

Moléculas moduladoras de vías de señalización basales y desencadenadas por el Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas (PDGF) en un modelo celular de fibrosarcoma humano

Modulating molecules of basal and triggered by Platelet-Derived Growth Factor (PDGF) signaling pathways in a human fibrosarcoma cell model

Adriana Grismaldo¹, Ludis Morales¹

Recibido: 15 de febrero 2018. Aceptado para publicación: 14 de marzo 2018
<https://doi.org/10.35454/rncm.v1n1.076>

Resumen

Introducción: la sobreexpresión del Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas (PDGF) y sus receptores ha sido relacionada con el desarrollo de patologías asociadas a la pérdida del control de la proliferación, como el cáncer, principalmente sarcomas de tejidos blandos y gliomas. Por lo anterior, el desarrollo de agentes terapéuticos que inhiban las respuestas biológicas desencadenadas por estas moléculas han sido blanco de estudios preclínicos en diferentes tipos de cáncer. En este sentido, el objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de dos péptidos sintetizados a partir del ligando natural de la isoforma PDGF-BB, así como de inhibidores específicos de proteínas intracelulares, sobre la activación de moduladores de las vías de señalización PI3K/Akt y MAPK basales y dependientes de PDGF y sobre el fenotipo proliferativo de la línea celular HT1080.

Métodos: se determinó el nivel basal de fosforilación de proteínas involucradas en las vías de señalización MAPK y PI3K/Akt en la línea celular HT1080 derivada de fibrosarcoma humano y se evaluó el efecto de la estimulación con PDGF-BB sobre su proliferación, la fosforilación de PDGFR β (Tyr751), Shp2 (Tyr542), Akt (Ser473) y Erk1/2 (Thr202/Tyr204). En paralelo se evaluó el efecto de dos péptidos sintéticos diseñados con base en la secuencia del ligando natural PDGF-BB, sobre la proliferación y fosforilación de proteínas involucradas en las vías de señalización PI3K/Akt y MAPK desencadenadas por PDGF-BB.

Resultados: Los resultados sugieren que la proliferación de la línea HT1080 no es dependiente del estímulo exógeno con

Summary

Introduction: Overexposure of the Platelet Derivative Growth Factor (PDGF) and its receptors has been linked to the development of pathologies associated with the loss of proliferation control, like cancer, mainly soft tissue sarcomas and gliomas. Thus, the development of therapeutic elements that inhibit the biological responses unleashed by these molecules have been a topic of preclinical studies in different types of cancer. In that sense, the objective of this study was to evaluate the effect of peptides synthesized from the natural linking of isoform PDGF-BB and specific intracellular protein inhibitors on the activation of modulators of signaling ways PI3K/Akt y MAPK baseline and dependent on PDGF and on the proliferative phenotype of cellular line HT1080.

Methods: The baseline for phosphorylation of proteins involved in signaling ways PI3K/Akt y MAPK and cellular line HT1080 derived from human fibrosarcoma was determined and the effect of PDGF-BB stimulation on its proliferation was evaluated, phosphorylation of PDGFR β (Tyr751), Shp2 (Tyr542), Akt (Ser473) y Erk1/2 (Thr202/Tyr204). At the same time the effect of synthetic peptides designed based on the natural link sequence PDGF-BB was evaluated, as well as the effect on proliferation and the phosphorylation of proteins involved in the signaling ways PI3K/Akt y MAPK unleashed by PDGF-BB.

Results: The results suggest that proliferation in line HT1080 is not dependent on the exogenous stimuli with PDGF-BB, although the attempt at signaling indicate a transitory and

¹ Departamento de Nutrición y Bioquímica, Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, D.C., Colombia.

Correspondencia: Ludis Morales
ludis.morales@javeriana.edu.co

PDGF-BB, aunque los ensayos de señalización indican una cinética de activación rápida y transitoria de proteínas involucradas en las vías de señalización PI3K/Akt y MAPK. El tratamiento con Péptido 1 no inhibió la fosforilación del receptor ni de la fosfatasa Shp2, el tratamiento con Péptidos 1 y 2 no disminuyó el nivel de fosforilación de Akt estimulada por PDGF-BB. Las células HT1080 expresan un nivel basal alto de pErk1/2 que no fue alterado por el estímulo con PDGF-BB, por lo tanto, no se evaluó el efecto de los péptidos sobre la activación de estas proteínas. Ensayos específicos sobre la vía MAPK mostraron que la inhibición de Mek con PD98059 inhibió la fosforilación basal de Erk1/2 e igualmente la proliferación de estas células.

Conclusión: se sugiere que la proliferación y potencial maligno de la línea celular HT1080 es dependiente de la señalización asociada a Erk1/2.

Palabras clave: fibrosarcoma, PDGF-BB, PDGFRb, MAPK, PI3K/Akt, péptidos sintéticos, PD98059.

quick activation kinetics of proteins involved in signaling ways PI3K/Akt and MAPK. Treatment with peptides 1 and 2 did not diminish the level of phosphorylation of the receptor or the phosphatase Shp2, treatment with peptides 1 and 2 did not diminish the phosphorylation level of Akt stimulated by PDGF-BB. Cells from HT1080 express a high baseline level of pErk1/2 which was not altered by stimulation with PDGF-BB, thus the effect of peptides on the activation of these proteins was not evaluated. Specific trials on MAPK way showed that inhibition with PD98059 inhibited the baseline phosphorylation of Erk1/2 and the proliferation of these cells.

Conclusion: The study suggests that proliferation and malign potential of cell line HT1080 is dependent on the signaling associated with Erk1/2.

Keywords: Fibrosarcoma; PDGF-BB; PDGFRb; MAPK; PI3K/Akt; Synthetic peptides; PD98059.

1. INTRODUCCIÓN

El factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) fue aislado a finales de los años 70 a partir de los gránulos α de las plaquetas, pero estudios posteriores demostraron que es producido por otros tipos celulares en los que se incluyen fibroblastos, células del músculo liso y células de la glia^(1,2) su forma biológicamente activa está formada por homo/heterodimerización de cuatro subunidades monoméricas diferentes A, B, C y D⁽³⁾. Sus receptores están constituidos por cinco dominios extracelulares tipo inmunoglobulina, un dominio transmembrana y uno intracelular con actividad quinasa^(2,4); al igual que los ligandos, la forma biológicamente activa del receptor se origina por homo/heterodimerización de las subunidades α y β ^(5,6).

La unión de los ligandos PDGF, su consiguiente dimerización y autofosforilación de los residuos de tirosina del dominio quinasa intracelular⁽²⁾, crea sitios de acoplamiento para moléculas con dominios SH, involucradas en la transducción de señales⁽⁷⁾. La interacción de estas moléculas con tirosinas fosforiladas específicas en los receptores desencadena la activación de vías de señalización, como PI3K/Akt y MAPK, importantes en supervivencia celular y proliferación, respectivamente^(2, 5, 8).

