh7 (2×10^6 /placa) fueron incubadas en placas de 10 cm de diámetro con medio libre de suero y tratadas durante 48 hs con IFN- α 2b (100.000 U/mL), con TGF- β 1 (2 ng/mL) o con una combinación de ambos factores, o se dejaron sin tratar. Los niveles de expresión de la proteína PCNA fueron evaluados por *western blot* en extractos nucleares de ambas líneas de HCC. La proteína β -actina fue utilizada como control de carga. El análisis densitométrico se realizó en al menos cuatro experimentos independientes. Los resultados se mostraron en valores porcentuales considerando arbitrariamente a las células control (sin tratar) como 100% y se expresaron como la media \pm el error estándar. C: células control, IFN: células tratadas con IFN- α 2b, I+T: células tratadas con IFN- α 2b más TGF- β 1, TGF: células tratadas con TGF- β 1, C3: línea celular C3A, HU: línea celular Huh7. * $p < 0,05$ vs. C.

5.1.5. Actividad Caspasa 3 y expresión de Citocromo c

Se cree que la cascada de cisteinil-aspartato proteasas (caspasas) es la principal vía por la cual se orchestra la muerte celular programada o apoptosis (292). Existen dos vías a partir de las cuales se produce la activación de las

caspasas: la extrínseca y la intrínseca. Ambas vías convergen en la activación de la Caspasa 3, que es la caspasa más prevalente de la célula. Esta caspasa es finalmente la responsable de la mayoría de los efectos y se la llama generalmente caspasa ejecutora, debido a su rol en coordinar la muerte de la célula (293). De esta manera, decidimos medir la actividad Caspasa 3 como parámetro de muerte celular programada.

Por otra parte, el gatillado de la apoptosis involucra la liberación de Citocromo c mitocondrial al citosol. Una vez que esta molécula sale de la mitocondria, la activación de las caspasas es irreversible (294, 295). Por este motivo, evaluamos el nivel proteico de Citocromo c en el citosol como un segundo parámetro de apoptosis.

En la *figura 5.1.5 A, B* se puede observar el efecto de IFN- α 2b y de TGF- β 1 sobre la actividad de la enzima Caspasa 3 en ambas líneas de HCC. Los tratamientos durante 48 hs con IFN- α 2b, con TGF- β 1 y con la combinación de ambos factores aumentaron significativamente la actividad de la enzima respecto de las células no tratadas. Asimismo, se observaron diferencias significativas entre los diferentes tratamientos sobre la actividad Caspasa 3. Como se muestra en la *figura 5.1.5 A, B* el mayor aumento de la actividad Caspasa 3 se obtuvo luego del tratamiento combinado con IFN- α 2b y TGF- β 1. El mismo elevó la actividad enzimática en un 164% en C3A y un 140% en Huh7, respecto de las células sin tratar, seguido de los tratamientos con IFN- α 2b solo, que incrementó la actividad de la enzima en un 98% en C3A y un 92% en Huh7 y con TGF- β 1 solo, que aumentó la actividad Caspasa 3 en un 68% en C3A y un 47% en Huh7.

Por otro lado, como se ve en la *figura 5.1.5 C* el contenido proteico de

Citocromo c aumentó significativamente luego de 48 hs de estimulación con IFN- α 2b y/o TGF- β 1, en extractos citosólicos de las líneas C3A (IFN +100%, I+T +286%, TGF +65%) y Huh7 (IFN +126%, I+T +257%, TGF +152%), respecto de las células sin tratar. El tratamiento combinado produjo el mayor incremento en los niveles de Citocromo c.

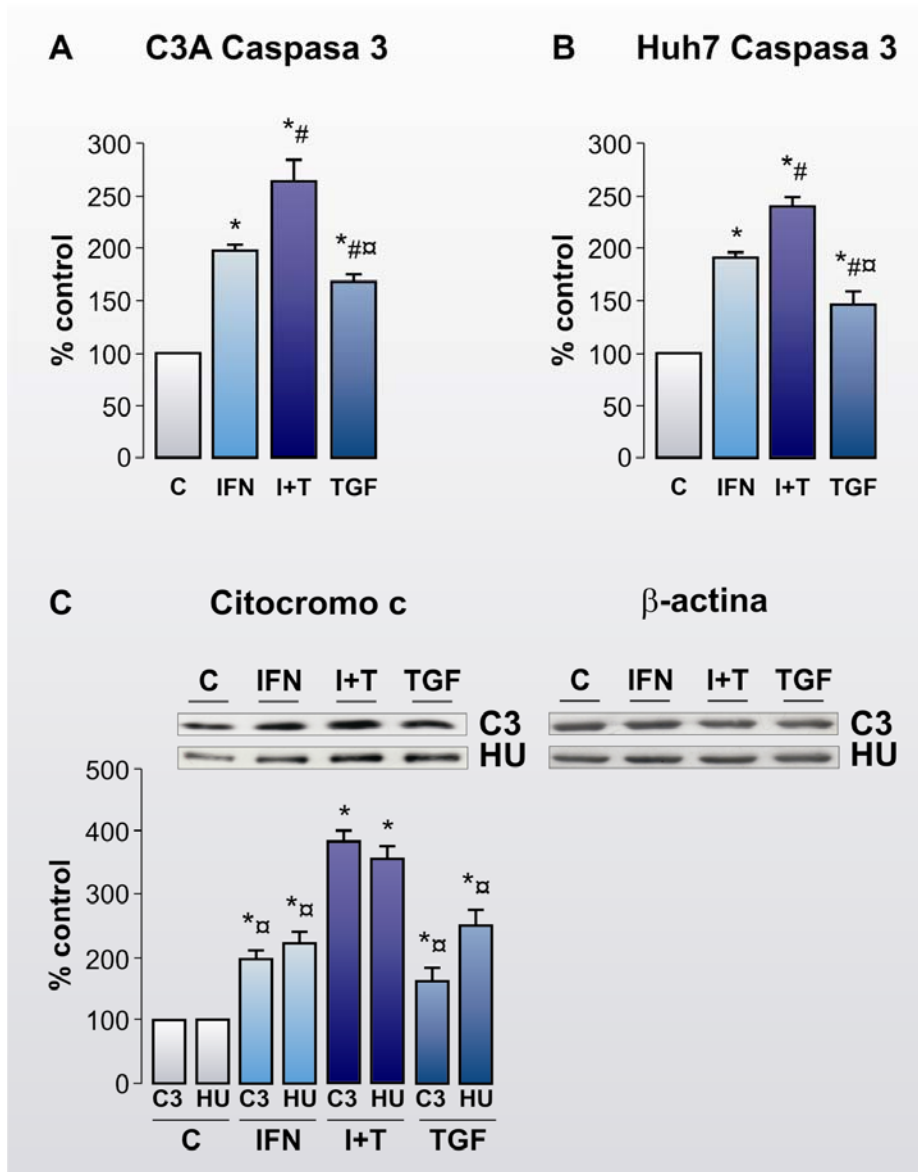


Figura 5.1.5: Inducción de la apoptosis luego del tratamiento con las citoquinas. Las células C3A (4×10^6 /placa) y Huh7 (2×10^6 /placa) fueron incubadas en placas de 10 cm de diámetro con medio libre de suero y tratadas durante 48 hs con IFN- α 2b (100.000 U/mL), con TGF- β 1 (2 ng/mL) o con una combinación de ambos factores, o dejadas sin tratar. La actividad Caspasa 3 se

medió en fracciones citosólicas y los resultados, para las líneas celulares C3A (**A**) y Huh7 (**B**), se mostraron en valores porcentuales considerando arbitrariamente a las células control (sin tratar) como 100%. Los resultados se expresaron como la media \pm el error estándar de al menos cuatro experimentos independientes. **C**) Las fracciones citosólicas se emplearon además para la detección de los niveles de expresión de Citocromo c mediante *western blot*. La proteína β -actina fue utilizada como control de carga. El análisis densitométrico se realizó en al menos cuatro experimentos independientes. Los resultados se mostraron en valores porcentuales considerando arbitrariamente a las células control (sin tratar) como 100% y se expresaron como la media \pm el error estándar. C: células control, IFN: células tratadas con IFN- α 2b, I+T: células tratadas con IFN- α 2b más TGF- β 1, TGF: células tratadas con TGF- β 1, C3: línea celular C3A, HU: línea celular Huh7. * $p < 0,05$ vs. C, # $p < 0,05$ vs. IFN, $\times p < 0,05$ vs. I+T.

5.1.6. Discusión

En este capítulo del presente trabajo de tesis nos propusimos evaluar si el tratamiento de las líneas de HCC HepG2/C3A y Huh7 con IFN- α 2b era capaz de generar la secreción de TGF- β 1 y los efectos de dicho tratamiento sobre los procesos de proliferación y de apoptosis. Dado que previamente demostramos que la administración *in vivo* de IFN- α 2b a ratas con preneoplasia hepática induce la apoptosis a través de un mecanismo que involucra la producción y secreción de TGF- β 1 por los propios hepatocitos (257, 288), quisimos determinar si este mismo fenómeno ocurría en las líneas de HCC.

Ambas líneas celulares fueron capaces de secretar TGF- β 1 al medio de cultivo en ausencia de IFN- α 2b, pero su comportamiento fue diferente a lo largo del tiempo. Por otro lado, la secreción de TGF- β 1 no fue afectada al tratar a las células C3A y Huh7 con IFN- α 2b. De esta manera, estas líneas de HCC producen y secretan TGF- β 1 y lo hacen de forma independiente de IFN- α 2b.

Así, la modulación de la producción y secreción de TGF- β 1 por IFN- α 2b que ocurre en etapas tempranas del desarrollo tumoral hepático (257, 288), no pudo ser reproducida en las líneas de HCC empleadas. Esto podría deberse, entre otros factores, al estadio del HCC utilizado. De ser de esta manera, podríamos suponer

que en estadios avanzados del desarrollo tumoral hepático las células cancerosas han modificado su respuesta a la citoquina IFN- α 2b en lo que respecta a la producción y a la secreción de TGF- β 1. Este evento se daría en el marco de las habilidades que han adquirido las células de HCC durante su desarrollo maligno y podría representar una ventaja adaptativa para su crecimiento y proliferación.

Por otro lado, se sabe que las líneas de HCC producen y secretan TGF- β 1 pero que este factor se encuentra mayoritariamente en una forma biológicamente inerte en el medio de cultivo (290). Debido a esto, decidimos medir los niveles de TGF- β 1 en medios condicionados no activados y no pudimos detectar dicho factor. Esto podría ser explicado por la falta de componentes de la matriz extracelular en las células en cultivo necesarios para el proceso de conversión de la forma latente del factor TGF- β 1 a la forma activa, a diferencia de lo que ocurre en un tejido. Por ello, decidimos incorporar TGF- β 1 recombinante a los tratamientos y evaluar los efectos de IFN- α 2b y de TGF- β 1, juntos o separados, sobre la proliferación y la apoptosis.

La estimulación de las células con IFN- α 2b o con TGF- β 1 no sólo logró disminuir la proliferación, sino que también desencadenó el proceso de apoptosis. Más interesante aún, el tratamiento combinado con ambos factores incrementó todavía más dichos fenómenos.

En HepG2 y Huh7 ya han sido demostrados los efectos antiproliferativos y proapoptóticos de IFN- α 2b (272, 274-276, 278, 279, 296) y de TGF- β 1 (126-128, 131, 133, 134, 297) por separado. Por el contrario, mientras que el tratamiento combinado con ambas citoquinas ha sido empleado en líneas humanas de melanoma para analizar la proliferación celular (298), no ha sido utilizado hasta el

momento en líneas de HCC.

De esta forma, nuestros resultados avalan la capacidad de IFN- α 2b y de TGF- β 1 de ejercer sus roles como citoquinas antiproliferativas y proapoptóticas en líneas de HCC. Además, el uso simultáneo de ambos factores permite aumentar el efecto obtenido sobre la proliferación y la apoptosis en estas líneas celulares.

Capítulo 2:

Análisis de la regulación de la vía Wnt/ β -catenina por las citoquinas
IFN- α 2b y TGF- β 1 en las líneas de HCC HepG2/C3A y Huh7

Capítulo 2: Análisis de la regulación de la vía Wnt/ β -catenina por las citoquinas IFN- α 2b y TGF- β 1 en las líneas de HCC HepG2/C3A y Huh7

5.2.1. Grupos experimentales

Para la realización de estos estudios se trataron las células HepG2/C3A y Huh7 durante 48 hs con IFN- α 2b, con TGF- β 1 o con la combinación de ambos factores, o se dejaron sin tratar.

5.2.2. Expresión de β -catenina total y de β -catenina activa

La línea de HCC HepG2 es heterocigota para β -catenina ya que presenta una forma salvaje de 92 KDa y una forma mayoritaria truncada de 75 KDa (299). La delección en la forma mutada ocurre en la región amino terminal, que contiene los sitios de fosforilación que conducen a la degradación de la proteína. De esta manera, HepG2 presenta la vía constitutivamente activada debido a que la forma mutada no puede ser marcada para ubiquitinación y posteriormente degradada, en ausencia de un ligando Wnt (299). Además, se encontró que HepG2 sobreexpresa el receptor Frizzled7, al comparar los niveles del ARNm con el del hígado normal (95).

Por otra parte, Huh7 presenta la vía aberrantemente activada al tener niveles de ARNm y proteicos de Frizzled7 muchos más elevados que HepG2, lo cual activa la señal Wnt canónica en presencia de β -catenina salvaje (95, 300).

Para estudiar los efectos de IFN- α 2b y de TGF- β 1 sobre la vía Wnt canónica, se analizaron en primer lugar los niveles proteicos de β -catenina total (en sus formas fosforilada y no fosforilada) y de β -catenina activa (con sus residuos

Ser37/Thr41 sin fosforilar), mediante *western blot*, en extractos citosólicos y nucleares de C3A y Huh7 luego de 48 hs de estimulación con IFN- α 2b y/o TGF- β 1. Los resultados obtenidos se muestran en las *figuras 5.2.1 y 5.2.2*.

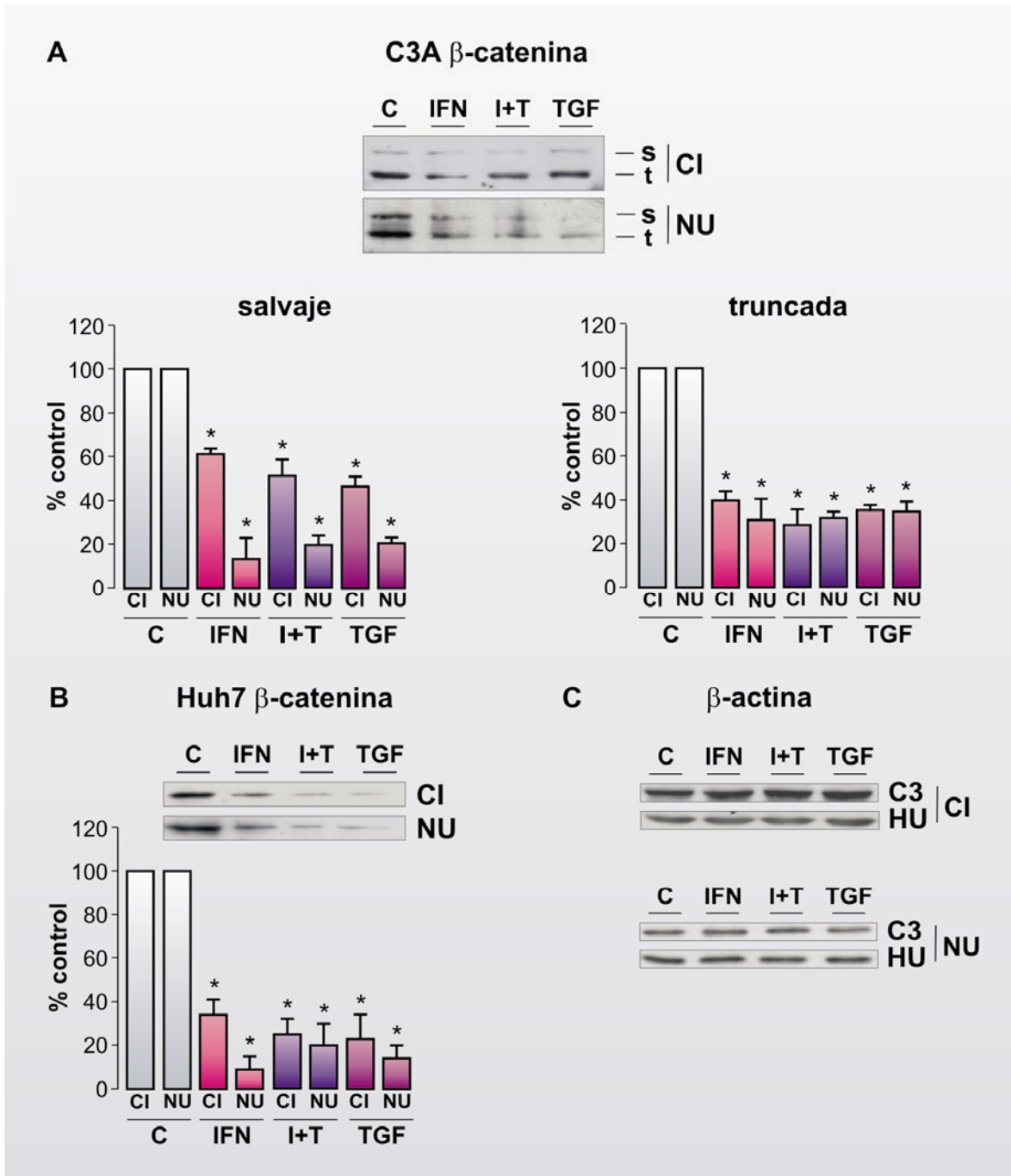


Figura 5.2.1: Disminución de los niveles de β -catenina total mediada por IFN- α 2b y por TGF- β 1. Las células C3A (4×10^6 /placa) y Huh7 (2×10^6 /placa) fueron incubadas en placas de 10

cm de diámetro con medio libre de suero y tratadas durante 48 hs con IFN- α 2b (100.000 U/mL), con TGF- β 1 (2 ng/mL) o con una combinación de ambos factores, o dejadas sin tratar. Los niveles de expresión de β -catenina total fueron estudiados en extractos citosólicos y nucleares de las líneas de HCC mediante *western blot* (**A**: C3A, **B**: Huh7). La proteína β -actina (**C**) fue utilizada como control de carga. El análisis densitométrico se realizó en al menos cuatro experimentos independientes. Los resultados se mostraron en valores porcentuales considerando arbitrariamente a las células control (sin tratar) como 100% y se expresaron como la media \pm el error estándar. C: células control, IFN: células tratadas con IFN- α 2b, I+T: células tratadas con IFN- α 2b más TGF- β 1, TGF: células tratadas con TGF- β 1, CI: extracto citosólico, NU: extracto nuclear, s: β -catenina salvaje, t: β -catenina truncada, C3: línea celular C3A, HU: línea celular Huh7. * $p < 0,05$ vs. C.

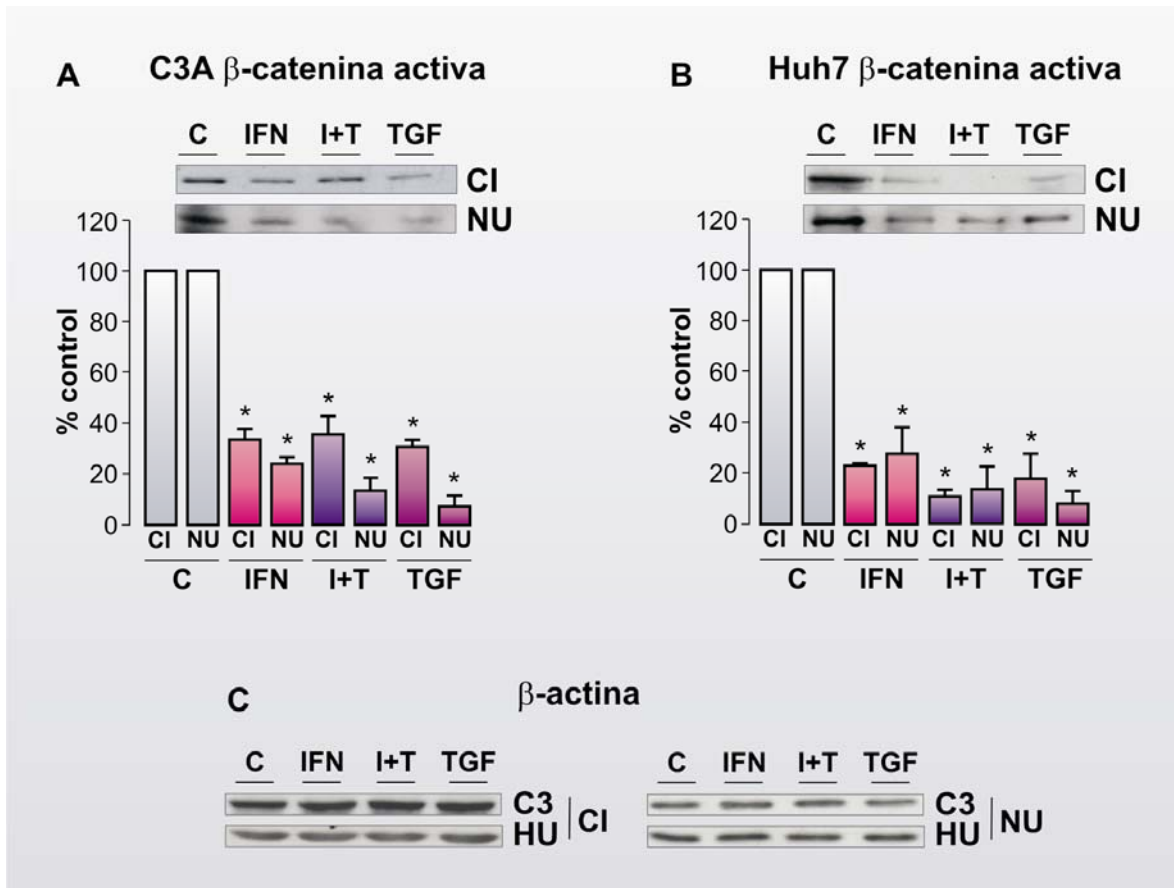


Figura 5.2.2: Reducción de los niveles de β -catenina activa por las citoquinas IFN- α 2b y TGF- β 1. Las células C3A (4×10^6 /placa) y Huh7 (2×10^6 /placa) fueron incubadas en placas de 10 cm de diámetro con medio libre de suero y tratadas durante 48 hs con IFN- α 2b (100.000 U/mL), con TGF- β 1 (2 ng/mL) o con una combinación de ambos factores, o dejadas sin tratar. Los niveles de expresión de β -catenina activa fueron estudiados en extractos citosólicos y nucleares de las líneas de HCC mediante *western blot* (**A**: C3A, **B**: Huh7). La proteína β -actina (**C**) fue utilizada como control de carga. El análisis densitométrico se realizó en al menos cuatro experimentos independientes. Los resultados se mostraron en valores porcentuales considerando arbitrariamente a las células control (sin tratar) como 100% y se expresaron como la media \pm el error estándar. C: células control, IFN: células tratadas con IFN- α 2b, I+T: células tratadas con IFN- α 2b más TGF- β 1, TGF: células tratadas con TGF- β 1, CI: extracto citosólico, NU: extracto nuclear, C3: línea celular C3A, HU: línea celular Huh7. * $p < 0,05$ vs. C.

Los niveles de β -catenina total disminuyeron significativamente con todos los tratamientos empleados, tanto en las fracciones citosólicas como en los extractos nucleares de las líneas de HCC C3A (*figura 5.2.1 A.* β -catenina salvaje: extracto citosólico IFN -39%, I+T -49% TGF -54%; extracto nuclear IFN -86%, I+T -80%, TGF -79%) y Huh7 (*figura 5.2.1 B.* extracto citosólico IFN -66%, I+T -75% TGF -77%; extracto nuclear IFN -91%, I+T -80%, TGF -86%), respecto de las células no tratadas.

Adicionalmente, en el caso de C3A este comportamiento no sólo se encontró para la forma salvaje sino también para la forma truncada de β -catenina (*figura 5.2.1 A.* extracto citosólico IFN -60%, I+T -71%, TGF -64%; extracto nuclear IFN -69%, I+T -68%, TGF -65%).

Por otra parte, los niveles de β -catenina activa también se redujeron significativamente luego del estímulo con IFN- α 2b y/o TGF- β 1 en C3A (*figura 5.2.2 A.* extracto citosólico IFN -66%, I+T -64%, TGF -69%; extracto nuclear IFN -76%, I+T -86%, TGF -92%) y Huh7 (*figura 5.2.2 B.* extracto citosólico IFN -77%, I+T -89%, TGF -82%; extracto nuclear IFN -72%, I+T -86%, TGF -92%), respecto de las células sin tratar.

5.2.3. Análisis de la unión de β -catenina a TCF4

Durante la activación anormal de la vía Wnt canónica β -catenina se acumula en el citosol y migra al núcleo, donde se une a los factores de transcripción LEF/TCF, entre ellos TCF4. El complejo TCF4/ β -catenina promueve entonces la transcripción de los genes blanco de la vía. Así, decidimos evaluar el efecto de IFN- α 2b y de TGF- β 1 sobre la asociación TCF4/ β -catenina mediante un ensayo de co-

inmunoprecipitación, utilizando lisados celulares totales de C3A y Huh7.

Como puede verse en la *figura 5.2.3*, los tratamientos gatillaron a las 48 hs el desacoplamiento del complejo nuclear TCF4/ β -catenina en C3A y Huh7, al atenuar la interacción entre ambas proteínas.