La cascada de señalización PI3K/Akt hace referencia a la activación de Akt por fosforilación en los residuos Thr308 y Ser473, que luego se dirige al citoplasma en donde controla varias respuestas biológicas incluyendo inhibición de apoptosis por fosforilación e inactivación

directa de proteínas proapoptóticas, o indirecta por modulación de la actividad de factores de transcripción⁽⁹⁾. Por otro lado, la vía de señalización MAPK inicia con la fosforilación y activación de las quinasas Erk1/2 en los residuos Thr202 y Tyr204 respectivamente. Erk1/2 pueden fosforilar sustratos en el citoplasma y factores de transcripción en el núcleo, involucrados con proliferación celular⁽¹⁰⁾. La sobreexpresión de PDGF, así como la de sus receptores ha sido relacionada con el desarrollo de diferentes tipos de cáncer como sarcomas de tejidos blandos y gliomas^(2,11). Con base en esta asociación, los ligandos PDGF y sus receptores se han convertido en blancos para el desarrollo de agentes terapéuticos potenciales con los que se han llevado a cabo estudios preclínicos en diferentes tipos de cáncer^(12,13). Sin embargo, ninguna de las moléculas desarrolladas hasta el momento muestra afinidad específica por los receptores de este factor de crecimiento, por lo tanto, estudios sobre los eventos de señalización y su posible modulación son importantes en el desarrollo de moléculas que inhiban de forma selectiva tanto la interacción ligando-receptor, así como la activación de moduladores intracelulares causada por esta interacción, que lleven a efectos biológicos importantes en células tumorales, en los que se incluyen inhibición de la proliferación celular o activación de apoptosis.

Con base en lo anterior, el grupo de Bioquímica Experimental y Computacional (antiguo Grupo de Terapia Celular y Molecular) de la Pontificia Universidad Javeriana diseñó y sintetizó dos péptidos lineales (P1 y

P2) a partir de la secuencia del ligando natural PDGF-BB, los cuales mostraron alta afinidad por los receptores de PDGF en la línea celular HT1080; esta línea celular, derivada de fibrosarcoma humano, presenta un fenotipo altamente maligno, invasivo y de rápida multiplicación⁽¹⁴⁾. En adición, el modelo celular mencionado tiene activas múltiples vías de señalización que le permiten mantener los rasgos asociados a una transformación neoplásica⁽¹⁵⁾. Por lo anterior, se consideró conveniente y necesario evaluar el efecto de estos péptidos, así como de inhibidores específicos de proteínas intracelulares, sobre la activación de moduladores de las vías de señalización PI3K/Akt y MAPK basales y dependientes de PDGF y sobre el fenotipo proliferativo de la línea celular HT1080.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Cultivo celular

La línea celular HT1080 fue adquirida de ATCC (N° CCL.122). Las células fueron cultivadas en medio DMEM suplementado con suero bovino fetal a 10 % y penicilina/estreptomicina/anfotericina. Antes de la estimulación con PDGF-BB o con los inhibidores, las células fueron privadas de suero durante 24 horas. Los tratamientos con PDGF-BB (Bachem), Péptidos 1 y 2 y PD98059 (Sigma) se realizaron en condiciones libres de suero. Todos los reactivos para cultivo celular fueron adquiridos de Lonza.

2.2 Ensayos de proliferación

Se sembraron células a una densidad de 10000 células/pozo en cajas de 24 pozos. A las 24 horas el medio fue reemplazado por DMEM libre de suero y 24 horas después, las células fueron tratadas por triplicado con las concentraciones 1 ng/mL, 10 ng/mL y 50 ng/mL de PDGF-BB, en presencia o ausencia de P1 y P2 (1 μ M) una hora antes de la estimulación. Cumplidas 72 horas de incubación, las células fueron tripsinizadas y cuantificadas por azul de tripán.

Para los ensayos con inhibidores, las células fueron sembradas a una densidad de 20.000 células/pozo en cajas de 24 pozos, bajo las mismas condiciones mencionadas para los tratamientos con PDGF-BB. Las células fueron tratadas por triplicado con las concentraciones 1 μ M, 5 μ M y 10 μ M de PD98059. Cumplidas 72 horas de incubación, las células fueron tripsinizadas y cuantificadas por citometría de flujo y tinción con tetrametilrodamina 500 nM.

2.3 Western Blot

Células de cultivos subconfluentes se sembraron a una densidad de 12.000 células/pozo en cajas de 12 pozos. Alcanzado 80 % de confluencia, el medio de cultivo fue reemplazado por DMEM libre de suero y 24 horas después, las células fueron tratadas o no con 30 ng/ml de PDGF-BB durante 5, 15, 30 y 60 minutos, en presencia o ausencia de P1 y P2 a concentración 50 μ M, una hora antes de la estimulación. Los tratamientos con PD98059 se realizaron durante la noche. Las células fueron lisadas con *buffer* lisis fosfato y *buffer Laemmli* en proporción 1:1. Los lisados celulares fueron separados por electroforesis y transferidos a membranas de PVDF. Las membranas fueron bloqueadas con TBST y 5 % de albúmina sérica bovina, incubadas durante la noche a 4° C con anticuerpo primario (1:500), lavadas 3 veces e incubadas durante 1 hora con anticuerpo secundario conjugado con HRP (1:3.000). Después de tres lavados, las proteínas fueron detectadas con el *kit SuperSignal West Dura Chemiluminescent Substrate* (Pierce), de acuerdo con las instrucciones del proveedor. Los anticuerpos primarios utilizados fueron: *PathScan PDGFR Activity Assay* que incluye los anticuerpos *Phospho PDGF Receptor β (Tyr751) Rabbit*, *Phospho Shp2 (Tyr542) Rabbit*, *Phospho Akt (Ser473) Rabbit*, *Phospho p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204) Rabbit*, *eIF4E*, factor de transcripción utilizado como control de carga y *phospho p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204) mouse* (todos de *Cell Signaling*). Los anticuerpos secundarios utilizados fueron: *Anti rabbit IgG HRP linked* y *Anti mouse IgG HRP linked*.

2.4 Citometría de flujo para evaluación de proliferación celular

El protocolo usado para la evaluación de la proliferación celular en respuesta al inhibidor PD98059 se basa en la tinción de las células con tetrametilrodamina (TMRM), que marca células con mitocondrias activas, siendo por lo tanto un indicador de viabilidad celular. Células tratadas durante 72 horas con concentraciones incrementales de PD98059 (1 μ M a 10 μ M) fueron colectadas y marcadas con TMRM a concentración final de 500 nM durante 20 minutos. Cumplido este tiempo, las células fueron adquiridas en citómetro *Guava EasyCyte* de *Millipore* y analizadas a partir de un gate alrededor de la población de interés con base en los *dot plots* de *forward* y *side scatter*. Para realizar comparaciones entre tratamientos se utilizó el parámetro de concentración celular (células por mililitro).

2.5 Análisis estadístico

El efecto de PDGF-BB sobre la proliferación de células HT1080, así como los eventos de señalización asociados a PDGF-BB e inhibidores sobre los eventos de señalización basal fueron analizados estadísticamente usando la prueba *t student*, en experimentos por triplicado.

RESULTADOS

3.1 Efecto de PDGF-BB y P1 - P2 sobre proliferación de células HT1080

Como se observa en las Figuras 1 y 2, se evidenció una respuesta diferencial en la proliferación de

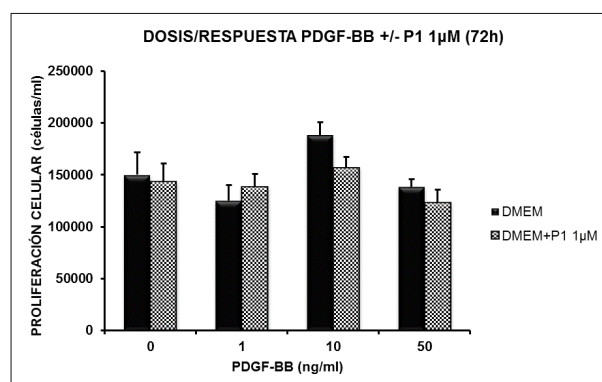


Figura 1. Efecto de tres concentraciones de PDGF-BB sobre la proliferación de células HT1080, en presencia y ausencia de P1 1 μM. Las barras negras indican tratamiento con concentraciones incrementales de PDGF-BB, las barras punteadas indican células tratadas con P1 una hora antes de la estimulación con PDGF-BB en las concentraciones indicadas. Los resultados de proliferación a las 72 horas se expresan como número de células por mililitro.

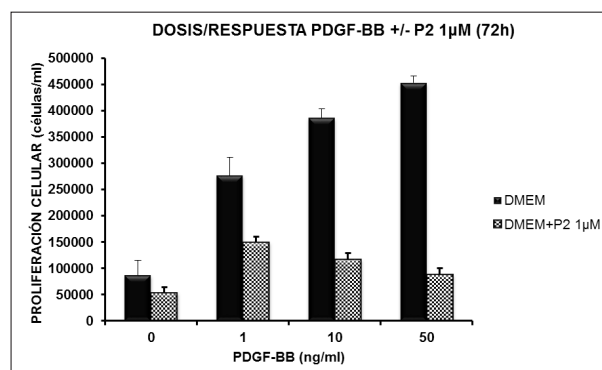


Figura 2. Efecto de tres concentraciones de PDGF-BB sobre la proliferación de células HT1080, en presencia y ausencia de P2 1 μM. Las barras negras indican tratamiento con concentraciones incrementales de PDGF-BB, las barras punteadas indican células tratadas con P2 una hora antes de la estimulación con PDGF-BB en las concentraciones indicadas. Los resultados de proliferación a las 72 horas se expresan como número de células por mililitro. **p* < 0,05 (prueba *t* pareado).

células estimuladas con las tres concentraciones incrementales de PDGF-BB empleadas, con respecto a la proliferación basal. Así, cuando PDGF-BB no estimuló la proliferación de células HT1080, la concentración 1 μM de P1 no tuvo ningún efecto sobre su proliferación (Figura 1), mientras que, cuando PDGF-BB logró estimular la proliferación, incluso a la concentración más baja utilizada, el tratamiento con P2 a la concentración 1 μM logró inhibir este estímulo mitogénico (Figura 2).

3.2 PDGF-BB induce fosforilación de PDGFRβ (Tyr751)

Una vez verificada la expresión del receptor β de PDGF (datos no mostrados), se evaluó el efecto de PDGF-BB sobre la fosforilación de este receptor en el residuo Tyr751. Como se ve en la Figura 3, en condiciones basales no se observó fosforilación del receptor en esta tirosina, por lo tanto, el estímulo con PDGF-BB causó una cinética de fosforilación rápida y transitoria, con un pico máximo a los 5 minutos de estimulación, el cual disminuyó a nivel basal a partir de los 15 minutos.

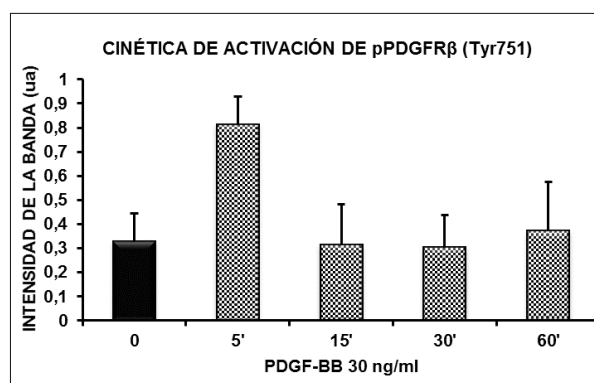
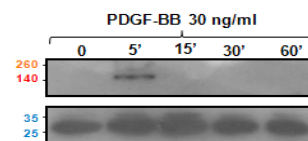


Figura 3. Fosforilación de PDGFRβ (Tyr751) asociada al tiempo de estimulación con PDGF-BB. Para el análisis densitométrico, la intensidad de la banda de pPDGFRβ se normalizó con respecto a la intensidad de la banda de eIF4E (control de carga incluido en el coctel de anticuerpos). Los resultados se muestran como promedio de intensidad de la banda en unidades arbitrarias de tres experimentos independientes. **p* < 0,05 (prueba *t* pareado).

3.3 PDGF-BB induce fosforilación de las proteínas de señalización Shp2 (Tyr542) y Akt (Ser473), pero no produce ningún efecto sobre la fosforilación de Erk1/2 (Thr202/Tyr204)

Como se observa en la figura 4, las células HT1080 no mostraron un nivel basal de las proteínas Shp2 y Akt fosforiladas; por lo tanto, y siguiendo la cinética de fosforilación del receptor β de PDGF, la estimulación de las células con PDGF-BB indujo la activación de estas proteínas por fosforilación de los residuos Tyr542 y Ser473, respectivamente, con pico máximo a los 5 minutos de estimulación y disminución a nivel basal a partir de los 15 minutos. Por el contrario, se observó un nivel basal alto de pErk1/2 (Thr202/Tyr204), por lo tanto, el estímulo con PDGF-BB exógeno no causó un efecto mayor sobre su activación. Los resultados obtenidos por *western blot* fueron reproducibles y validados por citometría de flujo.

3.4 Péptidos 1 y 2 no inhiben la activación de PDGFR β (Tyr751) inducida por PDGF-BB y de ninguna proteína de señalización asociada a este sitio de fosforilación

Una vez establecidos los eventos de señalización asociados a PDGF-BB arriba mencionados (Figura 4), se estimó la acción de P1 y P2 sobre la fosforilación de proteínas involucradas en las vías de señalización MAPK y PI3K/Akt desencadenadas por PDGF-BB.

Por *western blot* se evaluó el efecto de P1 sobre la fosforilación de PDGFR β en Tyr751, Shp2 en Tyr542 y Akt en Ser473, dependiente de PDGF-BB. Como el nivel basal de pErk1/2 no fue incrementado con el estímulo exógeno con PDGF-BB, no se evaluó la acción de P1 y P2 sobre la fosforilación constitutiva de estas proteínas, puesto que se sugiere que la acción de estos péptidos sintéticos es dependiente del estímulo exógeno con PDGF.