Figura 5.2.3: Reducción de la interacción entre TCF4 y β -catenina en presencia de IFN- α 2b y de TGF- β 1. Las células C3A (4×10^6 /placa) y Huh7 (2×10^6 /placa) fueron incubadas en placas de 10 cm de diámetro con medio libre de suero y tratadas durante 48 hs con IFN- α 2b (100.000 U/mL), con TGF- β 1 (2 ng/mL) o con una combinación de ambos factores, o dejadas sin tratar. Se prepararon lisados celulares totales y se inmunoprecipitaron cantidades iguales de proteínas con anticuerpo anti-TCF4. Los inmunoprecipitados fueron sometidos a *western blot* para detectar la proteína β -catenina mediante el uso de un anticuerpo específico. C: células control (sin tratar), IFN: células tratadas con IFN- α 2b, I+T: células tratadas con IFN- α 2b más TGF- β 1, TGF: células tratadas con TGF- β 1, s: β -catenina salvaje, t: β -catenina truncada.

5.2.4. Expresión del receptor Frizzled7

Es sabido que la sobreexpresión del receptor Frizzled7 también puede desencadenar una activación aberrante de la señalización Wnt/ β -catenina y que dicha sobreexpresión está frecuentemente implicada en la hepatocarcinogénesis (94-96). En concordancia con estas evidencias, las líneas de HCC HepG2 y Huh7 sobreexpresan Frizzled7 al comparar los niveles con el del hígado normal (95, 300). Debido a esto, decidimos evaluar los efectos de 48 hs de incubación con IFN- α 2b y/o TGF- β 1 sobre los niveles proteicos de este receptor, utilizando lisados totales de las células C3A y Huh7 (*western blot*).

En ambas líneas de HCC, los tratamientos empleados causaron una

disminución significativa de los contenidos proteicos del receptor (*figura 5.2.4*. C3A: IFN -66%, I+T -64%, TGF -69%. Huh7: IFN -64%, I+T -74%, TGF -83%), respecto de las células sin tratar.

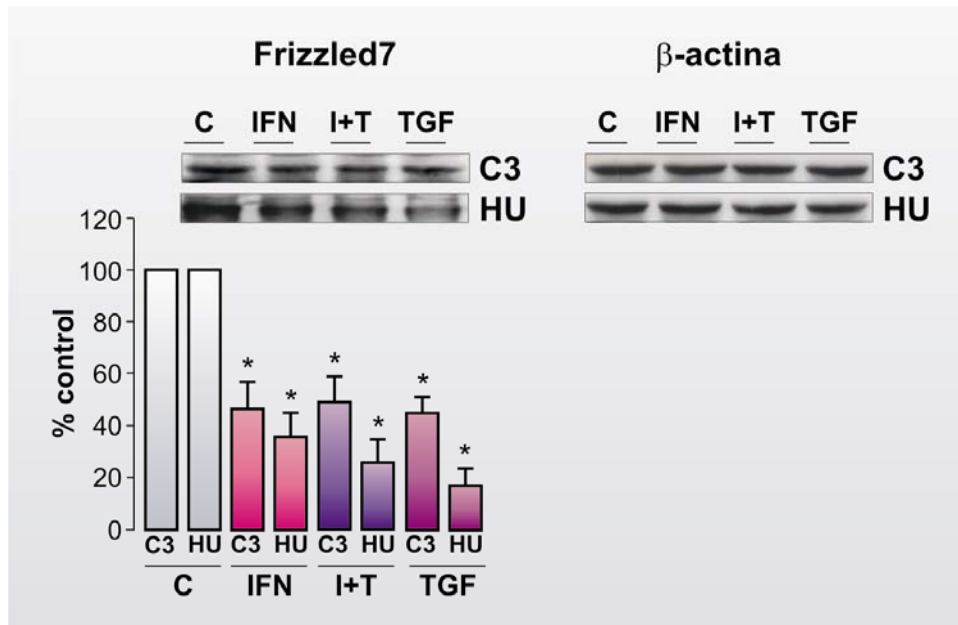


Figura 5.2.4: Disminución del contenido proteico del receptor Frizzled7 luego de los tratamientos con IFN- α 2b y/o TGF- β 1. Las células C3A (4×10^6 /placa) y Huh7 (2×10^6 /placa) fueron incubadas en placas de 10 cm de diámetro con medio libre de suero y tratadas durante 48 hs con IFN- α 2b (100.000 U/mL), con TGF- β 1 (2 ng/mL) o con una combinación de ambos factores, o dejadas sin tratar. Los niveles de expresión del receptor Frizzled7 fueron evaluados en lisados totales de las líneas de HCC por *western blot*. La proteína β -actina fue utilizada como control de carga. El análisis densitométrico se realizó en al menos cuatro experimentos independientes. Los resultados se mostraron en valores porcentuales considerando arbitrariamente a las células control (sin tratar) como 100% y se expresaron como la media \pm el error estándar. C: células control, IFN: células tratadas con IFN- α 2b, I+T: células tratadas con IFN- α 2b más TGF- β 1, TGF: células tratadas con TGF- β 1, C3: línea celular C3A, HU: línea celular Huh7. * $p < 0,05$ vs. C.

5.2.5. Discusión

El objetivo de esta parte de la tesis fue evaluar los efectos de IFN- α 2b y de TGF- β 1 sobre la vía Wnt canónica en líneas de HCC, analizando los niveles proteicos de β -catenina y de Frizzled7 y la asociación TCF4/ β -catenina.

Encontramos reducciones significativas de β -catenina total (que incluye las

formas fosforiladas y sin fosforilar de la proteína) y activa (no fosforilada) en extractos citosólicos y nucleares de células C3A y Huh7 tratadas con IFN- α 2b y/o TGF- β 1. Esta disminución conjunta de β -catenina total y activa indicaría la atenuación de la vía Wnt/ β -catenina debido a una reducción de la cantidad de la forma activa de β -catenina y, de esta forma, a una menor disponibilidad nuclear de la misma.

Resulta interesante notar la disminución de la forma truncada de β -catenina en la línea C3A luego de los tratamientos. Esta forma carece de los residuos Ser/Thr que participan en la fosforilación por GSK3 β y CK1 y que conducen a la degradación proteosomal de β -catenina. Debido a este hallazgo, postulamos que otro mecanismo estaría implicado en la reducción de los niveles proteicos de β -catenina en extractos citosólicos y nucleares mediada por IFN- α 2b y TGF- β 1, al menos en esta línea celular. Esto podría involucrar la inhibición de la transcripción del gen *CTNNB1* que codifica β -catenina, el aumento de β -catenina en la membrana celular y su asociación con E-cadherina, u otros mecanismos. Serían necesarios más estudios para confirmar estos supuestos.

Al mismo tiempo, hallamos una caída de los niveles de β -catenina unida al factor de transcripción TCF4, en las líneas de HCC que fueron estimuladas con IFN- α 2b y/o TGF- β 1. Esta alteración en la composición del complejo nuclear producida luego de los tratamientos podría conducir a una menor transcripción de los genes blanco de la vía Wnt/ β -catenina.

En conjunto, la llegada de una menor cantidad de β -catenina al núcleo tras los tratamientos disminuye el nivel de la proteína disponible para unirse a TCF4, generándose así una menor formación del complejo nuclear TCF4/ β -catenina.

Estos fenómenos producidos por IFN- α 2b y por TGF- β 1, contribuyen así a la atenuación de la vía Wnt canónica.

Trabajos realizados en líneas de HCC tratadas con IFN- α que fueron publicados recientemente avalan nuestros hallazgos (301, 302). Estos estudios y el presente trabajo de tesis ratifican la eficacia de utilizar IFN- α para inhibir la vía Wnt/ β -catenina en líneas de HCC.

Por otra parte, el impacto de TGF- β sobre la señalización Wnt/ β -catenina es compleja, ya que existen varios puntos de conexión entre ambas señales. Además, el efecto de la interacción parece depender del modelo y de las condiciones experimentales utilizadas (*sección 2.3.4*). De forma similar a nuestros resultados, se describió en algunos modelos la disminución de la señalización Wnt/ β -catenina mediada por TGF- β (159, 303, 304).

Adicionalmente, dado que se propuso que la sobreexpresión del receptor Frizzled7 está frecuentemente implicada en la hepatocarcinogenesis, decidimos evaluar el efecto de los tratamientos sobre los contenidos proteicos de este receptor. La incubación de las células C3A y Huh7 con IFN- α 2b y/o TGF- β 1, disminuyó significativamente la cantidad de Frizzled7 en lisados totales. No obstante, debido a que se ha informado que este receptor es también un gen blanco de la cascada de señalización Wnt/ β -catenina (90, 305), no podemos descartar la posibilidad de que la reducción encontrada en los niveles proteicos de Frizzled7 sea una consecuencia de la atenuación de la vía.

A la fecha, no hay trabajos publicados que analicen los efectos de estas citoquinas sobre Frizzled7. En un trabajo previo realizado por nuestro grupo de investigación, describimos que la expresión de este receptor se encuentra

significativamente aumentada a nivel de ARNm y de proteína en hígados preneoplásicos de ratas comparado con hígados normales y que este incremento es bloqueado en animales tratados con IFN- α 2b (258). Estos resultados concuerdan con los hallazgos mostrados en este trabajo.

Merece ser destacado el hecho de que a pesar de que las líneas celulares C3A y Huh7 presentan un perfil diferente respecto de la vía de señalización Wnt canónica (en C3A la vía se encuentra constitutivamente activada por la presencia de β -catenina truncada, mientras que en Huh7 esto ocurre por sobreexpresión de Frizzled7 en presencia de β -catenina salvaje), las citoquinas lograron disminuir los niveles de β -catenina en ambos casos y desencadenar globalmente la misma respuesta: disminución de la proliferación celular y aumento de la muerte celular programada.

Capítulo 3:

Estudio de la modulación de los intermediarios Smads y de su asociación con TCF4 mediada por IFN- α 2b y por TGF- β 1 en las líneas de HCC HepG2/C3A y Huh7

Capítulo 3: Estudio de la modulación de los intermediarios Smads y de su asociación con TCF4 mediada por IFN- α 2b y por TGF- β 1 en las líneas de HCC HepG2/C3A y Huh7

5.3.1. Grupos experimentales

Para la realización de estos estudios se trataron las células HepG2/C3A y Huh7 durante 48 hs con IFN- α 2b, con TGF- β 1 o con la combinación de ambos factores, o se dejaron sin tratar. Además, se incubaron las células durante 48 hs en presencia o ausencia del ligando Wnt3a, para inducir la señalización Wnt/ β -catenina.

5.3.2. Expresión de las proteínas Smads

Luego de dilucidar el impacto de IFN- α 2b y de TGF- β 1 sobre la vía Wnt/ β -catenina, se analizaron los efectos de dichas citoquinas sobre las proteínas Smads.

Las líneas HepG2 y Huh7 expresan los receptores de superficie para TGF- β y presentan además las proteínas Smads, teniendo así la vía TGF- β /Smads funcional (126, 286, 287).

Actualmente, el efecto de la estimulación con TGF- β 1 sobre las proteínas Smads sólo ha sido estudiado en las primeras horas de tratamiento con el factor (137, 287, 308). Así, decidimos determinar la acción de 48 hs de incubación con TGF- β 1 sobre los niveles proteicos de Smads, tiempo en el cual ya está instalado el proceso apoptótico.

Se evaluaron por *western blot* los niveles de Smads 2 y 3 fosforiladas (utilizando un anticuerpo que reconoce ambas proteínas en su estado fosforilado),

Smad4 y Smad7, en extractos citosólicos y nucleares de células C3A y Huh7 tratadas durante 48 hs con IFN- α 2b y/o TGF- β 1 (figura 5.3.1).

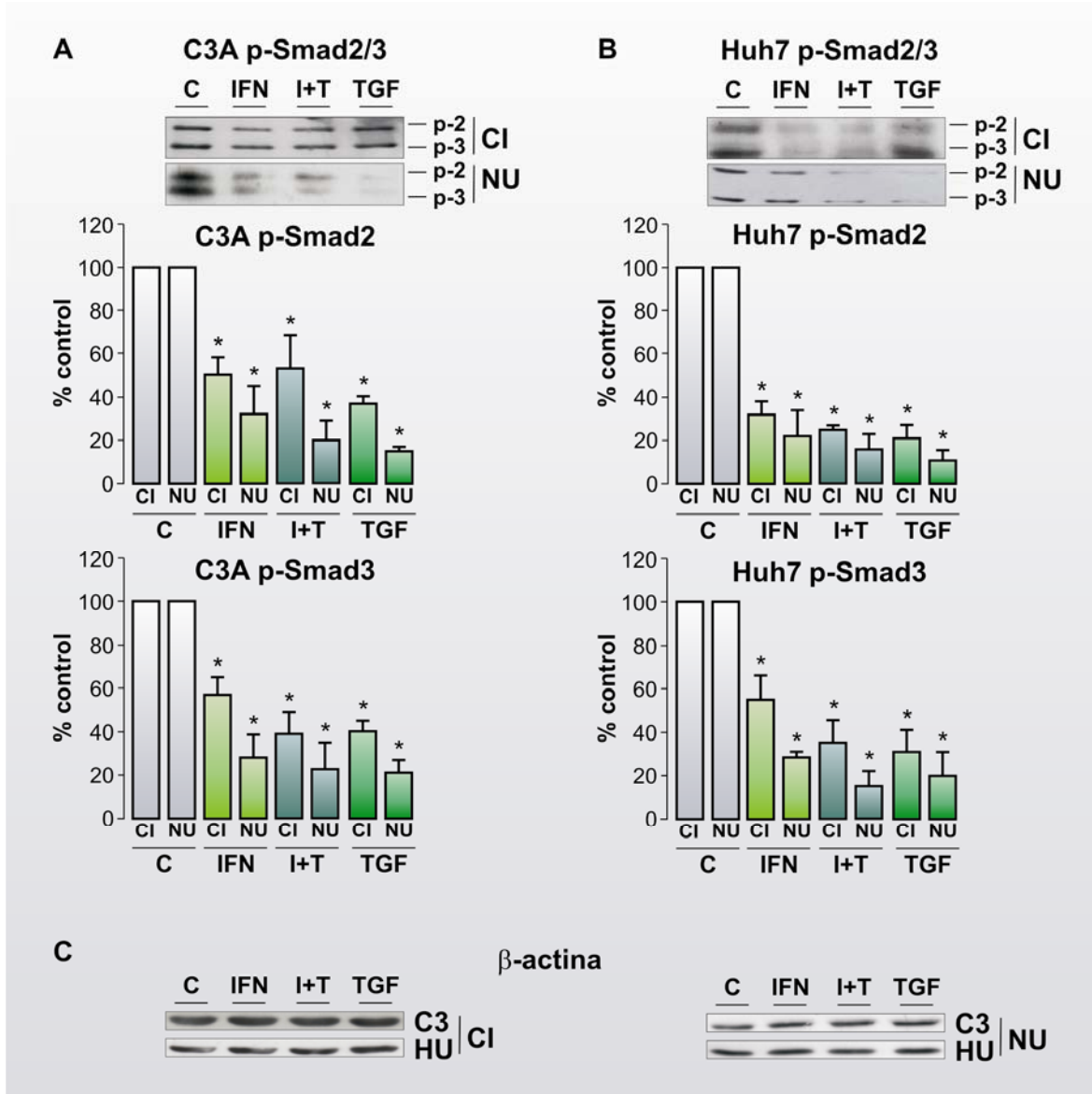


Figura 5.3.1: Disminución de los niveles proteicos de Smads 2 y 3 fosforiladas con IFN- α 2b y con TGF- β 1. Las células C3A (4×10^6 /placa) y Huh7 (2×10^6 /placa) fueron incubadas en placas de 10 cm de diámetro con medio libre de suero y tratadas durante 48 hs con IFN- α 2b (100.000 U/mL), con TGF- β 1 (2 ng/mL) o con una combinación de ambos factores, o dejadas sin tratar. Los niveles de expresión de Smads 2 y 3 fosforiladas (p-Smad2/3) fueron estudiados en extractos citosólicos y nucleares de las líneas de HCC por *western blot* (A: C3A, B: Huh7). La proteína β -actina (C) fue utilizada como control de carga. El análisis densitométrico se realizó en al menos cuatro experimentos independientes. Los resultados se mostraron en valores porcentuales considerando arbitrariamente a las células control (sin tratar) como 100% y se expresaron como la media \pm el error estándar. C: células control, IFN: células tratadas con IFN- α 2b, I+T: células

tratadas con IFN- α 2b más TGF- β 1, TGF: células tratadas con TGF- β 1, p-2: forma fosforilada de la proteína Smad2, p-3: forma fosforilada de la proteína Smad3, CI: extracto citosólico, NU: extracto nuclear, C3: línea celular C3A, HU: línea celular Huh7. * $p < 0,05$ vs. C.

Como se observa en la *figura 5.3.1*, el tratamiento durante 48 hs con IFN- α 2b y/o TGF- β 1 generó una disminución significativa de los contenidos proteicos de las formas fosforiladas de Smads 2 y 3 en extractos citosólicos y nucleares de C3A (extracto citosólico: p-Smad2: IFN -50%, I+T -47% TGF -64%; p-Smad3: IFN -42%, I+T -61%, TGF -60%. extracto nuclear: p-Smad2: IFN -68%, I+T -80% TGF -85%; p-Smad3: IFN -72%, I+T -77%, TGF -79%) y Huh7 (extracto citosólico: p-Smad2: IFN -68%, I+T -75% TGF -79%; p-Smad3: IFN -45%, I+T -65%, TGF -69%. extracto nuclear: p-Smad2: IFN -77%, I+T -84% TGF -89%; p-Smad3: IFN -93%, I+T -89%, TGF -81%), respecto de las células sin tratar.

De la misma manera, los tratamientos con ambas citoquinas también redujeron de manera significativa los niveles proteicos de Smad4 y de Smad7 en extractos citosólicos y nucleares de C3A (extracto citosólico: Smad4: IFN -57%, I+T -62%, TGF -80%; Smad7: IFN -55%, I+T -70%, TGF -61%. extracto nuclear: Smad4: IFN -66%, I+T -87%, TGF -81%; Smad7: IFN -65%, I+T -60%, TGF -69%) y Huh7 (extracto citosólico: Smad4: IFN -88%, I+T -92%, TGF -84%; Smad7: IFN -41%, I+T -52%, TGF -43%. extracto nuclear: Smad4: IFN -64%, I+T -82%, TGF -81%; Smad7: IFN -90%, I+T -80%, TGF -78%), respecto de las células no tratadas (*figura 5.3.2*).

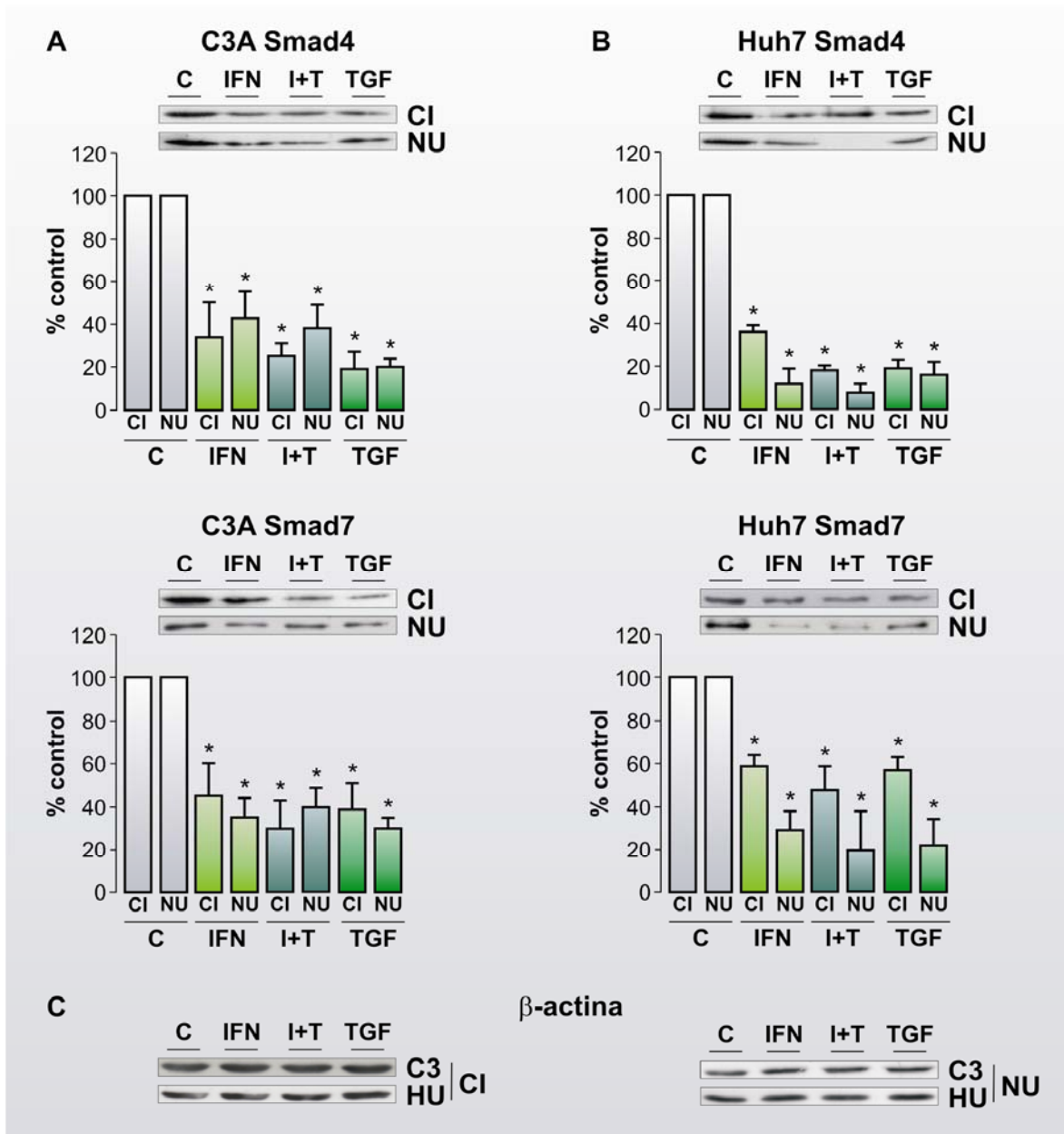


Figura 5.3.2: Reducción del contenido proteico de Smad4 y de Smad7 con IFN- α 2b y con TGF- β 1. Las células C3A (4×10^6 /placa) y Huh7 (2×10^6 /placa) fueron incubadas en placas de 10 cm de diámetro con medio libre de suero y tratadas durante 48 hs con IFN- α 2b (100.000 U/mL), con TGF- β 1 (2 ng/mL) o con una combinación de ambos factores, o dejadas sin tratar. Los niveles de expresión de Smad4 y Smad7 fueron evaluados en extractos citosólicos y nucleares de las líneas de HCC mediante *western blot* (A: C3A, B: Huh7). La proteína β -actina (C) fue utilizada como control de carga. El análisis densitométrico se realizó en al menos cuatro experimentos independientes. Los resultados se mostraron en valores porcentuales considerando arbitrariamente a las células control (sin tratar) como 100% y se expresaron como la media \pm el error estándar. C: células control, IFN: células tratadas con IFN- α 2b, I+T: células tratadas con IFN- α 2b más TGF- β 1, TGF: células tratadas con TGF- β 1, CI: extracto citosólico, NU: extracto nuclear, C3: línea celular C3A, HU: línea celular Huh7. * $p < 0,05$ vs. C.

5.3.3. Análisis de la unión de Smads a TCF4

Como se mencionó en la introducción, las vías Wnt/ β -catenina y TGF- β 1/Smads pueden interactuar mediante la asociación de los intermediarios Smads con el complejo nuclear TCF4/ β -catenina. Así, nos propusimos evaluar en las células C3A y Huh7 el efecto de los tratamientos sobre los niveles de las proteínas Smads unidas a TCF4. Para llevar a cabo este objetivo, lisados celulares totales fueron sometidos a un ensayo de co-inmunoprecipitación utilizando un anticuerpo anti-TCF4.

Como puede verse en la *figura 5.3.3*, la asociación entre Smads y TCF4 disminuyó luego de incubar a las células durante 48 hs con IFN- α 2b y/o TGF- β 1.

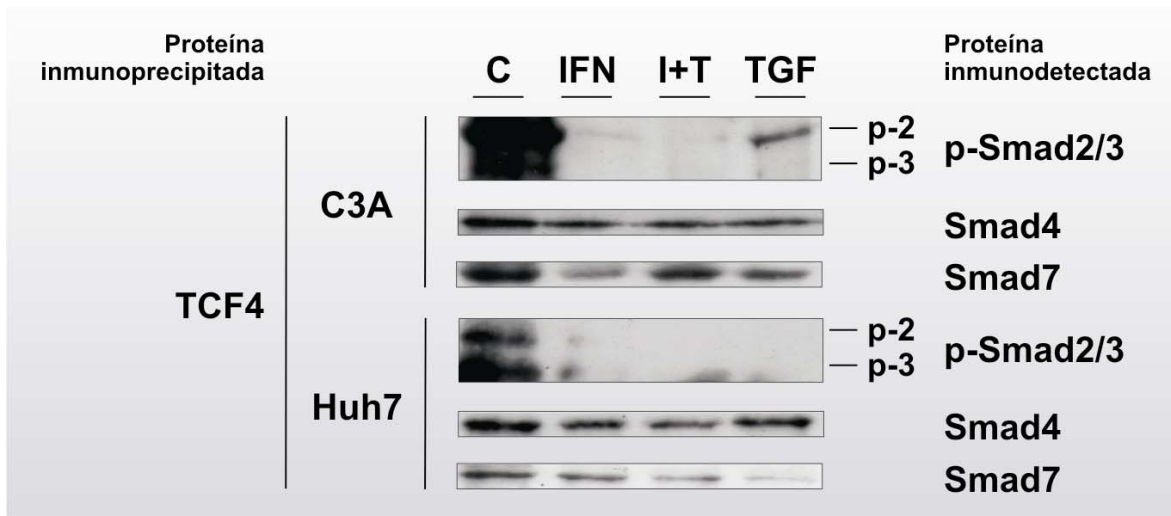


Figura 5.3.3: Disminución de la interacción entre Smads y TCF4 mediada por IFN- α 2b y por TGF- β 1. Las células C3A (4×10^6 /placa) y Huh7 (2×10^6 /placa) fueron incubadas en placas de 10 cm de diámetro con medio libre de suero y tratadas durante 48 hs con IFN- α 2b (100.000 U/mL), con TGF- β 1 (2 ng/mL) o con una combinación de ambos factores, o dejadas sin tratar. Se prepararon lisados celulares totales y se inmunoprecipitaron cantidades iguales de proteínas con anticuerpo anti-TCF4. Los inmunoprecipitados fueron sometidos a *western blot* para detectar las proteínas p-Smad2/3, Smad4 y Smad7, empleando anticuerpos específicos. C: células control (sin tratar), IFN: células tratadas con IFN- α 2b, I+T: células tratadas con IFN- α 2b más TGF- β 1, TGF: células tratadas con TGF- β 1, p-2: forma fosforilada de la proteína Smad2, p-3: forma fosforilada de la proteína Smad3.