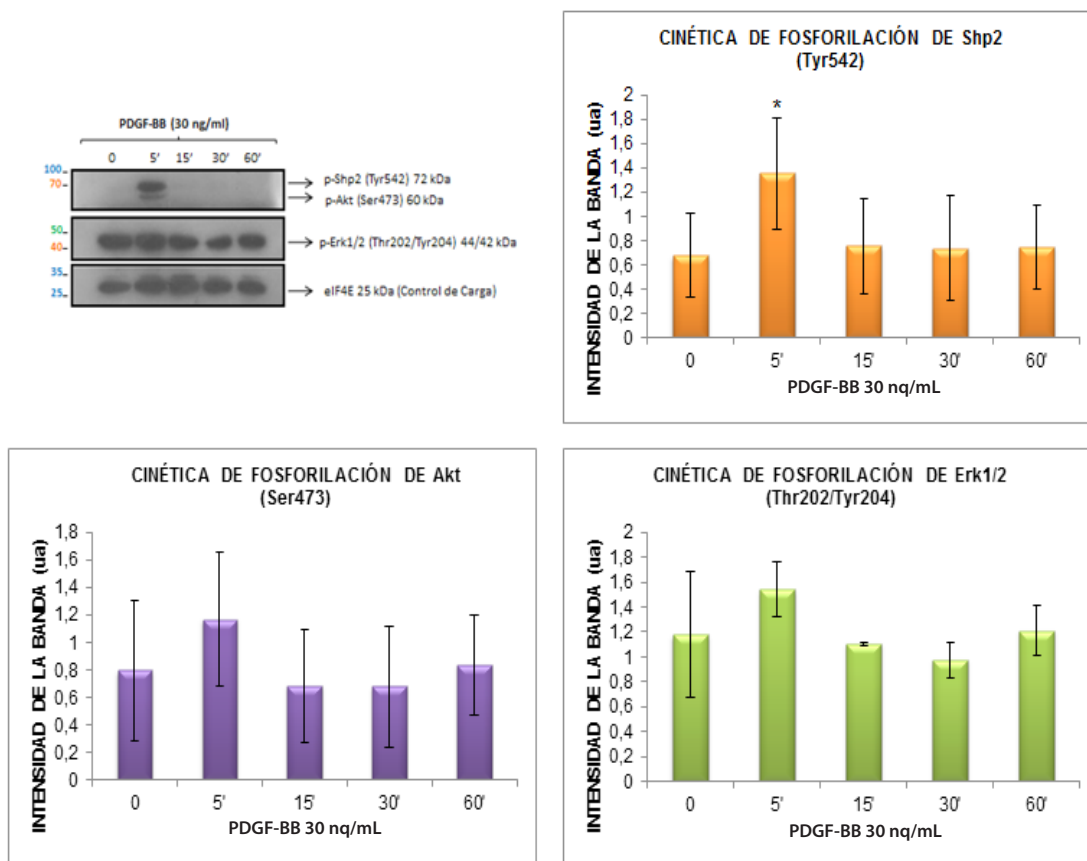


Figura 4. Fosforilación de Shp2 (Tyr542), Akt (Ser473) y Erk 1/2 (Thr202/Tyr204) asociada al tiempo de estimulación con PDGF-BB. Para el análisis densitométrico, la intensidad de la banda de cada una de las proteínas mencionadas se normalizó con respecto a la intensidad de la banda de eIF4E (control de carga incluido en el coctel de anticuerpos). Los resultados se muestran como promedio de intensidad de la banda en unidades arbitrarias de tres experimentos independientes. *p < 0,05 (prueba t pareado).

La concentración 50 μM de P1 no alteró la cinética de fosforilación de PDGFR β en Tyr751. En este sentido, P1 tampoco impidió la fosforilación de las proteínas Shp2 en Tyr542 y Akt en Ser473. El efecto de P1 y P2 sobre la fosforilación de Akt (Ser473) asociada a la estimulación con PDGF-BB durante 5 minutos, también fue medido por citometría de flujo. La estimulación con PDGF-BB durante 5 minutos causó fosforilación de Akt en Ser473 con respecto a células no estimuladas. Aunque se esperó que el tratamiento con P1 y P2 en células estimuladas inhibiera la fosforilación de Akt inducida por PDGF-BB, no se observó dicho efecto (datos no mostrados).

3.5 Efecto de PD98059 sobre proliferación basal de la línea celular HT1080

Con base en los estudios de señalización en los que se observó activación permanente de Erk1/2 e independiente de PDGF-BB, se examinó el efecto del bloqueo de la vía MAPK sobre la proliferación de células HT1080, a nivel de Mek con el inhibidor PD98059^(41,45,46). Como se observa en la Figura 5 (barras moradas), las concentraciones 1 μM y 5 μM de PD98059 no causaron diferencias significativas con respecto a la proliferación basal de células HT1080 (barra rosada), mientras que la concentración 10 μM logró disminuir de manera significativa su proliferación (<0,05).

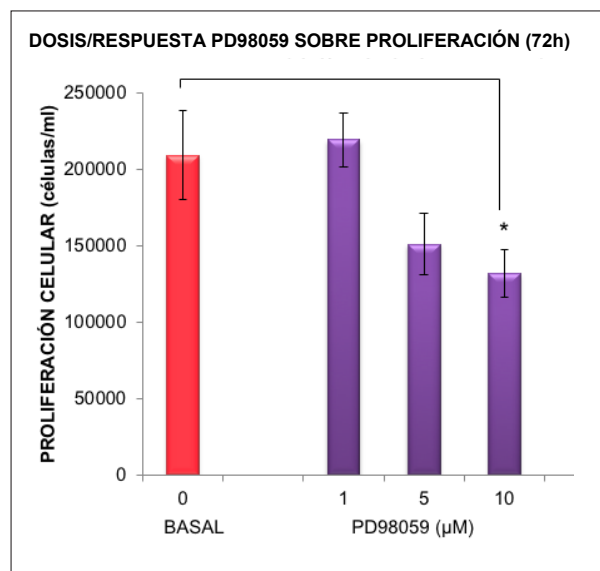


Figura 5. Efecto de tres concentraciones del inhibidor de Mek PD98059 sobre la proliferación basal de células HT1080. Los resultados de proliferación a las 72 horas se expresan como número de células por mililitro medido por citometría de flujo y tinción con TMRM. * $p < 0,05$ (prueba t pareado).

3.6 PD98059 inhibe la fosforilación basal de Erk1/2 (Thr202/Tyr204)

A partir de los resultados en los que se observó que la inhibición de la activación de Mek1/2 causó una disminución en la proliferación celular, se evaluó el efecto de la inhibición de Mek1/2 sobre su blanco directo de fosforilación Erk1/2 (Thr202/Tyr204), para ello se utilizaron las mismas concentraciones de PD98059 y se determinó la activación de Erk1/2 por *western blot* y citometría de flujo.

Los resultados se muestran en la Figura 6 e indican que la concentración 10 μM de PD98059 inhibió la fosforilación basal de Erk1/2. Los resultados obtenidos por citometría de flujo son comparables a los obtenidos por *western blot* (datos no mostrados).

DISCUSIÓN

El PDGF es considerado el mayor mitógeno para células de origen mesenquimal y ha sido involucrado en el desarrollo y progresión de diferentes tipos de cáncer específicamente gliomas y sarcomas, por lo tanto, la inhibición de las vías de señalización mediadas por el eje PDGF-PDGFR ha sido un blanco atractivo para terapias anticancerígenas⁽¹⁶⁾. En este estudio se evidenció que el estímulo exógeno con PDGF-BB causó una respuesta diferencial sobre la proliferación basal de la línea celular HT1080. Reportes previos, como el de Fthenou23 indican que estímulos con una concentración de 10 ng/ml de PDGF-BB y un tratamiento de 48 horas no logran aumentar la proliferación basal de esta línea celular, dicho efecto puede ser explicado a partir del bajo número de receptores de PDGF por célula HT1080, que fue estimado en $3,1 \times 10^4$ ⁽¹⁷⁾, a diferencia de otras líneas celulares y células primarias, en las que se han reportado cerca de 100.000 receptores/célula^(18,19) y por lo tanto la respuesta en proliferación a la estimulación con diferentes concentraciones de PDGF-BB es masiva. Sin embargo, el presente estudio es el primero en reportar un efecto incremental en la proliferación basal de la línea celular HT1080 dependiente de la dosis de PDGF-BB (Figura 2).

Adicionalmente, la línea celular HT1080 es conocida por poseer un alelo mutado endógeno del *oncogen Nras*^(14,20,21,23), por lo cual exhibe características típicas de células transformadas neoplásicas, en las que se incluyen pobre adherencia, crecimiento independiente del anclaje, ausencia de fibras de actina organizadas y formación de tumores agresivos *in vivo*, además de su alta capacidad metastásica^(14,20,21). Con base en esta

característica, se explica el crecimiento y proliferación de esta línea celular aún en condiciones basales, es decir, en DMEM libre de suero, al igual que la insensibilización al estímulo con PDGF-BB exógeno (Figura 1).