5.3.4. Tratamiento con Wnt3a: expresión de las proteínas Smads

Debido a que la incubación de las células con IFN- α 2b y/o TGF- β 1 durante 48 hs disminuyó los niveles de las proteínas Smads en las líneas de HCC utilizadas, evaluamos si los niveles de dichas proteínas eran modulados por la vía Wnt/ β -catenina. Para esto, tratamos las células con Wnt3a recombinante con el fin de aumentar los niveles de β -catenina. Posteriormente, medimos los niveles proteicos de Smads en extractos citosólicos y nucleares mediante *western blot*.

Wnt3a es un ligando Wnt de la vía canónica, capaz de unirse a Frizzled7 y a otros receptores Frizzled de la señalización Wnt/ β -catenina (pero no interactúa con receptores Frizzled no canónicos) (306, 307).

Como se especuló, el tratamiento con Wnt3a durante 48 hs no sólo generó el incremento significativo de la forma activa de la proteína β -catenina (*figura 5.3.4 A*), sino también el de los intermediarios Smads (*figura 5.3.4 B-D*), en extractos citosólicos y nucleares de las líneas de HCC.

Adicionalmente, la estimulación con Wnt3a causó un aumento significativo de la proteína PCNA en extractos nucleares de C3A y Huh7 (*figura 5.3.4 E*).

5.3.5. Discusión

En este capítulo se analizó el impacto de los tratamientos con IFN- α 2b y con TGF- β 1 sobre los niveles de las proteínas Smads y sobre la interacción entre Smads y TCF4.

La incubación de las células con IFN- α 2b y/o TGF- β 1 causó una disminución significativa de los contenidos proteicos de las formas fosforiladas de

Smads 2 y 3 y también de Smads 4 y 7, en extractos citosólicos y nucleares.

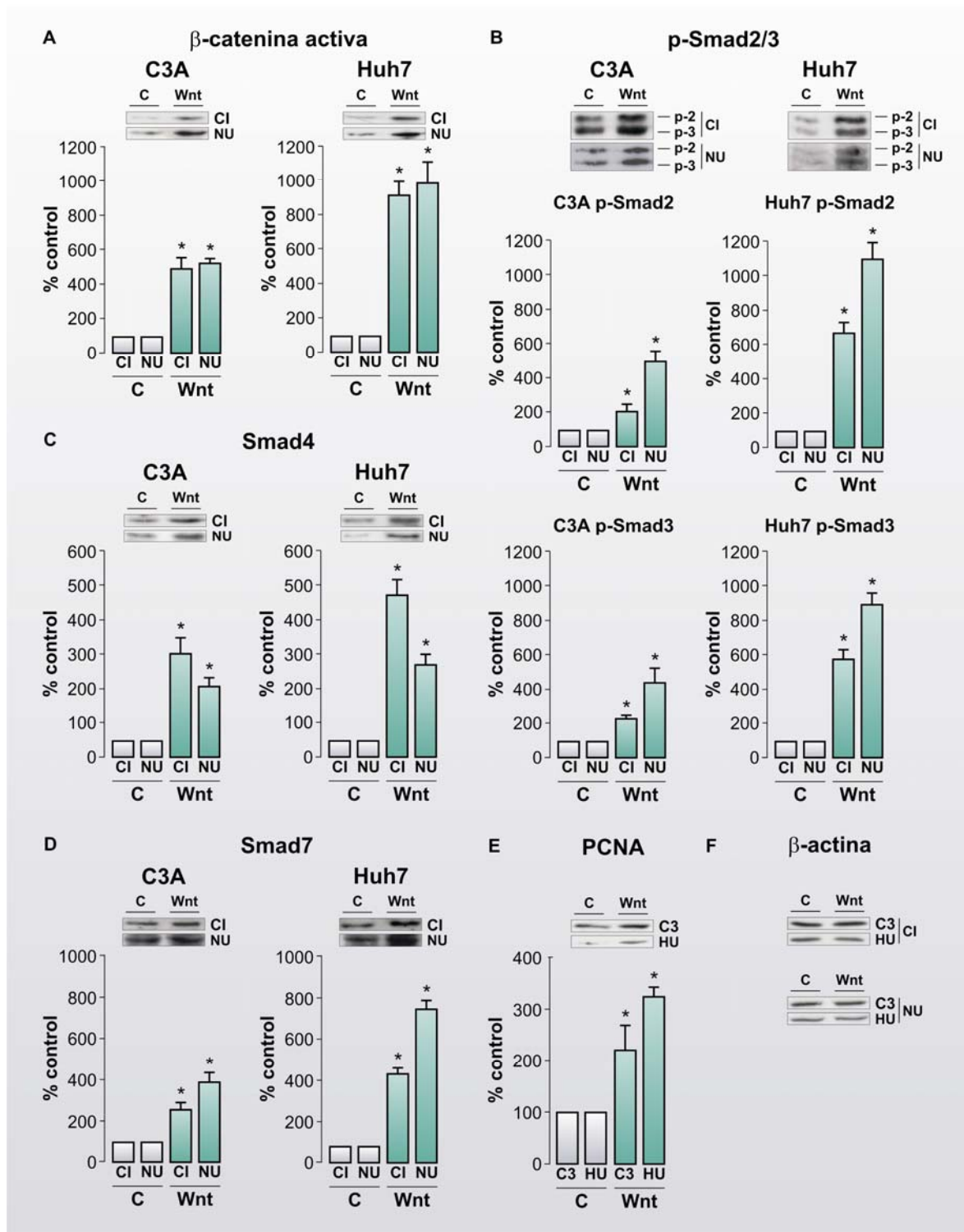


Figura 5.3.4: Incremento de β-catenina, Smads y PCNA luego del tratamiento con el ligando Wnt3a. Las células C3A (4x10⁶/placa) y Huh7 (2x10⁶/placa) fueron incubadas en placas

de 10 cm de diámetro con medio libre de suero y tratadas durante 48 hs en presencia o ausencia de Wnt3a recombinante (20 ng/mL). Los niveles de β -catenina activa (**A**), p-Smad2/3 (**B**), Smad4 (**C**) y Smad7 (**D**) se determinaron en extractos citosólicos y nucleares de las líneas de HCC mediante *western blot*. Los niveles de PCNA (**E**) se evaluaron en extractos nucleares de ambas líneas celulares utilizando el mismo método. En todos los casos β -actina (**F**) fue utilizada como control de carga. El análisis densitométrico se realizó en al menos cuatro experimentos independientes. Los resultados se mostraron en valores porcentuales considerando arbitrariamente a las células control (sin tratar) como 100% y se expresaron como la media \pm el error estándar. C: células control, Wnt: células tratadas con Wnt3a, p-2: forma fosforilada de la proteína Smad2, p-3: forma fosforilada de la proteína Smad3, CI: extracto citosólico, NU: extracto nuclear, C3: línea celular C3A, HU: línea celular Huh7. * $p < 0,05$ vs. C.

Al mismo tiempo, se observó una menor asociación del factor TCF4 con las proteínas Smads luego de los tratamientos. Así, las citoquinas redujeron los niveles de los intermediarios Smads en el citosol y en el núcleo y, de este modo, la disponibilidad de dichas proteínas en el complejo nuclear con TCF4.

Existe muy poca información acerca de la asociación Smads/TCF4 en líneas de HCC. Además, si bien ha sido informada la regulación de la interacción entre las proteínas Smads y TCF mediada por TGF- β 1 (139, 143), aún no se han publicado estudios que describan la modulación de Smads y su asociación con TCF mediada por IFN- α .

Por otra parte, la estimulación con TGF- β 1 arrojó resultados opuestos a los previstos, ya que al incubar las células con esta citoquina se esperaba un aumento de la señal TGF- β 1/Smads. Sin embargo, este evento sólo ha sido estudiado en las primeras horas del tratamiento con TGF- β 1 (generalmente 30 min y 1 h) (137, 287, 308). De esta manera, pareciera ser que el efecto de una estimulación prolongada con TGF- β 1 modifica el comportamiento de los intermediarios Smads. Por ello, evaluamos si la vía Wnt canónica era capaz de modular los niveles de Smads a las 48 hs. Para realizar este análisis, tratamos las células con el ligando Wnt3a con el propósito de activar la vía Wnt/ β -catenina. Este tratamiento aumentó

significativamente las cantidades de Smads 2 y 3 fosforiladas, de Smad4 y de Smad7, en extractos citosólicos y nucleares de C3A y Huh7. Esto indica que la activación de la señalización mediada por β -catenina genera el incremento de los niveles proteicos de Smads. De hecho, se demostró en otros modelos que β -catenina modula positivamente la vía de señalización TGF- β /Smads (309, 310) y, además, se identificó a TGF- β como un gen blanco de la vía Wnt/ β -catenina (311-313).

Adicionalmente, encontramos un aumento de los niveles de la proteína PCNA luego del tratamiento con Wnt3a en extractos nucleares de las células C3A y Huh7. Dado que PCNA es esencial para la replicación del ADN durante la fase S del ciclo celular (291), su incremento luego de la acumulación de β -catenina probablemente esté acelerando la síntesis de ADN y promoviendo la proliferación celular.

Finalmente, es de sumo interés advertir la modificación del comportamiento de la señalización de TGF- β que se produce durante la hepatocarciogénesis y que contribuye a la progresión tumoral (*sección 2.3.3*). Este fenómeno estaría en gran parte asociado a la interacción de Smads con otras señales, iniciadas o no por TGF- β (314). Un ejemplo de esta interacción es la unión de Smads con LEF/TCF/ β -catenina. Por otra parte, las proteínas Smads pueden ser inducidas en ausencia de TGF- β por otras vías de señalización, muchas de las cuales están desreguladas en el HCC (115, 163, 164, 314). Recientemente, se demostró el aumento de los niveles y la localización nuclear de Smads 2, 3 y 4 y de β -catenina y la formación de complejos entre estas proteínas y TCF durante la progresión maligna del HCC y de otros tipos

de tumores (315-319). Asimismo, se ha propuesto que la activación anormal de la vía Wnt/ β -catenina sería un evento temprano durante la hepatocarcinogénesis (99, 258, 320-322), mientras que el rol de TGF- β como estimulador de la progresión tumoral ocurre en estadios posteriores (123, 319). De esta manera, se puede suponer que la interacción de la señalización aberrante Wnt/ β -catenina con la señal TGF- β /Smads provee un mecanismo para convertir a TGF- β en un promotor tumoral. Al respecto, Labbé y col. (142) describieron un programa transcripcional inducido por la colaboración de ambas vías que no se hubiera podido predecir estudiando las dos señalizaciones por separado. Los autores sugirieron que la interacción de ambas vías promueve la tumorigénesis.

En relación a estas evidencias, en nuestro modelo se encontraron la vía Wnt/ β -catenina y las proteínas Smads elevadas en ausencia de tratamiento. Sin embargo, los niveles de β -catenina y de Smads y la asociación de estas proteínas con TCF4 disminuyeron luego de los tratamientos con IFN- α 2b y/o TGF- β 1. Podemos inferir entonces que estas citoquinas desencadenan el desacoplamiento del complejo Smads/TCF4/ β -catenina. Esta modificación estaría afectando la transcripción de los genes blanco de la vía Wnt/ β -catenina y de aquellos que surgen de la interacción entre esta vía y la señalización TGF- β 1/Smads. Adicionalmente, la inhibición de la formación de este complejo en presencia de IFN- α 2b y/o TGF- β 1 tendría un rol crítico en desacelerar la oncogénesis, ya que la acción global de estas citoquinas fue disminuir la proliferación celular y aumentar la muerte celular por apoptosis.

Capítulo 4:

Análisis de la regulación de FoxO3a y de su interacción con β -catenina y con Smads 2 y 3 mediada por IFN- α 2b en las líneas de HCC HepG2/C3A y Huh7

Capítulo 4: Análisis de la regulación de FoxO3a y de su interacción con β -catenina y con Smads 2 y 3 mediada por IFN- α 2b en las líneas de HCC HepG2/C3A y Huh7

5.4.1. Grupos experimentales

En esta parte del trabajo de tesis se utilizaron únicamente las células tratadas durante 48 hs en presencia o ausencia de IFN- α 2b. Esto se debió a que durante el análisis de las vías de señalización Wnt/ β -catenina (*Capítulo 2*) y TGF- β /Smads (*Capítulo 3*), la utilización de TGF- β 1 solo o combinado con IFN- α 2b, no aportó ventajas respecto del tratamiento con IFN- α 2b solo. Además, IFN- α 2b por sí solo fue capaz de modular a las proteínas Smads, que son los intermediarios de la cascada de señalización de TGF- β 1.

Para evaluar el rol de las quinasas IKK β , Erk y p38 en la modulación de FoxO3a mediada por IFN- α 2b, se pretrataron las células en presencia o ausencia de los inhibidores de las quinasas en estudio durante 1 h y, posteriormente, se incubaron las células en presencia o ausencia de IFN- α 2b durante 48 hs (manteniéndose a los inhibidores durante este tiempo).

5.4.2. Quinasas que regulan a FoxO3a

Tal como se detalló en la *sección 2.4.2*, la señalización de los factores FoxO es regulada negativamente por las quinasas Akt, IKK β y Erk y positivamente por las quinasas JNK y p38.

Para estudiar la participación de las quinasas mencionadas en la regulación de FoxO3a en las células tratadas con IFN- α 2b respecto de las células sin tratar, se

analizaron en primera instancia los niveles de la forma activa (fosforilada) de cada de las quinasas mediante *western blot*, empleando lisados totales (figura 5.4.1).

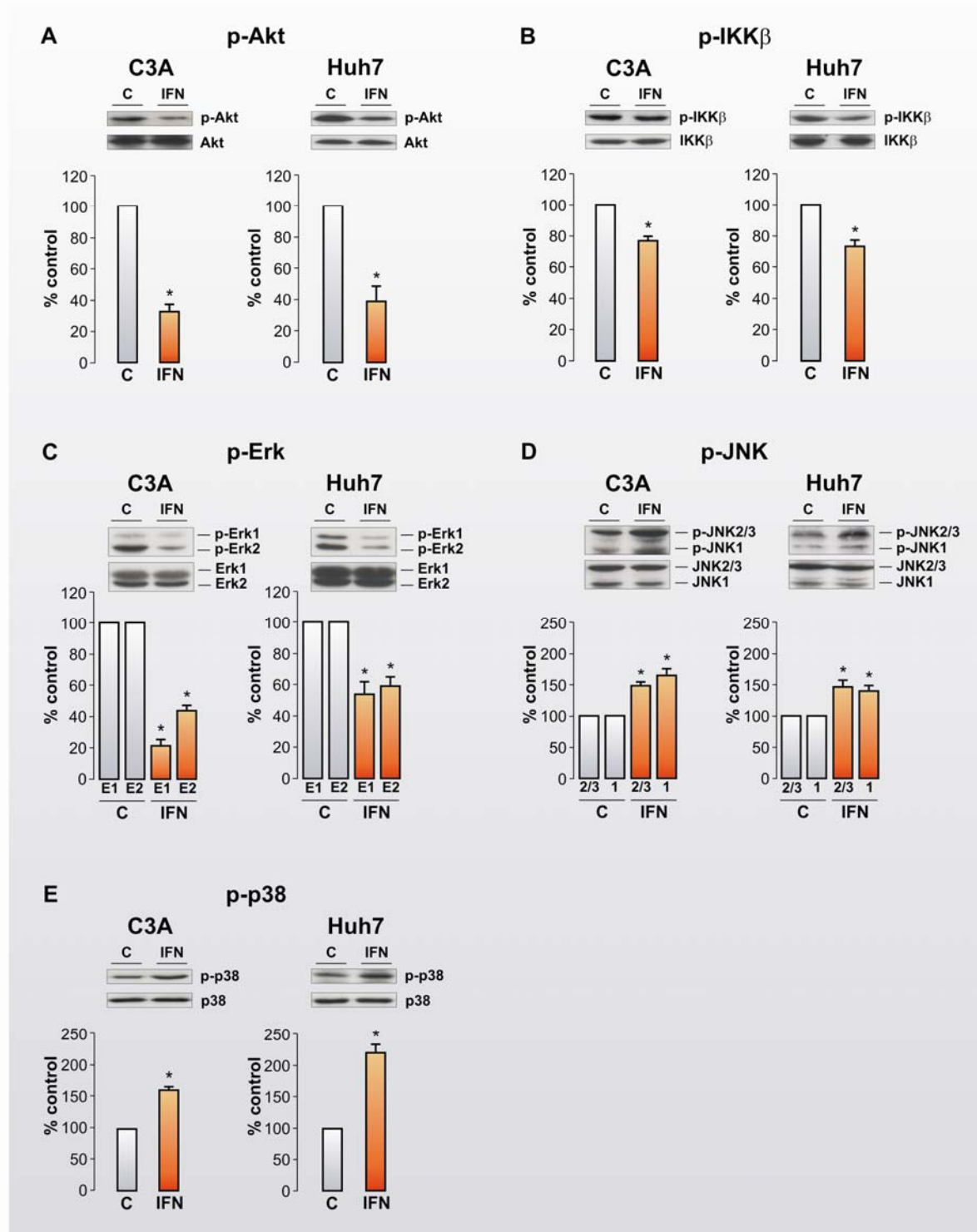


Figura 5.4.1: Modulación de los niveles proteicos de las formas fosforiladas (activas) de las quinasas Akt, IKK β , Erk, JNK y p38 por IFN- α 2b. Las células C3A (4×10^6 /placa) y Huh7 (2×10^6 /placa) fueron incubadas en placas de 10 cm de diámetro con medio libre de suero y tratadas durante 48 hs en presencia o ausencia de IFN- α 2b (100.000 U/mL). Los niveles proteicos de p-Akt (**A**), p-IKK β (**B**), p-Erk (**C**), p-JNK (**D**) y p-p38 (**E**) se determinaron en lisados totales de las líneas celulares C3A y Huh7 mediante *western blot*. El análisis densitométrico se realizó en al menos cuatro experimentos independientes. Los resultados se calcularon como la relación quinasa fosforilada/quinasa total y se mostraron en valores porcentuales considerando arbitrariamente a las células control (sin tratar) como 100%. Los resultados se expresaron como la media \pm el error estándar. C: células control, IFN: células tratadas con IFN- α 2b, E1: p-Erk1, E2: p-Erk2, 2/3: p-JNK2/3, 1: p-JNK1. * $p < 0,05$ vs. C.

En las células tratadas durante 48 hs con IFN- α 2b, se halló una disminución significativa de los contenidos proteicos de las formas activas de las quinasas Akt (C3A: -67%. Huh7: -61%), IKK β (C3A: -22%, Huh7: -27%) y Erk (C3A: p-Erk1 -79%, p-Erk2 -56%. Huh7: p-Erk1 -46%, p-Erk2 -41%), respecto de las células sin tratar (*figura 5.4.1 A-C*). En cambio, se observó luego del tratamiento un incremento significativo de los niveles proteicos de las formas activas de las quinasas JNK (C3A: p-JNK2/3 +49%, p-JNK1 +64%. Huh7: p-JNK2/3 +45%, p-JNK1 +41%) y p38 (C3A: +59%, Huh7: +121%), respecto de las células sin tratar (*figura 5.4.1 D, E*).

5.4.3. Localización del factor de transcripción FoxO3a

Para evaluar si la localización subcelular de FoxO3a era modificada en presencia de IFN- α 2b, se midieron los niveles proteicos de este factor en fracciones citosólicas y nucleares, mediante *western blot*. Además, se analizaron los niveles proteicos de FoxO3a en lisados celulares totales.

Los resultados obtenidos se muestran en la *figura 5.4.2*. Luego de estimular a las células C3A y Huh7 durante 48 hs con IFN- α 2b se obtuvo una reducción significativa de FoxO3a en fracciones citosólicas (C3A: -34%, Huh7: -48%), que se

correlacionó con un aumento significativo de esta proteína en fracciones nucleares (C3A: +84%, Huh7: +72%). No se observaron cambios de los niveles de FoxO3a en lisados celulares totales luego del tratamiento con IFN- α 2b.

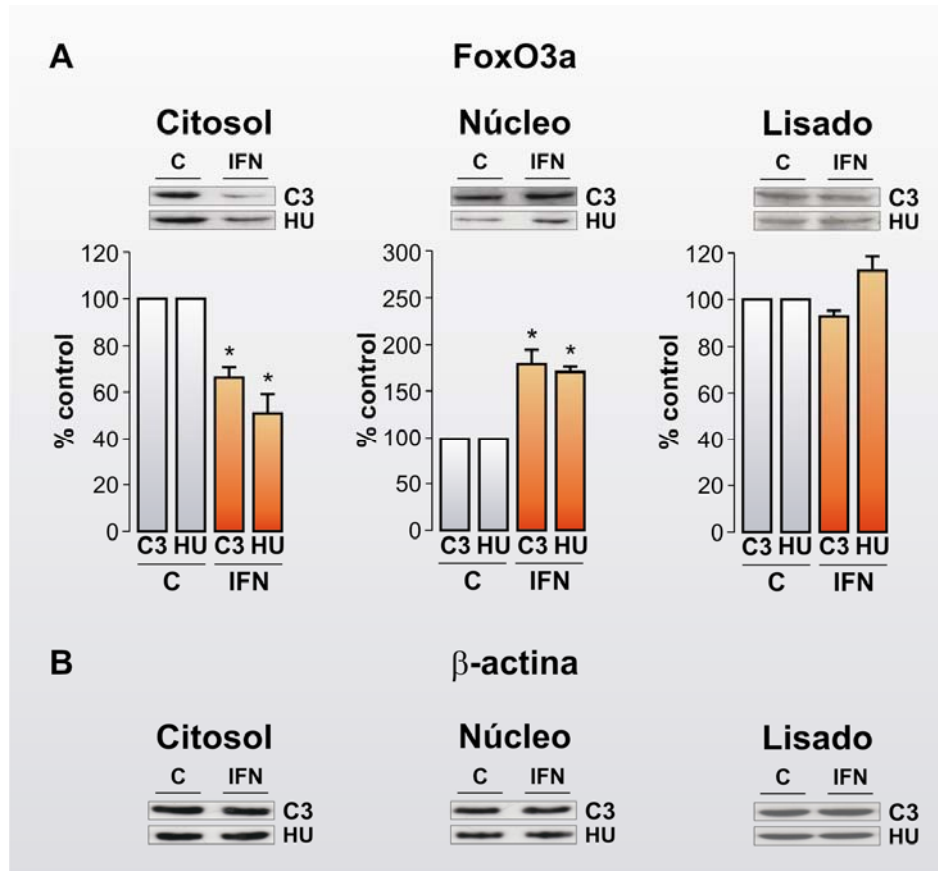


Figura 5.4.2: Modificación de la localización subcelular de FoxO3a por IFN- α 2b. Las células C3A (4×10^6 /placa) y Huh7 (2×10^6 /placa) fueron incubadas en placas de 10 cm de diámetro con medio libre de suero y tratadas durante 48 hs en presencia o ausencia de IFN- α 2b (100.000 U/mL). Los niveles proteicos del factor FoxO3a (A) fueron detectados en extractos citosólicos y nucleares y en lisados totales, mediante *western blot*. β -actina (B) fue utilizada como control de carga. El análisis densitométrico se realizó en al menos cuatro experimentos independientes. Los resultados se mostraron en valores porcentuales considerando arbitrariamente a las células control (sin tratar) como 100% y se expresaron como la media \pm el error estándar. C: células control, IFN: células tratadas con IFN- α 2b, C3: C3A, HU: Huh7. * $p < 0,05$ vs. C.

5.4.4. Regulación de FoxO3a mediada por quinasas

Una vez activa, la enzima Akt fosforila a FoxO3a en tres sitios conservados

(Thr32, Ser253 y Ser315) provocando su secuestro en el citosol. Por ello, para analizar si en las células tratadas con IFN- α 2b existía un cambio en la modulación de FoxO3a por Akt, se evaluaron los niveles proteicos de la forma fosforilada en Ser253 de FoxO3a en extractos citosólicos por *western blot*.

Como se aprecia en la *figura 5.4.3*, se observó una disminución significativa de p-FoxO3a (Ser253) en las células incubadas durante 48 hs con IFN- α 2b (C3A: -36%, Huh7: -49%), respecto de las células sin tratar. Este dato se corresponde con la disminución observada para la forma activa de la enzima Akt, en presencia de IFN- α 2b.

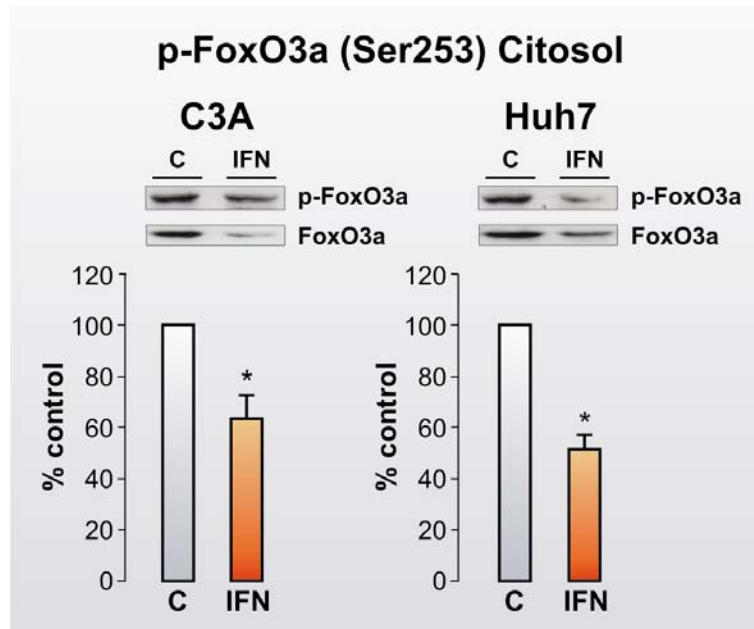


Figura 5.4.3: Reducción de la fosforilación de FoxO3a mediada por Akt en presencia de IFN- α 2b. Las células C3A (4×10^6 /placa) y Huh7 (2×10^6 /placa) fueron incubadas en placas de 10 cm de diámetro con medio libre de suero y tratadas durante 48 hs en presencia o ausencia de IFN- α 2b (100.000 U/mL). Los niveles proteicos del factor FoxO3a fosforilado en Ser253 (p-FoxO3a) fueron detectados en extractos citosólicos provenientes de las líneas de HCC, mediante *western blot*. El análisis densitométrico se realizó en al menos cuatro experimentos independientes. Los resultados se calcularon como la relación p-FoxO3a/FoxO3a y se mostraron en valores porcentuales considerando arbitrariamente a las células control (sin tratar) como 100%. Los resultados se expresaron como la media \pm el error estándar. C: células control, IFN: células tratadas con IFN- α 2b. * $p < 0,05$ vs. C.

A continuación, se analizó la regulación de Foxo3a por IKK β , Erk y p38 en presencia de IFN- α 2b. Para esto, las células Huh7 se trataron previamente con los inhibidores PS1145 (IKK β), PD98059 (Erk) y SB202190 (p38) y se realizó posteriormente el tratamiento habitual con IFN- α 2b. Luego, se midieron los niveles proteicos de FoxO3a en extractos nucleares mediante *western blot*.

Se apreció un aumento significativo de los niveles de FoxO3a al inhibir las quinasas IKK β (+44%) y Erk (+72%), respecto de las células sin tratar (*figura 5.4.4 A*). Por el contrario, la inhibición de p38 generó una disminución significativa del contenido proteico de FoxO3a (-57%), respecto de las células sin tratar (*figura 5.4.4 A*).

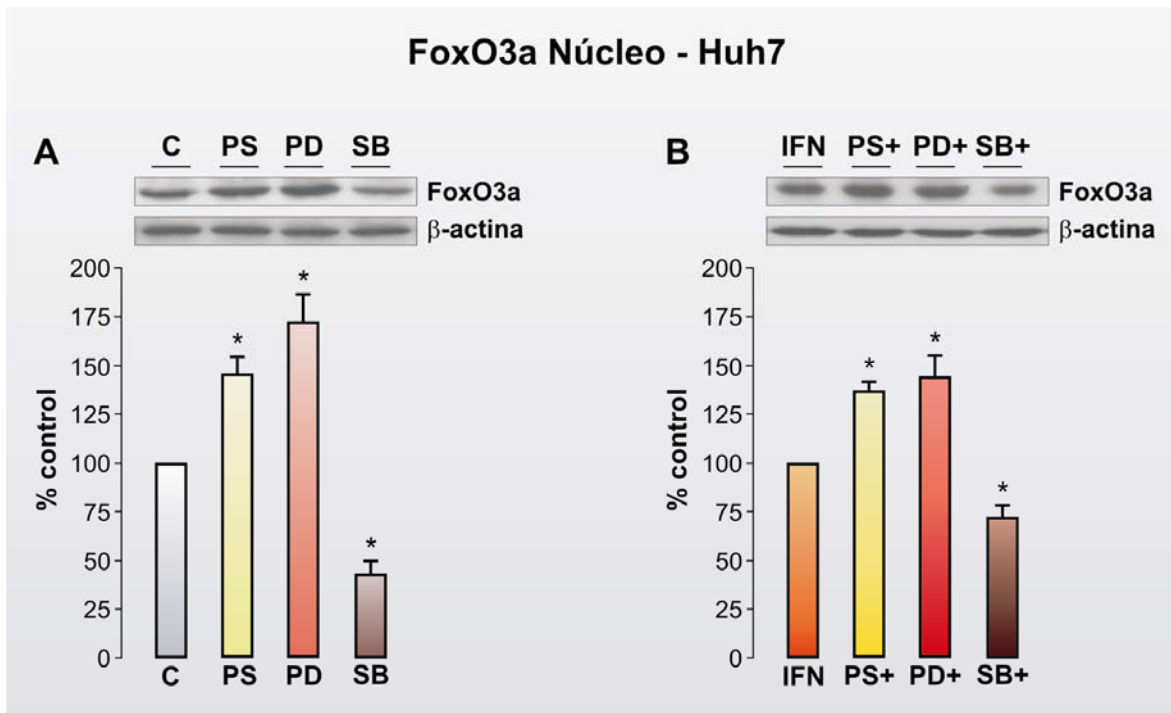


Figura 5.4.4: Participación de IKK β , Erk y p38 en la acumulación nuclear de FoxO3a mediada por IFN- α 2b. Las células Huh7 (2×10^6 /placa) fueron incubadas en placas de 10 cm de diámetro con medio libre de suero, tratadas previamente con PS1145, PD98059, SB202190 o sin tratar y posteriormente incubadas durante 48 hs en ausencia (A) o presencia (B) de IFN- α 2b (100.000 U/mL). Los niveles proteicos del factor FoxO3a fueron detectados en extractos nucleares mediante *western blot*. β -actina fue utilizada como control de carga. El análisis densitométrico se

realizó en al menos cuatro experimentos independientes. Los resultados se mostraron en valores porcentuales considerando arbitrariamente las células sin tratamiento con inhibidores como 100% y se expresaron como la media \pm el error estándar. C: células sin tratamiento, PS, PD y SB: células preincubadas con PS1145, PD98059 y SB202190, respectivamente, IFN: células tratadas con IFN- α 2b, PS+, PD+ y SB+: células preincubadas con PS1145, PD98059 y SB202190, respectivamente, y luego tratadas con IFN- α 2b. * $p < 0,05$ vs. C.

Por otro lado, al estimular las células con IFN- α 2b en presencia de PS1145 o de PD98059, se observó un incremento significativo de los niveles de FoxO3a (+36% y +45%, respectivamente), respecto de las células tratadas con IFN- α 2b. Del mismo modo, se observó una reducción significativa de los niveles de FoxO3a luego del tratamiento con SB202190 e IFN- α 2b (-28%), respecto del tratamiento con IFN- α 2b solo (*figura 5.4.4 B*).

5.4.5. Análisis de la unión de FoxO3a a β -catenina y a Smads 2 y 3

Debido a que el tratamiento con IFN- α 2b resultó en una menor unión de β -catenina y de Smads al factor de transcripción TCF4 y a un aumento del factor FoxO3a en extractos nucleares, se evaluó la posible asociación de FoxO3a con β -catenina y con las formas fosforiladas de Smads 2 y 3 en presencia de IFN- α 2b.

Para este análisis, se realizó un ensayo de co-inmunoprecipitación empleando lisados totales de las líneas celulares C3A y Huh7 tratadas durante 48 hs en presencia o ausencia de IFN- α 2b.

Tal como se muestra en la *figura 5.4.5*, el tratamiento favoreció la asociación de FoxO3a con β -catenina y con Smads 2 y 3 fosforiladas.

5.4.6. Discusión

Dentro de la familia de los factores FoxO, FoxO3a es el que más interés

despierta, ya que es el único miembro que es blanco común de las quinasas oncogénicas Akt, IKK β y Erk (182). Además, JNK y p38 también son capaces de modular a FoxO3a (194, 195, 200).

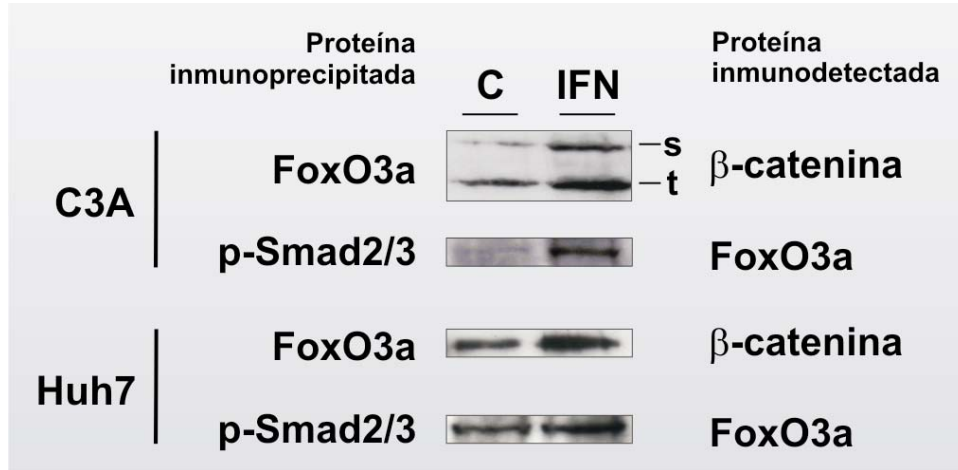


Figura 5.4.5: Asociación de FoxO3a con β -catenina y con p-Smad2/3 promovida por IFN- α 2b. Las células C3A (4×10^6 células/placa) y Huh7 (2×10^6 células/placa) fueron incubadas en placas de 10 cm de diámetro con medio libre de suero y tratadas durante 48 hs en presencia o ausencia de IFN- α 2b (100.000 U/mL). Se prepararon lisados celulares totales y se inmunoprecipitaron cantidades iguales de proteínas con anticuerpos específicos. Los inmunoprecipitados fueron sometidos a *western blot* para detectar las proteínas indicadas empleando anticuerpos específicos. C: células control (sin tratar), IFN: células tratadas con IFN- α 2b, s: β -catenina salvaje, t: β -catenina truncada.

En el *Capítulo 1* se mostró que el tratamiento con IFN- α 2b disminuye la proliferación y aumenta la muerte celular programada en las líneas de HCC HepG2/C3A y Huh7. En los *Capítulos 2* y *3* se demostró que este tratamiento reduce la cantidad de β -catenina y de las formas fosforiladas de Smads 2 y 3, unidas a TCF4. Es sabido que FoxO3a interactúa con β -catenina (204-206) y con Smads 2 y 3 (207-209). Por esto, y sumado al hecho de que FoxO3a participa en procesos de arresto y muerte celular, decidimos evaluar el efecto de IFN- α 2b sobre la regulación y localización de FoxO3a, las quinasas implicadas en dicho proceso y

la asociación de FoxO3a con β -catenina y con p-Smad2/3. Cabe destacar que no se han publicado estudios que analicen los efectos de IFN- α sobre FoxO3a en líneas celulares.

Para comenzar el análisis, se evaluó si los niveles proteicos de las quinasas que regulan a FoxO3a eran afectados por el tratamiento con IFN- α 2b. La estimulación de C3A y Huh7 con IFN- α 2b generó una disminución significativa de las formas fosforiladas de Akt, IKK β y Erk, mientras que aumentó significativamente los niveles proteicos de las formas fosforiladas de JNK y p38.

De manera similar a nuestros resultados, previamente se observaron disminuciones en los niveles proteicos de p-Akt y de p-Erk luego del tratamiento con IFN- α en líneas de HCC (323, 324) y en otros tipos celulares (325-328). Por otra parte, no hay estudios acerca de los efectos de IFN- α sobre el estado de fosforilación de IKK β en HCC o en otros tipos de células. Además, se ha descrito que IFN- α aumenta los niveles de p-JNK y de p-p38 en líneas de HCC (329, 330) y también en otros modelos (331-338).

Dado que el tratamiento con IFN- α 2b indujo la reducción de los niveles de las quinasas que inhiben a FoxO3a y el aumento de las que lo activan, analizamos si el contenido citosólico y nuclear de FoxO3a era modificado por esta citoquina. Los resultados mostraron una reducción significativa de FoxO3a en fracciones citosólicas y un aumento significativo de esta proteína en fracciones nucleares, luego de incubar las células C3A y Huh7 con IFN- α 2b. No se observaron cambios en los niveles proteicos de FoxO3a en lisados celulares totales en presencia de IFN- α 2b. Los cambios obtenidos evidencian una relocalización del factor FoxO3a luego

del tratamiento con IFN- α 2b, que favorece su localización nuclear.

A continuación, se estudiaron los niveles de FoxO3a fosforilado por Akt en células tratadas con IFN- α 2b. El tratamiento redujo significativamente los niveles proteicos de p-FoxO3a, en concordancia con la disminución hallada en p-Akt. Esto indica una acción reducida de Akt sobre FoxO3a en presencia de la citoquina. Además, esta disminución de la fosforilación de FoxO3a mediada por Akt estaría indicando una menor retención en el citosol y una mayor localización nuclear de FoxO3a en presencia de IFN- α 2b, lo cual coincide con los niveles encontrados para FoxO3a en extractos citosólicos y nucleares.

Posteriormente, se evaluó el rol de IKK β , Erk y p38 sobre la acumulación nuclear de FoxO3a en presencia de IFN- α 2b. El tratamiento con los inhibidores de IKK β y de Erk incrementó de forma significativa los niveles de la proteína FoxO3a en extractos nucleares de las células Huh7. Este resultado confirma la modulación descrita de FoxO3a por dichas quinasas (182). A su vez, la inhibición de IKK β y de Erk aumentó significativamente la acumulación nuclear de FoxO3a desencadenada por IFN- α 2b. Así, concluimos que la inhibición de IKK β y de Erk por IFN- α 2b contribuye al incremento nuclear de FoxO3a inducido por la citoquina.

Por el contrario, el aumento de los niveles proteicos de FoxO3a en extractos nucleares de la línea celular Huh7 fue bloqueado de manera significativa tras el tratamiento con el inhibidor de p38. Esto ratifica la activación de FoxO3a mediada por p38 descrita anteriormente (195, 200). Al mismo tiempo, la inhibición de p38 produjo una disminución significativa de la acumulación nuclear de FoxO3a generada por el tratamiento con IFN- α 2b. Dado que previamente demostramos que IFN- α 2b aumenta la activación de p38, concluimos entonces que p38

interviene en el incremento nuclear de FoxO3a promovido por esta citoquina.

En conjunto, los datos obtenidos indican que el aumento de la forma activa de p38 y la disminución de las formas activas de Akt, IKK β y Erk, favorecen la localización nuclear de FoxO3a en células tratadas con IFN- α 2b. Sin embargo, no podemos descartar la participación de otras quinasas (como por ejemplo JNK) en la modulación de FoxO3a, ya que el balance final entre las quinasas que regulan positiva y negativamente a FoxO3a será lo que determine la cantidad nuclear de este factor.

Por último, se evaluó la asociación del factor FoxO3a con β -catenina y con Smad2/3 en células C3A y Huh7 estimuladas con IFN- α 2b. El tratamiento favoreció la unión de FoxO3a tanto a β -catenina como a Smads 2 y 3 fosforiladas.

El resultado encontrado para la interacción β -catenina/FoxO3a, en conjunto con el obtenido en la *sección 5.2.3*, estaría indicando un desplazamiento de β -catenina desde TCF4 hacia FoxO3a en las células C3A y Huh7 tratadas con IFN- α 2b. Así, el aumento nuclear de FoxO3a en presencia de IFN- α 2b contribuiría a la atenuación de la vía Wnt canónica causada por la citoquina, mediante la disminución de la actividad transcripcional de TCF4. Al mismo tiempo, debido a que el tratamiento con IFN- α 2b disminuye los niveles nucleares de β -catenina activa mientras que aumenta los niveles nucleares de FoxO3a, la unión β -catenina/FoxO3a se genera en presencia de niveles bajos de β -catenina y niveles altos de FoxO3a, como se describió anteriormente (204, 206). De forma similar, en un trabajo anterior probamos que β -catenina interactúa con TCF4 en hígados de ratas con preneoplasia hepática y que el tratamiento con IFN- α 2b atenúa esta interacción, mientras que aumenta la unión β -catenina/FoxO3a (258).

Por otra parte, se sabe que FoxO3a es capaz de interactuar con Smads 2, 3 y 4 (207-209). En este estudio, sólo se analizó la asociación de FoxO3a con Smads 2 y 3, pero no se descarta la posibilidad de que se esté produciendo también una interacción entre FoxO3a y Smad4 en presencia de IFN- α 2b. Adicionalmente, en la *sección 5.3.3* informamos una unión reducida de Smad2/3 a TCF4 en presencia de IFN- α 2b, con lo cual también se estaría dando un desplazamiento de Smad2/3 desde TCF4 hacia FoxO3a, que acompañaría al de β -catenina. En conjunto, estos eventos generarían por un lado la atenuación de la actividad transcripcional del factor TCF4 y, por el otro, el aumento de la actividad transcripcional de FoxO3a. Como resultado, el tratamiento con IFN- α 2b favorecería la transcripción de los genes blanco de FoxO3a desde complejos transcripcionales que involucran a β -catenina, Smads, o a otros cofactores. Estos sucesos jugarían a favor del arresto celular y la apoptosis, mientras que se opondrían a los procesos que conducen a la supervivencia celular. Adicionalmente, la modulación de las quinasas estudiadas por IFN- α 2b colaboraría con los cambios en la proliferación y en la apoptosis observados, ya que estas quinasas no sólo regulan a FoxO3a sino que también interactúan con otras señalizaciones. Así, por ejemplo, se ha informado que Akt y Erk activan la vía Wnt/ β -catenina (339-342) y que las quinasas analizadas en este trabajo de tesis se relacionan de manera compleja con la señalización TGF- β /Smads (115, 163, 314).

Conclusiones Generales

6. Conclusiones Generales

Si bien la cascada de señalización Wnt/ β -catenina es clave durante el desarrollo y la homeostasis hepática, también es conocida por su rol oncogénico en el HCC (80). Adicionalmente, la vía TGF- β /Smads interactúa con la señalización Wnt/ β -catenina durante estos procesos (143, 145, 150, 159).

Por otro lado, el factor de transcripción FoxO3a interactúa con β -catenina (204-206) y con Smads (207-209) e interviene en procesos como arresto y muerte celular, entre otros (176).

Es de suma relevancia comprender los mecanismos que conducen a la inhibición del crecimiento y a la inducción de la apoptosis en las células cancerígenas. Respecto a esto, IFN- α presenta propiedades antiproliferativas y proapoptóticas (234, 239), pudiendo ser útil como agente antitumoral.

En este trabajo de tesis, decidimos analizar los efectos de IFN- α 2b y de TGF- β 1 sobre la vía Wnt/ β -catenina, los intermediarios Smads, el factor FoxO3a y su modulación por quinasas y la interacción entre estas rutas de señalización, en las líneas de HCC humanas HepG2/C3A y Huh7. Además, evaluamos la acción de estas citoquinas sobre los procesos de proliferación celular y apoptosis.

Nuestros resultados mostraron claramente una modulación negativa de la vía Wnt/ β -catenina mediada por IFN- α 2b y por TGF- β 1. Esta atenuación se evidenció por una disminución de los niveles proteicos de β -catenina y del receptor Frizzled7 y por una reducción de la cantidad de β -catenina unida a TCF4. En C3A, los tratamientos lograron disminuir también la forma truncada de β -catenina. La estimulación con IFN- α 2b y/o TGF- β 1 generó además una disminución de las

proteínas Smads y de su asociación con TCF4. Este efecto de los tratamientos sobre los niveles proteicos de Smads podría estar ligado a la reducción de los niveles de β -catenina, ya que observamos que el incremento de sus niveles genera el aumento del contenido proteico de Smads (figura 6.1).

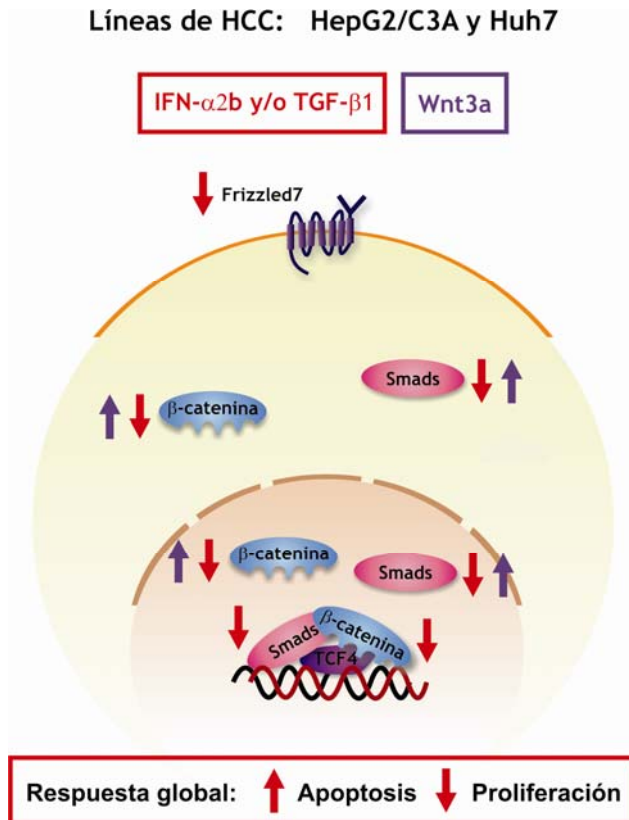


Figura 6.1: Efectos de los tratamientos con IFN- α 2b, TGF- β 1 y Wnt3a sobre la interacción entre la vía Wnt/ β -catenina y las proteínas Smads en las líneas celulares HepG2/C3A y Huh7. El tratamiento con IFN- α 2b y/o TGF- β 1 disminuyó los niveles proteicos de β -catenina, Frizzled7 y Smads y redujo la asociación de β -catenina y Smads a TCF4. La respuesta global de las células a las citoquinas fue la disminución de la proliferación y el aumento de la apoptosis. Por el contrario, el tratamiento con Wnt3a incrementó los niveles proteicos de β -catenina y de Smads.

Al mismo tiempo, IFN- α 2b favoreció la localización nuclear de FoxO3a y su asociación con β -catenina y con Smads 2 y 3. Este proceso estuvo mediado, al menos en parte, por la regulación de FoxO3a por las quinasas Akt, IKK β , Erk y p38. En este sentido, se observó un menor nivel de las formas activas de Akt, IKK β y Erk y un mayor nivel de las formas activas de JNK y p38 en las células tratadas con IFN- α 2b (figura 6.2).

Líneas de HCC: HepG2/C3A y Huh7

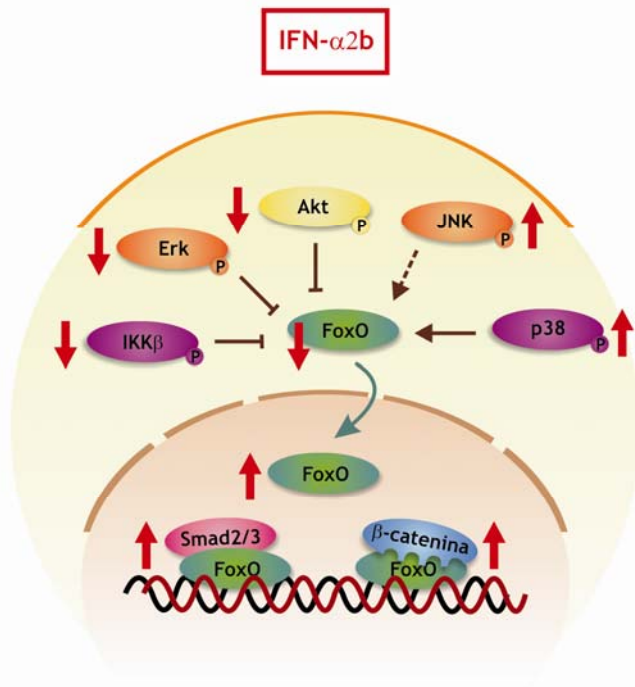


Figura 6.2: Efectos del tratamiento con IFN- α 2b sobre la señalización de FoxO3a en las líneas celulares HepG2/C3A y Huh7. El tratamiento con IFN- α 2b disminuyó los niveles proteicos de las formas activas de Akt, IKK β y Erk y aumentó los niveles de las formas activas de JNK y p38. IFN- α 2b redujo los niveles de FoxO3a en el citosol e incrementó sus niveles en el núcleo. La modulación de Akt, IKK β , Erk y p38 mediada por IFN- α 2b contribuyó en este proceso. JNK podría estar también implicada en el aumento nuclear de FoxO3a en presencia de IFN- α 2b (línea de puntos marrón). También se observó un aumento de la asociación de FoxO3a con β -catenina y con Smad2/3, en presencia de la citoquina.

Finalmente, el desacoplamiento de los complejos Smads/TCF4/ β -catenina contribuiría a contrarrestar la progresión tumoral, ya que la acción global de IFN- α 2b y de TGF- β 1 fue disminuir la proliferación celular y aumentar la muerte celular por apoptosis (*figura 6.1*). Adicionalmente, el desplazamiento de β -catenina y de Smad2/3 desde TCF4 hacia FoxO3a en presencia de IFN- α 2b presentaría una doble ventaja. Por un lado, el desacoplamiento de los complejos Smads/TCF4/ β -catenina y la consecuente atenuación de la actividad transcripcional del factor TCF4; y por otro, el aumento de la actividad transcripcional de FoxO3a, que regularía la expresión génica a partir de complejos transcripcionales que involucran a β -catenina, Smads, o a otros cofactores. Estos sucesos jugarían a favor del arresto celular y la apoptosis, mientras que se opondrían a los procesos que conducen a la supervivencia celular. La modulación de las quinasas Akt, IKK β , Erk, JNK y p38 por IFN- α 2b, también estaría colaborando con la respuesta celular final

que se obtiene en presencia de la citoquina (figura 6.3).