Los hallazgos de la acción inhibitoria de P2 sobre la proliferación celular inducida por PDGF-BB se relacionan con los resultados del estudio realizado por Contreras⁽¹⁷⁾, en el que se demostró que P2 fue capaz de inhibir la viabilidad de células HT1080 inducida por PDGF-BB, incluso a concentraciones picomolares. Adicionalmente, en un estudio previo se evidenció que, de los dos péptidos, P2 mostró una mayor capacidad de desplazamiento de la unión del ligando natural PDGF-BB⁽²³⁾.

Diferentes estudios han reportado péptidos sintéticos que tienen como blanco PDGFR⁽²³⁻²⁷⁾. Engström *et al* reportaron un péptido sintético derivado de PDGF B, que inhibió en forma significativa la proliferación de la línea celular AG1518 inducida por PDGF-BB⁽²⁷⁾. Por otra parte, el estudio de Brennand *et al* reportó la secuencia de un péptido lineal que no mostró efectos en la reducción de la síntesis de ADN ni inhibió la unión del ligando natural⁽²⁶⁾; sin embargo, cuando el péptido se cicló se logró reducir la síntesis de ADN e inhibió la unión del ligando natural PDGF-BB con un EC₅₀ de 220 μM en fibroblastos de piel humana. Con base en estos resultados, los autores explican que el reconocimiento de oligopéptidos lineales flexibles por receptores de membrana es sensible a las restricciones estéricas y que la ciclación de los péptidos limitaría este efecto, ya que les permitiría imitar las conformaciones naturales dentro de PDGF-BB proporcionando mayor afinidad de unión a los receptores de PDGF. Por lo tanto, la alternativa de ciclación de P1 y P2 se hace interesante, ya que podrían encontrarse efectos tan importantes como los hallados en el reporte mencionado.

La señalización por receptores de PDGF ocurre por fosforilación de al menos 10 residuos de tirosina en el dominio intracelular y su consiguiente asociación a moléculas de señalización secundarias con dominios SH2^(28, 29). Se ha demostrado que el residuo Tyr751 de PDGFRβ es un sitio de alta afinidad de unión para la subunidad p85 de PI3K^(29,30) y por lo tanto, podría participar en la activación indirecta de la quinasa Akt; adicionalmente, la fosforilación transitoria de este residuo puede deberse a un incremento en la tasa de defosforilación por Shp2, una fosfatasa que también es activada por estimulación con PDGF-BB^(31,32).

Shp2 es una proteína que promueve la activación más que la atenuación de vías de señalización intracelular

como MAPK^(33,34). Es así como en el estudio realizado por Rönstrand *et al* se reportó que los sitios de fosforilación Tyr763 y Tyr1009 en PDGFRβ forman los sitios de unión para los dominios SH de Shp2 causando su activación⁽³⁴⁾. Aun cuando la fosforilación de estos residuos de tirosina no fue evaluada en el presente estudio, se puede inferir que la unión del ligando PDGF-BB indujo la fosforilación de estos residuos y consecuente activación de Shp2 por fosforilación en Tyr542. Sin embargo, el papel de Shp2 parece no ser importante en la vía de señalización MAPK en la línea celular HT1080 debido a la mutación constitutiva en el gen que codifica para la proteína Ras, que se encuentra activa permanentemente corriente abajo de Shp2⁽³³⁾. Se ha demostrado también que los residuos de tirosina fosforilados en los receptores de PDGF pueden ser defosforilados e inactivados por proteínas tirosinas fosfatasas como Shp2⁽³⁵⁾, ejerciendo un evento de regulación negativa de la señalización⁽³⁴⁾. Shp2 defosforila de forma preferencial residuos de tirosina importantes para la unión de PI3K con PDGFRβ entre los que se incluyen Tyr740 y Tyr751^(29,31,32).

Acerca de la activación rápida y transitoria de Akt, inducida por PDGF-BB, Lennartsson *et al*, demostraron en células PAE, que puede sensibilizar a las células hacia la apoptosis⁽³⁶⁾. Por lo contrario, cuando el estímulo con PDGF-BB exógeno causa una activación rápida pero sostenida de Akt, la respuesta generada por este efecto tiene un papel importante en la promoción de la supervivencia celular⁽³⁶⁾, la cual depende de la inactivación por fosforilación de proteínas proapoptóticas como Bad, caspasa 9 y factores de transcripción FOXO9. La fosforilación transitoria de Akt, estimulada por PDGF-BB también puede ser atribuida a que el estímulo causó simultáneamente la activación de la fosfatasa Shp2, por lo tanto, se sugiere que Shp2 defosforiló al receptor β de PDGF en el residuo Tyr751 después de la unión de PI3K, y que PI3K fue capaz de iniciar la transducción de la señal. No obstante, la defosforilación del receptor por Shp2 interrumpió la transducción continua de la señal y causó la inactivación de PI3K, así como la rápida inactivación de Akt; se sugiere por lo tanto que Shp2 puede proveer un mecanismo de regulación negativa de la vía PI3K/Akt dependiente de PDGF en el modelo celular estudiado.

Con base en los resultados mostrados en las Figuras 1 y 4, se sugiere que la proliferación de la línea celular HT1080 no es dependiente del estímulo exógeno con PDGF. Se ha reportado que la sobreexpresión de Ras causa insensibilidad a estímulos extracelulares y es suficiente para dirigir la entrada al ciclo celular de células que se encuentran detenidas en fase G0 por ausencia

de factores de crecimiento^(15,37), lo que explica la proliferación de la línea celular HT1080 aún en condiciones basales. Con base en estos resultados, se propone que el potencial proliferativo de esta línea celular se debe a la activación permanente de Erk1/2, que se explica a partir de la mutación en el gen NRas.

La consecuencia biológica de la activación de Erk1/2 está especificada por la duración y magnitud de su fosforilación; es así como la fosforilación sostenida de estas proteínas causa expresión y estabilización de productos génicos tempranos, lo que resulta en transición G1/S en fibroblastos y células epiteliales¹⁰. Por lo tanto, se sugiere que la fosforilación sostenida y permanente de Erk en el modelo estudiado, podría resultar en la activación de factores de transcripción involucrados en proliferación celular, tales como: CREB, Ets-1, c-Jun y c-Myc involucrados en proliferación celular⁽³⁸⁾.

En cuanto al efecto del tratamiento con P1 sobre la fosforilación del residuo Tyr751 del receptor β de PDGF, los resultados indican que P1 no logró inhibir el efecto de PDGF-BB sobre este sitio de fosforilación. Se ha reportado una mayor eficiencia en la inhibición de la fosforilación de PDGFR con péptidos de naturaleza cíclica; este es el caso del péptido descrito por Brennan, et al que inhibió la interacción de PDGF AA y PDGF-BB con PDGFR α y PDGFR β , lo que sugiere que este péptido reconoce estructuras conservadas dentro de los dos tipos de receptores, que permiten tanto la inhibición de la autofosforilación como la dimerización en un 55%⁽²⁶⁾. Por lo anterior, este péptido es considerado un antagonista de los receptores de PDGF; sin embargo, el mismo péptido con estructura lineal no tuvo ningún efecto sobre la autofosforilación y dimerización inducida por PDGF-BB. Con base en estas evidencias, se sugiere que eventualmente el modificar cíclicamente P1 y P2 podría inducir una respuesta inhibitoria de la autofosforilación y/o dimerización de los receptores PDGF.