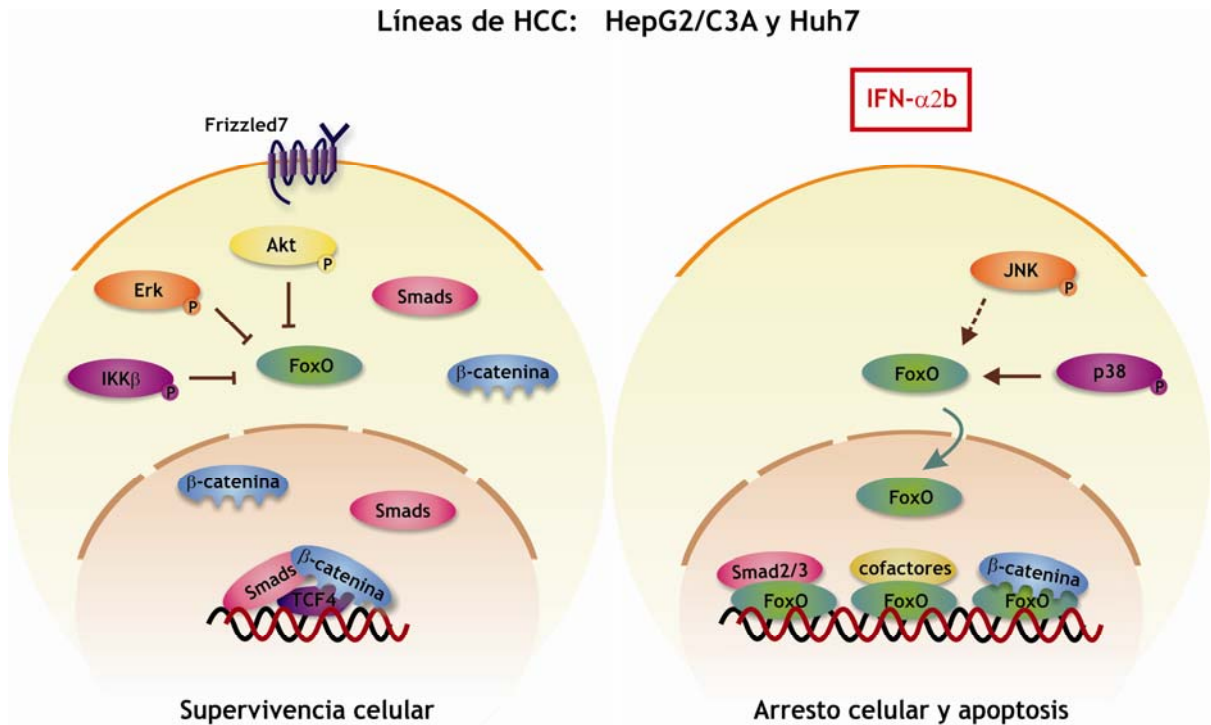


Figura 6.3: Esquema propuesto para describir los efectos de IFN-α2b sobre las interacciones entre la vía Wnt/β-catenina, los intermediarios Smads y la señalización de FoxO3a en las líneas celulares HepG2/C3A y Huh7. En ausencia de tratamiento (lado izquierdo) las células presentan niveles proteicos elevados de β-catenina, Frizzled7 y Smads, que favorecen la formación de complejos Smads/TCF4/β-catenina. Los niveles de las formas activas de las proteínas Akt, IKKβ y Erk se encuentran aumentados, manteniendo al factor FoxO3a secuestrado en el citosol. Estos fenómenos jugarían un rol clave en la supervivencia celular. En presencia de IFN-α2b (lado derecho) el factor FoxO3a se acumula en el núcleo y se asocia con β-catenina, Smad2/3 u otros cofactores, para regular la transcripción génica. El incremento de los niveles proteicos de la forma activa de p38 participa en este proceso. La quinasa JNK podría estar también involucrada en el aumento nuclear de FoxO3a. El resultado final es la disminución de la proliferación celular y el aumento de la apoptosis.

Tomando en cuenta estos antecedentes, el esclarecimiento de las señales inducidas por IFN-α y por TGF-β en células tumorales y su posible interacción con otras señalizaciones intracelulares, podría tener relevancia en el futuro diseño de estrategias terapéuticas que dirijan las respuestas celulares hacia la supresión tumoral.

En conclusión, nuestros hallazgos respaldan la eficacia de la inhibición de la vía Wnt/ β -catenina en líneas de HCC a través de IFN- α 2b o TGF- β 1, probando que estas citoquinas son efectivas tanto en presencia de β -catenina salvaje como de su forma truncada. Estos resultados abren una amplia gama de opciones terapéuticas para pacientes con HCC.

Referencias Bibliográficas

7. Referencias Bibliográficas

1. Hajdu, S. I. (2011) A note from history: landmarks in history of cancer, part 1. *Cancer*. 117, 1097-1102.
2. Olszewski, M. M. (2010) Concepts of Cancer from Antiquity to the Nineteenth Century. *UTMJ*. 87, 181-186.
3. DeVita, V. T. Jr y Rosenberg, S. A. (2012) Two hundred years of cancer research. *N Engl J Med*. 366, 2207-2214.
4. Futreal, P. A.; Kasprzyk, A.; Birney, E.; Mullikin, J. C.; Wooster, R. y Stratton, M. R. (2001) Cancer and genomics. *Nature*. 409, 850-852.
5. Grander, D. (1998) How do mutated oncogenes and tumor suppressor genes cause cancer? *Med Oncol*. 15, 20-26.
6. Hanahan, D. y Weinberg, R. A. (2000) The hallmarks of cancer. *Cell*. 100, 57-70.
7. Hanahan, D. y Weinberg, R. A. (2011) Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 144, 646-674.
8. Jemal, A.; Bray, F.; Center, M. M.; Ferlay, J.; Ward, E. y Forman, D. (2011) Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin*. 61, 69-90.
9. Perz, J. F.; Armstrong, G. L.; Farrington, L. A.; Hutin, Y. J. F. y Bell, B. P. (2006) The contributions of hepatitis B virus and hepatitis C virus infections to cirrhosis and primary liver cancer worldwide. *J Hepatol*. 45, 529-538.
10. Llovet, J. M.; Burroughs, A. y Bruix, J. (2003) Hepatocellular carcinoma. *Lancet*. 362, 1907-1917.
11. Calle, E. E.; Rodriguez, C.; Walker-Thurmond, K. y Thun M. J. (2003) Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of U.S. adults. *N Engl J Med*. 348, 1625-1638.
12. Chen, X.; Cheung, S. T.; So, S.; Fan, S. T.; Barry, C.; Higgins, J.; Lai, K. M.; Ji, J.; Dudoit, S.; Ng, I. O.; Van De Rijn, M.; Botstein, D. y Brown, P. O. (2002) Gene expression patterns in human liver cancers. *Mol Biol Cell*. 13, 1929-1939.
13. Yeh, S. H.; Chen, P. J.; Shau, W. Y.; Chen, Y. W.; Lee, P. H.; Chen, J. T. y Chen, D. S. (2001) Chromosomal allelic imbalance evolving from liver cirrhosis to hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*. 121, 699-709.
14. Saeki, R.; Nagai, H.; Kaneko, S.; Unoura, M.; Yamanaka, N.; Okamoto, E.; Kobayashi, K. y Matsubara, K. (2000) Intratumoral genomic heterogeneity in human hepatocellular carcinoma detected by restriction landmark genomic scanning. *J Hepatol*. 33, 99-105.
15. Su, Q.; Benner, A.; Hofmann, W. J.; Otto, G.; Pichlmayr, R. y Bannasch, P. (1997) Human hepatic preneoplasia: phenotypes and proliferation kinetics of foci and nodules of

altered hepatocytes and their relationship to liver cell dysplasia. *Virchows Arch.* 431, 391-406.

16. Ertel, A.; Verghese, A.; Byers, S. W.; Ochs, M. y Tozeren, A. (2006) Pathway-specific differences between tumor cell lines and normal and tumor tissue cells. *Mol Cancer.* 5, 55.

17. van Staveren, W. C.; Solís, D. Y.; Hébrant, A.; Detours, V.; Dumont, J. E. y Maenhaut, C. (2009) Human cancer cell lines: Experimental models for cancer cells in situ? For cancer stem cells? *Biochim Biophys Acta.* 1795, 92-103.

18. Barretina, J.; Caponigro, G.; Stransky, N.; Venkatesan, K.; Margolin, A. A.; Kim, S.; Wilson, C. J.; Lehár, J.; Kryukov, G. V.; Sonkin, D.; Reddy, A.; Liu, M.; Murray, L.; Berger, M. F.; Monahan, J. E.; Morais, P.; Meltzer, J.; Korejwa, A.; Jané-Valbuena, J.; Mapa, F. A.; Thibault, J.; Bric-Furlong, E.; Raman, P.; Shipway, A.; Engels, I. H.; Cheng, J.; Yu, G. K.; Yu, J.; Aspesi, P. Jr.; de Silva, M.; Jagtap, K.; Jones, M. D.; Wang, L.; Hatton, C.; Palesscandolo, E.; Gupta, S.; Mahan, S.; Sougnez, C.; Onofrio, R. C.; Liefeld, T.; MacConaill, L.; Winckler, W.; Reich, M.; Li, N.; Mesirov, J. P.; Gabriel, S. B.; Getz, G.; Ardlie, K.; Chan, V.; Myer, V. E.; Weber, B. L.; Porter, J.; Warmuth, M.; Finan, P.; Harris, J. L.; Meyerson, M.; Golub, T. R.; Morrissey, M. P.; Sellers, W. R.; Schlegel, R. y Garraway, L. A. (2012) The Cancer Cell Line Encyclopedia enables predictive modelling of anticancer drug sensitivity. *Nature.* 483, 603-607.

19. Greshock, J.; Nathanson, K.; Martin, A. M.; Zhang, L.; Coukos, G.; Weber, B. L. y Zaks, T. Z. (2007) Cancer cell lines as genetic models of their parent histology: analyses based on array comparative genomic hybridization. *Cancer Res.* 67, 3594-3600.

20. Gillet, J.P.; Calcagno, A. M.; Varma, S.; Marino, M.; Green, L. J.; Vora, M. I.; Patel, C.; Orina, J. N.; Eliseeva, T. A.; Singal, V.; Padmanabhan, R.; Davidson, B.; Ganapathi, R.; Sood, A. K.; Rueda, B. R.; Ambudkar, S. V. y Gottesman, M. M. (2011) Redefining the relevance of established cancer cell lines to the study of mechanisms of clinical anti-cancer drug resistance. *Proc Natl Acad Sci USA.* 108, 18708-18713.

21. Kashyap, C. P.; Tikka, B.; Sharma, S.; Kumari, S.; Verma, P.; Sharma, S. y Arya, V. (2011) Human cancer cell lines-A brief communication. *J Chem Pharm Res.* 3, 514-520.

22. Yamori, T. (2003) Panel of human cancer cell lines provides valuable database for drug discovery and bioinformatics. *Cancer Chemother Pharmacol.* 52, S74-S79.

23. Rangarajan, A. y Weinberg, R. A. (2003) Opinion: Comparative biology of mouse versus human cells: modelling human cancer in mice. *Nat Rev Cancer.* 3, 952-959.

24. Cadigan, K. M. y Nusse, R. (1997) Wnt signaling: a common theme in animal development. *Genes Dev.* 11, 3286-3305.

25. Sharma, R. P. (1973) Wingless, a new mutant in *D. melanogaster*. *Dros Inf Serv.* 50, 134.

26. Sharma, R. P. y Chopra, V. L. (1976) Effect of the Wingless (*wg1*) mutation on wing and haltere development in *Drosophila melanogaster*. *Dev Biol.* 48, 461-465.

27. Nüsslein-Volhard, C. y Wieschaus, E. (1980) Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature.* 287, 795-801.

28. Perrimon, N.; Engstrom, L. y Mahowald, A. P. (1989) Zygotic lethals with specific maternal effect phenotypes in *Drosophila melanogaster*. I. Loci on the X chromosome. *Genetics*. 121, 333-352.
29. Wieschaus, E. y Riggleman, R. (1987) Autonomous requirements for the segment polarity gene *armadillo* during *Drosophila* embryogenesis. *Cell*. 49, 177-184.
30. Klingensmith, J. y Nusse, R. (1994) Signaling by *wingless* in *Drosophila*. *Dev Biol*. 166, 396-414.
31. Klingensmith, J.; Nusse, R. y Perrimon, N. (1994) The *Drosophila* segment polarity gene *dishevelled* encodes a novel protein required for response to the *wingless* signal. *Genes Dev*. 8, 118-130.
32. Peifer, M.; Sweeton, D.; Casey, M. y Wieschaus, E. (1994) *Wingless* signal and *Zeste-white 3* kinase trigger opposing changes in the intracellular distribution of *Armadillo*. *Development*. 120, 369-380.
33. Brunner, E.; Peter, O.; Schweizer, L. y Basler, K. (1997) *Pangolin* encodes a *Lef-1* homologue that acts downstream of *Armadillo* to transduce the *Wingless* signal in *Drosophila*. *Nature*. 385, 829-833.
34. Van de Wetering, M.; Cavallo, R.; Dooijes, D.; van Beest, M.; van Es, J.; Loureiro, J.; Ypma, A.; Hursh, D.; Jones, T.; Bejsovec, A.; Peifer, M.; Mortin, M. y Clevers, H. (1997) *Armadillo* coactivates transcription driven by the product of the *Drosophila* segment polarity gene *dTCF*. *Cell*. 88, 789-799.
35. Noordermeer, J.; Klingensmith, J.; Perrimon, N. y Nusse, R. (1994) *Dishevelled* and *armadillo* act in the *wingless* signalling pathway in *Drosophila*. *Nature*. 367, 80-83.
36. Siegfried, E.; Wilder, E. L. y Perrimon, N. (1994) Components of *wingless* signalling in *Drosophila*. *Nature*. 367, 76-80.
37. Nusse, R. y Varmus, H. E. (1982) Many tumors induced by the mouse mammary tumor virus contain a provirus integrated in the same region of the host genome. *Cell*. 31, 99-109.
38. Rijsewijk, F.; Schuermann, M.; Wagenaar, E.; Parren, P.; Weigel, D. y Nusse, R. (1987) The *Drosophila* homolog of the mouse mammary oncogene *int-1* is identical to the segment polarity gene *wingless*. *Cell*. 50, 649-657.
39. Cabrera, C. V.; Alonso, M. C.; Johnston, P.; Phillips, R. G. y Lawrence, P. A. (1987) Phenocopies induced with antisense RNA identify the *wingless* gene. *Cell*. 50, 659-663.
40. Nusse, R.; Brown, A.; Papkoff, J.; Scambler, P.; Shackelford, G.; McMahon, A.; Moon, R. y Varmus, H. (1991) A new nomenclature for *int-1* and related genes: the *Wnt* gene family. *Cell*. 64, 231.
41. Miller, J. R. (2002) The *Wnts*. *Genome Biol*. 3, 1-15.

42. Willert, K.; Brown, J. D.; Danenberg, E.; Duncan, A. W.; Weissman, I. L.; Reya, T.; Yates, J. R. y Nusse, R. (2003) Wnt proteins are lipid-modified and can act as stem cell growth factors. *Nature*. 423, 448-452.
43. Wang, J. y Wynshaw-Boris, A. (2004) The canonical Wnt pathway in early mammalian embryogenesis and stem cell maintenance/differentiation. *Curr Opin Genet Dev*. 14, 533-539.
44. Rao, T. P. y Kühl, M. (2010) An updated overview on Wnt signaling pathways: a prelude for more. *Circ Res*. 106, 1798-1806.
45. Veeman, M. T.; Axelrod, J. D. y Moon, R. T. (2003) A second canon. Functions and mechanisms of beta-catenin-independent Wnt signaling. *Dev Cell*. 5, 367-377.
46. Bhanot, P.; Brink, M.; Samos, C. H.; Hsieh, J. C.; Wang, Y.; Macke, J. P.; Andrew, D.; Nathans, J. y Nusse, R. (1996) A new member of the frizzled family from *Drosophila* functions as a Wingless receptor. *Nature*. 382, 225-230.
47. Schulte, G. y Bryja, V. (2007) The Frizzled family of unconventional G-protein-coupled receptors. *Trends Pharmacol Sci*. 28, 518-525.
48. Foord, S. M.; Bonner, T. I.; Neubig, R. R.; Rosser, E. M.; Pin, J. P.; Davenport, A. P.; Spedding, M. y Harmar, A. J. (2005) International Union of Pharmacology. XLVI. G protein-coupled receptor list. *Pharmacol Rev*. 57, 279-288.
49. Thompson, M. D. y Monga, S. P. S. (2007) WNT/ β -catenin signaling in liver health and disease *Hepatology*. 45, 1298-1305.
50. Zeng, G.; Awan, F.; Otruba, W.; Muller, P.; Apte, U.; Tan, X.; Gandhi, C.; Demetris, A. J. y Monga, S. P. (2007) Wnt'er in liver: expression of Wnt and frizzled genes in mouse. *Hepatology*. 45, 195-204.
51. Lee, J. S.; Ishimoto, A. y Yanagawa, S. (1999) Characterization of mouse dishevelled (Dvl) proteins in Wnt/Wingless signaling pathway. *J Biol Chem*. 274, 21464-21470.
52. Umbhauer, M.; Djiane, A.; Goisset, C.; Penzo-Méndez, A.; Riou, J. F.; Boucaut, J. C. y Shi, D. L. (2000) The C-terminal cytoplasmic Lys-thr-X-X-X-Trp motif in frizzled receptors mediates Wnt/beta-catenin signalling. *EMBO J*. 19, 4944-4954.
53. Clevers, H. (2006) Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. *Cell*. 127, 469-480.
54. Fuerer, C.; Nusse, R. y Ten Berge, D. (2008) Wnt signalling in development and disease. Max Delbrück Center for Molecular Medicine meeting on Wnt signaling in Development and Disease. *EMBO Rep*. 9, 134-138.
55. Huang, H. y He, X. (2008) Wnt/b-catenin signaling: new (and old) players and new insights. *Curr Opin Cell Biol*. 20, 119-125.
56. Jamora, C. y Fuchs, E. (2002) Intercellular adhesion, signalling and the cytoskeleton. *Nat Cell Biol*. 4, E101-E108.

57. Ozawa, M.; Baribault, H. y Kemler, R. (1989) The cytoplasmic domain of the cell adhesion molecule uvomorulin associates with three independent proteins structurally related in different species. *EMBO J.* 8, 1711-1717.
58. Behrens, J. (1998) Functional interaction of an axin homolog, conductin, with beta-catenin, APC, and GSK3beta. *Science.* 280, 596-599.
59. Hart, M. J.; Santos, R. de los; Albert, I. N.; Rubinfeld, B. y Polakis, P. (1998) Downregulation of beta-catenin by human Axin and its association with the APC tumor suppressor, beta-catenin and GSK3 beta. *Curr Biol.* 8, 573-581.
60. Ikeda, S.; Kishida, S.; Yamamoto, H.; Murai, H.; Koyama, S. y Kikuchi, A. (1998) Axin , a negative regulator of the Wnt signaling pathway , forms a complex with GSK-3 β and β -catenin and promotes GSK-3 β -dependent phosphorylation of β -catenin. *EMBO J.* 17, 1371-1384.
61. Kimelman, D. y Xu, W. (2006) beta-catenin destruction complex: insights and questions from a structural perspective. *Oncogene.* 25, 7482-7491.
62. Lee, E.; Salic, A.; Krüger, R.; Heinrich, R. y Kirschner, M. W. (2003) The roles of APC and Axin derived from experimental and theoretical analysis of the Wnt pathway. *PLoS Biol.* 1, E10.
63. Liu, C.; Li, Y.; Semenov, M.; Han, C.; Baeg, G. H.; Tan, Y.; Zhang, Z.; Lin, X. y He, X. (2002) Control of beta-catenin phosphorylation/degradation by a dual-kinase mechanism. *Cell.* 108, 837-847.
64. Polakis P. (2002) Casein kinase 1: a Wnt'er of disconnect. *Curr Biol.* 12, R499-R501.
65. Wu, D. y Pan, W. (2010) GSK3: a multifaceted kinase in Wnt signaling. *Trends Biochem Sci.* 35, 161-168.
66. Yanagawa, S.; Matsuda, Y.; Lee, J. S.; Matsubayashi, H.; Sese, S.; Kadowaki, T. y Ishimoto, A. (2002) Casein kinase I phosphorylates the Armadillo protein and induces its degradation in *Drosophila*. *EMBO J.* 21, 1733-1742.
67. Aberle, H.; Bauer, A.; Stappert, J.; Kispert, A. y Kemler, R. (1997) beta-catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway. *EMBO J.* 16, 3797-3804.
68. He, X.; Semenov, M.; Tamai, K. y Zeng, X. (2004) LDL receptor-related proteins 5 and 6 in Wnt/beta-catenin signaling: arrows point the way. *Development.* 131, 1663-1677.
69. Pinson, K. I.; Brennan, J.; Monkley, S.; Avery, B. J. y Skarnes, W. C. (2000) An LDL-receptor-related protein mediates Wnt signalling in mice. *Nature.* 407, 535-538.
70. Tamai, K.; Semenov, M.; Kato, Y.; Spokony, R.; Liu, C.; Katsuyama, Y.; Hess, F.; Saint-Jeannet, J. P. y He, X. (2000) LDL-receptor-related proteins in Wnt signal transduction. *Nature.* 407, 530-535.
71. Liu, C.; Yao, M. y Hogue, C. W. (2011) Near-membrane ensemble elongation in the proline-rich LRP6 intracellular domain may explain the mysterious initiation of the Wnt signaling pathway. *BMC Bioinformatics.* 12, S13.

72. Zeng, X.; Huang, H.; Tamai, K.; Zhang, X.; Harada, Y.; Yokota, C.; Almeida, K.; Wang, J.; Doble, B. M.; Woodgett, J.; Wynshaw-Boris, A.; Hsieh, J. C. y He, X. (2008) Initiation of Wnt signaling: control of Wnt coreceptor Lrp6 phosphorylation/activation via frizzled, dishevelled and axin functions. *Development*. 135, 367-375.
73. Zeng, X.; Tamai, K.; Doble, B.; Li, S.; Huang, H.; Habas, R.; Okamura, H.; Woodgett, J. y He, X. (2005) A dual-kinase mechanism for Wnt co-receptor phosphorylation and activation. *Nature*. 438, 873-877.
74. Hurlstone, A. y Clevers, H. (2002) T-cell factors: turn-ons and turn-offs. *EMBO J*. 21, 2303-2311.
75. Cavallo, R. A.; Cox, R. T.; Moline, M. M.; Roose, J. ; Plevoy, G. A.; Clevers, H.; Peifer, M. y Bejsovec, A. (1998) *Drosophila* Tcf and Groucho interact to repress Wingless signalling activity. *Nature*. 395, 604-608.
76. Levanon, D.; Goldstein, R. E.; Bernstein, Y.; Tang, H.; Goldenberg, D.; Stifani, S.; Paroush, Z. y Groner, Y. (1998) Transcriptional repression by AML1 and LEF-1 is mediated by the TLE/Groucho corepressors. *Proc Natl Acad Sci USA*. 95, 11590-11595.
77. Roose, J.; Molenaar, M.; Peterson, J.; Hurenkamp, J.; Brantjes, H.; Moerer, P.; van de Wetering, M.; Destree, O. y Clevers, H. (1998) The *Xenopus* Wnt effector XTcf-3 interacts with Groucho-related transcriptional repressors. *Nature*. 395, 608-612.
78. Laurent-Puig, P.; Legoix, P.; Bluteau, O.; Belghiti, J.; Franco, D.; Binot, F.; Monges, G.; Thomas, G.; Bioulac-Sage, P. y Zucman-Rossi, J. (2001) Genetic alterations associated with hepatocellular carcinomas define distinct pathways of hepatocarcinogenesis. *Gastroenterology*. 120, 1763-1773.
79. Polakis, P. (2000) Wnt signaling and cancer. *Genes Dev*. 14, 1837-1851.
80. Takigawa, Y. y Brown, A. M. C. (2008) Wnt signaling in liver cancer. *Curr Drug Targets*. 9, 1013-1024.
81. Zucman-Rossi, J. (2008) Human and mouse hepatocellular adenoma and carcinoma display similar tumorigenesis pathway alterations. *J Hepatology*. 48, 884-886.
82. Ihara, A.; Koizumi, H.; Hashizume, R. y Uchikoshi, T. (1996) Expression of epithelial cadherin and alpha- and beta-catenins in nontumoral livers and hepatocellular carcinomas. *Hepatology*. 23, 1441-1447.
83. Cui, J.; Zhou, X.; Liu, Y.; Tang, Z. y Romeih, M. (2003) Wnt signaling in hepatocellular carcinoma: Analysis of mutation and expression of beta-catenin, T-cell factor-4 and glycogen synthase kinase 3-beta genes. *J Gastroenterol Hepatol*. 18, 280-287.
84. de La Coste, A.; Romagnolo, B.; Billuart, P.; Renard, C. A.; Buendia, M. A.; Soubrane, O.; Fabre, M.; Chelly, J.; Beldjord, C.; Kahn, A. y Perret, C. (1998) Somatic mutations of the beta-catenin gene are frequent in mouse and human hepatocellular carcinomas. *Proc Natl Acad Sci USA*. 95, 8847-8851.
85. Fujie, H.; Moriya, K.; Shintani, Y.; Tsutsumi, T.; Takayama, T.; Makuuchi, M.; Kimura, S. y Koike, K. (2001) Frequent beta-catenin aberration in human hepatocellular carcinoma. *Hepatol Res*. 20, 39-51.

86. Kim, Y. D.; Park, C. H.; Kim, H. S.; Choi, S. K.; Rew, J. S., Kim, D. Y., Koh, Y. S.; Jeung, K. W.; Lee, K. H.; Lee, J. S.; Juhng, S. W. y Lee, J. H. (2008) Genetic alterations of Wnt signaling pathway associated genes in hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol.* 23, 110-118.
87. Kondo, Y.; Kanai, Y.; Sakamoto, M.; Genda, T.; Mizokami, M.; Ueda, R. y Hirohashi, S. (1999) Beta-catenin accumulation and mutation of exon 3 of the beta-catenin gene in hepatocellular carcinoma. *Jpn J Cancer Res.* 90, 1301-1309.
88. Miyoshi, Y.; Iwao, K.; Nagasawa, Y.; Aihara, T.; Sasaki, Y.; Imaoka, S.; Murata, M.; Shimano, T. y Nakamura, Y. (1998) Activation of the beta-catenin gene in primary hepatocellular carcinomas by somatic alterations involving exon 3. *Cancer Res.* 58, 2524-2527.
89. Wong, C. M.; Fan, S. T. y Ng, I. O. (2001) beta-Catenin mutation and overexpression in hepatocellular carcinoma: clinicopathologic and prognostic significance. *Cancer.* 92, 136-145.
90. Lee, H. C.; Kim, M. y Wands, J. R. (2006) Wnt/frizzled signaling in hepatocellular carcinoma. *Front Biosci.* 11, 1901-1915.
91. Ishizaki, Y.; Ikeda, S.; Fujimori, M.; Shimizu, Y.; Kurihara, T.; Itamoto, T.; Kikuchi, A.; Okajima, M. y Asahara, T. (2004) Immunohistochemical analysis and mutational analyses of beta-catenin, Axin family and APC genes in hepatocellular carcinomas. *Int J Oncol.* 24, 1077-1083.
92. Satoh, S.; Daigo, Y.; Furukawa, Y.; Kato, T.; Miwa, N.; Nishiwaki, T.; Kawasoe, T.; Ishiguro, H.; Fujita, M.; Tokino, T.; Sasaki, Y.; Imaoka, S.; Murata, M.; Shimano, T.; Yamaoka, Y. y Nakamura, Y. (2000) AXIN1 mutations in hepatocellular carcinomas, and growth suppression in cancer cells by virus-mediated transfer of AXIN1. *Nat Genet.* 24, 245-250.
93. Taniguchi, K.; Roberts, L. R.; Aderca, I. N.; Dong, X.; Qian, C.; Murphy, L. M.; Nagorney, D. M.; Burgart, L. J.; Roche, P. C.; Smith, D. I.; Ross, J. A. y Liu, W. (2002) Mutational spectrum of beta-catenin, AXIN1, and AXIN2 in hepatocellular carcinomas and hepatoblastomas. *Oncogene.* 21, 4863-4871.
94. Kim, M.; Lee, H. C.; Tsedensodnom, O.; Hartley, R.; Lim, Y. S.; Yu, E.; Merle, P. y Wands, J. R. (2008) Functional interaction between Wnt3 and Frizzled-7 leads to activation of the Wnt/beta-catenin signaling pathway in hepatocellular carcinoma cells. *J Hepatol.* 48, 780-791.
95. Merle, P.; de la Monte, S.; Kim, M.; Herrmann, M.; Tanaka, S.; Von Dem Bussche, A.; Kew, M. C.; Trepo, C. y Wands, J. R. (2004) Functional consequences of frizzled-7 receptor overexpression in human hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology.* 127, 1110-1122.
96. Merle, P.; Kim, M.; Herrmann, M.; Gupte, A.; Lefrançois, L.; Califano, S.; Trépo, C.; Tanaka, S.; Vitvitski, L.; de la Monte, S. y Wands, J. R. (2005) Oncogenic role of the frizzled-7/beta-catenin pathway in hepatocellular carcinoma. *J Hepatol.* 43, 854-862.
97. Endo, K.; Ueda, T.; Ueyama, J.; Ohta, T. y Terada, T. (2000) Immunoreactive E-cadherin, alpha-catenin, beta-catenin, and gamma-catenin proteins in hepatocellular

carcinoma: relationships with tumor grade, clinicopathologic parameters, and patients' survival. *Hum Pathol.* 31, 558-565.

98. Nuruki, K.; Toyoyama, H.; Ueno, S.; Hamanoue, M.; Tanabe, G.; Aikou, T. y Ozawa, M. (1998) E-cadherin but not N-cadherin expression is correlated with the intracellular distribution of catenins in human hepatocellular carcinomas. *Oncol Rep.* 5, 1109-1114.

99. Bengochea, A.; de Souza, M. M.; Lefrançois, L.; Le Roux, E.; Galy, O.; Chemin, I. ; Kim, M.; Wands, J. R.; Trepo, C.; Hainaut, P.; Scoazec, J. Y. ; Vitvitski, L. y Merle, P. (2008) Common dysregulation of Wnt/Frizzled receptor elements in human hepatocellular carcinoma. *Br J Cancer.* 99, 143-150.

100. Ban, K. C.; Singh, H.; Krishnan, R. y Seow, H. F. (2003) GSK-3beta phosphorylation and alteration of beta-catenin in hepatocellular carcinoma. *Cancer Lett.* 199, 201-208.

101. Funkenstein, B.; Olekh, E. y Jakowlew, S. B. (2010) Identification of a novel transforming growth factor-beta (TGF-beta6) gene in fish: regulation in skeletal muscle by nutritional state. *BMC Mol Biol.* 11, 37.

102. Govinden, R. y Bhoola, K. D. (2003) Genealogy, expression, and cellular function of transforming growth factor-beta. *Pharmacol Ther.* 98, 257-265.

103. Roberts, A. B. (1998) Molecular and cell biology of TGF-beta. *Miner Electrolyte Metab.* 24, 111-119.

104. Frolik, C. A.; Dart, L. L.; Meyers, C. A.; Smith, D. M. y Sporn, M. B. (1983) Purification and initial characterization of a type beta transforming growth factor from human placenta. *Proc Natl Acad Sci USA.* 80, 3676-3680.

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

106. Gordon, K. J. y Blobe, G. C. (2008) Role of transforming growth factor-beta superfamily signaling pathways in human disease. *Biochim Biophys Acta.* 1782, 197-228.

107. Hartsough, M. T. y Mulder, K. M. (1997) Transforming growth factor-beta signaling in epithelial cells. *Pharmacol Ther.* 75, 21-41.

108. Massagué, J. (2008) TGFbeta in Cancer. *Cell.* 134, 215-230.

109. Miyazono, K.; Ehata, S. y Koinuma, D. (2012) Tumor-promoting functions of transforming growth factor- β in progression of cancer. *Ups J Med Sci.* 117, 143-152.

110. Hayashi, H. y Sakai, T. (2012) Biological Significance of Local TGF- β Activation in Liver Diseases. *Front Physiol.* 3, 12.

111. Horiguchi, M.; Ota, M. y Rifkin, D. B. (2012) Matrix control of transforming growth factor- β function. *J Biochem.* 152, 321-329.

112. Attisano, L. y Wrana, J. L. (2000) Smads as transcriptional co-modulators. *Curr Opin Cell Biol.* 12, 235-243.

113. Santibañez, J. F.; Quintanilla, M. y Bernabeu, C. (2011) TGF- β /TGF- β receptor system and its role in physiological and pathological conditions. *Clin Sci (Lond)*. 121, 233-251.
114. Massagué, J. (1998) TGF-beta signal transduction. *Annu Rev Biochem*. 67, 753-791.
115. Massagué, J.; Seoane, J. y Wotton, D. (2005) Smad transcription factors. *Genes Dev*. 19, 2783-2810.
116. Ishisaki, A.; Yamato, K.; Hashimoto, S.; Nakao, A.; Tamaki, K.; Nonaka, K.; ten Dijke, P.; Sugino, H. y Nishihara, T. (1999) Differential inhibition of Smad6 and Smad7 on bone morphogenetic protein- and activin-mediated growth arrest and apoptosis in B cells. *J Biol Chem*. 274, 13637-13642.
117. Itóh, S.; Landström, M.; Hermansson, A.; Itoh, F.; Heldin, C. H.; Heldin, N. E. y ten Dijke P. (1998) Transforming growth factor beta1 induces nuclear export of inhibitory Smad7. *J Biol Chem*. 1998 273, 29195-29201.
118. Mochizuki, T.; Miyazaki, H.; Hara, T.; Furuya, T.; Imamura, T.; Watabe, T. y Miyazono, K. (2004) Roles for the MH2 domain of Smad7 in the specific inhibition of transforming growth factor-beta superfamily signaling. *J Biol Chem*. 279, 31568-31574.
119. Moustakas, A. y Heldin, C.-H. (2009) The regulation of TGF β signal transduction. *Development*. 136, 3699-3714.
120. Hayashi, H.; Abdollah, S.; Qiu, Y.; Cai, J.; Xu, Y. Y.; Grinnell, B. W.; Richardson, M. A.; Topper, J. N.; Gimbrone, M. A. Jr.; Wrana, J. L. y Falb, D. (1997) The MAD-related protein Smad7 associates with the TGFbeta receptor and functions as an antagonist of TGFbeta signaling. *Cell*. 89, 1165-1173.
121. Nakao, A.; Afrakhte, M.; Morén, A.; Nakayama, T.; Christian, J. L.; Heuchel, R.; Itoh, S.; Kawabata, M.; Heldin, N. E.; Heldin, C. H. y ten Dijke, P. (1997) Identification of Smad7, a TGFbeta-inducible antagonist of TGF-beta signalling. *Nature*. 389, 631-635.
122. Zhang, S.; Fei, T.; Zhang, L.; Zhang, R.; Chen, F.; Ning, Y.; Han, Y.; Feng, X. H.; Meng, A. y Chen, Y. G. (2007) Smad7 antagonizes transforming growth factor beta signaling in the nucleus by interfering with functional Smad-DNA complex formation. *Mol Cell Biol*. 27, 4488-4499.
123. Dooley, S. y ten Dijke, P. (2012) TGF- β in progression of liver disease. *Cell Tissue Res*. 347, 245-256.
124. Thorgeirsson, S. S.; Teramoto, T. y Factor, V. M. (1998) Dysregulation of apoptosis in hepatocellular carcinoma. *Semin Liver Dis*. 18, 115-122.
125. Buchmann, A.; Willy, C.; Buenemann, C. L.; Stroh, C.; Schmiechen, A. y Schwarz, M. (1999) Inhibition of transforming growth factor beta1-induced hepatoma cell apoptosis by liver tumor promoters: characterization of primary signaling events and effects on CPP32-like caspase activity. *Cell Death Differ*. 6, 190-200.
126. Damdinsuren, B.; Nagano, H.; Kondo, M.; Natsag, J.; Hanada, H.; Nakamura, M.; Wada, H.; Kato, H.; Marubashi, S.; Miyamoto, A.; Takeda, Y.; Umeshita, K.; Dono, K. y

Monden, M. (2006) TGF-beta1-induced cell growth arrest and partial differentiation is related to the suppression of Id1 in human hepatoma cells. *Oncol Rep.* 15, 401-408.

127. Fan, G.; Ma, X.; Wong, P. Y.; Rodrigues, C. M. y Steer, C. J. (2004) p53 dephosphorylation and p21(Cip1/Waf1) translocation correlate with caspase-3 activation in TGF-beta1-induced apoptosis of HuH-7 cells. *Apoptosis.* 9, 211-221.

128. Ho, J.; Cocolakis, E.; Dumas, V. M.; Posner, B. I.; Laporte, S. A. y Lebrun, J. J. (2005) The G protein-coupled receptor kinase-2 is a TGFbeta-inducible antagonist of TGFbeta signal transduction. *EMBO J.* 24, 3247-3258.

129. Lin, J. K. y Chou, C. K. (1992) In vitro apoptosis in the human hepatoma cell line induced by transforming growth factor beta 1. *Cancer Res.* 52, 385-388.

130. Müllauer, L.; Grasl-Kraupp, B.; Bursch, W. y Schulte-Hermann, R. (1996) Transforming growth factor beta 1-induced cell death in preneoplastic foci of rat liver and sensitization by the antiestrogen tamoxifen. *Hepatology.* 23, 840-847.

131. Shima, Y.; Nakao, K.; Nakashima, T.; Kawakami, A.; Nakata, K.; Hamasaki, K.; Kato, Y.; Eguchi, K. y Ishii, N. (1999) Activation of caspase-8 in transforming growth factor-beta-induced apoptosis of human hepatoma cells. *Hepatology.* 30, 1215-1222.

132. Yamamoto, M.; Fukuda, K.; Miura, N.; Suzuki, R.; Kido, T. y Komatsu, Y. (1998) Inhibition by dexamethasone of transforming growth factor beta1-induced apoptosis in rat hepatoma cells: a possible association with Bcl-xL induction. *Hepatology.* 27, 959-966.

133. Zhang, H.; Ozaki, I.; Mizuta, T.; Hamajima, H.; Yasutake, T.; Eguchi, Y.; Ideguchi, H.; Yamamoto, K. y Matsushashi, S. (2006) Involvement of programmed cell death 4 in transforming growth factor-beta1-induced apoptosis in human hepatocellular carcinoma. *Oncogene.* 25, 6101-6112.

134. Zhang, H.; Ozaki, I.; Mizuta, T.; Yoshimura, T.; Matsushashi, S.; Eguchi, Y.; Yasutake, T.; Hisatomi, A.; Sakai, T. y Yamamoto, K. (2004) Transforming growth factor-beta 1-induced apoptosis is blocked by beta 1-integrin-mediated mitogen-activated protein kinase activation in human hepatoma cells. *Cancer Sci.* 95, 878-886.

135. Roberts, A. B. y Wakefield, L. M. (2003) The two faces of transforming growth factor beta in carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 100, 8621-8623.

136. Santoni-Rugiu, E.; Jensen, M. R.; Factor, V. M. y Thorgeirsson, S. S. (1999) Acceleration of c-myc-induced hepatocarcinogenesis by Co-expression of transforming growth factor (TGF)-alpha in transgenic mice is associated with TGF-beta1 signaling disruption. *Am J Pathol.* 154, 1693-1700.

137. Sugano, Y.; Matsuzaki, K.; Tahashi, Y.; Furukawa, F.; Mori, S.; Yamagata, H.; Yoshida, K.; Matsushita, M.; Nishizawa, M.; Fujisawa, J. y Inoue, K. (2003) Distortion of autocrine transforming growth factor beta signal accelerates malignant potential by enhancing cell growth as well as PAI-1 and VEGF production in human hepatocellular carcinoma cells. *Oncogene.* 22, 2309-2321.

138. Sporn, M. B. y Roberts, A. B. (1990) TGF-beta: problems and prospects. *Cell Regul.* 1, 875-882.

139. Labbé, E.; Letamendia, A. y Attisano, L. (2000) Association of Smads with lymphoid enhancer binding factor 1/T cell-specific factor mediates cooperative signaling by the transforming growth factor-beta and wnt pathways. *Proc Natl Acad Sci USA*. 97, 8358-8363.
140. Nishita, M.; Hashimoto, M. K.; Ogata, S.; Laurent, M. N.; Ueno, N.; Shibuya, H. y Cho, K. W. (2000) Interaction between Wnt and TGF-beta signalling pathways during formation of Spemann's organizer. *Nature*. 403, 781-785.
141. Hussein, S. M.; Duff, E. K. y Sirard, C. (2003) Smad4 and beta-catenin co-activators functionally interact with lymphoid-enhancing factor to regulate graded expression of Msx2. *J Biol Chem*. 278, 48805-48814.
142. Labbé, E.; Lock, L.; Letamendia, A.; Gorska, A. E.; Gryfe, R.; Gallinger, S.; Moses, H. L. y Attisano, L. (2007) Transcriptional cooperation between the transforming growth factor-beta and Wnt pathways in mammary and intestinal tumorigenesis. *Cancer Res*. 67, 75-84.
143. Letamendia, A.; Labbé, E. y Attisano, L. (2001) Transcriptional regulation by Smads: crosstalk between the TGF-beta and Wnt pathways. *J Bone Joint Surg Am*. 83-A, S31-S39.
144. Sasaki, T.; Suzuki, H.; Yagi, K.; Furuhashi, M.; Yao, R.; Susa, S.; Noda, T.; Arai, Y.; Miyazono, K. y Kato, M. (2003) Lymphoid enhancer factor 1 makes cells resistant to transforming growth factor beta-induced repression of c-myc. *Cancer Res*. 63, 801-806.
145. Warner, D. R.; Greene, R. M. y Pisano, M. M. (2005) Cross-talk between the TGFbeta and Wnt signaling pathways in murine embryonic maxillary mesenchymal cells. *FEBS Lett*. 579, 3539-3546.
146. Amini Nik, S.; Ebrahim, R. P.; Van Dam, K.; Cassiman, J. J. y Tejpar, S. (2007) TGF-beta modulates beta-Catenin stability and signaling in mesenchymal proliferations. *Exp Cell Res*. 313, 2887-2895.
147. Edlund, S.; Lee, S. Y.; Grimsby, S.; Zhang, S.; Aspenström, P.; Heldin, C. H. y Landström, M. (2005) Interaction between Smad7 and beta-catenin: importance for transforming growth factor beta-induced apoptosis. *Mol Cell Biol*. 25, 1475-1488.
148. Hirota, M.; Watanabe, K.; Hamada, S.; Sun, Y.; Strizzi, L.; Mancino, M.; Nagaoka, T.; Gonzales, M.; Seno, M.; Bianco, C. y Salomon, D. S. (2008) Smad2 functions as a co-activator of canonical Wnt/beta-catenin signaling pathway independent of Smad4 through histone acetyltransferase activity of p300. *Cell Signal*. 20, 1632-1641.
149. Incassati, A.; Pinderhughes, A.; Eelkema, R. y Cowin, P. (2009) Links between transforming growth factor-beta and canonical Wnt signaling yield new insights into breast cancer susceptibility, suppression and tumor heterogeneity. *Breast Cancer Res*. 11, 103.
150. Tian, X.; Du, H.; Fu, X. ; Li, K. ; Li, A. y Zhang, Y. (2009) Smad4 restoration leads to a suppression of Wnt/beta-catenin signaling activity and migration capacity in human colon carcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 380, 478-483.

151. Lei, S.; Dubeykovskiy, A.; Chakladar, A.; Wojtukiewicz, L. y Wang, T. C. (2004) The murine gastrin promoter is synergistically activated by transforming growth factor-beta/Smad and Wnt signaling pathways. *J Biol Chem.* 279, 42492-42502.
152. Lim, S. K. y Hoffmann, F. M. (2006) Smad4 cooperates with lymphoid enhancer-binding factor 1/T cell-specific factor to increase c-myc expression in the absence of TGF-beta signaling. *Proc Natl Acad Sci USA.* 103, 18580-18585.
153. Furuhashi, M.; Yagi, K.; Yamamoto, H.; Furukawa, Y.; Shimada, S.; Nakamura, Y.; Kikuchi, A.; Miyazono, K. y Kato, M. (2001) Axin facilitates Smad3 activation in the transforming growth factor beta signaling pathway. *Mol Cell Biol.* 21, 5132-5141.
154. Liu, W.; Rui, H.; Wang, J.; Lin, S.; He, Y.; Chen, M.; Li, Q.; Ye, Z.; Zhang, S.; Chan, S. C.; Chen, Y. G.; Han, J. y Lin, S. C. (2006) Axin is a scaffold protein in TGF-beta signaling that promotes degradation of Smad7 by Arkadia. *EMBO J.* 25, 1646-1658.
155. Han, G.; Li, A. G.; Liang, Y. Y.; Owens, P.; He, W.; Lu, S.; Yoshimatsu, Y.; Wang, D.; Ten Dijke, P.; Lin, X. y Wang, X. J. (2006) Smad7-induced beta-catenin degradation alters epidermal appendage development. *Dev Cell.* 11, 301-312.
156. Jian, H.; Shen, X.; Liu, I.; Semenov, M.; He, X. y Wang, X. F. (2006) Smad3-dependent nuclear translocation of beta-catenin is required for TGF-beta1-induced proliferation of bone marrow-derived adult human mesenchymal stem cells. *Genes Dev.* 20, 666-674.
157. Li, T. F.; Chen, D.; Wu, Q.; Chen, M.; Sheu, T. J.; Schwarz, E. M.; Drissi, H.; Zuscik, M. y O'Keefe, R. J. (2006) Transforming growth factor-beta stimulates cyclin D1 expression through activation of beta-catenin signaling in chondrocytes. *J Biol Chem.* 281, 21296-21304.
158. Romero, D.; Iglesias, M.; Vary, C. P. y Quintanilla, M. (2008) Functional blockade of Smad4 leads to a decrease in beta-catenin levels and signaling activity in human pancreatic carcinoma cells. *Carcinogenesis.* 29, 1070-1076.
159. Tang, Y.; Liu, Z.; Zhao, L.; Clemens, T. L. y Cao, X. (2008) Smad7 stabilizes beta-catenin binding to E-cadherin complex and promotes cell-cell adhesion. *J Biol Chem.* 283, 23956-23963.
160. Zhang, M.; Wang, M.; Tan, X.; Li, T. F.; Zhang, Y. E. y Chen, D. (2010) Smad3 prevents beta-catenin degradation and facilitates beta-catenin nuclear translocation in chondrocytes. *J Biol Chem.* 285, 8703-8710.
161. Warner, D. R.; Greene, R. M. y Pisano, M. M. (2005) Interaction between Smad 3 and Dishevelled in murine embryonic craniofacial mesenchymal cells. *Orthod Craniofac Res.* 8, 123-130.
162. Warner, D. R.; Pisano, M. M.; Roberts, E. A. y Greene, R. M. (2003) Identification of three novel Smad binding proteins involved in cell polarity. *FEBS Lett.* 539, 167-173.
163. Derynck, R. y Zhang, Y. E. (2003) Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. *Nature.* 425, 577-584.

164. Hoover, L. L. y Kubalak, S. W. (2008) Holding their own: the noncanonical roles of Smad proteins. *Sci Signal.* 1, pe48.
165. Weigel, D.; Jürgens, G.; Küttner, F.; Seifert, E. y Jäckle, H. (1989) The homeotic gene fork head encodes a nuclear protein and is expressed in the terminal regions of the *Drosophila* embryo. *Cell.* 57, 645-658.
166. Weigel, D. y Jäckle, H. (1990) The fork head domain: a novel DNA binding motif of eukaryotic transcription factors? *Cell.* 63, 455-456.
167. Benayoun, B. A.; Caburet, S. y Veitia, R. A. (2011) Forkhead transcription factors: key players in health and disease. *Trends Genet.* 27, 224-232.
168. Jackson, B. C.; Carpenter, C., Nebert, D. W. y Vasiliou, V. (2010) Update of human and mouse forkhead box (FOX) gene families. *Hum Genomics.* 4, 345-352.
169. Kaestner, K. H.; Knöchel, W. y Martínez, D. E. (2000) Unified nomenclature for the winged helix/forkhead transcription factors. *Genes Dev.* 14, 142-146.
170. Maiese, K.; Chong, Z. Z.; Shang, Y. C. y Hou, J. (2009) A “FOXO” in sight: targeting Foxo proteins from conception to cancer. *Med Res Rev.* 29, 395-418.
171. Katoh, M. y Katoh, M. (2004) Human FOX gene family (Review). *Int J Oncol.* 25, 1495-1500.
172. Anderson, M. J., Viars, C. S.; Czekay, S.; Cavenee, W. K. y Arden, K. C. (1998) Cloning and characterization of three human forkhead genes that comprise an FKHR-like gene subfamily. *Genomics.* 47, 187-199.
173. Biggs, W. H.; Cavenee, W. K. y Arden, K. C. (2001) Identification and characterization of members of the FKHR (FOX O) subclass of winged-helix transcription factors in the mouse. *Mamm Genome.* 12, 416-425.
174. Furuyama, T.; Nakazawa, T.; Nakano, I. y Mori, N. (2000) Identification of the differential distribution patterns of mRNAs and consensus binding sequences for mouse DAF-16 homologues. *Biochem J.* 349, 629-634.
175. Jacobs, F. M. J.; van der Heide, L. P.; Wijchers, P. J. E. C.; Burbach, J. P. H.; Hoekman, M. F. M. y Smidt, M. P. (2003) FoxO6, a novel member of the FoxO class of transcription factors with distinct shuttling dynamics. *J Biol Chem.* 278, 35959-35967.
176. Greer, E. L. y Brunet, A. (2005) FOXO transcription factors at the interface between longevity and tumor suppression. *Oncogene.* 24, 7410-7425.
177. Van Der Heide, L. P.; Hoekman, M. F. M. y Smidt, M. P. (2004) The ins and outs of FoxO shuttling: mechanisms of FoxO translocation and transcriptional regulation. *Biochem J.* 380, 297-309.
178. Calnan, D. R. y Brunet, A. (2008) The FoxO code. *Oncogene.* 27, 2276-2288.