Igualmente, ni la fosfatasa Shp2 ni la quinasa Akt activadas por PDGF-BB y asociadas al residuo de Tyr751 en el receptor β de PDGF, fueron inhibidas por el tratamiento con P1. Específicamente sobre Akt, en un estudio previo se reportó que la concentración 100 pM de P1 no mostró un efecto inhibitorio sobre la activación de Akt inducida por estimulación con 500 pM (15 ng/ml) de PDGF-BB¹⁷. Estos resultados son consecuentes con el efecto de P1 sobre la fosforilación de PDGFR β (Tyr751), en el que tampoco se evidenció inhibición de la fosforilación estimulada por PDGF-BB, desencadenándose así la cascada de señalización PI3K/Akt. Sin embargo, en el mismo estudio se reportó que P2 fue capaz de inhibir en un 31,59 % la fosforilación de Akt

inducida por PDGF-BB, en sus condiciones experimentales, estimulación con 500 pM de PDGF-BB e inhibición con 100 pM de P2. Las concentraciones utilizadas en el presente estudio son diferentes, ya que el estímulo se realizó con 1000 pM (30 ng/ml) de PDGF-BB y la inhibición con 50 μ M de P2; evidenciando resultados diferenciales dependiendo de las dosis de ligando natural y sintético ensayadas.

Los estudios realizados sobre los efectos de P1 y P2 sobre la fosforilación de Akt mediada por PDGF-BB son contradictorios y por lo tanto no concluyentes; se sugiere realizar más estudios que ayuden a esclarecer los eventos de señalización asociados a P1 y P2 en líneas celulares que sean dependientes de PDGF-BB. En la actualidad, se han desarrollado diferentes estrategias para detener los eventos de señalización iniciados por PDGF en las que se incluyen anticuerpos neutralizantes para los ligandos y receptores de PDGF, aptámeros, PDGF sin procesamiento en N terminal y receptores solubles que excluyen el dominio quinasa 16. Sin embargo, ninguna de las moléculas aprobadas hoy es específica para PDGF, pues estas moléculas son consideradas inhibidores multiquinasa en los que también se incluyen como blancos VEGFR y KIT; *crenolanib*, *imatinib*, *nilotinib*, *olatumab* y *ponatinib*, son inhibidores de receptores tirosina quinasa que se encuentran en ensayos de fase II para el tratamiento de tumor estromal gastrointestinal, glioblastoma y melanoma, entre otros. *Olatumab* y *tovetumab*, son anticuerpos monoclonales con afinidad y selectividad más alta por PDGFR α y por lo tanto causan menor toxicidad y efectos secundarios⁽¹²⁾.

Finalmente, los resultados obtenidos acerca de la vía de señalización MAPK, sugieren que la inhibición de la activación de Mek a la dosis 10 μ M de PD98059 logró atenuar los efectos proliferativos mediados por la activación permanente de Erk1/2 en la línea celular HT1080. Debido a la activación constitutiva de la vía de señalización Ras/Mek/Erk, que se presenta en aproximadamente 30% de los cánceres humanos, se han desarrollado inhibidores específicos contra Mek39 que son exitosos debido a los pocos sitios de fosforilación de estas proteínas involucrados en su activación/inactivación^(39,40).

Es así como los estudios realizados por Hoshino *et al* y Matsui *et al*, evaluaron el efecto del bloqueo de la vía de Erk, con los inhibidores PD98059 y U0126, específicos de Mek, en la proliferación de células tumorales humanas en las que Erk está constitutivamente activado^(41,42). Los resultados indican que estos inhibidores son capaces de reducir la proliferación e inducir una detención del ciclo celular en G1, seguida por una respuesta en apoptosis. Con base en estos resultados se evidencia la importancia

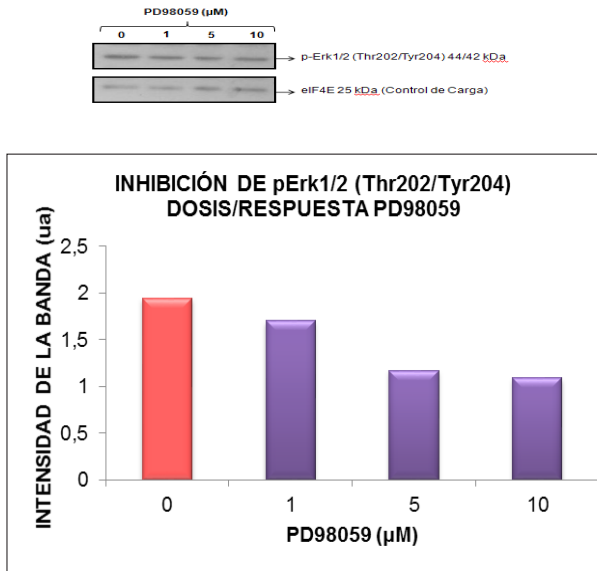


Figura 6. Efecto de PD98059 sobre el nivel basal de pErk1/2 (Thr202/Tyr204). Para el análisis densitométrico, la intensidad de la banda de pErk1/2 se normalizó con respecto a la intensidad de la banda de eIF4E (control de carga incluido en el coctel de anticuerpos).

de la intervención terapéutica en la activación de Mek, así como de otras proteínas involucradas en la vía de señalización MAPK en cánceres asociados a mutaciones en el gen Ras.

Cuando se evaluó el efecto de PD98059 sobre la activación basal de pErk1/2 en células HT1080, se evidenció que efectivamente, la dosis más alta de este inhibidor logró reducir su activación. La progresión del ciclo celular a través de cada fase es regulada por ciclinas y quinasas dependientes de ciclinas CDKs⁽⁴³⁾. En el estudio realizado por Hoshino, *et al* se evidenció disminución en la activación de Erk1/2 después del tratamiento de las células con PD98059 y aumento en la activación de p27, un inhibidor de complejos CDK/ciclina, lo que explica la detención del ciclo celular en la fase G1 y consecuente efecto negativo en la proliferación de células con mutaciones constitutivas en Ras; p27 ejerce este efecto al asociarse con complejos CDK-ciclinas específicas de G1 como D1/CDK4 y E/CDK2 e inhibir su actividad catalítica, que es esencial para que las células entren en fase S⁽⁴⁴⁾.