179. Brunet, A.; Bonni, A.; Zigmund, M. J.; Lin, M. Z.; Juo, P.; Hu, L. S.; Anderson, M. J.; Arden, K. C.; Blenis, J. y Greenberg, M. E. (1999) Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell*. 96, 857-868.
180. Kops, G. J. y Burgering, B. M. (1999) Forkhead transcription factors: new insights into protein kinase B (c-akt) signaling. *J Mol Med (Berl)*. 77, 656-665.
181. Yang, J. Y. y Hung, M. C. (2009) A new fork for clinical application: targeting forkhead transcription factors in cancer. *Clin Cancer Res*. 15, 752-757.
182. Yang, J. Y. y Hung, M. C. (2011) Deciphering the role of forkhead transcription factors in cancer therapy. *Curr Drug Targets*. 12, 1284-1290.
183. Biggs, W. H.; Meisenhelder, J.; Hunter, T.; Cavenee, W. K. y Arden, K. C. (1999) Protein kinase B/Akt-mediated phosphorylation promotes nuclear exclusion of the winged helix transcription factor FKHR1. *Proc Natl Acad Sci USA*. 96, 7421-7426.
184. Tzivion, G.; Dobson, M. y Ramakrishnan, G. (2011) FoxO transcription factors; Regulation by AKT and 14-3-3 proteins. *Biochim Biophys Acta*. 1813, 1938-1945.
185. Brenkman, A. B.; de Keizer, P. L.; van den Broek, N. J.; Jochemsen, A. G. y Burgering, B. M. (2008) Mdm2 induces mono-ubiquitination of FOXO4. *PLoS One*. 3, e2819.
186. Fu, W.; Ma, Q.; Chen, L.; Li, P.; Zhang, M.; Ramamoorthy, S.; Nawaz, Z.; Shimojima, T.; Wang, H.; Yang, Y.; Shen, Z.; Zhang, Y.; Zhang, X.; Nicosia, S. V.; Zhang, Y.; Pledger, J. W.; Chen, J. y Bai, W. (2009) MDM2 acts downstream of p53 as an E3 ligase to promote FOXO ubiquitination and degradation. *J Biol Chem*. 284, 13987-14000.
187. Huang, H.; Regan, K. M.; Wang, F.; Wang, D.; Smith, D. I.; van Deursen, J. M. y Tindall, D. J. (2005) Skp2 inhibits FOXO1 in tumor suppression through ubiquitin-mediated degradation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 102, 1649-1654.
188. Hu, M. C.; Lee, D. F.; Xia, W.; Golfman, L. S.; Ou-Yang, F.; Yang, J. Y.; Zou, Y.; Bao, S.; Hanada, N.; Saso, H.; Kobayashi, R. y Hung, M. C. (2004) IkappaB kinase promotes tumorigenesis through inhibition of forkhead FOXO3a. *Cell*. 117, 225-237.
189. Yang, J. Y.; Zong, C. S.; Xia, W.; Yamaguchi, H.; Ding, Q.; Xie, X.; Lang, J. Y.; Lai, C. C.; Chang, C. J.; Huang, W. C.; Huang, H.; Kuo, H. P.; Lee, D. F.; Li, L. Y.; Lien, H. C.; Cheng, X.; Chang, K. J.; Hsiao, C. D.; Tsai, F. J.; Tsai, C. H.; Sahin, A. A.; Muller, W. J.; Mills, G. B.; Yu, D.; Hortobagyi, G. N. y Hung, M. C. (2008) ERK promotes tumorigenesis by inhibiting FOXO3a via MDM2-mediated degradation. *Nature Cell Biol*. 10, 138-148.
190. Asada, S.; Daitoku, H.; Matsuzaki, H.; Saito, T.; Sudo, T.; Mukai, H.; Iwashita, S.; Kako, K.; Kishi, T.; Kasuya, Y. y Fukamizu, A. (2007) Mitogen-activated protein kinases, Erk and p38, phosphorylate and regulate Foxo1. *Cell Signal*. 19, 519-527.
191. Su, J. L.; Cheng, X.; Yamaguchi, H.; Chang, Y. W.; Hou, C. F.; Lee, D. F.; Ko, H. W.; Hua, K. T.; Wang, Y. N.; Hsiao, M.; Chen, P. B.; Hsu, J. M.; Bast, R. C. Jr.; Hortobagyi, G. N. y Hung, M. C. (2011) FOXO3a-Dependent Mechanism of E1A-Induced Chemosensitization. *Cancer Res*. 71, 6878-6887.

192. Tsai, W. B.; Chung, Y. M.; Zou, Y.; Park, S. H.; Xu, Z.; Nakayama, K.; Lin, S. H. y Hu, M. C. (2010) Inhibition of FOXO3 tumor suppressor function by betaTrCP1 through ubiquitin-mediated degradation in a tumor mouse model. *PLoS One*. 5, e11171.
193. Brunet, A.; Sweeney, L. B.; Sturgill, J. F.; Chua, K. F.; Greer, P. L.; Lin, Y.; Tran, H.; Ross, S. E.; Mostoslavsky, R.; Cohen, H. Y.; Hu, L. S.; Cheng, H.-L.; Jedrychowski, M. P.; Gygi, S. P.; Sinclair, D. A.; Alt, F. W. y Greenberg, M. E. (2004) Stress-dependent regulation of FOXO transcription factors by the SIRT1 deacetylase. *Science*. 303, 2011-2015.
194. Essers, M. A. G.; Weijzen, S.; de Vries-Smits, A. M. M.; Saarloos, I.; de Ruiter, N. D.; Bos, J. L. y Burgering, B. M. (2004) FOXO transcription factor activation by oxidative stress mediated by the small GTPase Ral and JNK. *EMBO J*. 23, 4802-4812.
195. Ho, K. K.; McGuire, V. A.; Koo, C. Y.; Muir, K. W.; de Olano, N.; Maifoshie, E.; Kelly, D. J.; McGovern, U. B.; Monteiro, L. J.; Gomes, A. R.; Nebreda, A. R.; Campbell, D. G.; Arthur, J. S. y Lam, E. W. (2012) Phosphorylation of FOXO3a on Ser-7 by p38 promotes its nuclear localization in response to doxorubicin. *J Biol Chem*. 287, 1545-1555.
196. Oh, S. W.; Mukhopadhyay, A.; Svrikapa, N.; Jiang, F.; Davis, R. J. y Tissenbaum, H. A. (2005) JNK regulates lifespan in *Caenorhabditis elegans* by modulating nuclear translocation of forkhead transcription factor/DAF-16. *Proc Natl Acad Sci USA*. 102, 4494-4499.
197. Wang, M. C.; Bohmann, D. y Jasper, H. (2005) JNK extends life span and limits growth by antagonizing cellular and organism-wide responses to insulin signaling. *Cell*. 121, 115-125.
198. Sunayama, J.; Tsuruta, F.; Masuyama, N. y Gotoh, Y. (2005) JNK antagonizes Akt-mediated survival signals by phosphorylating 14-3-3. *J Cell Biol*. 170, 295-304.
199. Tsuruta, F.; Sunayama, J.; Mori, Y.; Hattori, S.; Shimizu, S.; Tsujimoto, Y.; Yoshioka, K.; Masuyama, N. y Gotoh, Y. (2004) JNK promotes Bax translocation to mitochondria through phosphorylation of 14-3-3 proteins. *EMBO J*. 23, 1889-1899.
200. Cai, B. y Xia, Z. (2008) p38 MAP kinase mediates arsenite-induced apoptosis through FOXO3a activation and induction of Bim transcription. *Apoptosis*. 13, 803-810.
201. Puthanveetil, P.; Wang, Y.; Wang, F.; Kim, M. S.; Abrahani, A. y Rodrigues, B. (2010) The increase in cardiac pyruvate dehydrogenase kinase-4 after short-term dexamethasone is controlled by an Akt-p38-forkhead box other factor-1 signaling axis. *Endocrinology*. 151, 2306-2318.
202. Birkenkamp, K. U. y Coffey, P. J. (2003) FOXO transcription factors as regulators of immune homeostasis: molecules to die for? *J Immunol*. 171, 1623-1629.
203. Ramaswamy, S.; Nakamura, N.; Sansal, I.; Bergeron, L. y Sellers, W. R. (2002) A novel mechanism of gene regulation and tumor suppression by the transcription factor FKHR. *Cancer Cell*. 2, 81-91.
204. Almeida, M.; Han, L.; Martin-Millan, M.; O'Brien, C. A. y Manolagas, S. C. (2007) Oxidative stress antagonizes Wnt signaling in osteoblast precursors by diverting beta-

catenin from T cell factor- to forkhead box O-mediated transcription. *J Biol Chem.* 282, 27298-27305.

205. Essers, M. A. G.; de Vries-Smits, L. M.; Barker, N.; Polderman, P. E.; Burgering, B. M. y Korswagen, H. C. (2005) Functional interaction between beta-catenin and FOXO in oxidative stress signaling. *Science.* 308, 1181-1184.

206. Hoogeboom, D.; Essers, M. A. G.; Polderman, P. E.; Voets, E.; Smits, L. M. M. y Burgering, B. M. (2008) Interaction of FOXO with beta-catenin inhibits beta-catenin/T cell factor activity. *J Biol Chem.* 283, 9224-9230.

207. Fu, G. y Peng, C. (2011) Nodal enhances the activity of FoxO3a and its synergistic interaction with Smads to regulate cyclin G2 transcription in ovarian cancer cells. *Oncogene.* 30, 3953-3966.

208. Gomis, R. R.; Alarcón, C.; Nadal, C.; Van Poznak, C. y Massagué, J. (2006) C/EBPbeta at the core of the TGFbeta cytostatic response and its evasion in metastatic breast cancer cells. *Cancer Cell.* 10, 203-214.

209. Seoane, J.; Le, H. V.; Shen, L.; Anderson, S. A. y Massagué, J. (2004) Integration of Smad and forkhead pathways in the control of neuroepithelial and glioblastoma cell proliferation. *Cell.* 117, 211-223.

210. Huang, H. y Tindall, D. J. (2007) Dynamic FoxO transcription factors. *J Cell Sci.* 120, 2479-2487.

211. Accili, D. y Arden, K. C. (2004) FoxOs at the crossroads of cellular metabolism, differentiation and transformation. *Cell.* 117, 421-426.

212. Lagutina, I.; Conway, S. J.; Sublett, J. y Grosveld, G. C. (2002) Pax3-FKHR knock-in mice show developmental aberrations but do not develop tumors. *Mol Cell Biol.* 22, 7204-7216.

213. Maiese, K.; Chong, Z. Z.; Shang, Y. C. y Hou, J. (2008) Clever cancer strategies with FoxO transcription factors. *Cell Cycle.* 7, 3829-3839.

214. Cervello, M.; McCubrey, J. A.; Cusimano, A.; Lampiasi, N.; Azzolina, A. y Montalto, G. (2012) Targeted therapy for hepatocellular carcinoma: novel agents on the horizon. *Oncotarget.* 3, 236-260.

215. Chariot, A. (2009) The NF-kappaB-independent functions of IKK subunits in immunity and cancer. *Trends Cell Biol.* 19, 404-413.

216. Fabregat, I. (2009) Dysregulation of apoptosis in hepatocellular carcinoma cells. *World J Gastroenterol.* 15, 513-520.

217. Osaki, M.; Oshimura, M. y Ito, H. (2004) PI3K-Akt pathway: its functions and alterations in human cancer. *Apoptosis.* 9, 667-676.

218. Reddy, K. B.; Nabha, S. M. y Atanaskova, N. (2003) Role of MAP kinase in tumor progression and invasion. *Cancer Metastasis Rev.* 22, 395-403.

219. Shen, R. R. y Hahn, W. C. (2011) Emerging roles for the non-canonical IKKs in cancer. *Oncogene*. 30, 631-641.
220. Steelman, L. S.; Chappell, W. H.; Abrams, S. L.; Kempf, R. C.; Long, J.; Laidler, P.; Mijatovic, S.; Maksimovic-Ivanic, D.; Stivala, F.; Mazzarino, M. C.; Donia, M.; Fagone, P.; Malaponte, G.; Nicoletti, F.; Libra, M.; Milella, M.; Tafuri, A.; Bonati, A.; Bäsecke, J.; Cocco, L.; Evangelisti, C.; Martelli, A. M.; Montalto, G.; Cervello, M. y McCubrey, J. A. (2011) Roles of the Raf/MEK/ERK and PI3K/PTEN/Akt/mTOR pathways in controlling growth and sensitivity to therapy-implications for cancer and aging. *Aging (Albany NY)*. 3, 192-222.
221. Arden, K. C. (2006) Multiple roles of FOXO transcription factors in mammalian cells point to multiple roles in cancer. *Exp Gerontol*. 41, 709-717.
222. Potente, M.; Urbich, C.; Sasaki, K.; Hofmann, W. K.; Heeschen, C.; Aicher, A.; Kollipara, R.; DePinho, R. A.; Zeiher, A. M. y Dimmeler, S. (2005) Involvement of Foxo transcription factors in angiogenesis and postnatal neovascularization. *J Clin Invest*. 115, 2382-2392.
223. Delpuech, O.; Griffiths, B.; East, P.; Essafi, A.; Lam, E. W.; Burgering, B.; Downward, J. y Schulze, A. (2007) Induction of Mxi1-SR alpha by FOXO3a contributes to repression of Myc-dependent gene expression. *Mol Cell Biol*. 27, 4917-4930.
224. Li, Y.; Wang, Z.; Kong, D.; Murthy, S.; Dou, Q. P.; Sheng, S.; Reddy, G. P. y Sarkar, F. H. (2007) Regulation of FOXO3a/beta-catenin/GSK-3beta signaling by 3,3'-diindolylmethane contributes to inhibition of cell proliferation and induction of apoptosis in prostate cancer cells. *J Biol Chem*. 282, 21542-21550.
225. Modur, V.; Nagarajan, R.; Evers, B. M. y Milbrandt, J. (2002) FOXO proteins regulate tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand expression. Implications for PTEN mutation in prostate cancer. *J Biol Chem*. 277, 47928-47937.
226. Roy, S. K.; Chen, Q.; Fu, J.; Shankar, S. y Srivastava, R. K. (2011) Resveratrol inhibits growth of orthotopic pancreatic tumors through activation of FOXO transcription factors. *PLoS One*. 6, e25166.
227. Sunters, A.; Madureira, P. A.; Pomeranz, K. M.; Aubert, M.; Brosens, J. J.; Cook, S. J.; Burgering, B. M.; Coombes, R. C. y Lam, E. W. (2006) Paclitaxel-induced nuclear translocation of FOXO3a in breast cancer cells is mediated by c-Jun NH2-terminal kinase and Akt. *Cancer Res*. 66, 212-220.
228. Yang, J. Y.; Xia, W. y Hu, M. C. (2006) Ionizing radiation activates expression of FOXO3a, Fas ligand, and Bim, and induces cell apoptosis. *Int J Oncol*. 29, 643-648.
229. Isaacs, A. y Lindenmann, J. (1957) Virus interference. I. The interferon. *Proc Roy Soc London*. B147, 258-273.
230. Pestka, S.; Krause, C. D. y Walter, M. R. (2004) Interferons, interferon-like cytokines and their receptors. *Immunol Rev*. 202, 8-32.
231. Bromberg, J. y Darnell, J. E. Jr. (2000) The role of STATs in transcriptional control and their impact on cellular function. *Oncogene*. 19, 2468-2473.

232. Pestka, S.; Langer, J. A.; Zoon, K. C. y Samuel, C. E. (1987) Interferons and their actions. *Annu Rev Biochem.* 56, 727-777.
233. Gutterman, J. U. (1994) Cytokine Therapeutics: Lessons from Interferon. *Proc Natl Acad Sci USA.* 91, 1198-1205.
234. Friedman, R. M. (2008) Clinical uses of interferons. *Br J Clin Pharmacol.* 65, 158-162.
235. Borden, E. C.; Sen, G. C.; Uze, G.; Silverman, R. H.; Ransohoff, R. M.; Foster, G. R. y Stark, G. R. (2007) Interferons at age 50: past, current and future impact on biomedicine. *Nat Rev Drug Discov.* 6, 975-990.
236. Decker, T.; Müller, M. y Stockinger, S. (2005) The yin and yang of type I interferon activity in bacterial infection. *Nat Rev Immunol.* 5, 675-687.
237. Plataniotis, L. C. (2005) Mechanisms of type-I- and type-II-interferon-mediated signalling. *Nat Rev Immunol.* 5, 375-386.
238. Ferrantini, M.; Capone, I. y Belardelli, F. (2007) Interferon-alpha and cancer: mechanisms of action and new perspectives of clinical use. *Biochimie.* 89, 884-893.
239. Jonasch, E. y Haluska, F. G. (2001) Interferon in oncological practice: review of interferon biology, clinical applications, and toxicities. *Oncologist.* 6, 34-55.
240. Wadler, S. y Schwartz, E. L. (1997) New Advances in Interferon Therapy of Cancer. *Oncologist.* 2, 254-267.
241. Hagiwara, S.; Sakurai, T.; Takita, M.; Ueshima, K.; Minami, Y.; Inoue, T.; Yada, N.; Kitai, S.; Nagai, T.; Hayaishi, S.; Arizumi, T.; Nishida, N. y Kudo, M. (2012) Risk of Hepatocellular Carcinoma Development in Cases of Hepatitis C Treated by Long-Term, Low-Dose PEG-IFN α -2a. *Dig Dis.* 30, 561-567.
242. Kim, B. K.; Han, K. H. y Ahn, S. H. (2011) Prevention of hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis B virus infection. *Oncology.* 81, 41-49.
243. Kimer, N.; Dahl, E. K.; Gluud, L. L. y Krag, A. (2012) Antiviral therapy for prevention of hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis C: systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials. *BMJ Open.* 2, e001313.
244. Masuzaki, R.; Yoshida, H. y Omata, M. (2010) Interferon reduces the risk of hepatocellular carcinoma in hepatitis C virus-related chronic hepatitis/liver cirrhosis. *Oncology.* 78, 17-23.
245. Miyatake, H.; Kobayashi, Y.; Iwasaki, Y.; Nakamura, S.; Ohnishi, H.; Kuwaki, K.; Toshimori, J.; Hagihara, H.; Nouse, K. y Yamamoto, K. (2012) Effect of previous interferon treatment on outcome after curative treatment for hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma. *Dig Dis Sci.* 57, 1092-1101.
246. Ogawa, E.; Furusyo, N.; Kajiwar, E.; Takahashi, K.; Nomura, H.; Maruyama, T.; Tanabe, Y.; Satoh, T.; Nakamura, M.; Kotoh, K.; Azuma, K.; Dohmen, K.; Shimoda, S.; Hayashi, J. y The Kyushu University Liver Disease Study (KULDS) Group. (2012) Efficacy

of pegylated interferon alpha-2b and ribavirin treatment on the risk of hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis C: A prospective, multicenter study. *J Hepatol.* S0168-8278, 00816-1.

247. Qu, L. S.; Chen, H.; Kuai, X. L.; Xu, Z. F.; Jin, F. y Zhou, G. X. (2012) Effects of interferon therapy on development of hepatocellular carcinoma in patients with hepatitis C-related cirrhosis: A meta-analysis of randomized controlled trials. *Hepatol Res.* 42, 782-789.

248. Takeyasu, M.; Akuta, N.; Suzuki, F.; Seko, Y.; Kawamura, Y.; Sezaki, H.; Suzuki, Y.; Hosaka, T.; Kobayashi, M.; Kobayashi, M.; Arase, Y.; Ikeda, K. y Kumada, H. (2012) Long-term interferon monotherapy reduces the risk of HCV-associated hepatocellular carcinoma. *J Med Virol.* 84, 1199-1207.

249. Wong, G. L.; Yiu, K. K.; Wong, V. W.; Tsoi, K. K. y Chan, H. L. (2010) Meta-analysis: reduction in hepatic events following interferon-alfa therapy of chronic hepatitis B. *Aliment Pharmacol Ther.* 32, 1059-1068.

250. Yang, Y.-F.; Zhao, W.; Zhong, Y.-D.; Xia, H.-M.; Shen, L. y Zhang, N. (2009) Interferon therapy in chronic hepatitis B reduces progression to cirrhosis and hepatocellular carcinoma: a meta-analysis. *J Viral Hepat.* 16, 265-271.

251. Lo, C. M.; Liu, C. L.; Chan, S. C.; Lam, C. M.; Poon, R. T.; Ng, I. O.; Fan, S. T. y Wong, J. (2007) A randomized, controlled trial of postoperative adjuvant interferon therapy after resection of hepatocellular carcinoma. *Ann Surg.* 245, 831-42.

252. Shimomura, S. y Nishiguchi, S. (2012) Anticarcinogenic impact of interferon therapy on the progression of hepatocellular carcinoma in patients with chronic viral infection. *Hepatol Res.* 42, 22-32.

253. Testino, G.; Ansaldi, F.; Andorno, E.; Ravetti, G. L.; Ferro, C.; De Iaco, F.; Icardi, G. y Valente, U. (2002) Interferon therapy does not prevent hepatocellular carcinoma in HCV compensated cirrhosis. *Hepatology.* 49, 1636-1638.

254. Valla, D. C.; Chevallier, M.; Marcellin, P.; Payen, J. L.; Trepo, C.; Fonck, M.; Bourliere, M.; Boucher, E.; Miquet, J. P.; Parlier, D.; Lemonnier, C. y Opolon, P. (1999) Treatment of hepatitis C virus-related cirrhosis: a randomized, controlled trial of interferon alfa-2b versus no treatment. *Hepatology.* 29, 1870-1875.

255. Zhang, C. H.; Xu, G. L.; Jia, W. D.; Li, J. S.; Ma, J. L. y Ge, Y. S. (2011) Effects of interferon treatment on development and progression of hepatocellular carcinoma in patients with chronic virus infection: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Int J Cancer.* 129, 1254-1264.

256. de Luján Alvarez, M.; Cerliani, J. P.; Monti, J.; Carnovale, C.; Ronco, M. T.; Pisani, G.; Lugano, M. C. y Carrillo, M. C. (2002) The in vivo apoptotic effect of interferon alfa-2b on rat preneoplastic liver involves Bax protein. *Hepatology.* 35, 824-833.

257. de Luján Alvarez, M.; Ronco, M. T.; Ochoa, J. E.; Monti, J. A.; Carnovale, C. E.; Pisani, G. B.; Lugano, M. C. y Carrillo, M. C. (2004) Interferon alpha-induced apoptosis on rat preneoplastic liver is mediated by hepatocytic transforming growth factor beta(1). *Hepatology.* 40, 394-402.

258. Parody, J. P.; Alvarez, M. L.; Quiroga, A. D.; Ceballos, M. P.; Frances, D. E.; Pisani, G. B.; Pellegrino, J. M.; Carnovale, C. E.; Carrillo, M. C. (2010) Attenuation of the Wnt/beta-catenin/TCF pathway by in vivo interferon alpha2b (IFN-alpha2b) treatment in preneoplastic rat livers. *Growth Factors*. 28, 166-177.
259. Brown, K. S. (2006) Chemotherapy and other systemic therapies for hepatocellular carcinoma and liver metastases. *Semin Intervent Radiol*. 23, 99-108.
260. Chen, L. T.; Chen, M. F.; Li, L. A.; Lee, P. H.; Jeng, L. B.; Lin, D. Y.; Wu, C. C.; Mok, K. T.; Chen, C. L.; Lee, W. C.; Chau, G. Y.; Chen, Y. S.; Lui, W. Y.; Hsiao, C. F.; Whang-Peng, J.; Chen, P. J.; Disease Committee of Adjuvant Therapy for Postoperative Hepatocellular Carcinoma; Taiwan Cooperative Oncology Group. y National Health Research Institutes; Zhunan, Taiwan. (2012) Long-term results of a randomized, observation-controlled, phase III trial of adjuvant interferon Alfa-2b in hepatocellular carcinoma after curative resection. *Ann Surg*. 255, 8-17.
261. Okita, K.; Yamasaki, T.; Hamabe, S.; Saeki, I.; Harima, Y.; Terai, S. y Sakaida, I. (2012) Hepatic Arterial Infusion Chemotherapy in Combination with Pegylated Interferon- α -2b for Advanced Hepatocellular Carcinoma. *Hepatogastroenterology*. 59, 533-537.
262. Nagano, H. (2010) Treatment of advanced hepatocellular carcinoma: intraarterial infusion chemotherapy combined with interferon. *Oncology*. 78, 142-147.
263. Sakae, M.; Kubo, S.; Takemura, S.; Sakata, C.; Uenishi, T.; Kodai, S.; Shinkawa, H.; Urata, Y.; Ohata, K.; Kaneda, K.; Nishioka, T.; Nozawa, A. y Suehiro, S. (2012) Effect of interferon therapy on first and second recurrence after resection of hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma. *Hepatol Res*. 42, 564-573.
264. Sakaguchi, Y.; Kudo, M.; Fukunaga, T.; Minami, Y.; Chung, H. y Kawasaki, T. (2005) Low-dose, long-term, intermittent interferon-alpha-2b therapy after radical treatment by radiofrequency ablation delays clinical recurrence in patients with hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma. *Intervirol*. 48, 64-70.
265. Shen, Y. C.; Hsu, C.; Chen, L. T.; Cheng, C. C.; Hu, F. C. y Cheng, A. L. (2010) Adjuvant interferon therapy after curative therapy for hepatocellular carcinoma (HCC): a metaregression approach. *J Hepatol*. 52, 889-894.
266. Zhong, J. H.; Li, H.; Li, L. Q.; You, X. M.; Zhang, Y.; Zhao, Y. N.; Liu, J. Y.; Xiang, B. D. y Wu, G. B. (2012) Adjuvant therapy options following curative treatment of hepatocellular carcinoma: a systematic review of randomized trials. *Eur J Surg Oncol*. 38, 286-295.
267. Kasai, K.; Ushio, A.; Kasai, Y.; Sawara, K.; Miyamoto, Y.; Oikawa, K.; Kuroda, H.; Takikawa, Y. y Suzuki, K. (2011) Combination therapy of intra-arterial 5-fluorouracil and systemic pegylated interferon α -2b for advanced hepatocellular carcinoma. *Int J Clin Oncol*. 16, 221-229.
268. Kasai, K.; Ushio, A.; Kasai, Y.; Sawara, K.; Miyamoto, Y.; Oikawa, K.; Kuroda, H.; Takikawa, Y. y Suzuki, K. (2012) Therapeutic efficacy of combination therapy with intra-arterial 5-fluorouracil and systemic pegylated interferon α -2b for advanced hepatocellular carcinoma with portal venous invasion. *Cancer*. 118, 3302-3310.