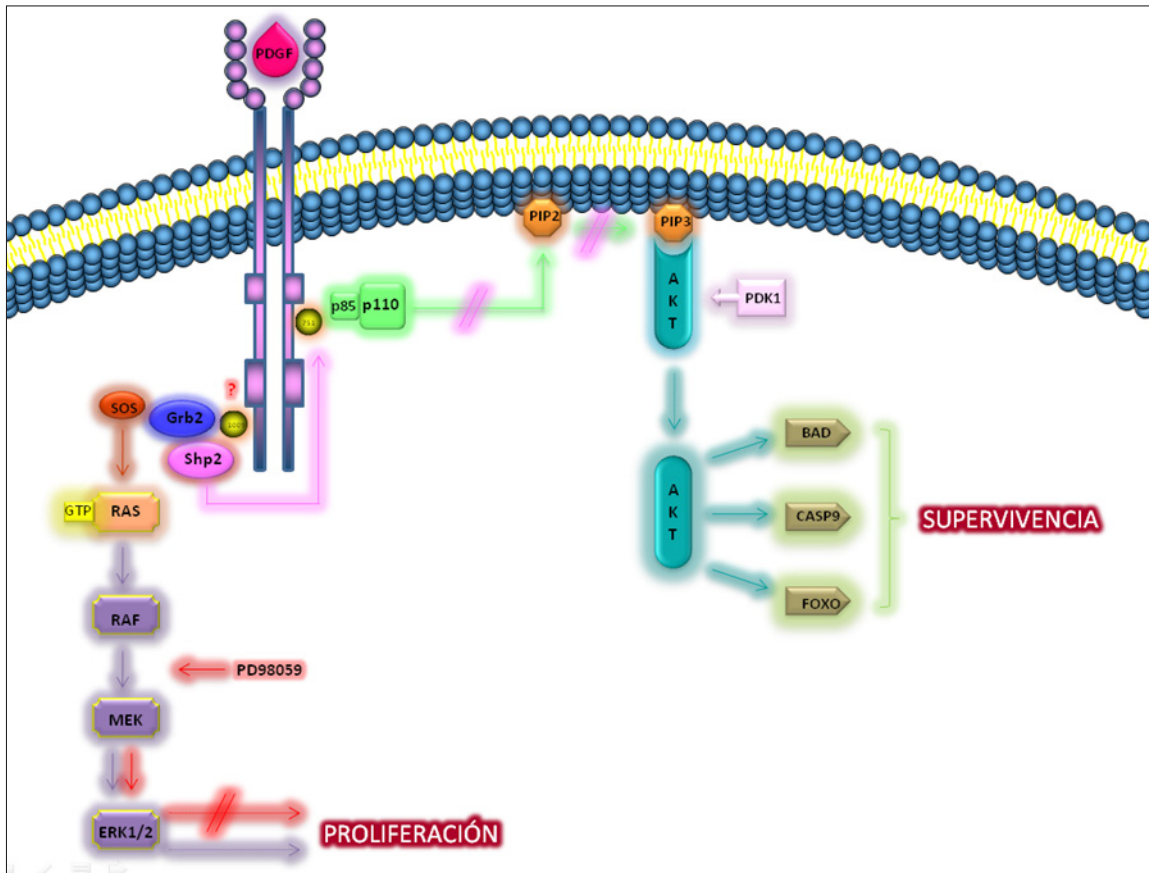


Figura 7. Modelo propuesto para señalización basal e inducida por PDGF-BB en la línea celular HT1080.

CONCLUSIÓN

Se propone el modelo para señalización basal e inducida por PDGF-BB en la línea celular HT1080 (Figura 7). La unión de PDGF-BB causa la dimerización de PDGFR β y su autofosforilación en Tyr751, de esta forma la subunidad catalítica p85 de PI3K es reclutada hacia el receptor produciendo su activación. PI3K activado se dirige a la membrana celular en donde cataliza la formación de PIP3 a partir de PIP2. PIP3 tiene gran afinidad por los dominios de homología a plectrina PH de Akt por lo tanto causa su reclutamiento a la membrana celular y un cambio conformacional que expone los dos sitios de fosforilación de Akt importantes para su activación: Thr308 y Ser473. Akt activado puede fosforilar y por lo tanto inactivar proteínas proapoptóticas y factores de transcripción involucrados en supervivencia celular. Sin embargo, PDGF-BB puede activar un mecanismo alterno de regulación negativa sobre la vía PI3K/Akt, es así como se sugiere que la unión del ligando podría causar la fosforilación de PDGFR β en Tyr763 y Tyr1009, reclutar y activar a Shp2 que defosforila a Tyr751 y finalmente lleva a fosforilación inicial rápida pero transitoria de Akt, suprimiendo su efecto antiapoptótico; por los resultados obtenidos en este trabajo, se sugiere que la vía PI3K/Akt desencadenada por PDGF-BB exógeno, no es la más importante para el fenotipo maligno de la línea celular HT1080.

Por otro lado, la mutación en el gen N-Ras insensibiliza a las células al efecto de factores extracelulares como PDGF-BB y por ende P1 y P2 sobre la vía de señalización MAPK. La unión de Ras a GTP promueve su activación permanente y por consiguiente la activación permanente de las proteínas quinasas Raf, Mek y Erk1/2; el bloqueo de esta vía con PD98059 (inhibidor específico de Mek), inhibe la fosforilación de Erk1/2 y en consecuencia se sugiere que inhibe la transcripción de genes involucrados en proliferación celular. Con base en estas evidencias, se sugiere que el potencial maligno y proliferativo de la línea celular HT1080 es dependiente de la activación permanente de Ras, por lo tanto, las proteínas que se activan corriente abajo como Raf, Mek y Erk son blancos importantes para el desarrollo de moléculas terapéuticas en cánceres con mutaciones constitutivas en Ras.

Conflicto de intereses

Ninguno.

Financiación: Este trabajo fue financiado por la Pontificia Universidad Javeriana, proyectos 0464 y 3548.

Referencias bibliográficas

1. Raica M, Cimpean A. Platelet-derived growth factor (PDGF)/PDGF receptors (PDGFR) axis as target for antitumor and antiangiogenic therapy. *Pharmaceuticals*. 2010;3(3):572-599.
2. Yu J, Ustach C, Kim H. Platelet-derived growth factor signaling and human cancer. *J. Biochem Mol Biol*. 2003;36(1):49-59.
3. Fredriksson L, Li H, Eriksson U. The PDGF family: four gene products form five dimeric isoforms. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2004;15(4):197-204.
4. Heldin C, Westermark B. Mechanism of action and in vivo role of platelet-derived growth factor. *Physiol Rev*. 1999;79(4):1283-316.
5. Cao Y. Multifarious functions of PDGFs and PDGFRs in tumor growth and metastasis. *Trends Mol Med*. 2013;19(8):460-73.
6. Kang S. Two axes in platelet-derived growth factor signaling: tyrosine phosphorylation and reactive oxygen species. *Cell Mol Lif Sci*. 2007;64(5):533-41.
7. Feigelson S, Fitzer C, Eisenbach L. The role of platelet derived growth factor (PDGF) and its receptors in cancer and metastasis. *Cancer Metastasis Biology and Treatment*. 2006;2:167-86.
8. Demoulin JB, Essahir A. PDGF receptor signaling networks in normal and cancer cells. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2014;25(3): 273-83.
9. Calvo E, Bolós V, Grande E. Multiple roles and therapeutic implications of Akt signaling in cancer. *Onco Targets Ther*. 2009;2:135-50.
10. Jurek A, Heldn, C, Lennartsson J. Platelet derived growth factor-induced signaling pathways interconnect to regulate the temporal pattern of Erk1/2 phosphorylation. *Cell Signal*. 2011;23(1):280-7.
11. Liu KW, Hu B, Cheng SY. Platelet-derived growth factor receptor alpha in glioma: a bad seed. *Chin. J. Cancer*. 2011;30(9):590-602.
12. Arrondeau J, Huillard O, Tlemsani C, Cessot A, Boudou-Rouquerre P, Blanchet B, et al. Investigational therapies up to phase II which target PDGF receptors: potential anti-cancer therapeutics. *Expert Opin. Investig. Drugs*. 2015;24(5):1-15.
13. Fabbro D. 25 years of small molecular weight kinase inhibitors: potentials and limitations. *Mol. Pharmacol*. 2015;87(5):766-75.
14. Rasheed S, Nelson W, Toth E, Arnstein P, Gardner M. Characterization of a newly derived human sarcoma cell line (HT1080). *Cancer*. 1974;33(4):1027-33.
15. Gupta Y, Grabocka E, Bar-Sagi D. RAS oncogenes: weaving a tumorigenic web. *Nat. Rev. Cancer*. 2011;11(11):761-74.
16. Gacche R, Meshram R. Angiogenic factors as potential drug target: Efficacy and limitations of anti-angiogenic therapy. *Biochim Biophys Acta*. 2014;1846(1):161-79.
17. Contreras M. Efecto de dos péptidos sintéticos sobre la función del PDGF en la vía de señalización PI3K/Akt en células tumorales humanas HT1080. Tesis maestría. 2009. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Departamento de Nutrición y Bioquímica. Bogotá. Colombia. 147p.

18. Nazarenko I, Hede S, He X, Hedrén A, Thompson J, Lindström M, et al. PDGF and PDGF receptors in glioma. *Ups J Med Sci*. 2012;117(2):99-112.
19. Abouantoun T, MacDonald T. Imatinib blocks migration and invasion of medulloblastoma cells by concurrently inhibiting activation of platelet-derived growth factor receptor and transactivation of epidermal growth factor receptor. *Mol Cancer Ther*. 2009;8(5):1137-47.
20. Nishimura Y, Bereczky B, Yoshioka K, Taniguchi, S, Itoh K. A novel role of Rho-kinase in the regulation of ligand-induced phosphorylated EGFR endocytosis via the early/late endocytic pathway in human fibrosarcoma cells. *J Mol Histol*. 2011;42(5):427-42.
21. Cao J, Shafee N, Vickery L, Kaluz S, Ru N, Stanbridge E. MEK1act/tubulin interactions is an important determinant of mitotic stability in cultured HT1080 human fibrosarcoma cells. *Cancer Res*. 2010;70(14):6004-14.
22. Ariza M. Síntesis y evaluación de la afinidad de péptidos sintéticos por el receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF). Tesis de Maestría. 2007. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Departamento de Nutrición y Bioquímica. Bogotá. Colombia. 150p.
23. Fthenou E, Zafiroopoulos A, Tsatsakis A, Stathopoulos A, Karamanos N, Tzanakakis G. Chondroitin sulfate A chains enhance platelet derived growth factor-mediated signaling in fibrosarcoma cells. *Int J Biochem Cell Biol*. 2006;38(12):2141-50.
24. Chiara F, Bishayee S, Heldin C, Demoulin J. Autoinhibition of the platelet-derived growth factor receptor β tyrosine kinase by its C-terminal tail. *J Biol Chem*. 2004;279(19):19732-8.
25. Yamamoto M, Tova Y, Jensen R, Ishikawa Y. Caveolin is an inhibitor of platelet-derived growth factor receptor signaling. *Exp Cell Res*. 1999;247(2):380-8.
26. Brennan D, Dennehy U, Ellis V, Scully M, Tripathi P, Kakkar V, et al. Identification of a cyclic peptide inhibitor of platelet-derived growth factor-BB receptor-binding and mitogen-induced DNA synthesis in human fibroblasts. *FEBS Lett*. 1997;413(1):70-4.
27. Engström U, Engström A, Ernlund A, Westermark B, Heldin C. Identification of a peptide antagonist for platelet-derived growth factor. *J Biol Chem*. 1992;267(23):16581-7.
28. Wu J, Goswami R, Cai X, Exum S, Huang X, Zhang L, et al. Regulation of the platelet-derived growth factor receptor-beta by G protein-coupled receptor kinase-5 in vascular smooth muscle cells involves the phosphatase Shp2. *J Biol Chem*. 2006; 281(49):37758-72.
29. Welsh L. Platelet-derived growth factor receptor signals. *J Biol Chem*. 1994;269(51):32023-6.
30. Kashishian A, Kazlauskas A, Cooper J. Phosphorylation sites in the PDGF receptor with different specificities for binding GAP and PI3 kinase in vivo. *EMBO J*. 1992;11(4):1373-1382.
31. Lin H, Ballou L, Lin R. Stimulation of the α 1A adrenergic receptor inhibits PDGF-induced PDGF β receptor Tyr751 phosphorylation and PI 3-kinase activation. *FEBS Lett*. 2003;540(1-3):106-10.
32. Lin X, Takahashi K, Liu Y, Zamora P. A synthetic, bioactive PDGF mimetic with binding to both α -PDGF y β -PDGF receptors. *Growth Factors*. 2007;25(2):87-93.
33. Dance M, Montagner A, Salles J, Yart A, Raynal P. The molecular functions of Shp2 in the Ras/Mitogen-activated protein kinase (Erk1/2) pathway. *Cell Signal*. 2008;20(3):453-9.
34. Rönstrand L, Arvidsson A, Kallin A, Rorsman C, Hellman U, Engström U, et al. SHP-2 binds to Tyr763 and Tyr1009 in the PDGF β -receptor and mediates PDGF-induced activation of the Ras/MAP kinase pathway and chemotaxis. *Oncogene*. 1999;18(25):3696-02.
35. Nakata S, Fujita N, Kitagawa Y, Okamoto R, Ogita H, Takai Y. Regulation of platelet-derived growth factor receptor activation by afadin through Shp2. *J Biol Chem*. 2007;282(52):37815-25.
36. Lennartsson J, Burovic F, Witek B, Jurek A, Heldin C. Erk5 is necessary for sustained PDGF-induced Akt phosphorylation and inhibition of apoptosis. *Cell Signal*. 2010;22(6):955-60.
37. Gupta S, Stuffrein S, Plattner R, Tencati M, Gray C, Whang Y, et al. Role of phosphoinositide 3-kinase in the aggressive tumor growth of HT1080 human fibrosarcoma cells. *Mol Cell Biol*. 2001;21(17):5846-56.
38. Katz M, Amit I, Yarden Y. Regulation of MAPKs by growth factors and receptor tyrosine kinases. *Biochim Biophys Acta*. 2007;1773(8):1161-76.
39. McCubrey J, Steelman L, Chappell W, Abrams S, Wong E, Chang F, et al. Roles of the Raf/Mek/Erk pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance. *Biochim Biophys Acta*. 2007;1773(8):1263-84.
40. Pratilas C, Solit D. Targeting the mitogen-activated protein kinase pathway: physiological feedback and drug response. *Clin Cancer Res*. 2010;16(13):3329-34.
41. Hoshino R, Tanimura S, Watanabe K, Kataoka T, Kohno M. Blockade of the extracellular signal-regulated kinase pathway induces marked G1 cell cycle arrest and apoptosis in tumor cells in which the pathway is constitutively activated. *J Biol Chem*. 2001;276(4):2686-92.
42. Matsui T, Murata H, Sowa Y, Sakabe T, Koto K, Horie N, et al. A novel Mek1/2 inhibitor induces G1/s cell cycle arrest in human fibrosarcoma cells. *Oncol Rep*. 2010; 24(2):329-33.
43. Canavese M, Santo L, Raje N. Cyclin dependent kinases in cancer: Potential for therapeutic intervention. *Cancer Biol Ther*. 2012;13(7):451-7.
44. Jung S, Park S, Kim W, Moon S. Ras/ERK1 pathway regulation of p27KIP1-mediated G1-phase cell-cycle arrest in cordycepin-induced inhibition of the proliferation of vascular smooth muscle cells. *Eur J Pharmacol*. 2012;681(1-3):15-22.
45. Piscazzi A, Costantino E, Maddalena F, Natalicchio M, Gerardi A, Antonetti R, et al. Activation of the RAS/RAF/ERK signaling pathway contributes to resistance to sunitinib in thyroid carcinoma cell lines. *J Clin Endocrinol Metab*. 2012;97(6):1-9.
46. Cargnello M, Roux P. Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2011;75(1):50-83.