269. Nagano, H.; Kobayashi, S.; Marubashi, S.; Wada, H.; Eguchi, H.; Tanemura, M.; Tomimaru, Y.; Umeshita, K.; Doki, Y. y Mori, M. (2013) Combined IFN- α and 5-FU treatment as a postoperative adjuvant following surgery for hepatocellular carcinoma with portal venous tumor thrombus. *Exp Ther Med.* 5, 3-10.
270. Obi, S.; Yoshida, H.; Toune, R.; Unuma, T.; Kanda, M.; Sato, S.; Tateishi, R.; Teratani, T.; Shiina, S. y Omata, M. (2006) Combination therapy of intraarterial 5-fluorouracil and systemic interferon-alpha for advanced hepatocellular carcinoma with portal venous invasion. *Cancer.* 106, 1990-1997.
271. Uchino, K.; Obi, S.; Tateishi, R.; Sato, S.; Kanda, M.; Sato, T.; Arano, T.; Enooku, K.; Goto, E.; Masuzaki, R.; Nakagawa, H.; Asaoka, Y.; Kondo, Y.; Yamashiki, N.; Goto, T.; Shiina, S.; Omata, M.; Yoshida, H. y Koike, K. (2012) Systemic combination therapy of intravenous continuous 5-fluorouracil and subcutaneous pegylated interferon alfa-2a for advanced hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol.* 47, 1152-1159.
272. Fujioka, N.; Ariyasu, T.; Arai, N. ; Ariyasu, H.; Yamamoto, S.; Tanimoto, T.; Ikegami, H.; Ikeda, M.; Ohta, T.; Fukuda, S. y Kurimoto, M. (2006) Role of p53 in the inhibitory effects of interferon-alpha subtypes on proliferation of hepatocellular carcinoma cells. *Biomed Res.* 27, 219-226.
273. Hagiwara, S.; Kudo, M.; Nakatani, T.; Sakaguchi, Y.; Nagashima, M.; Fukuta, N.; Kimura, M.; Hayakawa, S. y Munakata, H. (2007) Combination therapy with PEG-IFN-alpha and 5-FU inhibits HepG2 tumour cell growth in nude mice by apoptosis of p53. *Br J Cancer.* 97, 1532-1537.
274. Herzer, K.; Hofmann, T. G.; Teufel, A.; Schimanski, C. C.; Moehler, M.; Kanzler, S.; Schulze-Bergkamen, H. y Galle, P. R. (2009) IFN-alpha-induced apoptosis in hepatocellular carcinoma involves promyelocytic leukemia protein and TRAIL independently of p53. *Cancer Res.* 69, 855-862.
275. Murata, M.; Nabeshima, S.; Kikuchi, K.; Yamaji, K.; Furusyo, N. y Hayashi, J. (2006) A comparison of the antitumor effects of interferon-alpha and beta on human hepatocellular carcinoma cell lines. *Cytokine.* 33, 121-128.
276. Murphy, D.; Detjen, K. M.; Welzel, M.; Wiedenmann, B. y Rosewicz S. (2001) Interferon-alpha delays S-phase progression in human hepatocellular carcinoma cells via inhibition of specific cyclin-dependent kinases. *Hepatology.* 33, 346-356.
277. Sasaki, S.; Ishida, T.; Toyota, M.; Ota, A.; Suzuki, H.; Takaoka, A.; Yasui, H.; Yamamoto, H.; Takagi, H.; Maeda, M.; Seito, T.; Tsujisaki, M.; Shinomura, Y. y Imai, K. (2011) Interferon- α/β and anti-fibroblast growth factor receptor 1 monoclonal antibody suppress hepatic cancer cells in vitro and in vivo. *PLoS One.* 6, e19618.
278. Schlosser, S. F.; Schuler, M.; Berg, C. P.; Lauber, K.; Schulze-Osthoff, K.; Schmahl, F. W. y Wesselborg, S. (2003) Ribavirin and alpha interferon enhance death receptor-mediated apoptosis and caspase activation in human hepatoma cells. *Antimicrob Agents Chemother.* 47, 1912-1921.
279. Wang, L.; Jia, D.; Duan, F.; Sun, Z.; Liu, X.; Zhou, L.; Sun, L.; Ren, S.; Ruan, Y. y Gu, J. (2012) Combined anti-tumor effects of IFN- α and sorafenib on hepatocellular carcinoma in vitro and in vivo. *Biochem Biophys Res Commun.* 422, 687-692.

280. Wang, C. J.; Xiao, C. W.; You, T. G.; Zheng, Y. X.; Gao, W.; Zhou, Z. Q.; Chen, J.; Xue, X. B.; Fan, J. y Zhang, H. (2012) Interferon-alpha enhances antitumor activities of oncolytic adenovirus-mediated IL-24 expression in hepatocellular carcinoma. *Mol Cancer*. 11, 31.
281. Yin, H.; Xie, F.; Zhang, J.; Yang, Y.; Deng, B.; Sun, J.; Wang, Q.; Qu, X. y Mao, H. (2011) Combination of interferon- α and 5-fluorouracil induces apoptosis through mitochondrial pathway in hepatocellular carcinoma in vitro. *Cancer Lett*. 306, 34-42.
282. Miyazono, K.; Hellmann, U.; Wernstedt, C. y Heldin, C. H. (1988) Latent high molecular weight complex of transforming growth factor- β 1. Purification from human platelets and structural characterization. *J Biol Chem*. 263, 6407-6415.
283. De Duve, C.; Pressman, B. C.; Gianetto, R.; Wattiaux, R. y Appelmans, F. (1955) Tissue fractionation studies. 6. Intracellular distribution patterns of enzymes in rat-liver tissue. *Biochem J*. 60, 604-617.
284. Lowry, O. H.; Rosebrough, N. J.; Farr, A. L. y Randall, R. J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 193, 265-275.
285. Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227, 680-685.
286. Fukuda, K.; Kawata, S.; Tamura, S.; Matsuda, Y.; Inui, Y.; Igura, T.; Inoue, S.; Kudara, T. y Matsuzawa, Y. (1998) Altered regulation of Src tyrosine kinase by transforming growth factor beta1 in a human hepatoma cell line. *Hepatology*. 28, 796-804.
287. Matsuzaki, K.; Date, M.; Furukawa, F.; Tahashi, Y.; Matsushita, M.; Sugano, Y.; Yamashiki, N.; Nakagawa, T.; Seki, T.; Nishizawa, M.; Fujisawa, J. y Inoue, K. (2000) Regulatory mechanisms for transforming growth factor beta as an autocrine inhibitor in human hepatocellular carcinoma: implications for roles of smads in its growth. *Hepatology*. 32, 218-227.
288. Alvarez, M. de L.; Quiroga, A. D.; Parody, J. P.; Ronco, M. T.; Francés, D. E.; Carnovale, C. E. y Carrillo, M. C. (2009) Cross-talk between IFN-alpha and TGF-beta1 signaling pathways in preneoplastic rat liver. *Growth Factors*. 27, 1-11.
289. Balasubramanian, V.; Murugaiyan, G.; Shukla, R.; Bhonde, R. R. y Nalini, N. (2007) Leptin downregulates ethanol-induced secretion of proinflammatory cytokines and growth factor. *Cytokine*. 37, 96-100.
290. Mouri, H.; Sakaguchi, K.; Sawayama, T.; Senoh, T.; Ohta, T.; Nishimura, M.; Fujiwara, A.; Terao, M.; Shiratori, Y. y Tsuji, T. (2002) Suppressive effects of transforming growth factor-beta1 produced by hepatocellular carcinoma cell lines on interferon-gamma production by peripheral blood mononuclear cells. *Acta Med Okayama*. 56, 309-315.
291. Naryzhny, S. N. (2008) Proliferating cell nuclear antigen: a proteomics view. *Cell Mol Life Sci*. 65, 3789-3808.
292. Zimmermann, K. C. y Green, D. R. (2001) How cells die: apoptosis pathways. *J Allergy Clin Immunol*. 108, S99-S103.

293. Okada, H. y Mak, T. W. (2004) Pathways of apoptotic and non-apoptotic death in tumour cells. *Nat Rev Cancer*. 4, 592-603.
294. Goldstein, J. C.; Waterhouse, N. J.; Juin, P.; Evan, G. I. y Green, D. R. (2000) The coordinate release of cytochrome c during apoptosis is rapid, complete and kinetically invariant. *Nat Cell Biol*. 2, 156-162.
295. Green, D. R. y Reed, J. C. (1998) Mitochondria and apoptosis. *Science*. 281, 1309-1312.
296. Huber, B. E.; Wirth, P. J. y Newbold, J. E. (1991) Effects of human lymphoblastoid interferon on proliferation, gene expression and tumourigenicity of human hepatoma cell lines. *Drugs Exp Clin Res*. 17, 281-291.
297. Fan, G.; Ma, X.; Kren, B. T. y Steer, C. J. (2002) Unbound E2F modulates TGF-beta1-induced apoptosis in HuH-7 cells. *J Cell Sci*. 115, 3181-3191.
298. Foser, S.; Redwanz, I.; Ebeling, M.; Heizmann, C. W. y Certa, U. (2006) Interferon-alpha and transforming growth factor-beta co-induce growth inhibition of human tumor cells. *Cell Mol Life Sci*. 63, 2387-2396.
299. Carruba, G.; Cervello, M.; Miceli, M. D.; Farruggio, R.; Notarbartolo, M.; Virruso, L.; Giannitrapani, L.; Gambino, R.; Montalto, G. y Castagnetta, L. (1999) Truncated form of beta-catenin and reduced expression of wild-type catenins feature HepG2 human liver cancer cells. *Ann N Y Acad Sci*. 886, 212-216.
300. Wei, W.; Chua, M. S.; Grepper, S. y So, S. K. (2011) Soluble Frizzled-7 receptor inhibits Wnt signaling and sensitizes hepatocellular carcinoma cells towards doxorubicin. *Mol Cancer*. 11, 10-16.
301. Li, W.; Huang, X.; Tong, H.; Wang, Y.; Zhang, T.; Wang, W.; Dai, L.; Li, T. ; Lin, S. y Wu, H. (2012) Comparison of the regulation of β -catenin signaling by type I, type II and type III interferons in hepatocellular carcinoma cells. *PLoS One*. 7, e47040.
302. Thompson, M. D.; Dar, M. J. y Monga, S. P. (2011) Pegylated interferon alpha targets Wnt signaling by inducing nuclear export of b-catenin. *J Hepatol*. 54, 506-512.
303. Dong, Y.; Drissi, H.; Chen, M.; Chen, D.; Zuscik, M. J.; Schwarz, E. M. y O'Keefe, R. J. (2005) Wnt-mediated regulation of chondrocyte maturation: modulation by TGF-beta. *J Cell Biochem*. 95, 1057-1068.
304. Vander Lugt, B.; Beck, Z. T.; Fuhlbrigge, R. C.; Hacohen, N.; Campbell, J. J. y Boes, M. (2011) TGF- β suppresses β -catenin-dependent tolerogenic activation program in dendritic cells. *PLoS One*. 6, e20099.
305. Willert, J.; Epping, M.; Pollack, J. R.; Brown, P. O. y Nusse, R. (2002) A transcriptional response to Wnt protein in human embryonic carcinoma cells. *BMC Dev Biology*. 2, 8.
306. Gurney, A.; Axelrod, F.; Bond, C. J.; Cain, J.; Chartier, C.; Donigan, L.; Fischer, M.; Chaudhari, A.; Ji, M.; Kapoun, A. M.; Lam, A.; Lazetic, S.; Ma, S.; Mitra, S.; Park, I. K.; Pickell, K.; Sato, A.; Satyal, S.; Stroud, M.; Tran, H.; Yen, W. C.; Lewicki, J. y Hoey, T.

- (2012) Wnt pathway inhibition via the targeting of Frizzled receptors results in decreased growth and tumorigenicity of human tumors. *Proc Natl Acad Sci USA*. 109, 11717-11722.
307. Kemp, C. R.; Willems, E.; Wawrzak, D.; Hendrickx, M.; Agbor Agbor, T. y Leyns, L. (2007) Expression of Frizzled5, Frizzled7, and Frizzled10 during early mouse development and interactions with canonical Wnt signaling. *Dev Dyn*. 236, 2011-2019.
308. Liu, X.; Yang, Y.; Zhang, X.; Xu, S.; He, S.; Huang, W. y Roberts, M. S. (2010) Compound Astragalus and Salvia miltiorrhiza extract inhibits cell invasion by modulating transforming growth factor-beta/Smad in HepG2 cell. *J Gastroenterol Hepatol*. 25, 420-426.
309. Carthy, J. M.; Garmaroudi, F. S.; Luo, Z. y McManus, B. M. (2011) Wnt3a induces myofibroblast differentiation by upregulating TGF- β signaling through SMAD2 in a β -catenin-dependent manner. *PLoS One*. 6, e19809.
310. Schohl, A. y Fagotto, F. (2002) Beta-catenin MAPK and Smad signaling during early Xenopus development. *Development*. 129, 37-52.
311. Carre, A. L.; James, A. W.; MacLeod, L.; Kong, W.; Kawai, K.; Longaker, M. T. y Lorenz, H. P. (2010) Interaction of wingless protein (Wnt), transforming growth factor-beta1, and hyaluronan production in fetal and postnatal fibroblasts. *Plast Reconstr Surg*. 125, 74-88.
312. Chen, S.; McLean, S.; Carter, D. E. y Leask, A. (2007) The gene expression profile induced by Wnt3a in NIH 3T3 fibroblasts. *J Cell Commun Signal*. 1, 175-183.
313. Kim, T. H.; Kim, S. H.; Seo, J. Y.; Chung, H.; Kwak, H. J.; Lee, S. K.; Yoon, H. J.; Shin, D. H.; Park, S. S. y Sohn, J. W. (2011) Blockade of the Wnt/ β -catenin pathway attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Tohoku J Exp Med*. 223, 45-54.
314. Javelaud, D. y Mauviel, A. (2005) Crosstalk mechanisms between the mitogen-activated protein kinase pathways and Smad signaling downstream of TGF-beta: implications for carcinogenesis. *Oncogene*. 24, 5742-5750.
315. Fuxe, J.; Vincent, T. y Garcia de Herreros, A. (2010) Transcriptional crosstalk between TGF- β and stem cell pathways in tumor cell invasion: role of EMT promoting Smad complexes. *Cell Cycle*. 9, 2363-2374.
316. Matsuzaki, K.; Date, M.; Furukawa, F.; Tahashi, Y.; Matsushita, M.; Sakitani, K.; Yamashiki, N.; Seki, T.; Saito, H.; Nishizawa, M.; Fujisawa, J. y Inoue, K. (2000) Autocrine stimulatory mechanism by transforming growth factor beta in human hepatocellular carcinoma. *Cancer Res*. 60, 1394-1402.
317. Mikula, M.; Proell, V.; Fischer, A. N. y Mikulits, W. (2006) Activated hepatic stellate cells induce tumor progression of neoplastic hepatocytes in a TGF-beta dependent fashion. *J Cell Physiol*. 209, 560-567.
318. Mishra, B.; Tang, Y.; Katuri, V.; Fleury, T.; Said, A. H.; Rashid, A.; Jogunoori, W. y Mishra, L. (2004) Loss of cooperative function of transforming growth factor-beta signaling proteins, smad3 with embryonic liver fodrin, a beta-spectrin, in primary biliary cirrhosis. *Liver Int*. 24, 637-645.

319. Yamazaki, K.; Masugi, Y. y Sakamoto, M. (2011) Molecular pathogenesis of hepatocellular carcinoma: altering transforming growth factor- β signaling in hepatocarcinogenesis. *Dig Dis.* 29, 284-288.
320. Devereux, T. R.; Anna, C. H.; Foley, J. F.; White, C. M.; Sills, R. C. y Barrett, J. C. (1999) Mutation of beta-catenin is an early event in chemically induced mouse hepatocellular carcinogenesis. *Oncogene.* 18, 4726-4733.
321. Feitelson, M. A.; Sun, B.; Satiroglu Tufan, N. L.; Liu, J.; Pan, J. y Lian, Z. (2002) Genetic mechanisms of hepatocarcinogenesis. *Oncogene.* 21, 2593-2604.
322. Wang, Q. M.; Yang, K. M.; Zhou, H. Y.; Yu, Z. H.; Li, X. y Yang, H. J. (2006) Role of beta-catenin in hepatocarcinogenesis of rats. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int.* 5, 85-89.
323. Franceschini, L.; Realdon, S.; Marcolongo, M.; Mirandola, S.; Bortoletto, G. y Alberti, A. (2011) Reciprocal interference between insulin and interferon-alpha signaling in hepatic cells: a vicious circle of clinical significance? *Hepatology.* 54, 484-494.
324. Inamura, K.; Matsuzaki, Y.; Uematsu, N.; Honda, A.; Tanaka, N. y Uchida, K. (2005) Rapid inhibition of MAPK signaling and anti-proliferation effect via JAK/STAT signaling by interferon-alpha in hepatocellular carcinoma cell lines. *Biochim Biophys Acta.* 1745, 401-410.
325. Dal Col, J.; Mastorci, K.; Faè, D. A.; Muraro, E.; Martorelli, D.; Inghirami, G. y Dolcetti, R. (2012) Retinoic acid/alpha-interferon combination inhibits growth and promotes apoptosis in mantle cell lymphoma through Akt-dependent modulation of critical targets. *Cancer Res.* 72, 1825-1835.
326. Li, C.; Chi, S.; He, N.; Zhang, X.; Guicherit, O.; Wagner, R.; Tying, S. y Xie, J. (2004) IFNalpha induces Fas expression and apoptosis in hedgehog pathway activated BCC cells through inhibiting Ras-Erk signaling. *Oncogene.* 23, 1608-1617.
327. Romerio, F.; Riva, A. y Zella, D. (2000) Interferon-alpha2b reduces phosphorylation and activity of MEK and ERK through a Ras/Raf-independent mechanism. *Br J Cancer.* 83, 532-538.
328. Romerio, F. y Zella, D. (2002) MEK and ERK inhibitors enhance the anti-proliferative effect of interferon-alpha2b. *FASEB J.* 16, 1680-1682.
329. Zhao, L. J.; Hua, X.; He, S. F.; Ren, H. y Qi, Z. T. (2011) Interferon alpha regulates MAPK and STAT1 pathways in human hepatoma cells. *Virology.* 8, 157.
330. Zhou, Z.; Hamming, O. J.; Ank, N.; Paludan, S. R.; Nielsen, A. L. y Hartmann, R. (2007) Type III interferon (IFN) induces a type I IFN-like response in a restricted subset of cells through signaling pathways involving both the Jak-STAT pathway and the mitogen-activated protein kinases. *J Virol.* 81, 7749-7758.
331. Caraglia, M.; Abbruzzese, A.; Leardi, A.; Pepe, S.; Budillon, A.; Baldassare, G.; Selleri, C.; Lorenzo, S. D.; Fabbrocini, A.; Giuberti, G.; Vitale, G.; Lupoli, G.; Bianco, A. R. y Tagliaferri, P. (1999) Interferon-alpha induces apoptosis in human KB cells through a stress-dependent mitogen activated protein kinase pathway that is antagonized by epidermal growth factor. *Cell Death Differ.* 6, 773-780.

332. Chen, J.; Panchanathan, R. y Choubey, D. (2008) Stimulation of T cells up-regulates expression of *Ifi202*, an interferon-inducible lupus susceptibility gene, through activation of JNK/c-Jun pathway. *Immunol Lett.* 118, 13-20.
333. Goh, K. C.; Haque, S. J. y Williams, B. R. (1999) p38 MAP kinase is required for STAT1 serine phosphorylation and transcriptional activation induced by interferons. *EMBO J.* 18, 5601-5608.
334. Huang, X.; Yang, N.; Ou, X.; Li, D.; Wang, Z.; Xie, Q.; Chen, Y.; Lin, H.; Yin, G. y Wen, F. (2008) Sequential activation of protein kinase C delta and JNK is required for interferon-alpha-induced expression of IFIT4. *Cell Signal.* 20, 112-119.
335. Li, Y.; Sassano, A.; Majchrzak, B.; Deb, D. K.; Levy, D. E.; Gaestel, M.; Nebreda, A. R.; Fish, E. N. y Plataniias, L. C. (2004) Role of p38alpha Map kinase in Type I interferon signaling. *J Biol Chem.* 279, 970-979.
336. Mayer, I. A.; Verma, A.; Grumbach, I. M.; Uddin, S.; Lekmine, F.; Ravandi, F.; Majchrzak, B.; Fujita, S.; Fish, E. N. y Plataniias, L. C. (2001) The p38 MAPK pathway mediates the growth inhibitory effects of interferon-alpha in BCR-ABL-expressing cells. *J Biol Chem.* 276, 28570-28577.
337. Quiroga, A. D.; de Lujan Alvarez, M.; Parody, J. P.; Ronco, M. T.; Carnovale, C. E. y Carrillo, M. C. (2009) Interferon-alpha2b (IFN-alpha2b)-induced apoptosis is mediated by p38 MAPK in hepatocytes from rat preneoplastic liver via activation of NADPH oxidase. *Growth Factors.* 27, 214-227.
338. Yanase, N.; Hayashida, M.; Kanetaka-Naka, Y.; Hoshika, A. y Mizuguchi, J. (2012) PKC- δ mediates interferon- α -induced apoptosis through c-Jun NH₂-terminal kinase activation. *BMC Cell Biol.* 13, 7.
339. Cross, D. A.; Alessi, D. R.; Cohen, P.; Andjelkovich, M. y Hemmings, B. A. (1995) Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature.* 378, 785-789.
340. Ding, Q.; Xia, W.; Liu, J. C.; Yang, J. Y.; Lee, D. F.; Xia, J.; Bartholomeusz, G.; Li, Y.; Pan, Y.; Li, Z.; Bargou, R. C.; Qin, J.; Lai, C. C.; Tsai, F. J.; Tsai, C. H. y Hung, M. C. (2005) Erk associates with and primes GSK-3beta for its inactivation resulting in upregulation of beta-catenin. *Mol Cell.* 19, 159-170.
341. Fang, D.; Hawke, D.; Zheng, Y.; Xia, Y.; Meisenhelder, J.; Nika, H.; Mills, G. B.; Kobayashi, R.; Hunter, T. y Lu, Z. (2007) Phosphorylation of beta-catenin by AKT promotes beta-catenin transcriptional activity. *J Biol Chem.* 282, 11221-11229.
342. Krejci, P.; Aklian, A.; Kaucka, M.; Sevcikova, E.; Prochazkova, J.; Masek, J. K.; Mikolka, P.; Pospisilova, T.; Spoustova, T.; Weis, M.; Paznekas, W. A.; Wolf, J. H.; Gutkind, J. S.; Wilcox, W. R.; Kozubik, A.; Jabs, E. W.; Bryja, V.; Salazar, L.; Vesela, I. y Balek, L. (2012) Receptor tyrosine kinases activate canonical WNT/ β -catenin signaling via MAP kinase/LRP6 pathway and direct β -catenin phosphorylation. *PLoS One.* 7, e35826.

Agradecimientos

Quiero expresar mi agradecimiento a la Dra. María Cristina Carrillo por haberme dirigido en la realización de este trabajo de tesis, por su confianza en mí, su estímulo, ayuda y generosidad.

A mis compañeros de mesada: Lu, Juan y Ari, por toda su ayuda, enseñanza y apoyo, pero sobre todo por su amistad. Esto no hubiera podido ser posible sin ustedes!. A Laurita por su carisma y su buena onda.

A la Dra. Cristina Carnovale por su interés y disposición para colaborar en todo momento. Al resto del grupo: Dani, Tere y Pao, por tanta ayuda y buena onda...y por salvarme con un par de reactivos!.

A mis vecinas de la mesada de enfrente: Anita y Stella, por tantas charlas, risas y lindos momentos. A Virgi, por su alegría, sus charlas y sus consejos. A Andre y Fla, por su buena onda, su ayuda y por prestarme reactivos para poder terminar mi trabajo de tesis. A Ceci L. por las líneas celulares. A Elena, por su asistencia en la primera parte del Doctorado, por sus lindas charlas y su generosidad. A Noe, por su alegría y la ayuda que me brindó en algunos experimentos.

A las chicas del IFISE por tantos buenos momentos que hemos pasado dentro y fuera del instituto. A todas las chicas y chicos del IFISE por crear un hermoso ambiente de trabajo en el cual da gusto estar, por brindar ayuda siempre que la he necesitado, por la alegría, la generosidad y los lindos momentos.

A los demás integrantes del IFISE, gracias por su ayuda desinteresada.

Al CONICET por las becas otorgadas que me han permitido desarrollar este trabajo de tesis.

A mis tutoras: Dra. María Eugenia Mamprín y Dra. Patricia Estela Marini, por haber seguido mi trabajo de tesis y especialmente a la Dra. María Eugenia Mamprín por ser también Jurado de mi tesis y dedicar gentilmente parte de su tiempo para evaluar este trabajo.

Al resto del Jurado de la tesis: Dra. Elisa Dora Bal de Kier Joffe y Dra. Claudia Lee Malvina Lanari, por aceptar evaluar mi trabajo y dedicar gentilmente parte de su tiempo para hacerlo.

A mis amigas de Paraná: Cami y Flo, por estar en los buenos y malos momentos y por tantos años de amistad compartidos. A Lu, Nani y Lau, gracias por las alegrías vividas. A mis amigos de la facu: Juli, Ceci D., Ceci C., Maby, Lucho, Rodri, Eva, Nico y Seba, por tantas risas y alegrías. A Juli, por tantas charlas y bellos momentos.

A mis padres, porque sin ellos no estaría hoy acá ni sería la persona que soy. Gracias por confiar siempre en mí y alentarme en todos mis proyectos, por ayudarme siempre, por enseñarme a ser una mejor persona y por darme todo su amor.

A mi hermana Sofi, por todo su amor, su ayuda y por los hermosos momentos vividos.

A mi marido Ezequiel, mi alma gemela, por estar en los buenos y malos momentos, por apoyarme, creer en mí y por su amor incondicional. Gracias Eze, porque el mejor proyecto es y será el que estamos creando juntos.

